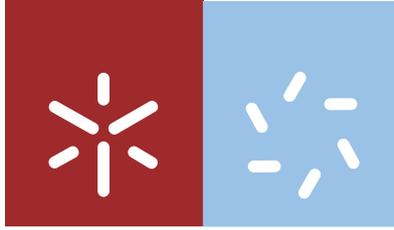


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Nuno Ramos da Fonseca

**Desenvolvimento de abordagens de
espectroscopia de fibra ótica para a
análise em alto débito de estirpes de
*Saccharomyces cerevisiae***



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Nuno Ramos da Fonseca

**Desenvolvimento de abordagens de
espectroscopia de fibra ótica para a
análise em alto débito de estirpes de
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação do Mestrado de Genética Molecular

Trabalho realizado sob a orientação da
Professora Doutora Dorit-Elisabeth Schuller
e co-orientação do
**Professor Doutor António Augusto Martins
de Oliveira Soares Vicente**

Maio 2013

DECLARAÇÃO

Nome: Nuno Ramos da Fonseca

Endereço electrónico: nunoramosfonseca@gmail.com Telefone: 964861808

Número do Bilhete de Identidade: 12328381

Título dissertação

Desenvolvimento de abordagens de espectroscopia de fibra ótica para a análise em alto débito de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

Orientador(es):

Dorit-Elisabeth Schuller

António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente

Ano de conclusão: 2013

Designação do Mestrado ou do Ramo de Conhecimento do Doutoramento:

Dissertação do Mestrado de Genética Molecular

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a gente que, de uma maneira ou de outra, teve uma participação, mesmo que indireta, na concretização da minha tese:

À minha orientadora Professora Dorit Schuller pela força, apoio, empenho e prestabilidade que demonstrou ter ao longo destes anos e a quem muito devo por poder apresentar esta tese;

Ao meu coorientador Professor António Vicente por ter aceitado orientar-me à última da hora e pela ajuda prestada na correção da minha tese;

À Professora Maria João pela disponibilidade e ajuda para os processos burocráticos ao longo do meu mestrado;

Ao Doutor Rui Martins por me ter confiado este projeto;

Aos meus colegas de grupo Ricardo Duarte, João Neves, Raquel Pereira, Inês Mendes, Eugénia Vieira e Ana Magalhães pelo apoio intelectual, amizade e pelos bons momentos passados no laboratório;

Aos meus colegas de “cela” Cristiana Castro e João Silva pela companhia e ajuda que me ofereceram para a realização da minha tese;

Aos meus colegas de laboratório Neide Vieira, Filipa Pereira, Jéssica Gomes, Ana Santos, Carina Cunha, Marlene Mota e Gabriel Rocha pela boa disposição, amizade e ajuda que me deram no decorrer da minha tese;

Ao Nuno Fachada pela ajuda disponibilizada na análise utilizando algoritmos matemáticos;

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Biologia, em especial ao Amaro Rodrigues e à Manuela Rodrigues pela boa disposição e ajuda com o material e reagentes, e à Cristina Ribeiro pela ajuda com os equipamentos;

Aos meus colegas de curso de mestrado, em especial ao Rómulo Sobral, Sara Andrade, Catarina Meireles, Ana Freitas, Ana Moreira, Jéssica Gomes e João Simões pelo apoio e amizade que me deram ao longo destes anos;

À minha família e amigos pelo apoio prestado ao longo destes anos, principalmente nos momentos menos felizes, mas em especial aos meus pais que sempre acreditaram em mim de forma incondicional e me deram a oportunidade de concluir este mestrado;

À Cris pela ajuda e apoio que me deu e também por ter sido a minha inspiração para a conclusão da tese e a continuação da minha vida.

RESUMO

Desenvolvimento de abordagens de espectroscopia de fibra ótica para a análise em alto débito de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

O objetivo deste trabalho consistiu na implementação de um teste espectrométrico miniaturizado e de alto rendimento para a análise de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* da coleção do Centro de Biologia Molecular e Ambiental da Universidade do Minho. Para atingir esse objetivo foi necessário desenvolver um suporte para microplacas de 96 poços onde se realizaram as medições, no sentido de encontrar as melhores condições de crescimento para as estirpes e a posterior aquisição dos espectros. Os espectros foram adquiridos na zona da luz ultravioleta-visível-infravermelha próximo de ondas curtas (200 – 1100 nm). As estirpes utilizadas foram inoculadas em meio YPD agarizado numa microplaca de 96 poços. Os espectros obtidos foram submetidos a pré-tratamentos e posteriormente a análise de componentes principais relevantes e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais, quando indicado.

Ensaio preliminares de otimização sugeriram a necessidade de ter em atenção determinados cuidados para minimizar os erros provenientes do material utilizado e que podiam interferir com a análise espectral das estirpes. Foi demonstrada a possibilidade de distinguir 11 estirpes da levedura *S. cerevisiae*, provenientes de diferentes localizações geográficas e origens de isolamento, bem como de 9 isolados isogénicos da estirpe comercial de vinificação Zymaflore VL1 (Lallemand), desde que se consideram condições experimentais muito padronizados como, por exemplo, a obtenção de espectros que foram obtidos na mesma microplaca. Com esta abordagem foi alcançada uma boa reprodutibilidade de réplicas de crescimentos e medições espectrométricas. No entanto, não foi obtida uma boa reprodutibilidade entre microplacas contendo as mesmas estirpes. Verificou-se também que a semelhança espectral não está relacionada com a localização geográfica e/ou a origem do isolamento das estirpes. As modificações espectrais foram também registadas durante o crescimento das estirpes nos poços das microplacas. As análises posteriores distinguiram as diferentes fases de crescimento, mas para o tempo de incubação entre 42 h e 76 h não se verificaram diferenças espectrais significativas. Em todas as experiências anteriores, a identidade de cada estirpe analisada era conhecida. Para validar este método espectroscópico foi necessário verificar a possibilidade de se conseguir distinguir isolados da estirpe *S. cerevisiae* sem conhecimento prévio da sua identidade. Os resultados das análises espectrais obtidos foram comparados com os de perfis moleculares (análise interdelta) destes isolados e não se observou uma correspondência entre o número de estirpes identificado por cada um dos métodos. Por este motivo, trata-se de uma técnica que não poderá ser utilizada para distinguir estirpes cuja identidade seja desconhecida. Sendo uma técnica no início do seu desenvolvimento, verificou-se a ocorrência de vários problemas sistemáticos nas experiências realizadas, inerentes ao material utilizado e devido à variação na composição das microplacas e do meio de cultura. Contudo, foram apresentadas soluções para a obtenção de resultados mais fiáveis e reprodutíveis no futuro.

ABSTRACT

Development of approaches for high-throughput analysis of strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fiber optic spectroscopy

The aim of this work was to develop a high-throughput spectrometric assay for the analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strains from the collection of the Centre for Molecular Biology and Environment, University of Minho. To achieve this goal it was necessary to develop a support for 96-well microplates for small-scale spectra acquisition and for the development of the best growth conditions. The spectra were acquired in the region of ultraviolet-visible-near infrared short wave light (200 - 1100 nm). The strains used were inoculated in wells of a 96-well microplate containing YPD agar. The spectra obtained were subjected to pre-treatments and subsequently to relevant principal components analysis and the discriminant analysis by partial least squares, whenever indicated.

Preliminary optimization tests suggested the need to consider several aspects (such as the material used), that could interfere with the spectral analysis of the *S. cerevisiae* strains. It was possible to distinguish between 11 *S. cerevisiae* strains from different geographical locations and sources of isolation and 9 isogenic isolates of the commercial winemaking strain Zymaflore VL1 (Lallemand), that were re-isolated from vineyards when the obtained spectra derived from a single microplate. The distinction of strains occurred with a good reproducibility of the four replicates included in each microplate. However, a lack of reproducibility occurred between spectra obtained from different microplates that contained the same strains. It was also found that the spectral similarity of strains did not correlate with the geographic localisation and the source of isolation. Spectral analyses distinguished different stages of exponential cellular growth, whereas no significant spectral differences were recorded between 42 h and 76 h of growth. In all previous experiments, the identity of each strain analysed was known. For further validation of this spectroscopic method, we evaluated the ability to distinguish among several *S. cerevisiae* isolates that were previously characterized by interdelta analysis. The comparison of results from spectral analysis with interdelta profiles revealed the number of strains identified by each method was different. We herein developed a first exploratory approach for the high throughput analysis of *S. cerevisiae* strains by fiber optics spectroscopy. Several systemic problems, inherent to the materials used, such as variation in the composition of the microplate and the culture medium still need to be solved and we present solutions for the achievement of more reliable and reproducible results in the future.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS	xi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. Espectroscopia: conceitos gerais e técnicas de espectroscopia	3
1.2. Aplicações da espectroscopia na indústria vinícola	7
1.3. A utilização da espectroscopia na identificação de microrganismos	10
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : modelo biológico	13
1.5. O impacto da diversidade genética da levedura <i>S. cerevisiae</i> na qualidade do vinho	15
1.6. Objetivos	15
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1. Aquisição de espectros	19
2.2. Análise dos dados espectroscópicos.....	21
2.2.1. Normalização dos espectros	21
2.2.2. Correção robusta da média da dispersão	22
2.2.3. Análise de componentes principais relevantes	22
2.2.4. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais	23
2.3. Coleção de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.4. Pré-cultura e condições de crescimento.....	27
2.5. Testes preliminares	29
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS	31
3.1. Testes preliminares	33
3.2. Análise de estirpes de <i>S. cerevisiae</i> por UV-Vis-SWNIR	44
3.3. Análise de isolados isogénicos da estirpe comercial Zymaflore VL1	52
3.4. Análise espectral de uma estirpe durante o tempo de crescimento.....	56
3.5. Análise de mutantes de deleção de <i>S. cerevisiae</i> (coleção EUROSCARF)	58
3.6. Análise espectral de estirpes desconhecidas de <i>S. cerevisiae</i> e correspondência com dados de tipagem molecular	60
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.....	63
CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
CBMA	Centro de Biologia Molecular e Ambiental
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
D.O.	Densidade ótica
EUA	Estados Unidos da América
EUROSCARF	European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Archive for Functional Analysis
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier (Fourier transform infrared)
GM	Meio de glicerol (Glycerol medium)
IR	Infravermelho (Infrared)
L	Litro
LDA	Análise de discriminação linear (Linear discriminant analysis)
MIR	Infravermelho médio (Mid infrared)
NIR	Infravermelho próximo (Near infrared)
PCA	Análise de componentes principais (Principal components analysis)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
PLS	Mínimos quadrados parciais (Partial least squares)
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (Partial least squares - discriminant analysis)
RMSC	Correção robusta da média da dispersão (Robust mean scattering correction)
RPCA	Análise de componentes principais relevantes (Relevant principal components analysis)
SWNIR	Infravermelho próximo de ondas curtas (Short wave near infrared)
UV	Ultravioleta (Ultraviolet)
Vis	Visível (Visible)
YPD	Glucose-peptona-extrato de levedura (Yeast extract peptone dextrose)

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Espectroscopia: conceitos gerais e técnicas de espectroscopia

A espectroscopia é uma técnica multivariada que fornece informações pormenorizadas de grande interesse sobre a estrutura molecular e mecanismos de reação para os estudos metabólicos dos sistemas biológicos. Devido ao seu carácter não destrutivo, esta metodologia é atualmente utilizada para caracterizar proteínas, lípidos, hidratos de carbono e membranas, sendo aplicada em várias indústrias, mas principalmente na indústria alimentar para o controlo da qualidade dos alimentos. Mais recentemente, têm sido utilizadas na microbiologia para análise e distinção de microrganismos e em determinadas aplicações clínicas.

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, através da determinação dos níveis de energia dos átomos e moléculas. A energia total de uma molécula é a soma das energias eletrónicas, vibracionais e rotacionais.

A interação da luz com a matéria tem captado o interesse do homem nos últimos 2000 anos. Em 130 a.C., Ptolemaeus tabelou a refração da luz para alguns materiais transparentes e, em 1305, Von Freiburg simulou a estrutura do arco-íris utilizando esferas de vidro cheias com água. Em meados do século XVIII, através do trabalho de cientistas como Snell, Huygens, Newton, Bradley e Priestly, foram formuladas as leis da reflexão e da refração da luz. No princípio do século XX, a natureza do espectro eletromagnético já era melhor compreendida. Contudo, a evolução tecnológica dessa altura não era suficiente para permitir progressos para desenvolver esta área [1]. Foi só a partir dos anos 70 que, com a aplicação de espectroscópios modernos, o acesso fácil e praticamente ilimitado a computadores de alta velocidade e os recentes desenvolvimentos dos métodos estatísticos, houve um forte impulso para continuar a investigação neste domínio [2].

Os três principais tipos de espectroscopia utilizados atualmente são a espectroscopia por absorção, transmissão e dispersão. A medição da absorção envolve a medição diferencial da radiação ao passar através da amostra. As medições de transmissão usam o mesmo princípio, mas medem a radiação refletida. A dispersão é o redireccionamento da luz resultante da sua interação com a matéria [3].

A espectroscopia ótica pode ser definida em termos do espectro eletromagnético e inclui as regiões do ultravioleta (*ultraviolet*, UV, 190 – 400 nm) até ao infravermelho (*infrared*, IR, 780 nm – 1000 μ m) (Figura 1.1) [4]. De um modo geral, a incidência da radiação sobre uma molécula pode gerar uma transição entre os estados energéticos da mesma, de acordo com o valor de energia da radiação

eletromagnética incidente sobre essa molécula. A luz UV e visível (*visible*, Vis) causam, geralmente, transições eletrônicas, enquanto a IR resulta na excitação dos modos de vibração [5].

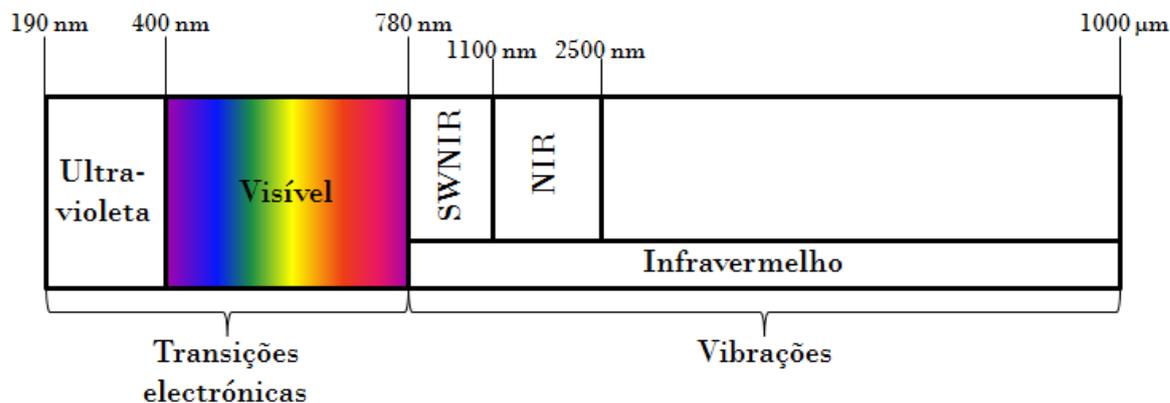


Figura 1.1 – Espectro de luz e o tipo de interação da radiação com a molécula no respetivo intervalo de comprimento de onda.

As técnicas atuais de espectroscopia englobam, geralmente, as regiões do espectro nos UV-Vis (190 – 780 nm) e IR (780 nm – 1000 μm) [3].

A espectroscopia **UV-Vis** é uma técnica que vem sendo utilizada há mais de 50 anos na identificação e determinação quantitativa de muitas espécies moleculares inorgânicas e orgânicas em diferentes tipos de materiais. Tipicamente, os espectros de reflexão na região do UV-Vis caracterizam-se por apresentar curvas do tipo gaussianas distorcidas e alargadas. A posição das bandas ao longo dos espectros é característica das substâncias refletivas. A absorção molecular nesta região depende da estrutura eletrônica da molécula e conduz à passagem dos eletrões de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia num estado excitado [6].

Muitas moléculas biológicas possuem grupos cromóforos que fazem aumentar a absorção na região de UV-Vis, tais como: azo, azo-amino, azoxi, nitro, nitroso, carbonilo e tiocarbonilo. A Tabela 1.1 apresenta alguns grupos orgânicos moleculares e a absorção máxima associada a cada transição [6]. Estes dados servem apenas como referência para identificar grupos funcionais, uma vez que esses valores máximos podem ser afetados pelo ambiente (temperatura, pH, humidade) e por detalhes estruturais da molécula em geral.

Tabela 1.1 – Valores de absorção máxima nos UV dos grupos orgânicos moleculares mais comuns.

Grupos moleculares	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Carbonilo	271
Carboxilo	204
Amida	208
Etileno	193
Acetileno	173
Nitrato	270

Com a espectroscopia do UV-Vis também se registra o efeito de retorno às orbitais inferiores, o que vai resultar em modos de vibração e de rotação, que aumentam os espectros característicos dos materiais biológicos. Este efeito vai aumentar as reações fotoquímicas e a fluorescência, características importantes para a identificação microbiológica. Isto acontece porque quando se incide luz UV-Vis num microrganismo, o espectrofotômetro registra as reações de excitação e de retorno às orbitais das moléculas que compõem o microrganismo, o que resulta num espectro característico da composição parede celular (se presente), membrana celular e dos metabolitos intracelulares que constituem o microrganismo (Figura 1.2).

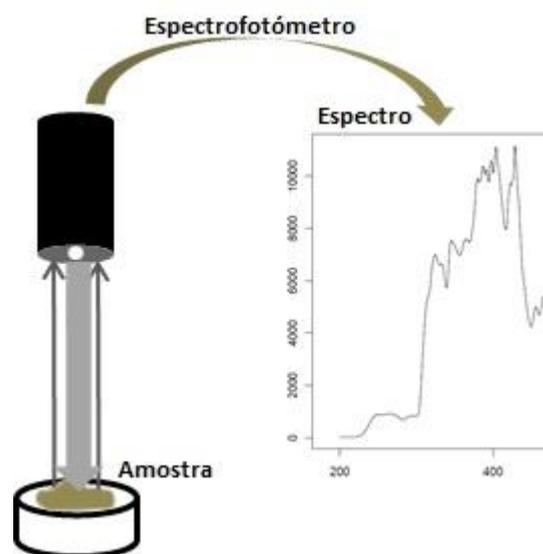


Figura 1.2 – Representação esquemática da aquisição de um espectro UV-Vis de uma amostra.

Na aquisição de espectros no UV-Vis, o recipiente da amostra deve ser construído com um material transparente à radiação eletromagnética. Para espectros

na zona do Vis, é indicado utilizar recipientes compostos por vidro ou plástico. Contudo, para medições na região do UV, não se pode utilizar estes materiais porque eles absorvem a radiação UV. Em alternativa, deve-se usar recipientes feitos de quartzo, pois este não absorve esta região do espectro [7].

A espectroscopia de **IR** é baseada nas transições entre níveis vibracionais de energia de uma molécula. Estas transições surgem devido à variação do momento dipolar da molécula como consequência do seu movimento vibracional, ou seja, as bandas observadas nos espectros de IR são devidas aos movimentos vibracionais dos átomos nas moléculas que resultam numa alteração do momento dipolar entre o estado fundamental e o estado excitado. Os tipos de excitação que podem ocorrer estão associados, por exemplo, a uma variação do comprimento de uma dada ligação química, denominadas vibrações de alongação ou estiramento, e a uma variação dos ângulos das ligações químicas, vibrações de deformação, etc. Como a maioria das moléculas orgânicas sofrem alterações dipolo quando se incide luz IR, este tipo de luz tem sido a preferida para a caracterização de amostras orgânicas, em detrimento da UV-Vis [3].

A espectroscopia no IR está relacionada com a identificação dos grupos funcionais (por exemplo: álcool, aldeído, fenol e cetona) existentes num composto ou mistura, sendo utilizada tanto na indústria quanto na pesquisa científica, pois é uma técnica rápida e fiável para o controlo de qualidade e análises realizadas ao longo do tempo [8].

Na região do IR existem duas zonas que são muito utilizadas em espectroscopia: o infravermelho próximo de ondas curtas (*short wave near infrared*, SWNIR) (780-1100 nm) e o infravermelho próximo (*near infrared*, NIR) (1100-2500 nm) [3].

A região **SWNIR** é utilizada para medir vibrações moleculares e bandas de combinação de grupos C-H (gorduras, óleos, hidratos de carbono), segundos sobretons (tons de frequência superior à da frequência fundamental) de grupos O-H (água, álcool) e N-H (proteínas) e terceiros sobretons de grupos C-H. A posição exata das bandas depende do ambiente químico, havendo um grau elevado de exclusividade de espectros para as diferentes moléculas orgânicas. As vantagens do SWNIR incluem um valor elevado da razão sinal/ruído (tipicamente 25000:1) assim como um alto rendimento utilizando cabos de fibra ótica, pois este tipo de cabos orienta um feixe de luz a partir de um ponto para outro sem que ocorram efeitos de dispersão, reflexão e refração. Portanto, a sua utilização com técnicas espectroscópicas é altamente atrativo para monitorização de bioprocessos [9].

A região do **NIR** do espectro regista, principalmente, combinações de vibrações fundamentais e sobretons mais fracos. Os espectros no NIR são, na maior parte, o

resultado de bandas de sobretons de grupos fundamentais contendo ligações C-H, O-H e N-H [1].

1.2. Aplicações da espectroscopia na indústria vinícola

Como referido anteriormente, a espectroscopia pode ter várias aplicações em diferentes áreas. Nas duas últimas décadas, com o desenvolvimento de melhores espectrofotômetros e de técnicas quimiométricas que permitem depois analisar a informação espectral obtida, tem-se observado um aumento da sua aplicação em áreas como a saúde, alimentação e microbiologia, entre outras. Nota-se em particular, um crescente interesse do uso da espectroscopia na indústria vinícola, devido ao volume de negócio que o vinho movimenta.

A nível mundial, em 2008, havia cerca de 7800 milhões de hectares de vinhas e foram produzidos mais de 24 mil milhões de litros de vinho [10]. Estes grandes volumes demonstram a importância da necessidade em utilizar métodos de análise rápidos, de baixo custo e que sejam amigos do ambiente para manter a sustentabilidade da indústria vitivinícola.

Dada a grande complexidade na composição química (por exemplo: água, compostos azotados, compostos fenólicos, minerais, taninos, vitaminas) da uva, do mosto e do vinho, existem muitas vantagens em desenvolver métodos instrumentais para descrever, quantificar e monitorizar a sua composição. Contudo, para ser possível utilizá-los na indústria vinícola, esses instrumentos devem ser de custo reduzido e fornecer rapidamente resultados reprodutíveis em operações contínuas [11].

Quando comparados com os métodos tradicionais de laboratório (como a utilização de testes enzimáticos para a deteção dos níveis de ácido málico e cítrico no vinho), as técnicas espectroscópicas muitas vezes oferecem uma medição de um grande número de compostos químicos, permitindo caracterizar cada amostra [12, 13]. Estas características da espectroscopia têm sido o ímpeto para o desenvolvimento destes métodos.

Contudo, a extração da informação qualitativa e quantitativa dos espectros não é direta, sendo necessárias análises estatísticas, como a análise de componentes principais (*principal components analysis*, PCA) e a análise por mínimos quadrados parciais (*partial least squares*, PLS), para lidar com a enorme quantidade de dados obtidos e extrair a informação relevante.

Os métodos analíticos existentes para a medição da composição da uva (como, por exemplo, a medição do teor de sólidos solúveis, pH e acidez titulável) não são ideais para as exigências de produção na indústria do vinho, onde os dois fatores de rapidez e baixo custo de análise são de grande importância. A maioria das adegas possui laboratórios para realizarem análises simples. Contudo, as análises mais complexas, tais como a medição da cor da uva, a análise de terpenos, a concentração de azoto e a análise de compostos fenólicos, não são consideradas como opções viáveis pela indústria devido ao seu custo e ao tempo de resposta lento.

Num estudo recente, demonstrou-se o potencial da espectroscopia UV-Vis-SWNIR numa tecnologia denominada VinePAT para a gestão de vinhas [14]. O sistema VinePAT baseia-se num espectrofotómetro de fibra ótica miniaturizado (modelo HR 4000, 200 to 1100 nm; 3648 pixéis), adaptado para a realização de medições em uvas e adequado para proceder à recolha de dados no exterior. Estas medições são georreferenciadas e quando analisadas utilizando modelos de calibração com uvas com estado de maturação já conhecido, permite ao viticultor observar o estado de maturação das uvas na vinha através da utilização de uma metodologia *in vivo* não destrutiva e obter uma imagem global da vinha. O sistema permite, assim, que o administrador da vinha controle o processo de maturação da uva e proceda à recolha de informação sobre a variância da maturação da uva. Além disso, permite igualmente que os vinicultores vão registando as informações sobre diferentes anos de vindima numa base de dados, que podem depois ser utilizadas como forma de ajustar e planear medidas de correção a ser aplicadas na vinha [14].

A informação sobre a composição do mosto e do vinho pode ser usada em sistemas de apoio à gestão, a fim de melhorar, monitorizar e adaptar os sistemas de produção do vinho.

A espectroscopia no IR tem sido utilizada para medir diversas propriedades da composição do vinho, como, por exemplo, o pH, a quantidade de álcool, a acidez, os ácidos orgânicos, málico, tartárico e láctico e o dióxido de enxofre em vinhos tinto, branco e rosé [11, 15]. Numa experiência utilizando espectroscopia Vis-NIR, 15 parâmetros enológicos (teor de álcool, pH, massa volúmica, glicerol, ácido láctico, entre outros) que costumam ser monitorizados nas adegas foram analisados para estudar a fiabilidade desta técnica na monitorização destes parâmetros [15]. Como referência, cada um dos parâmetros foi medido separadamente por uma técnica alternativa. Dos 15 parâmetros analisados, em 9 (teor de álcool, massa volúmica, acidez total, pH, glicerol, polifenóis totais, ácido láctico, cor e tonalidade) foram obtidos valores de coeficiente de correlação acima de 0,78 e nos outros 6 (acidez volátil, açúcares redutores, ácido málico, ácido tartárico, ácido glucónico e dióxido de enxofre

total) valores abaixo de 0,70. Neste estudo, concluiu-se que os valores de coeficiente de correlação cima dos 0,78 são suficientes para o rastreio desses parâmetros [15].

Os compostos fenólicos são componentes importantes para o vinho, contribuindo para a cor e aroma. Embora os compostos fenólicos encontrados no vinho possam ser produzidos por microrganismos, a maior parte dos constituintes fenólicos encontrados no vinho são derivados da uva. No vinho branco, os compostos fenólicos mais importantes são os ácidos hidroxicinâmicos. Estes compostos são importantes no que se refere à qualidade visual do vinho branco. No vinho tinto, os taninos e as antocianinas são as classes fenólicas mais importantes. Os taninos contribuem para o aroma do vinho, mas também formam polímeros pigmentados em associação com as antocianinas para fornecer os pigmentos estáveis necessários para dar ao vinho tinto uma cor estável a longo prazo [16].

Recentemente, a investigação nesta área tem sido conduzida a fim de se avaliar o potencial da espectroscopia para prever a concentração e monitorizar a evolução e extração de compostos fenólicos durante a fermentação do vinho tinto, em tempo real. Os resultados mostraram que a espectroscopia no Vis-NIR pode prever a concentração de antocianinas, polímeros pigmentados e taninos, em vinhos Cabernet Sauvignon e Shiraz, durante a fermentação [11].

A determinação da densidade e dos açúcares durante a fermentação do vinho branco avaliou-se utilizando um aparelho em miniatura de espectroscopia NIR por fibra ótica. A redução de açúcares (glicose e frutose) foi medida com uma precisão elevada utilizando a análise por PLS e a regressão linear múltipla, tendo-se obtido valores de correlação de 0,92 [17].

A espectroscopia por NIR e infravermelho médio (*mid infrared*, MIR) foi também utilizada para monitorizar micro-fermentações [18]. As amostras foram também analisadas por meio de métodos químicos para quantificar os açúcares (glicose e frutose), álcoois (etanol e glicerol) e compostos fenólicos (fenóis totais, antocianinas totais e flavonoides totais). Os dados espectrais pré-tratados foram processados utilizando a análise por PCA, PLS de regressão e a análise de discriminação linear (*linear discriminant analysis*, LDA) para classificar e prever o teor de açúcar, etanol, glicerol e os compostos fenólicos, simultaneamente, durante a fermentação. Os resultados do LDA, caracterizados por uma percentagem elevada de classificação correta (87% e 100% como valor médio em predição para NIR e MIR, respetivamente), mostraram que se pode classificar corretamente a qual etapa da fermentação as amostras pertencem. Bons modelos de calibração para a previsão das principais mudanças de composição durante a fermentação alcoólica foram obtidos com ambas espectroscopias NIR e MIR, sugerindo que qualquer um destes instrumentos poderia

ser utilizado para fazer monitorização simultânea *online* destes compostos no vinho tinto [18].

A espectroscopia Vis-NIR foi utilizada para discriminar os vinhos Riesling e Chardonnay, com uma precisão de até 95% [19]. Ambas as espectroscopia Vis e NIR, combinadas com a análise multivariada, foram utilizadas para classificar a origem geográfica dos vinhos comerciais Tempranillo da Austrália e Espanha. A PCA, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*partial least squares - discriminant analysis*, PLS-DA) e a LDA foram utilizadas para classificar os vinhos Tempranillo de acordo com a sua origem geográfica. A PLS-DA classificou corretamente 100% e 84,7% das amostras do vinho Tempranillo australiano e espanhol, respetivamente. Além disso, os modelos de calibração LDA classificaram corretamente 72% dos vinhos australianos e 85% dos vinhos espanhóis. Estes resultados demonstram a utilização potencial da espectroscopia Vis e NIR combinada com a quimiometria como um método rápido para a classificação de vinhos Tempranillo de acordo com a sua origem geográfica [20].

1.3. A utilização da espectroscopia na identificação de microrganismos

Atualmente, para a identificação de microrganismos utilizam-se, maioritariamente, técnicas de biologia molecular como ferramentas para o diagnóstico de agentes etiológicos e estudo epidemiológico de doenças infecciosas, assim como na identificação e discriminação entre espécies com características fenotípicas semelhantes e até mesmo de difícil cultivo e isolamento.

Os métodos mais rápidos, entre as técnicas de biologia molecular que têm sido utilizados para diferenciar e identificar microrganismos, são baseados na reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR). As técnicas baseadas em PCR consistem na amplificação de determinados segmentos de DNA, a partir de *primers* especificamente escolhidos para essas regiões em estudo, sendo esta uma ferramenta base para inúmeras metodologias de análise do DNA. Os métodos baseados em PCR tornam-se vantajosos devido à facilidade de execução e por só necessitarem de uma pequena quantidade de DNA. Outras técnicas incluem a análise de restrição do DNA genómico ou mitocondrial, a amplificação aleatória de DNA polimórfico e análise por microsatélites. Como as metodologias moleculares utilizam o material genómico para identificar e caracterizar a célula microbiana, consegue-se obter resultados satisfatórios nos estudos de identificação de microrganismos considerados semelhantes fenotipicamente [21-24].

Apesar das técnicas de biologia molecular serem precisas e bastante fiáveis, elas requerem a extração do DNA de culturas puras o que provoca a destruição das amostras, que pode limitar e comprometer a realização de análises futuras. Estas técnicas requerem também uma mão-de-obra especializada e o consumo de reagentes caros.

As técnicas espectroscópicas têm vindo a ser desenvolvidas para a identificação de microrganismos. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier transform infrared*, FTIR) e a espectroscopia de Raman são duas técnicas que estão bem estabelecidas nos laboratórios para uma rápida identificação microbiana [25-28]. Estas técnicas são fáceis de utilizar, requerem pouca quantidade de amostra, os espectros são obtidos rapidamente, analisados em poucos minutos e fornecem informações sobre as moléculas que compõem a amostra.

A espectroscopia por **FTIR** foi uma das primeiras técnicas de espectroscopia a conseguir diferenciar e identificar microrganismos. Esta técnica consiste em submeter um feixe de IR, que é emitido a partir de uma fonte de luz, que atravessa uma câmara para controlar a quantidade de luz irradiada na amostra. O feixe de IR entra no interferómetro onde ocorre uma codificação espectral do qual resulta um interferograma. Além disso, o feixe de IR entra no compartimento da amostra sendo transmitido ou refletido da amostra em função do tipo de análise que se realiza. Depois, o feixe passa para o detetor para a medição final e o sinal medido é digitalizado e enviado de volta para o computador em que a transformação de Fourier é realizada. O espectro final de infravermelho é então apresentado ao usuário [29]. Através da interpretação do espectro de absorção de IR, podem ser determinadas as ligações químicas de uma molécula. A soma dos espectros vibracionais do conteúdo de uma célula (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, polissacarídeos, etc.) pode produzir um espectro de absorção de infravermelho, que é como uma “impressão digital” molecular do material biológico.

Através desta técnica, foi possível distinguir entre cinco estirpes de *Escherichia coli* até ao nível do serotipo utilizando os espectros FTIR de extratos bacterianos em fenol [30] e identificar o género de 95% das bactérias de ácido láctico e bactérias de ácido propiónico analisadas [31].

A espectroscopia de **Raman** também tem tido uma grande utilidade na identificação de microrganismos [32]. Nesta técnica, um feixe de laser na região do Vis ou IR ou UV é incidido sobre a amostra e o feixe que é disperso é detetado para se obter informações sobre os modos de vibração das moléculas da amostra. Já foram desenvolvidos vários trabalhos, em que os autores identificaram espécies diferentes de bactérias através da análise de células individuais por micro-espectroscopia de Raman [33], e em que foi desenvolvido um método para a identificação de espécies de

Candida por micro-espectroscopia de Raman [34]. Esta técnica utiliza um micro-espectrômetro que consiste num espectrômetro de Raman integrado com um microscópio ótico, permitindo adquirir espectros de amostras microscópicas ou de zonas microscópicas de amostras maiores. Em outro estudo, foram identificadas bactérias em meio sólido, permitindo uma análise mais rápida, diminuindo o tempo de incubação para algumas horas e a quantidade de reagentes utilizados [35]. Este método consistia em obter espectros diretamente de uma micro-colônia em meio sólido, corrigindo, posteriormente, a contribuição do meio para o espectro. Ainda neste estudo, verificou-se também que, num *cluster* de espectros de uma estirpe, os espectros medidos no mesmo dia tendiam a agruparem-se, o que sugeria uma variação espectral em dias diferentes. Na análise dos espectros de duas estirpes medidos em 3 dias diferentes, não foi possível separá-los utilizando um método de classificação não supervisionado, mas obteve-se uma boa separação após uma análise feita por PCA seguida de uma LDA [35].

A espectroscopia **Vis-NIR** tem grande potencial como técnica rápida de análise para discriminar diferentes estirpes de microrganismos através dos seus perfis metabólicos extracelulares. Estirpes de *S. cerevisiae* com deleções em genes de diferentes vias metabólicas, provenientes da coleção EUROSCARF, foram analisadas por espectroscopia Vis-NIR [36]. Os espectros foram obtidos a partir dos sobrenadantes das culturas de cada estirpe, após centrifugação para remoção das células. Os resultados mostraram uma separação da estirpe S288c das restantes estirpes mutantes, sugerindo que as deleções introduzidas afetaram a síntese de metabolitos que foram detetados de forma indireta por Vis-NIR, nos espectros dos respetivos sobrenadantes. Ainda neste trabalho, os autores analisaram as réplicas obtidas ao longo de três meses. A estirpe S288c foi sempre classificada corretamente, mas as réplicas das estirpes mutantes apresentaram variação nos espectros dos sobrenadantes sendo classificadas com cerca de 70% de precisão. Os autores sugerem que esta variação se terá devido a variações biológicas das próprias estirpes, não podendo ser nunca esperada uma fiabilidade de 100% na classificação e que, por isso, seria necessário estabelecer um limiar de aceitação/rejeição com base nos espectros. Por estas razões, foi sugerido que a espectroscopia no NIR fosse utilizada como uma técnica exploratória que permite fazer um agrupamento inicial das leveduras com base nos seus metabolitos externos, seguida de uma análise mais detalhada utilizando métodos como a espectrometria de massa ou a cromatografia líquida de alta eficiência [36].

Outra técnica espectroscópica recentemente utilizada na distinção de espécies de microrganismos é a espectroscopia **UV-Vis-SWNIR**. Esta técnica, que complementa a análise das transições eletrónicas ocorridas no UV-Vis com as

vibrações moleculares do SWNIR, foi utilizada para distinguir espécies de bactérias (*Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Candida albicans* e *Yarrowia lipolytica*) em cultura com meio sólido em placa [37]. Os espectros foram obtidos na zona dos 200 aos 1100 nm com um espectrofotómetro de fibra ótica, tendo sido posteriormente normalizados para minimizar os efeitos do meio no espectro e corrigidos os efeitos de dispersão utilizando um método de correção robusta da média da dispersão. Neste estudo foi possível distinguir todas as espécies analisadas com exceção da *P. fluorescens*. Os espectros obtidos para esta espécie não eram reproduzíveis, sendo bastante diferentes entre as diferentes leituras realizadas. Isto poder-se-ia dever ao facto de tanto as colónias como o meio de crescimento serem bastante translúcidos, ocorrendo a difusão da radiação [37]. Com esta técnica, foi possível distinguir algumas espécies de microrganismos, apresentando uma boa reprodutibilidade espectral. O método utilizado para a remoção de efeitos de dispersão da luz no meio e nas células foi eficaz. Alguns melhoramentos ainda são necessários para otimizar esta técnica, mas como uma técnica exploratória parece ser promissora.

1.4. *Saccharomyces cerevisiae*: modelo biológico

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela formação dos principais produtos de fermentação: cerveja, vinho, fermento de pão e proteína microbiana. Devido à importância económica dos processos biotecnológicos que envolvem esta levedura, quer na panificação, na produção de cerveja, de vinho e outras bebidas alcoólicas ou ainda na produção de um combustível alternativo e renovável, pode ser considerado o eucariota mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido [38].

S. cerevisiae foi o primeiro organismo eucariótico com o genoma sequenciado [39]. *S. cerevisiae* possui cerca de 12 milhões de bases de ADN nuclear, distribuídos por 16 cromossomas, contendo cerca de 6000 genes. O conhecimento detalhado do genoma combinado com as técnicas de genética e biologia molecular colocaram a *S. cerevisiae* no centro dos programas de pesquisa, desde o estudo de genes relacionados com doenças humanas, até estudos de vanguarda de biologia de sistemas [40]. Atualmente, *S. cerevisiae* é utilizada na produção de compostos farmacêuticos como a insulina e de vacinas como a da hepatite e a do vírus do papiloma. Também é utilizada na produção de bioetanol, ácidos lácticos, piruvato, glicerol e isopropanóis [41].

A levedura *S. cerevisiae* é o organismo que foi domesticado há mais tempo, estando associada ao processo de vinificação há mais de 5000 anos, tendo sido descobertos vestígios de DNA ribossomal em jarras de barro usadas no Egito datadas de 3150 a.C. [42]. Em 1960, Antonie van Leeuwenhoek observou pela primeira vez leveduras ao microscópio [38] e, em 1863, Pasteur provou que eram as leveduras que eram as responsáveis pela transformação do açúcar presente no mosto em etanol e dióxido de carbono [43].

Tradicionalmente, o vinho é produzido através da fermentação do mosto de uva, recorrendo à microflora localizada na superfície da uva. Esta microflora indígena inclui espécies diferentes de leveduras, sendo *Hanseniopsis uvarum* (= *Kloeckera apiculata*) a espécie predominante, constituindo cerca de 50-70% da população total de leveduras. As espécies do género *Metschnikowia*, *Candida*, *Pichia* e *Kluyveromyces*, assim como *S. cerevisiae* estão presentes em menor quantidade. O sumo da uva exerce uma pressão seletiva na população microbiana devido ao baixo valor de pH (3 a 3,5) e à alta concentração de açúcar (geralmente entre 200 a 280 g/L). No decorrer da fermentação são estabelecidas condições de anaerobiose que acabam por selecionar só os microrganismos capazes de sobreviver nestas condições. Leveduras do género *Kloeckera* são geralmente responsáveis pelo começo da fermentação, mas em fases posteriores quando o etanol chega a uma concentração de 3 a 4% (v/v), a levedura *S. cerevisiae*, conhecida como a espécie mais tolerante ao etanol, predomina entre a flora fermentativa [44].

Atualmente, a maior parte dos produtores de vinho utiliza leveduras *starter* comerciais para garantir a reprodutibilidade e a previsibilidade da qualidade do vinho [45]. As vantagens das fermentações que contêm culturas *starter* estão relacionadas com o facto de que são rápidas e produzem vinho com mais consistência e previsibilidade. Nestas fermentações, o produtor de vinho tem controlo sobre a microbiologia do processo, porque a estirpe de levedura inoculada predomina geralmente sobre a flora indígena [45]. A escolha da melhor levedura *starter* depende das suas características enológicas, sendo as mais importantes a produção elevada de etanol, tolerância ao etanol, consumo completo dos açúcares, crescimento a baixas temperaturas, crescimento em altas concentrações de açúcar, produção de glicerol e baixa produção de dióxido de enxofre, de espuma, de sulfito de hidrogénio, de ácidos voláteis e de acetaldeído [46, 47].

Além de produzir etanol, *S. cerevisiae* produz também muitos metabolitos secundários que são determinantes na qualidade do vinho, tendo um contributo importante para o aroma.

1.5. O impacto da diversidade genética da levedura *S. cerevisiae* na qualidade do vinho

As coleções de estirpes de *S. cerevisiae* de fermentações naturais têm demonstrado a existência de uma elevada diversidade biológica a nível de estirpe [38]. Cada fermentação espontânea parece ter a sua própria população de diferentes estirpes de *S. cerevisiae*, que contribui para a composição química e qualidade sensorial do vinho [48].

Numa análise aos compostos formados por estirpes diferentes de *S. cerevisiae* isoladas de uvas de vinhas onde se produz o vinho Aglianico del Vulture [49], verificou-se que as estirpes apresentaram uma baixa variabilidade nos níveis de produção de *n*-propanol (20-46 mg/L) e acetato de etilo (18-57 mg/L) e uma variabilidade significativa em compostos como o isobutanol (12-219 mg/L), álcool isoamílico (180-432 mg/L) e acetaldeído (11-158 mg/L), consoante a estirpe que realizou a fermentação do mosto. A principal variável para a diferenciação de estirpes de *S. cerevisiae* de Aglianico foi a produção de ácido acético (130-1610 mg/L). Este estudo demonstrou que a biodiversidade das estirpes determina diferenças significativas nas qualidades organoléticas do vinho, sendo o nível de produção de cada composto dependente da estirpe que realiza o processo fermentativo [49].

As estirpes de *S. cerevisiae* encontram-se amplamente distribuídas numa dada região vitícola e em anos consecutivos [50, 51]. Isolados de *S. cerevisiae* são também encontrados em locais não relacionados com as vinhas, como no solo associado a carvalhos, em exsudatos de carvalho, em pacientes localizados nos EUA e na Europa e em insetos [52].

A procura de novas e melhores estirpes *starter* de *S. cerevisiae* por parte dos produtores de leveduras *starter* e a ocorrência da grande diversidade destas estirpes, impulsionam os avanços nesta área para uma análise mais rápida com a capacidade de identificar, distinguir e caracterizar as leveduras analisadas.

1.6. Objetivos

O Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA) da Universidade do Minho possui uma das maiores coleções de estirpes (cerca de 600) de *S. cerevisiae*. A caracterização genética e fenotípica dessas estirpes já foi realizada em trabalhos anteriores [22, 23, 51, 53-55], faltando realizar uma caracterização espectroscópica a esta coleção.

O principal objetivo deste trabalho é realizar um ensaio espectrométrico miniaturizado e de alto rendimento para a análise das estirpes de *S. cerevisiae*. Com esta análise pretende-se que no futuro seja possível avaliar o rendimento destas estirpes sob condições fermentativas, utilizando uma assinatura espectrométrica das células para identificação de estirpes e medir as mudanças metabólicas que as leveduras passam ao longo da fermentação.

Para atingir o objetivo proposto será necessário:

- Desenvolver um suporte para microplacas de 96 poços, onde se possam realizar medições espectroscópicas em UV-Vis-SWNIR (200 – 1100 nm) por fibra ótica;
- Encontrar as melhores condições para o crescimento das estirpes e a posterior aquisição de espectros;
- Caracterizar diferentes estirpes de *S. cerevisiae* da coleção do CBMA por espectroscopia;
- Avaliar a utilidade desta técnica na distinção de mutantes de deleção da coleção European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis (EUROSCARF).

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Aquisição de espectros

A espectroscopia por UV-Vis-SWNIR foi realizada utilizando um espectrofotômetro de UV-Vis-SWNIR da marca Ocean Optics (modelo HR4000, 200 a 1100 nm; 3648 pixel), uma sonda de reflexão de UV-Vis (Ocean Optics, modelo FCR-7UV200-2ME), uma fonte de luz de deutério e halogênio (Ocean Optics, DH-2000) para a transmissão de luz UV e Vis-SWNIR, respectivamente, e o programa Spectrasuite [56] que foi utilizado para se proceder à recolha de dados. As lâmpadas de deutério e halogênio ficaram a estabilizar durante 15 minutos antes de se proceder à realização das medições.

Construiu-se uma caixa para efetuar medições espectroscópicas a uma microplaca de 96 poços (Thermo Scientific), protegendo-a da luz ambiente. A utilização da microplaca para as medições permitiu realizar medições a um maior número de estirpes por experiência. Conforme ilustrado na Figura 2.1, a caixa era constituída por: uma zona superior com aberturas com uma dimensão adaptada à sonda utilizada, de modo a que esta tivesse um encaixe perfeito e se mantivesse na posição vertical, ficando alinhada para uma medição correta; uma gaveta com o fundo espelhado onde se coloca a microplaca, de modo que a luz que atravessasse a cultura de *S. cerevisiae* e o meio fosse refletida de volta para a sonda; e uma tampa deslizante para proteger a microplaca da luz ambiente e fixar bem a gaveta.

Os espectros foram adquiridos à temperatura ambiente, entre os 200 e os 1100 nm com uma resolução de 0,20 nm. Para cada poço da microplaca foram adquiridas 5 leituras, cuja média foi calculada de modo a melhorar a razão sinal/ruído. Antes da leitura de cada poço, foi realizada uma leitura do ruído de fundo cujo espectro foi automaticamente subtraído ao espectro de cada poço. O tempo de aquisição dos espectros para cada poço foi de aproximadamente de 10s e os espectros são apresentados em valores de refletância.

O equipamento utilizado para a leitura dos espectros é ilustrado na Figura 2.2.

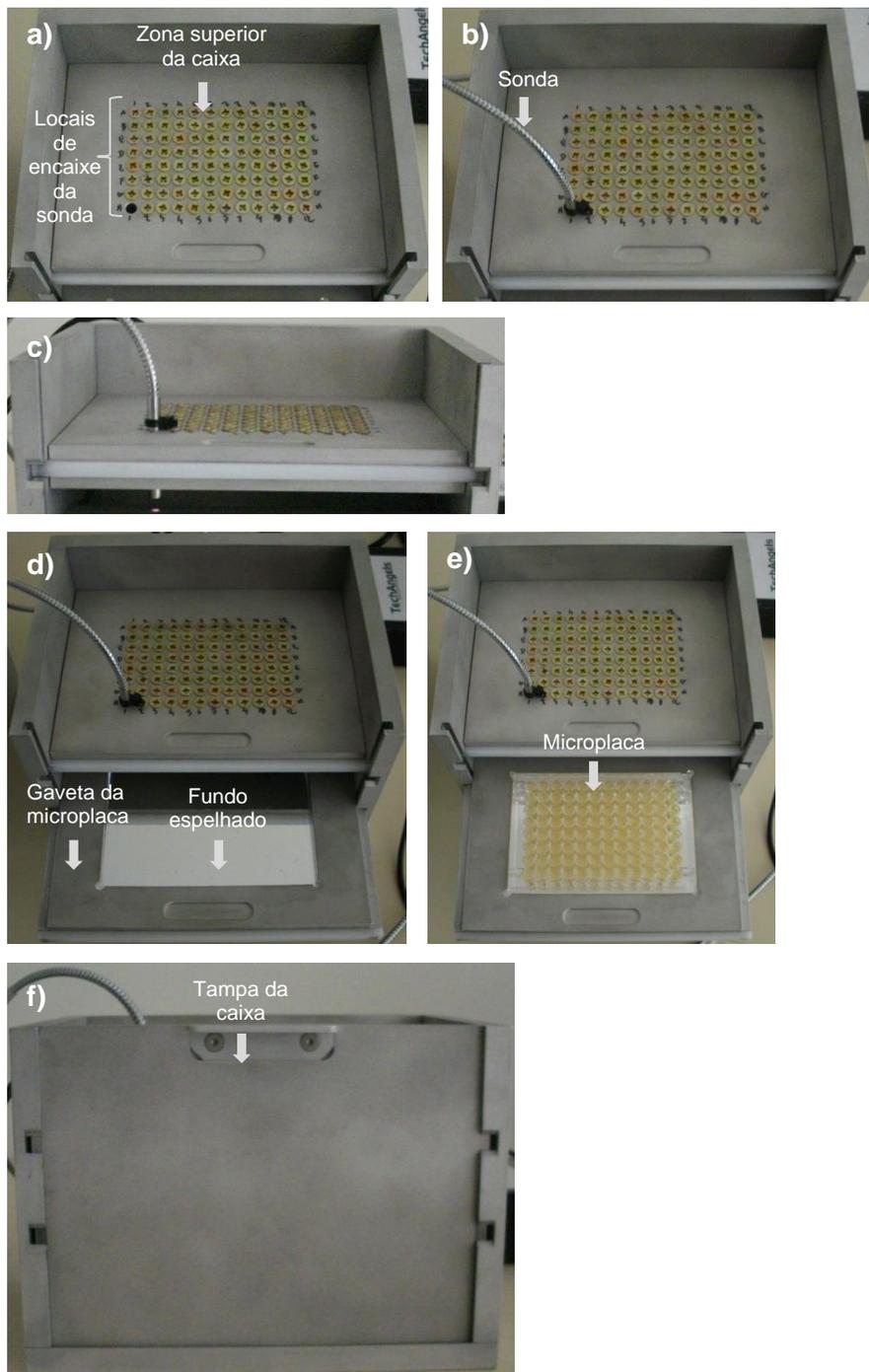


Figura 2.1 – Fotografias de diferentes perspetivas da caixa: zona superior (a-c), gaveta da de suporte da microplaca (d, e) e tampa da caixa (f).

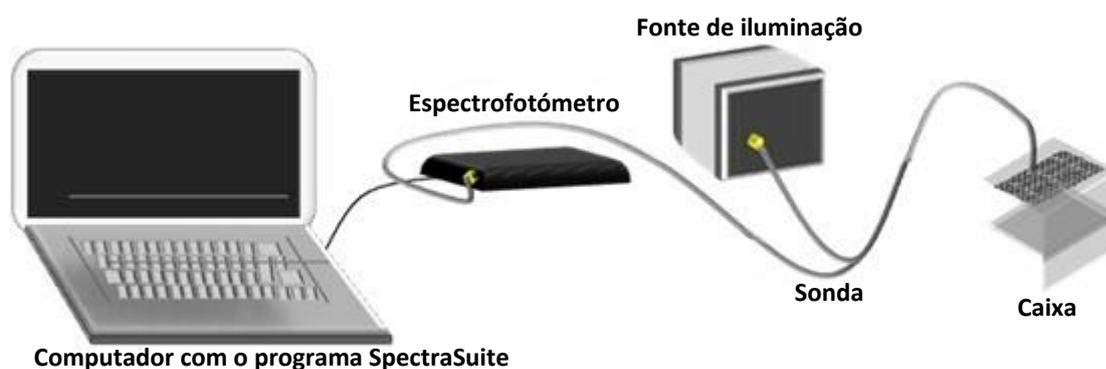


Figura 2.2 – Esquema de montagem do equipamento para a aquisição de espectros.

2.2. Análise dos dados espectroscópicos

Na análise dos espectros obtidos foram utilizadas duas abordagens quimiométricas. A primeira baseou-se num método não supervisionado através do qual são analisados os dados, independentemente da identidade da amostra. Neste método, a análise de componentes principais relevantes (*relevant principal components analysis*, RPCA), é considerada um método qualitativo uma vez que o seu objetivo principal é o de distinguir objetos ou populações. A segunda abordagem foi baseada num método supervisionado, a PLS-DA, em que é necessário o conhecimento da identidade da amostra. Neste método, partiu-se de um grupo de amostras conhecidas que foi depois utilizado para a determinação da identidade de uma amostra desconhecida.

Antes de se processar os dados espectroscópicos, foi necessário reduzir o ruído nos espectros e extrair mais informações dele, fazendo alterações ou cálculos matemáticos dos espectros originais, conforme descrito nos pontos a seguir e esquematizado na Figura 2.3.

Entre os pré-processamentos mais convencionais encontram-se a normalização dos espectros e a correção robusta da média da dispersão (*robust mean scattering correction*, RMSC).

Todas as análises foram realizadas em computador utilizando o programa R [57].

2.2.1. Normalização dos espectros

Devido às diferenças de espessura do meio e da cultura de *S. cerevisiae* entre os diferentes poços da microplaca, não foi possível utilizar os mesmos tempos de

integração para as diferentes estirpes e condições durante o decorrer das experiências. Por este motivo foram realizadas correções de normalização vetorial (x_{norm}) em todo o intervalo espectral: $x_{norm(i)} = x_{raw(i)}/max(x_{(i)})$, sendo $x_{raw(i)}$ o espectro original e $x_{norm(i)}$ o espectro i normalizado pelo seu valor máximo. Os espectros foram normalizados pela banda mais intensa numa dada região espectral.

2.2.2. Correção robusta da média da dispersão

Os espectros foram depois pré-processados utilizando a RMSC. A RMSC é um pré-tratamento que reduz as variações no espectro causadas pela dispersão da luz que são provocadas pela heterogeneidade das amostras. Esta heterogeneidade pode ser provocada tanto pelas diferenças na geometria ou orientação das partículas de compostos sólidos, como pela presença de material em suspensão em amostras líquidas.

Cada espectro foi corrigido utilizando as equações $x_{corr} = xb+a = x_{ref}$, sendo \mathbf{a} e \mathbf{b} computados minimizando o seguinte erro, e $e_j = bx_j+a-x_{ref}$, onde \mathbf{x}_j é a amostra de espectro j e \mathbf{x}_{ref} é o espectro de referência.

Este algoritmo de RMSC é baseado na aplicação do método robusto dos quadrados mínimos para determinar as matrizes \mathbf{a} e \mathbf{b} assegurando que as áreas espectrais que não correspondem a artefactos de dispersão não são tidos em conta. O algoritmo iterativo coloca o espectro de referência (\mathbf{x}_{ref}) igual ao espectro da amostra mais próximo da média do espectro, corrige os espectros das amostras que sobram aplicando o procedimento robusto dos quadrados mínimos descrito acima, calcula a média do espectro e itera até convergir.

2.2.3. Análise de componentes principais relevantes

Após o pré-processamento dos dados espectrais, uma das abordagens utilizadas para a análise destes dados foi a RPCA [58]. Esta análise é uma variação da PCA com o objetivo de descobrir que variáveis são estatisticamente relevantes em cada componente principal. Quando não é possível descobrir componentes principais relevantes, este método utiliza todas as variáveis para computar as componentes principais.

A RPCA utiliza a decomposição em valores singulares para calcular as componentes principais (*principal components*, PCs) $X = USV^T$, sendo \mathbf{X} a matriz do espectro, \mathbf{US} são os *scores* e \mathbf{V}^T os *loadings*.

Para distinguir entre o número de decomposições relevantes, determinou-se o número de valores singulares relevantes, realizando 5000 randomizações da matriz do espectro original.

2.2.4. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais

A PLS-DA [59, 60] foi a outra abordagem utilizada para a análise dos dados espectrais após o pré-processamento. Esta análise é um método multivariado de regressão que relaciona um conjunto de dados multivariados, \mathbf{X} , com um valor de referência, \mathbf{Y} : $Y = X b + e$, onde \mathbf{b} representa o coeficiente de regressão e \mathbf{e} é a variação não capturada no modelo.

Nesta análise foram consideradas duas matrizes: uma matriz X , que representava a variável independente que continha os dados espectrais pré-processados a analisar, e uma matriz Y que representava a variável dependente que tinha a informação sobre que estirpe correspondia a cada espectro. A matriz Y tinha um número de linhas igual ao número de linhas da matriz X , uma vez que as linhas correspondiam aos espectros a estudar, e um número de colunas igual ao número de estirpes analisadas. Na matriz Y só existiam números 1 e 0, sendo que foi assinalado com 1 a coluna da estirpe a que correspondia o espectro e com 0 as restantes colunas. Através da PLS-DA, foi assim possível procurar as maiores similaridades entre estirpes iguais e as maiores diferenças entre estirpes diferentes e também realizar a predição da identificação de isolados através da geração de valores entre 0 e 1 o que permitiu avaliar se foi possível classificar os isolados corretamente.

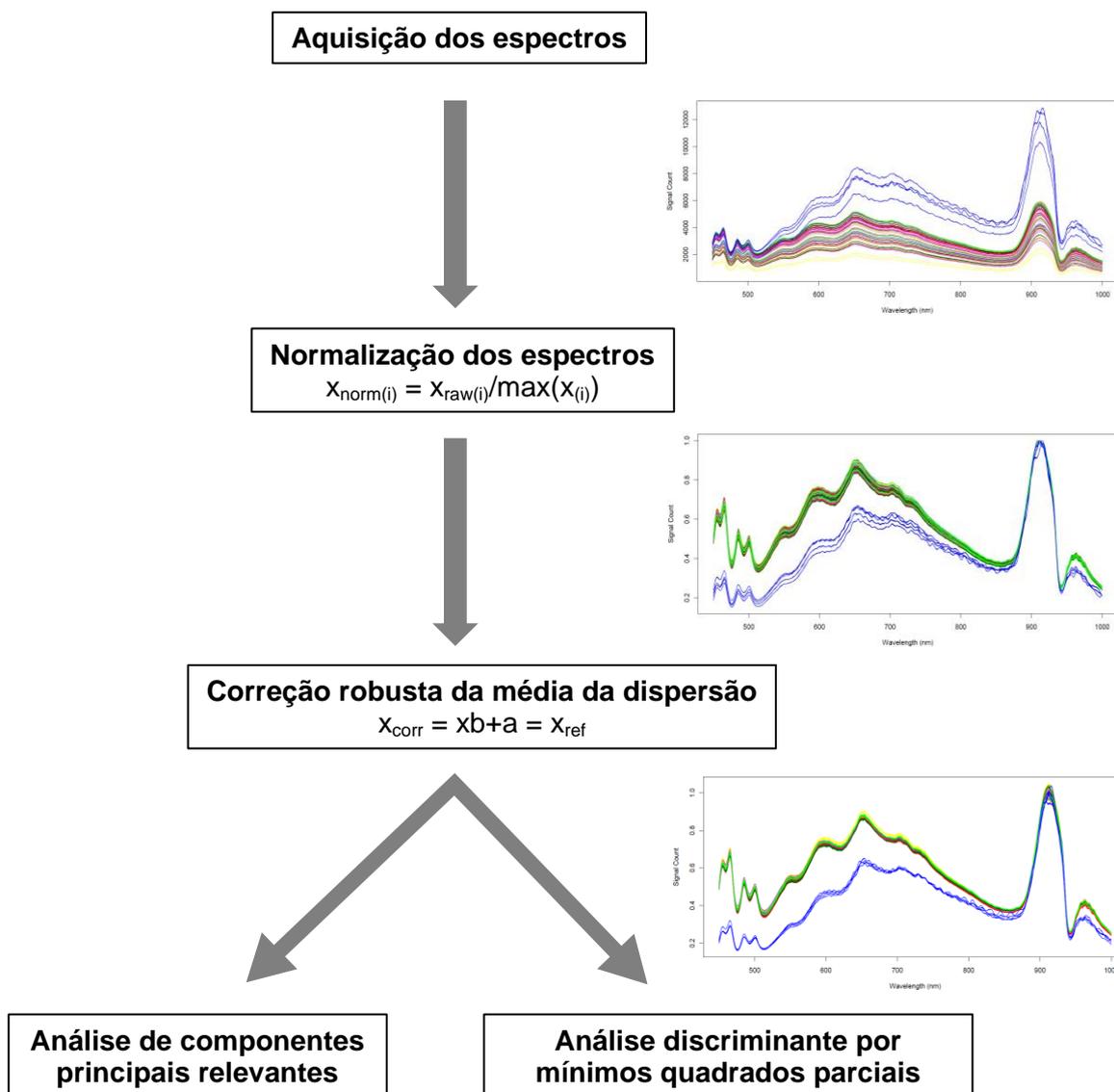


Figura 2.3 – Esquema de cada passo de pré-tratamento dos espectros.

2.3. Coleção de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

As estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo são provenientes da coleção do Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA) do Departamento de Biologia da Universidade do Minho. Esta coleção contém mais de 600 estirpes de *S. cerevisiae* constituída por isolados de origens geográficas e aplicações tecnológicas diferentes.

Na Tabela 2.1 apresentam-se as 30 estirpes utilizadas e a sua proveniência.

Tabela 2.1 – Listagem das estirpes de *S. cerevisiae* incluídas no estudo, o ambiente de onde foram isoladas e a sua localização geográfica.

Objetivo	Estirpes	Origem do isolamento	Localização geográfica
Análise espectroscópica para avaliar diferenças entre os poços de uma microplaca	GMY31	Vinha	Portugal
	L558	Hospital	Portugal
Análise espectroscópica de estirpes de <i>S. cerevisiae</i> mais variáveis	L709	Fermentação (vinho de palma)	África
	L718	Fermentação (Saqué)	Japão
	L724	Vinho e frutos fermentados	Turquia
	L734	Hospital	Itália
	L739	Solo	Finlândia
	L748	Panificação	Singapura
	L752	Abelha	Malásia
	L756	Milho	Etiópia
	S288c	Laboratório	
	Análise espectroscópica de estirpes isogénicas de <i>S. cerevisiae</i>	Zymaflore VL1	Estirpe comercial
VL002			
VL006			
VL011		Estirpe isogénicas com a estirpe Zymaflore VL1, re-isolados de vinhas localizadas perto de uma adega em que foi utilizada, nos últimos 5 a 10 anos, a estirpe comercial Zymaflore VL1 [23]	
VL018			
VL020			
VL064			
VL097			
VL099			
VL108			
W303	Laboratório (Adquiridas na EUROSCARF)		
W303,ady2Δ			
W303,gup1Δ			
Análise espectroscópica de mutantes da estirpe laboratorial <i>S. cerevisiae</i> W303	W303,jen1Δ		
	S01		
Validação do método	S02		
	S13	Vinha	Portugal
	S22		
	S24		

A estirpe GMY31 é uma estirpe vínica que foi utilizada em ensaios preliminares para avaliar diferenças espectroscópicas entre os poços da mesma microplaca.

As estirpes L558 à L756 são estirpes de países diferentes, com as origens indicadas na tabela. Estas foram utilizadas para verificar até que ponto o método desenvolvido permitia a distinção entre as estirpes e se era possível encontrar

algumas relações entre elas com base nos espectros obtidos, como por exemplo uma maior semelhança espectroscópica de estirpes com maior proximidade geográfica ou semelhança no que respeita à origem de isolamento.

As estirpes VL002 à VL108 são estirpes isogénicas da estirpe comercial Zymaflore VL1, que foram re-isoladas de uma vinha próxima de uma adega onde esta estirpe foi utilizada durante anos consecutivos [23]. Estes isolados possuem padrões de polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial idênticos, mas padrões diferentes de cariótipo. Destes isolados, 4 (VL006, VL020, VL064, VL097) possuíam pequenas diferenças no que respeita aos alelos dos microssatélites em relação à estirpe Zymaflore VL1. Conforme resumido na Tabela 2.2, a estirpe Zymaflore VL1 com o padrão M1 de microssatélite, possui heterozigotia para os *loci* ScAAT1, ScAAT2, ScAAT5 e ScAAT6, e homozigotia para os *loci* ScAAT3 e ScAAT4; os isolados VL064 e VL097, com os padrões M2 e M4 respetivamente, são caracterizados pela perda total de heterozigotia; os isolados VL020 e VL006, com os padrões M7 e M8 respetivamente, são caracterizados pela ausência dos alelos 219 (em ScAAT5) e 256 (em ScAAT6), respetivamente [23].

Através da espectroscopia, pretende-se averiguar se a técnica utilizada terá sensibilidade para distinguir entre estes isolados. Seriam assim um grupo de controlo para a análise espectral da variabilidade intra-estirpe, contribuindo também para uma melhor interpretação dos dados obtidos para as estirpes L558 à L756.

Tabela 2.2 – Análise de microssatélites dos isolados da estirpe Zymaflore VL1 [23].

Loci	Padrões de microssatélites				
	M1	M2	M4	M7	M8
ScAAT1	204/219	219	204	201/219	204/219
ScAAT2	372/381	372	385	372/381	372/381
ScAAT3	265	265	265	265	265
ScAAT4	329	329	329	329	329
ScAAT5	219/222	222	219	222	219/222
ScAAT6	256/259	256	256	259/259	259
Estirpes	VL002				
	VL011				
	VL018	VL064	VL097	VL020	VL006
	VL099				
	VL108				

As estirpes W303,ady2Δ, W303,gup1Δ, W303,jen1Δ são estirpes mutantes construídas a partir da estirpe W303. Estas estirpes foram adquiridas na EUROSCARF. A estirpe W303,ady2Δ possui uma deleção no gene que codifica o

transportador de acetato da membrana citoplasmática [61], a estirpe W303,gup1Δ possui uma deleção no transportador de glicerol [62] e a estirpe W303,jen1Δ no transportador de lactato [63]. Estas estirpes permitirão verificar se será possível distinguir isolados com base em alterações à membrana originadas por mutações de deleção num gene que codifica uma proteína membranar.

Os isolados S01 à S24 são estirpes vínicas provenientes da mesma vinha. Estes isolados foram utilizados para determinar quantas estirpes diferentes se poderiam detetar por espectroscopia e comparar com os resultados de análises moleculares realizados previamente. O objetivo deste ensaio consistiu na validação do método desenvolvido. Estes isolados foram caracterizadas pelo seu perfil de sequências interdelta, sequências de 300 pares de base que se encontram nos flancos de retrotransposições TY1 e TY2, utilizando um protocolo baseado no PCR para amplificar estas regiões [64], pois o número e a localização destes elementos varia de estirpe para estirpe [53]. Estes ensaios foram realizados para verificar se o método de espectroscopia classificava como idênticos os isolados com o mesmo perfil interdelta e se os isolados com perfis interdelta distintos eram considerados como diferentes nas medições espectroscópicas.

2.4. Pré-cultura e condições de crescimento

As estirpes de *S. cerevisiae* encontravam-se conservadas a -80 °C em criotubos numa solução de glicerol a 30% (v/v). O crescimento e a leitura espectroscópica das estirpes foram realizados em meio YPD agarizado e GM agarizado para verificar em qual se obtinha um crescimento que preenchesse o poço da microplaca e tivesse uma superfície mais uniforme. O meio YPD agarizado foi constituído por extrato de levedura 1% (p/v), peptona 1% (p/v), glucose 2% (p/v) e agar 2% (p/v). O meio GM agarizado foi constituído por extrato de levedura 1% (p/v), glicerol 3% (v/v) e agar 2% (p/v). Em cada um dos 96 poços de uma microplaca foi adicionada com uma micropipeta automática 150 µL de meio YPD agarizado a 70 °C, aproximadamente.

De cada criotubo foi retirada uma alíquota de biomassa com um palito esterilizado. As estirpes foram depois inoculadas em placas com meio agarizado e incubadas a 30°C numa estufa durante 24 h. A seguir, foi retirada uma pequena quantidade de biomassa que foi ressuspensa em meio. Após determinação da densidade ótica (D.O. 640 nm), foram preparadas suspensões com uma D.O. de 1,0. A partir desta suspensão, uma alíquota de 7 µL de cada estirpe foi inoculada em oito

poços com meio agarizado de uma microplaca, conforme ilustrado na Figura 2.4. A microplaca foi depois colocada na estufa a 30 °C durante 3 dias. Este tempo de incubação foi o menor encontrado para que ocorresse um bom crescimento das estirpes em meio YPD (Figura 2.5-A). Em meio GM, ao fim dos 3 dias de incubação a cultura não preenchia totalmente o poço e tinha uma superfície irregular (Figura 2.5-B). Por esta razão, foi escolhido o meio YPD para a realização das análises das estirpes por espectroscopia.

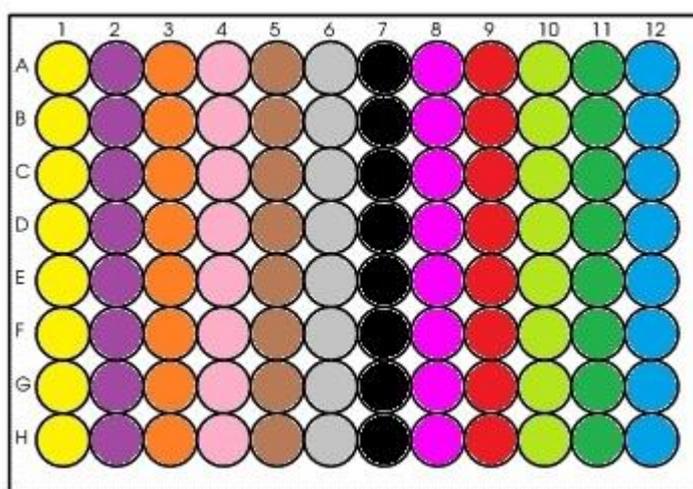


Figura 2.4 – Representação esquemática de uma microplaca. A cada estirpe inoculada corresponde uma cor, com a exceção da última coluna (coluna 12) que contém apenas meio agarizado (azul). Cada estirpe foi inoculada em 8 poços.

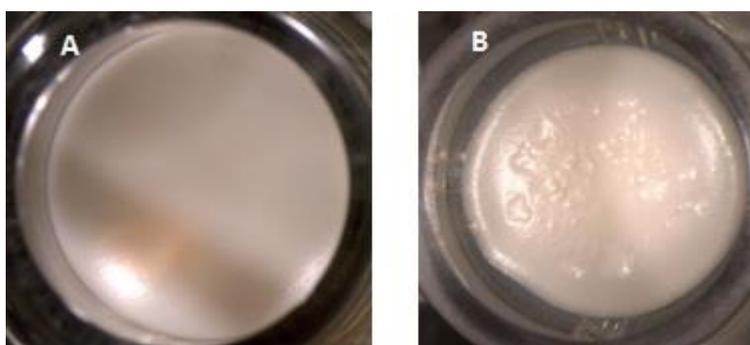


Figura 2.5 – Fotografia (ampliação de 10x, aproximadamente) da cultura de uma estirpe de *S. cerevisiae* em YPD (A) e GM (B) num poço da microplaca, após 3 dias de incubação a 30 °C.

2.5. Testes preliminares

Antes de iniciar as análises de espectroscopia, foram realizados vários ensaios preliminares de otimização. A primeira experiência consistiu na análise dos espectros de luz dos 96 poços da microplaca, do meio YPD agarizado e do meio GM agarizado, para verificar se ocorriam diferenças entre os meios e se dentro de cada conjunto de espectros de cada microplaca ocorriam variações. O espectro de luz foi obtido inserindo a sonda em cada uma das 96 posições, incidindo o feixe de luz diretamente no fundo espelhado da gaveta. O espectro da microplaca foi adquirido da mesma maneira que o de luz mas com uma microplaca colocada na gaveta, sobre a qual incidiu o feixe de luz. Os espectros dos meios YPD e GM foram obtidos utilizando uma microplaca para cada meio, contendo em cada poço 150 μ L de meio.

Como controlo adicional, avaliou-se também a homogeneidade das microplacas e do meio YPD entre lotes diferentes. Para tal, foram utilizadas duas microplacas do mesmo lote e uma microplaca de um lote diferente. Para avaliar a influência do meio de cultura, foram realizadas leituras em três microplacas do mesmo lote, duas contendo meio YPD preparado no mesmo dia e uma com meio YPD preparado num dia diferente. Cada poço da microplaca continha 150 μ L de meio e foram adquiridos os espetros de todos os 96 poços de uma microplaca.

Adicionalmente foi também avaliada a reprodutibilidade das leituras espectroscópicas entre os diferentes poços de duas microplaca do mesmo lote, contendo meio YPD preparado no mesmo dia e inoculados com a mesma estirpe (GMY31).

Todos os 96 poços de duas microplacas, com 150 μ L de meio YPD agarizado cada, foram inoculados com a estirpe GMY31. Os espectros foram obtidos nas 96 posições possíveis da sonda na caixa em ambas as microplacas.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Testes preliminares

Antes de se começar a analisar por espectroscopia as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, realizaram-se três testes preliminares a este método. O primeiro teste consistiu em adquirir o espectro de luz, o espectro de microplaca, o espectro do meio YPD e o espectro do meio GMY nas 96 posições possíveis da sonda e verificar se havia diferenças entre eles e se dentro de cada conjunto de espectros de cada microplaca ocorriam variações. Para tal, foram utilizadas quatro microplacas do mesmo lote, uma para cada condição.

A Figura 3.1 mostra os espectros obtidos para o 1º teste no comprimento de onda UV-Vis-SWNIR (200 – 1100 nm). Os espectros de luz (preto) e da microplaca (azul) são mais uniformes e apresentam uma maior variação da refletância entre a zona dos 200 – 450 nm. Sendo o espectro de luz o espectro original da luz emitida, a menor variação ocorrida no espectro da microplaca significa que esta absorve luz nesta zona do UV. As microplacas utilizadas são feitas de um plástico não transparente ao UV (poliestireno) e, por isso, vão absorver luz neste comprimento de onda. Nos espectros dos meios YPD (verde) e GM (amarelo) observam-se variações espectrais entre réplicas na zona do UV (200 – 450 nm) e numa zona do NIR (850 – 1100 nm). A variação ocorrida na zona dos UV poderá dever-se a uma maior, ou menor, refração da luz no meio, sendo esta mais, ou menos, absorvida pela microplaca. Na zona do NIR, a variação pode ser explicada pela diferença no teor de água no meio, havendo nesta região absorção de luz por parte do grupo O-H da água. Apesar de cada poço da microplaca ter sido preenchido com meio preparado no mesmo dia, é possível que tenham ocorrido erros de pipetagem, havendo uma distribuição desigual de meio em cada poço.

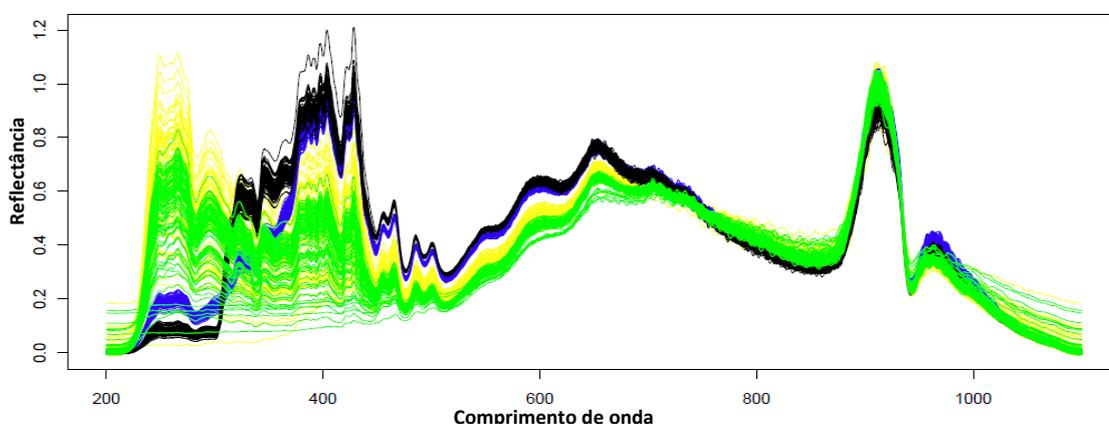


Figura 3.1 – Espectros UV-Vis-SWNIR de luz (preto), microplaca (azul), meio YPD (verde) e meio GM (amarelo) medidos nas 96 posições da caixa.

Assim, pelas razões acima apontadas, resolveu-se prosseguir com a análise espectral utilizando somente a zona dos 450 – 850 nm, sendo a região do espectro com uma maior uniformidade entre réplicas.

Antes de se proceder à análise por RPCA, determinou-se o número de componentes adequadas através da representação gráfica dos valores de desvio padrão em função do número de componentes principais (Figura 3.2). Duas componentes foram utilizadas para fazer a análise por RPCA, uma vez que só duas componentes apresentaram um valor de desvio padrão considerado relevante por se encontrarem acima da linha que determina o valor mínimo para ser considerado significativo, conforme se pode observar na figura. Estas duas componentes representam 97,51% da variabilidade espectral, sendo que a PC1 possui a maioria da variabilidade com 94,70% e a PC2 2,82%.

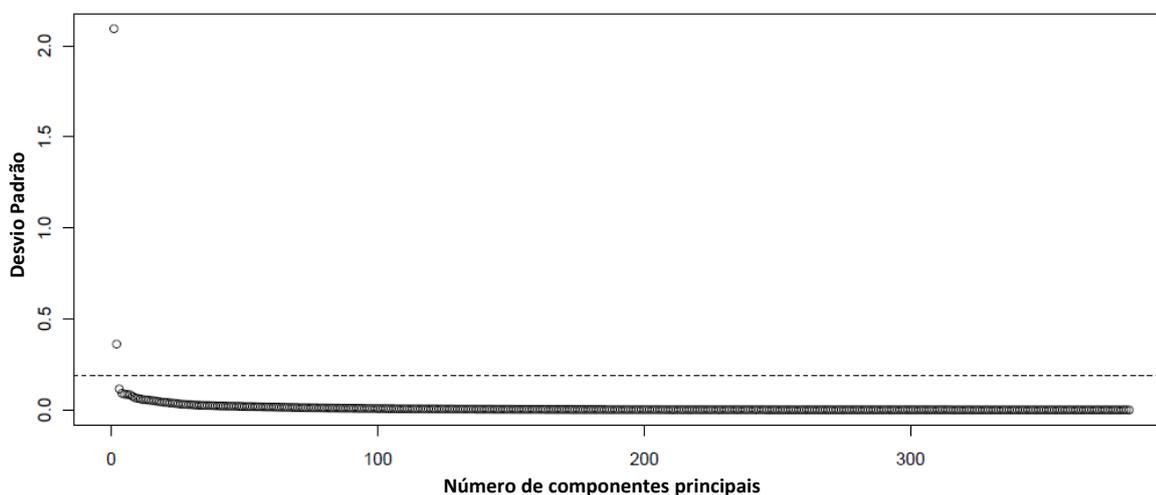


Figura 3.2 – Representação gráfica dos valores de desvio padrão em função do número de componentes principais.

A seguir, os espectros foram submetidos à análise por RPCA utilizando as duas primeiras componentes. Posteriormente foram relacionadas entre si (Figura 3.3), demonstrando que os espectros das diferentes condições de medição separam-se em grupos distintos havendo, contudo, alguma dispersão dentro do grupo de cada meio. Esta dispersão pode ser novamente explicada pela refração da luz no meio. Outra causa poderá ser um efeito causado pelas diferentes posições dos poços. Para estudar este fator procedeu-se a uma análise dos espectros de cada meio por linhas e por colunas. A Figura 3.4 representa os espectros dos meios YPD (A e B) e GM (C e D). De uma maneira geral, em cada gráfico ocorrem sobreposições de espectros e estes apresentam uma forma semelhante. Procedeu-se à análise por RPCA (Figura 3.5) para verificar se haveria alguma linha ou coluna de poços que divergisse dos restantes. Quando se comparam os resultados entre os espectros das linhas com os

das colunas de cada meio verifica-se que entre os meios, os poços que se encontram mais afastados do agrupamento maior de espectros são diferentes. Portanto, a posição dos poços na microplaca não parece ter interferido com a análise espectral.

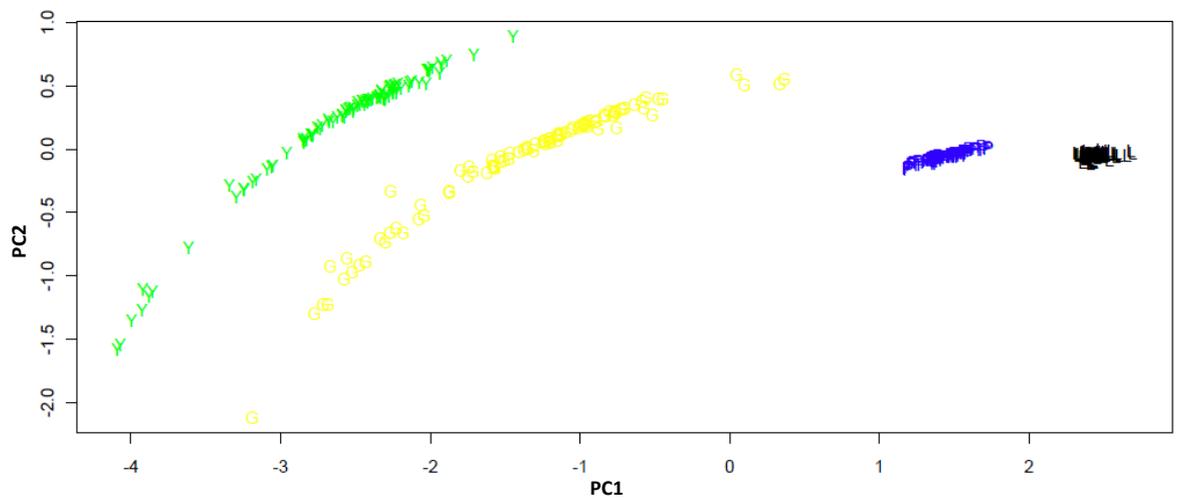


Figura 3.3 – Análise de componentes principais para os espectros da luz (preto), microplaca (azul), meio YPD (verde) e meio GM (amarelo).

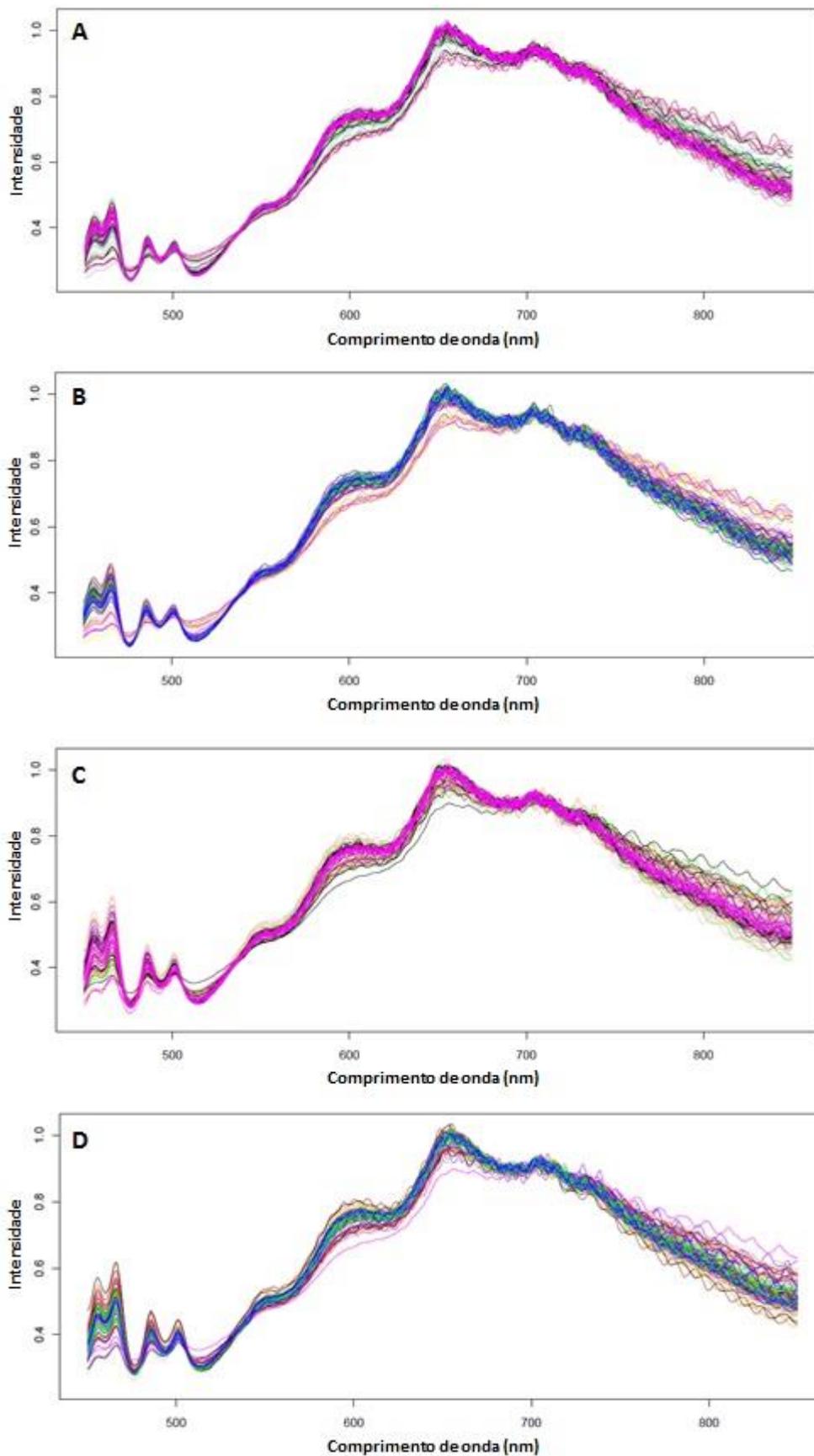


Figura 3.4 – Espectros UV-Vis-SWNIR do meio YPD (A e B) e do meio GM (C e D) medidos nas 96 posições da caixa. Em A e C, cada conjunto de espectros de uma coluna está representado por uma cor diferente. Em B e D, cada conjunto de espectros de uma linha está representado por uma cor diferente.

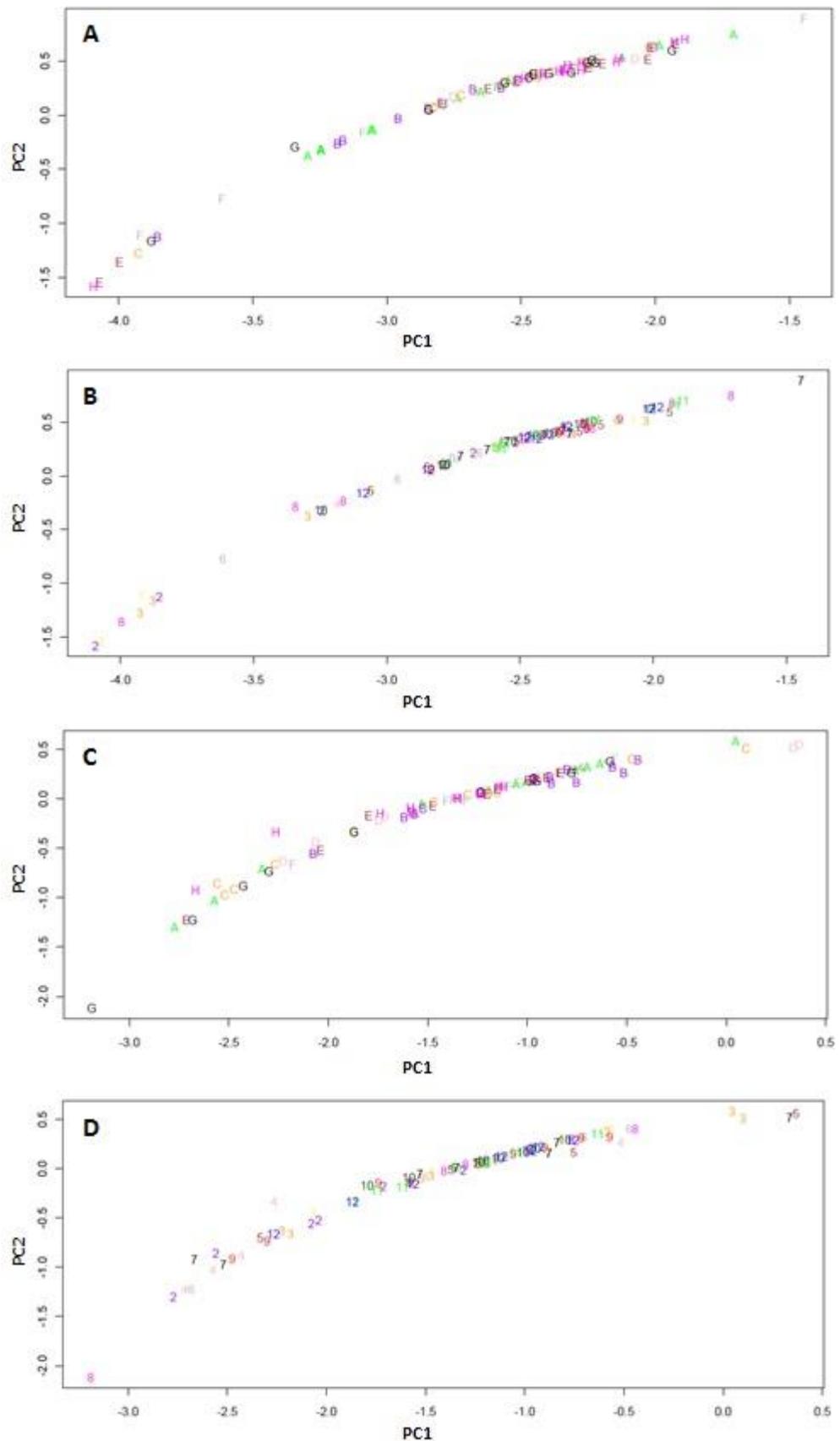


Figura 3.5 – Análise de componentes principais para os espectros do meio YPD (A e B) e do meio GM (C e D). Em A e C, cada conjunto de espectros de uma coluna está representado por uma cor diferente. Em B e D, cada conjunto de espectros de uma linha está representado por uma cor diferente.

O teste seguinte consistiu em verificar se microplacas de lotes diferentes e meio YPD preparado em dias diferentes apresentavam dissemelhanças que pudessem comprometer os resultados da análise. Para a análise das microplacas foram utilizadas duas microplacas do mesmo lote e uma de um lote diferente, enquanto que para a análise do meio foram utilizadas três microplacas do mesmo lote, em que duas continham meio YPD preparado no mesmo dia e uma meio YPD preparado num dia diferente. Em ambas as análises, foram realizadas leituras de todos os 96 poços de cada microplaca.

Os espectros obtidos no 2º teste no comprimento de onda UV-Vis-SWNIR (200 – 1100 nm) estão representados na Figura 3.6. Observa-se novamente uma variação espectral no UV (200 – 450 nm) e no NIR (850 – 1100 nm) do meio YPD (Figura 3.6-A), provavelmente devido às razões apresentadas anteriormente, tendo-se decidido prosseguir com a análise espectral utilizando apenas a zona dos 450 – 850 nm.

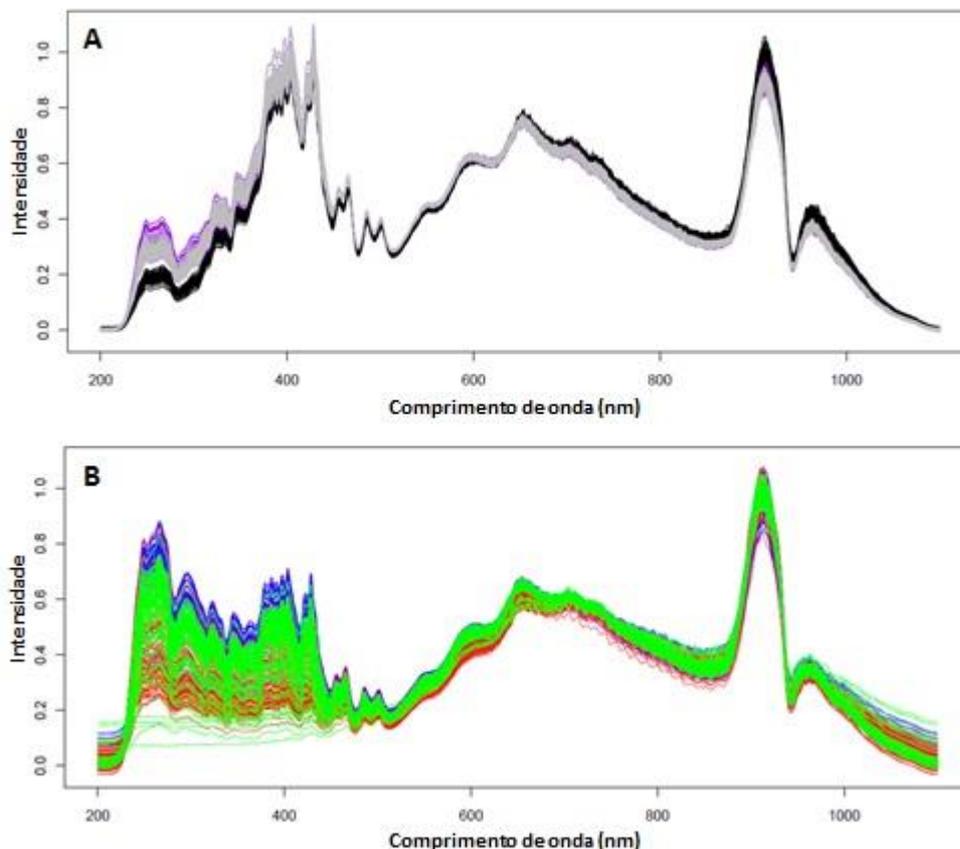


Figura 3.6 – Espectros UV-Vis-SWNIR da leitura dos 96 poços de: A - duas microplacas do mesmo lote (cinzento e roxo) e uma microplaca de um lote diferente (preto); B - meio YPD feito no mesmo dia (azul e verde) e meio YPD feito num dia diferente (vermelho).

O número de componentes foi determinado para a análise por RPCA, sendo as duas primeiras componentes a que representam a maioria da informação que explica a variabilidade. A PC1 possui 95,80% dessa informação e a PC2 2,73%.

A Figura 3.7 representa a relação entre estas duas componentes. Como se pode observar pelo gráfico, existe um agrupamento para os espectros das microplacas do mesmo lote (cinzento e roxo) e um grupo diferente para os espectros da microplaca de um lote diferente (preto) (Figura 3.7-A). Isto sugere que devem existir diferenças na composição de microplacas de diferentes lotes que provoquem alterações significativas dos espectros. Na Figura 3.7-B observa-se que os espectros de cada microplaca contendo meio YPD ficaram separados em grupos distintos, havendo, contudo, alguma dispersão dentro do grupo de cada meio. Os espectros das microplacas com meio preparado no mesmo dia e com meio preparado num dia diferente apresentam diferenças espectrais significativas entre eles, ou seja, poderão existir diferenças composicionais em meios feitos em alturas diferentes e até mesmo num meio preparado no mesmo dia mas analisados em microplacas diferentes (possivelmente devido aos limites do equipamento utilizado na preparação de cada meio).

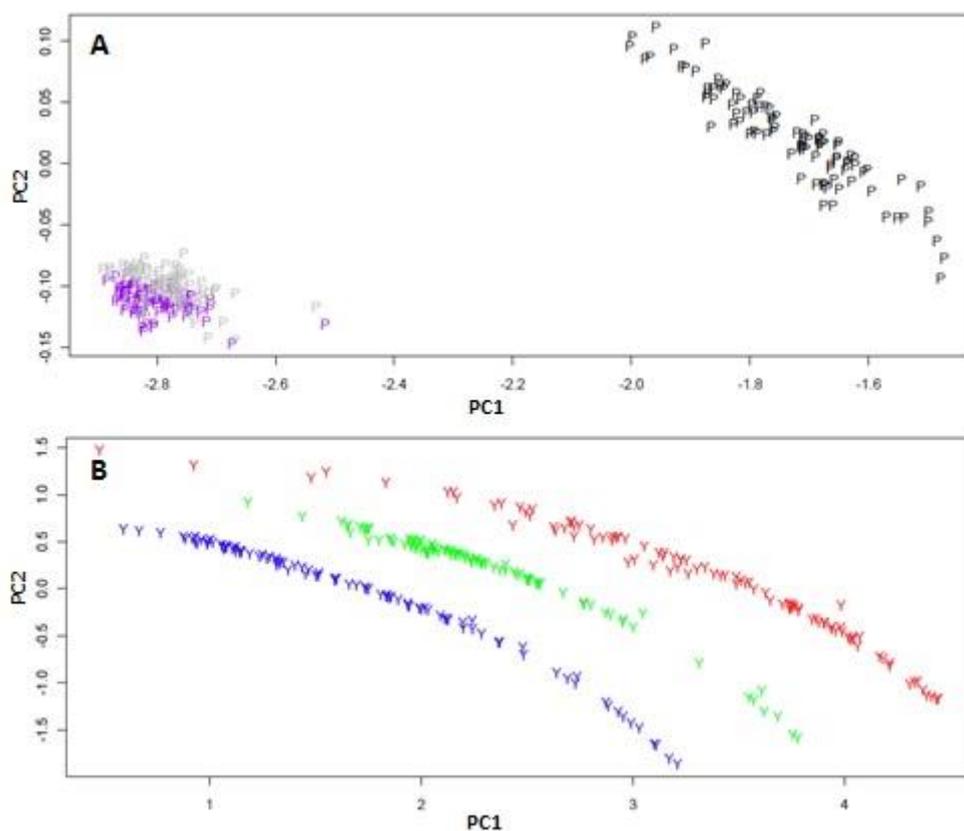


Figura 3.7 – Análise de componentes principais para os espectros de: A - duas microplacas do mesmo lote (cinzento e roxo) e uma microplaca de um lote diferente (preto); B - meio YPD feito no mesmo dia (azul e verde) e meio YPD feito num dia diferente (vermelho).

No último teste, analisaram-se duas microplacas do mesmo lote, contendo meio YPD preparado no mesmo dia e inoculadas com a estirpe GMY31 para avaliar a reprodutibilidade entre os diferentes poços das duas microplacas.

Nos espectros obtidos neste teste (Figura 3.8) no comprimento de onda UV-Vis-SWNIR (200 – 1100 nm) observa-se uma variação espectral na região do UV (200 – 450 nm) e do NIR (850 – 1100 nm). As variações ocorridas nestas regiões do espectro foram persistentes nos três testes preliminares e as suas origens dever-se-ão provavelmente às razões apontadas no primeiro teste. Deste modo, decidiu-se prosseguir com a análise espectral utilizando apenas a região dos 450 – 850 nm. Nesta região, de uma maneira geral, o conjunto de espectros de cada microplaca apresentam formas semelhantes e encontram-se sobrepostos, não havendo uma distinção entre os diferentes conjuntos de espectros em linha ou coluna.

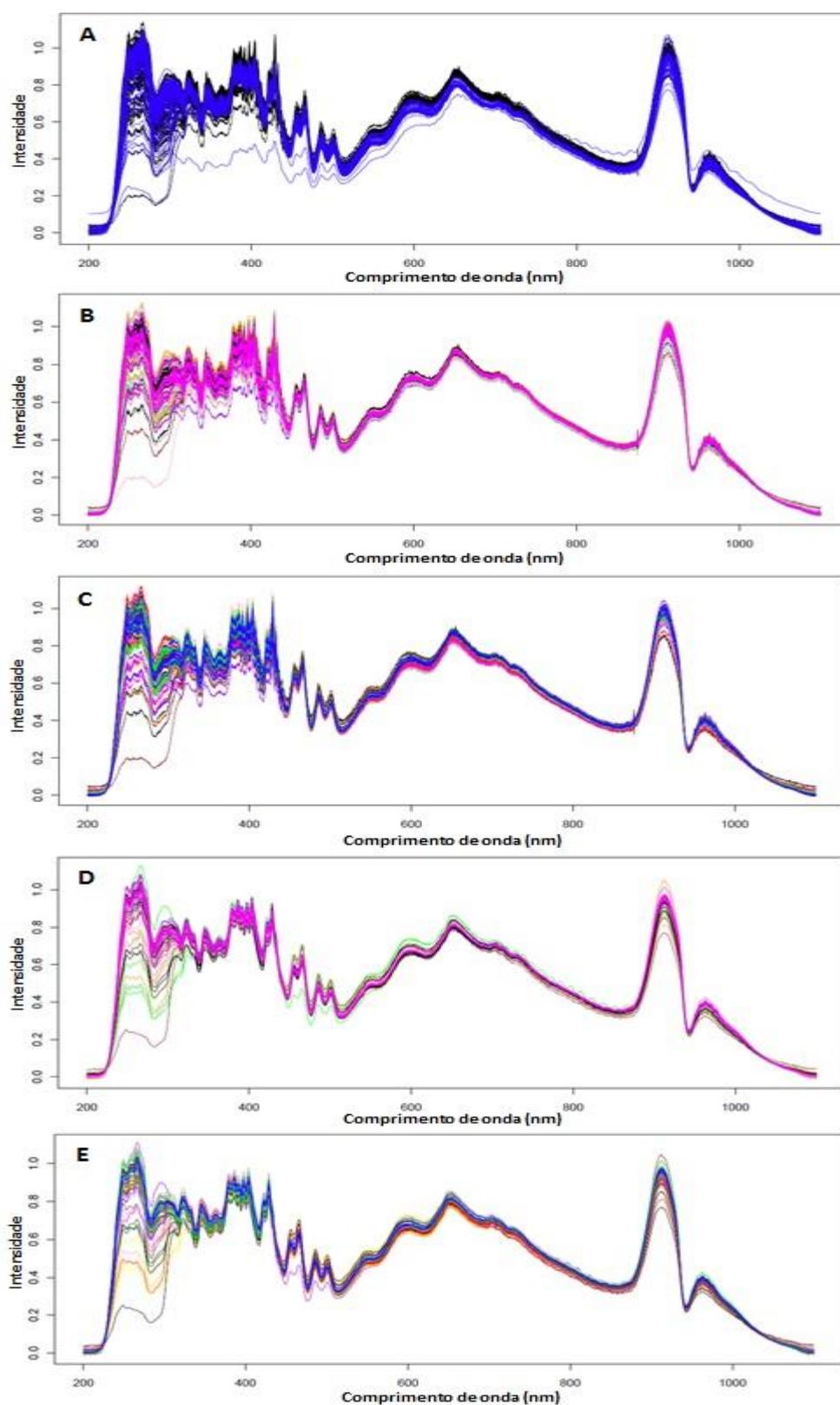


Figura 3.8 – Espectros UV-Vis-SWNIR da leitura dos 96 poços de: A - duas microplacas do mesmo lote contendo meio YPD preparado no mesmo dia inoculadas com a estirpe GMY31 (preto e azul); B e C - uma microplaca contendo meio YPD preparado no mesmo dia inoculadas com a estirpe GMY31, em que cada conjunto de espectros em linha (B) e coluna (C) está representado por uma cor diferente; D e E - outra microplaca contendo meio YPD preparado no mesmo dia inoculadas com a estirpe GMY31, em que cada conjunto de espectros em linha (B) e coluna (C) está representado por uma cor diferente.

Determinou-se o número de componentes principais a serem utilizadas na análise por RPCA. Duas componentes foram utilizadas e estas abrangiam 88,80% da variabilidade espectral, tendo a PC1 73,90% da variabilidade e a PC2 14,90%. Os dados espectrais foram de seguida submetidos à análise por RPCA utilizando duas componentes e representado graficamente a relação entre estas (Figura 3.9). Na Figura 3.9-A é possível observar dois grupos, um para cada conjunto de espectros de uma microplaca. Esta separação poder-se-á dever a diferenças entre microplacas no crescimento das estirpes, a diferenças no tempo entre as leituras para cada microplaca, variações na quantidade de meio presente em cada poço, o método utilizado para diminuir o efeito do meio na leitura das estirpes não ser suficientemente eficaz, sendo que estas causas interferem na análise dos espectros sobrepondo-se ao espectro da estirpe propriamente dita. Apesar de não se conseguir distinguir bem cada ponto nos gráficos correspondente a cada poço de cada espectro analisado, observa-se que a maioria dos espectros da estirpe GMY31 de uma microplaca se encontra aglomerado, o que indica que não existe uma variação significativa entre os espectros da estirpe GMY31 inoculada nos diferentes poços, não sendo a posição na microplaca um fator para a variação espectral na análise de estirpes (Figura 3.9-B à E). Os espectros que se encontram mais afastados dos aglomerados são de estirpes cujo crescimento não ocupou toda a superfície do meio no poço (Figura 3.10-A) ou que apresentava a superfície irregular (Figura 3.10-B).

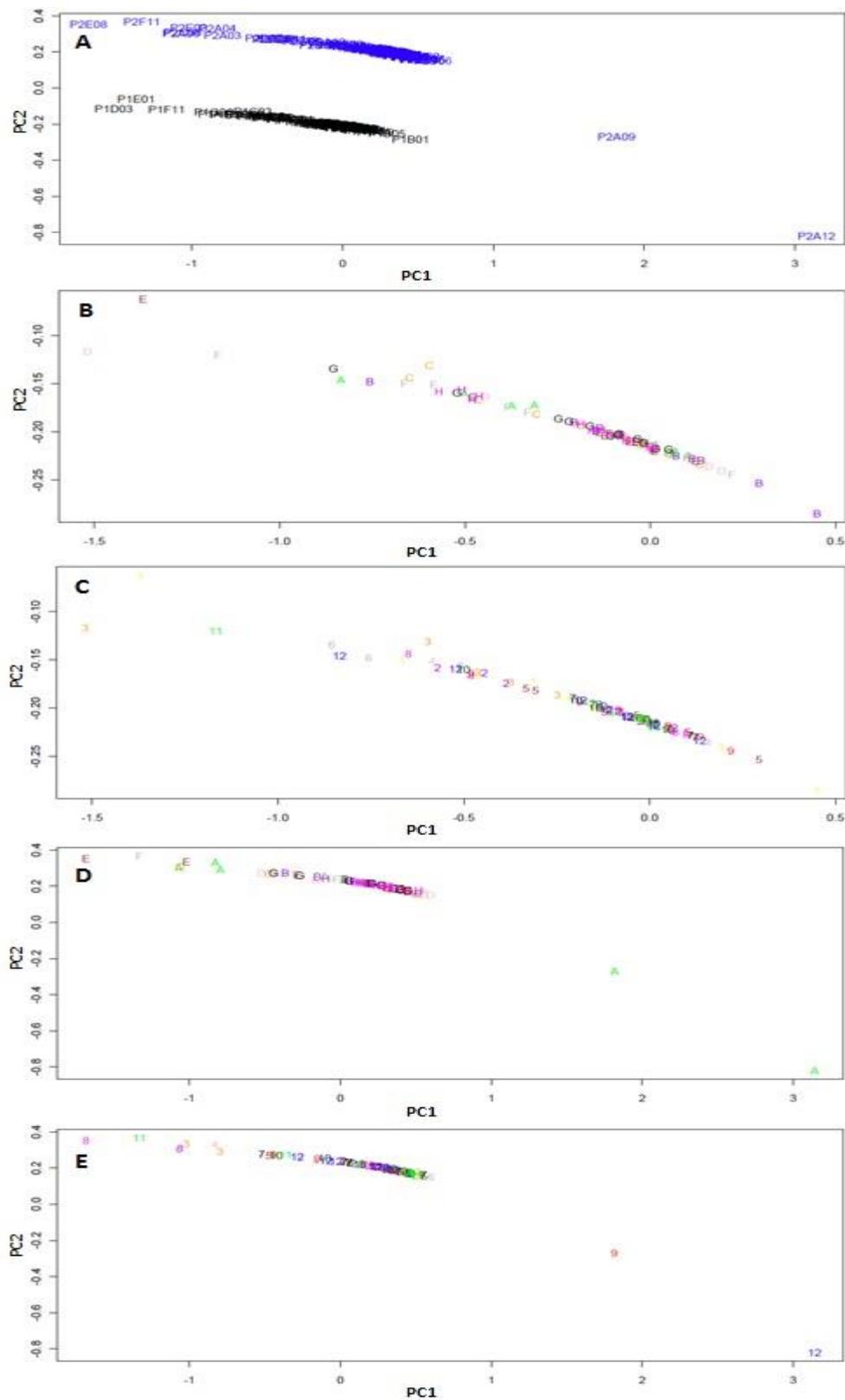


Figura 3.9 – Análise de componentes principais para os espectros de: A - duas microplacas do mesmo lote contendo meio YPD preparado no mesmo dia inoculadas com a estirpe GMY31 (preto e azul); B e C - uma microplaca contendo meio YPD preparado no mesmo dia inoculadas com a estirpe GMY31, em que cada conjunto de espectros em linha (B) e coluna (C) está representado por uma cor diferente; D e E - outra microplaca contendo meio YPD preparado no mesmo dia inoculadas com a estirpe GMY31, em que cada conjunto de espectros em linha (B) e coluna (C) está representado por uma cor diferente.

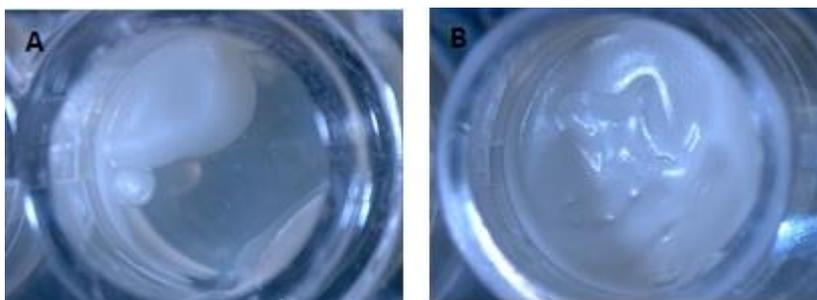


Figura 3.10 – Fotografia (ampliação de 10x, aproximadamente) da cultura de uma estirpe de *S. cerevisiae* em YPD num poço da microplaca, após 3 dias de incubação a 30 °C.

Os resultados dos testes preliminares realizados sugerem que, durante a análise das estirpes de *S. cerevisiae*, devem ter-se alguns cuidados para minimizar os erros provenientes do material utilizado e que podem interferir com a análise espectral: devem utilizar-se microplacas do mesmo lote para a análise das estirpes; deve-se subtrair a informação do meio na análise das estirpes para minimizar a variação espectral ocorrida devido às diferenças composicionais e aos problemas de refração de luz no meio; e deve-se recorrer à zona espectral dos 450 – 850 nm para a análise dos espectros das estirpes.

Após a realização destes testes preliminares, procedeu-se à análise de estirpes de *S. cerevisiae*.

3.2. Análise de estirpes de *S. cerevisiae* por UV-Vis-SWNIR

Na primeira análise aos espectros de *S. cerevisiae* foram utilizadas onze estirpes diferentes para verificar se com esta técnica espectroscópica era possível distingui-las e estabelecer relações entre a localização geográfica e/ou a origem de cada uma com os resultados dos dados espectrais. Nesta experiência foram utilizadas as estirpes L558 à L756 (Tabela 2.1), de localizações geográficas diferentes e com aplicações diferentes, e as estirpes de referência S288c e Zymaflore VL1.

As 11 estirpes foram inoculadas numa microplaca com meio YPD agarizado, tendo cada uma 8 réplicas, conforme esquematizado na Figura 3.11. Dessas 8, foram obtidos espectros das 4 em que se observou um crescimento mais uniforme e que preenchesse a superfície do meio.

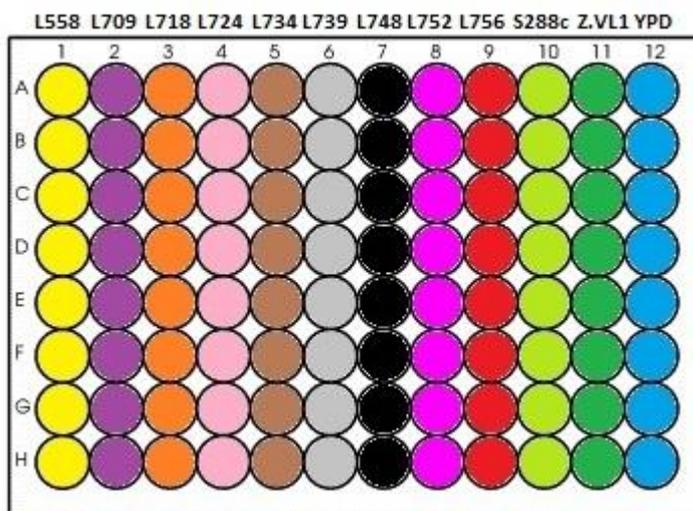


Figura 3.11 – Representação esquemática de uma microplaca. A cada estirpe inoculada corresponde uma cor, com a exceção da última coluna (coluna 12) que contém apenas meio YPD agarizado (azul). Cada estirpe foi inoculada em 8 poços. As estirpes utilizadas são: L558 (amarelo), L709 (roxo), L718 (laranja), L724 (rosa), L734 (castanho), L739 (cinzento), L748 (preto), L752 (magenta), L756 (vermelho), S288c (verde) e Zymaflore VL1 (verde escuro).

Na Figura 3.12 são representados os espectros das estirpes utilizadas, obtidos na região dos 450 – 850 nm. Os espectros das estirpes apresentam, de uma maneira geral, uma forma semelhante entre eles, ocorrendo a sobreposição de alguns espectros no gráfico.

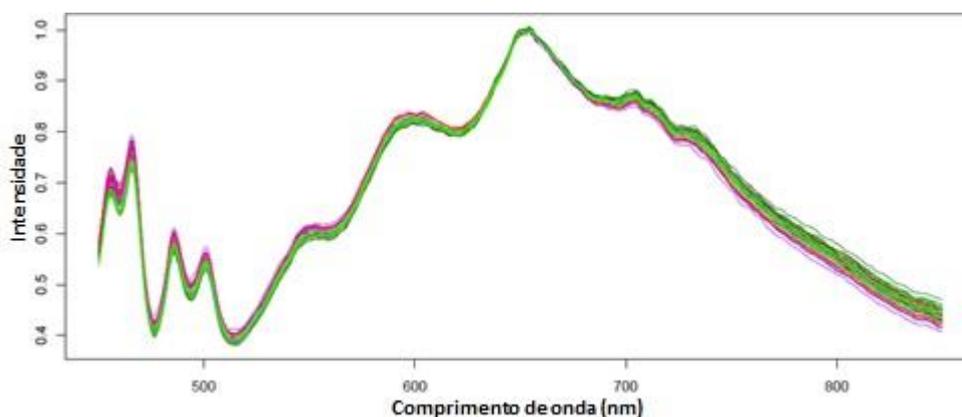


Figura 3.12 – Espectros UV-Vis-SWNIR das estirpes L558 (amarelo), L709 (roxo), L718 (laranja), L724 (rosa), L734 (castanho), L739 (cinzento), L748 (preto), L752 (magenta), L756 (vermelho), Zymaflore VL1 (verde escuro) e S288c (verde), inoculadas numa microplaca com YPD, tendo cada estirpe 4 réplicas.

Procedeu-se à análise por RPCA utilizando duas componentes: a PC1 que representa 91,00% da variabilidade espectral e a PC2 que representa 4,66%. Na

Figura 3.13 encontra-se a representação gráfica da relação entre as duas componentes principais, sendo possível observar uma boa reprodutibilidade das réplicas das diferentes estirpes e uma separação nítida entre os agrupamentos de cada estirpe.

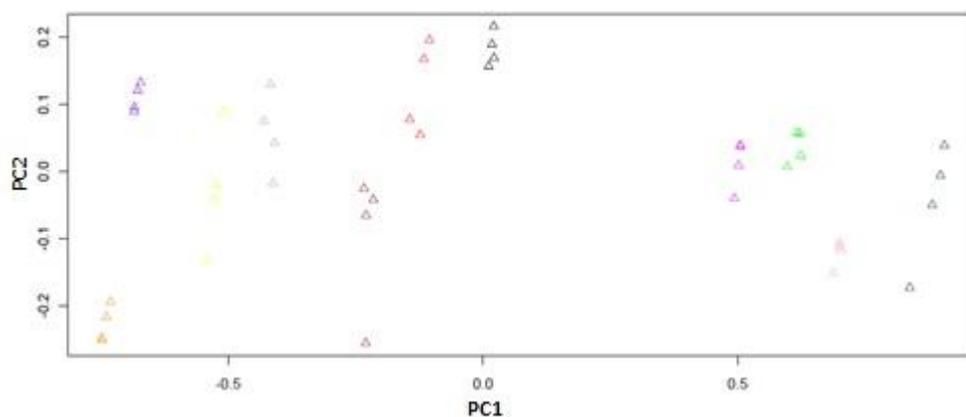


Figura 3.13 – Análise de componentes principais para os espectros de estirpes diferentes: L558 (△), L709 (△), L718 (△), L724 (△), L734 (△), L739 (△), L748 (△), L752 (△), L756 (△), Zymaflore VL1 (△), S288c (△).

Comparando a semelhança espectral com a localização geográfica das estirpes aqui analisadas (Tabela 2.1 e Figura 3.14), verifica-se que não se pode estabelecer uma relação entre estes dois dados. As estirpes L718, L748 e L752 deveriam ter espectros mais semelhantes de acordo com a sua localização, não sendo isso o observado no gráfico da análise de componentes principais onde estas três estirpes se encontram afastadas umas das outras. As estirpes do continente africano (L709 e L756) também se encontram afastadas entre si no gráfico. As estirpes L558, L734 e L739, provenientes da Europa, encontram-se próximas entre si, mas era esperado que a estirpe encontrada em Portugal (L558) estivesse mais próxima da estirpe de Itália (L734) do que a da Finlândia (L739), se se tiver em consideração a localização geográfica.

De um modo geral, não pode ser estabelecida uma relação entre as semelhanças espectrais das estirpes e a sua origem de isolamento com base nos resultados obtidos. As estirpes L558 e L734, que possuem a mesma origem de isolamento, não se encontram mais próximas uma da outra do que de outras estirpes com diferentes origens de isolamento. As estirpes que foram isoladas de fermentações (L709 e L718) são semelhantes a nível espectral, encontrando-se próximas uma da outra no gráfico de análise de componentes principais, sendo estas as únicas onde se consegue estabelecer uma relação de semelhança espectral com origem de isolamento.

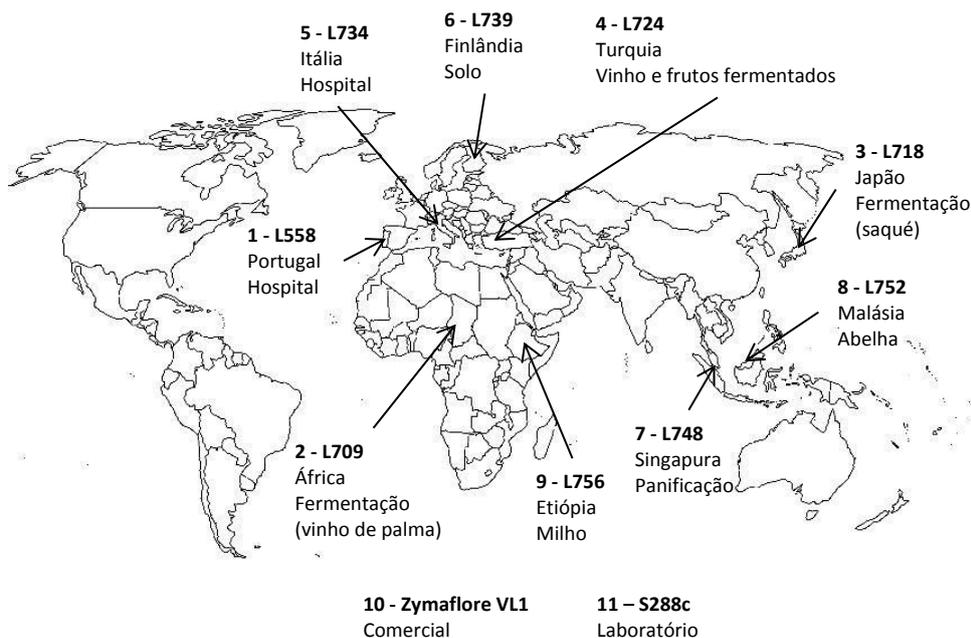


Figura 3.14 – Localização geográfica e origem do isolamento das estirpes L558, L709, L718, L724, L734, L739, L748, L752, L756, Zymaflore VL1 e S288c (imagem adaptada de <http://www.geoensino.net/2011/10/blog-post.html>).

Assim, os resultados obtidos nesta análise, de uma maneira geral, não têm uma relação com os dados geográficos e os da origem do isolamento das estirpes. Contudo, utilizando este método obteve-se uma boa reprodutibilidade das réplicas e foi possível distinguir as diferentes estirpes.

Nos ensaios preliminares verificou-se que nas análises que envolveram microplacas do mesmo lote com meio YPD preparado no mesmo dia ocorriam variações nos espectros entre as diferentes microplacas (Figura 3.7). Tendo-se reduzido a variação do meio e das microplacas a um mínimo, resolveu-se averiguar a reprodutibilidade dos espectros de estirpes inoculadas em diferentes microplacas. Foi realizada uma análise a estas estirpes inoculando-as em 4 microplacas do mesmo lote com meio YPD preparado no mesmo dia seguindo o mesmo esquema de inoculação da Figura 3.11. Os espectros foram obtidos na zona dos 450 – 850 nm (Figura 3.15). Alguns dos espectros encontram-se sobrepostos e, de uma maneira geral, verifica-se que aparentam ser muito semelhantes entre si. Posteriormente, os dados espectrais foram tratados por RPCA utilizando duas componentes, sendo a PC1 responsável por 97,00% da variabilidade encontrada nesta análise e a PC2 por 2,24%.

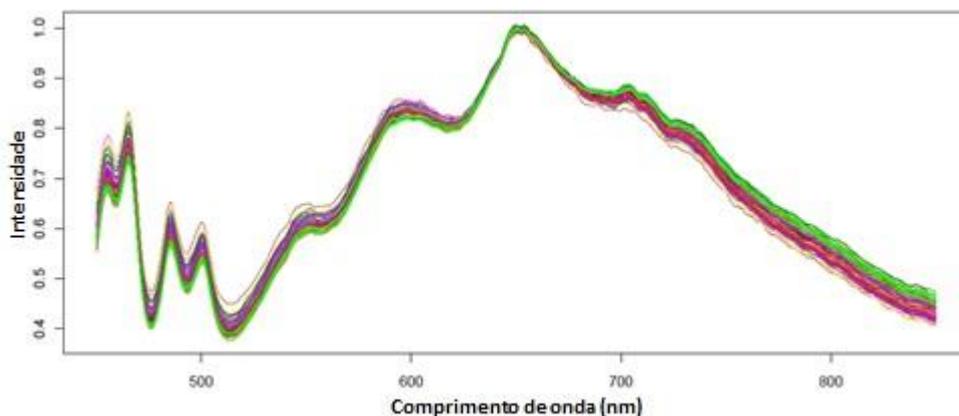


Figura 3.15 – Espectros UV-Vis-SWNIR de 4 microplacas do mesmo lote com meio YPD preparado no mesmo dia inoculadas com as estirpes L558 (amarelo), L709 (roxo), L718 (laranja), L724 (rosa), L734 (castanho), L739 (cinzento), L748 (preto), L752 (magenta), L756 (vermelho), Zymaflore VL1 (verde escuro) e S288c (verde).

Como se pode observar na Figura 3.16, de uma maneira geral, ocorreu um agrupamento para cada conjunto de espectros de uma microplaca. Isto já ocorreu em experiências anteriores com microplacas do mesmo lote com meio preparado no mesmo dia (Figura 3.7) e com microplacas do mesmo lote inoculadas com a estirpe GMY31 em meio YPD preparado no mesmo dia (Figura 3.9). As possíveis causas destas separações já foram referidas anteriormente e poderão estar na origem destes erros sistemáticos. Na Figura 3.16, observa-se ainda em algumas microplacas uma distinção pouco nítida entre algumas estirpes diferentes. Se uma análise por RPCA for realizada para cada microplaca individualmente, essa distinção entre as estirpes já se torna mais nítida (Figura 3.17) e observa-se uma boa reprodutibilidade das réplicas das diferentes estirpes em cada microplaca. Contudo, a relação entre as diferentes estirpes (a distância entre cada uma no gráfico) é, de um modo geral, diferente em cada microplaca. A estirpe L709 encontra-se afastada de outra estirpe em 3 das 4 microplacas (vermelho, verde e preto), sendo a estirpe que apresenta um resultado mais constante nas 4 microplacas. A estirpe L558 também tem uma posição relativamente constante nos gráficos. Estas diferenças entre as microplacas podem ser devidas às causas já nomeadas para o que ocorreu no gráfico da Figura 3.16.

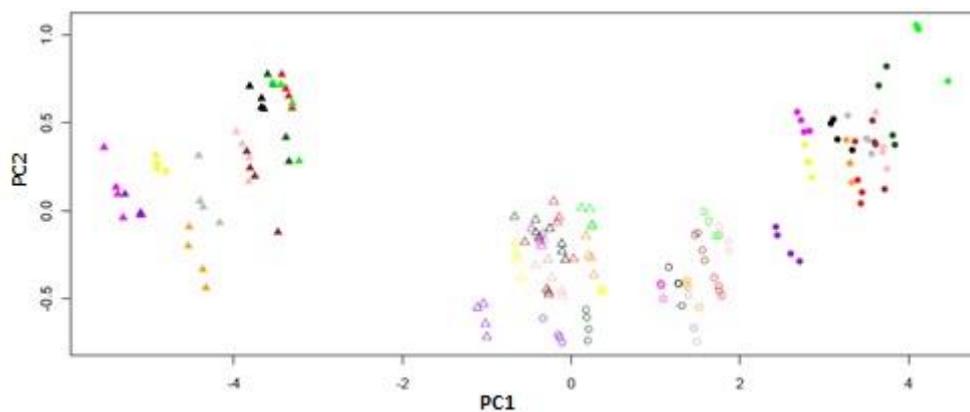


Figura 3.16 – Análise de componentes principais para os espectros de estirpes diferentes: L558 (amarelo), L709 (roxo), L718 (laranja), L724 (rosa), L734 (castanho), L739 (cinzento), L748 (preto), L752 (magenta), L756 (vermelho), Zymaflore VL1 (verde escuro) e S288c (verde) em 4 microplacas (Δ, ▲, ○ e ●).

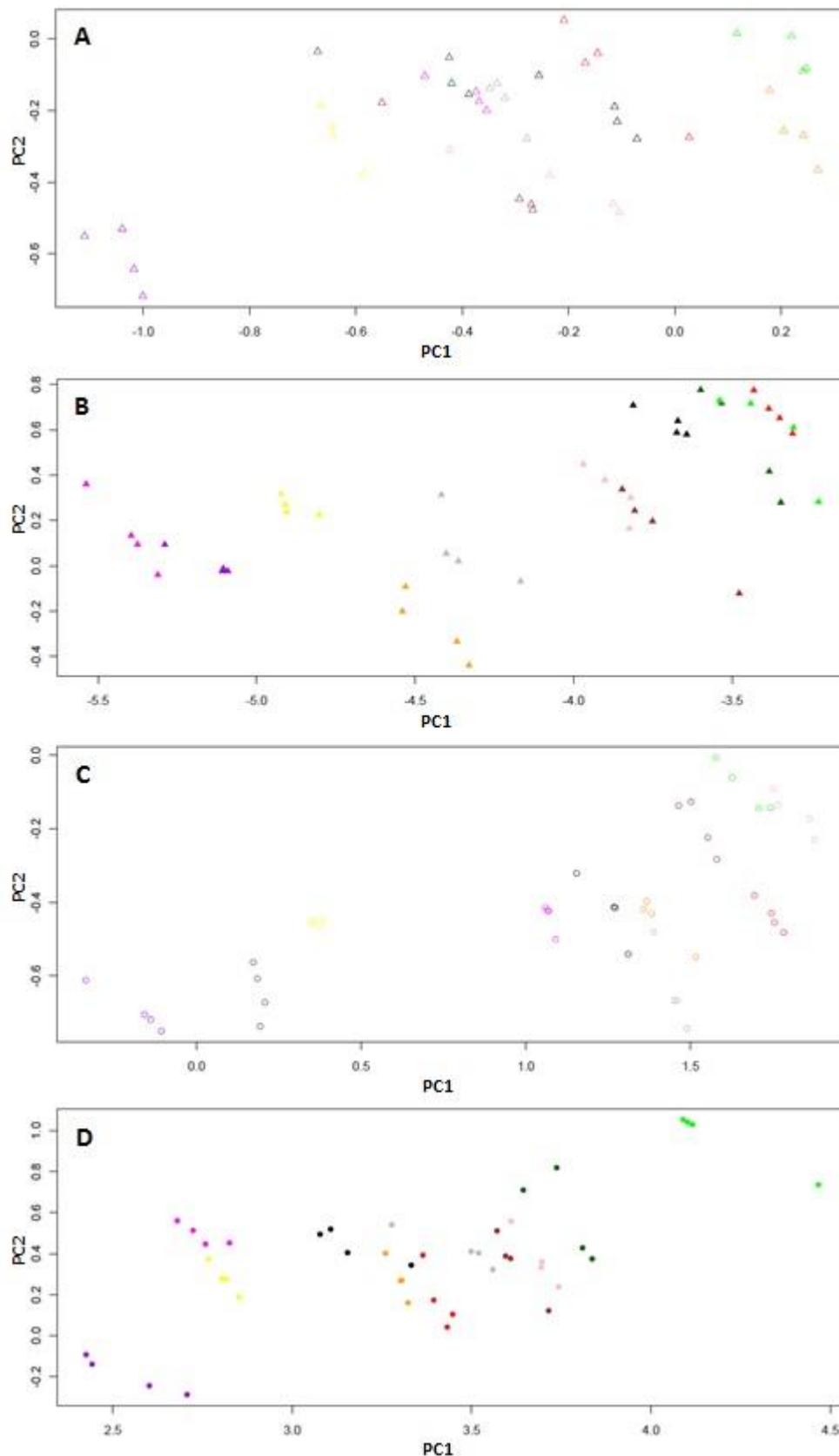


Figura 3.17 – Análise de componentes principais para os espectros de estirpes diferentes: L558 (amarelo), L709 (roxo), L718 (laranja), L724 (rosa), L734 (castanho), L739 (cinzento), L748 (preto), L752 (magenta), L756 (vermelho), Zymaflore VL1 (verde escuro) e S288c (verde); em 4 microplacas: A (Δ), B (\blacktriangle), C (\circ) e D (\bullet).

Como através da RPCA não foi possível obter resultados reprodutíveis entre microplacas, resolveu-se analisar os espectros por PLS-DA. Com esta análise pretende-se minimizar os efeitos provocados pelos erros sistemáticos maximizando as semelhanças entre os espectros em vez das diferenças, como acontece na RPCA. Na Figura 3.18 encontra-se a representação gráfica da análise por PLS-DA. De uma maneira geral, as réplicas de cada estirpe em cada microplaca mantêm-se agrupadas e a separação entre as estirpes de cada microplaca foi reduzida, em relação à análise por RPCA. Contudo, a mesma estirpe de cada microplaca não se encontram agrupadas. As estirpes L709, S288c e Zymaflore VL1 de 3 microplacas (azul, vermelho e verde) são as estirpes que se encontram mais próximas entre si nas diferentes microplacas. No entanto, cada uma destas estirpes de cada microplaca, encontra-se, de um modo geral, mais próxima de outras estirpes, não se podendo dizer que existe um agrupamento entre a mesma estirpe de cada uma das 3 microplacas.

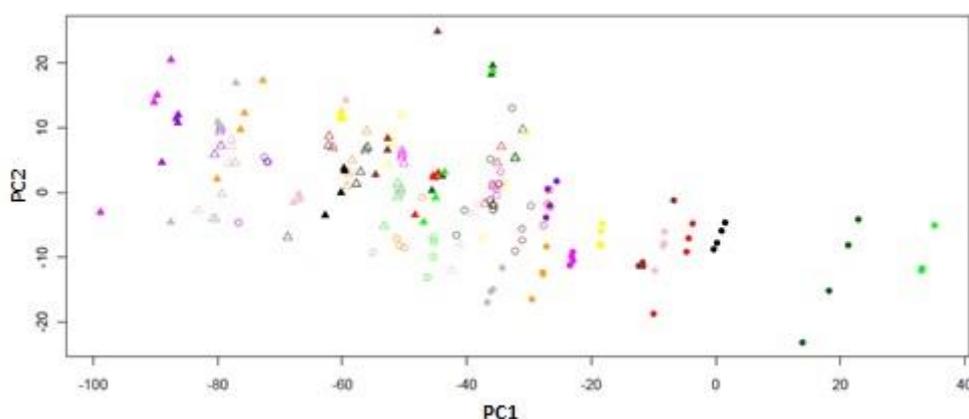


Figura 3.18 – Análise por PLS-DA para os espectros de estirpes diferentes: L558 (amarelo), L709 (roxo), L718 (laranja), L724 (rosa), L734 (castanho), L739 (cinzento), L748 (preto), L752 (magenta), L756 (vermelho), Zymaflore VL1 (verde escuro) e S288c (verde) em 4 microplacas (Δ , \blacktriangle , \circ e \bullet).

Determinou-se ainda a probabilidade de prever a identidade de uma estirpe utilizando como modelo metade das réplicas dos espectros e a outra metade como objeto a identificar. Os coeficientes de previsão obtidos são inferiores a 0,2, o que indicam que a probabilidade de um espectro pertencer a uma determinada estirpe é inferior a 20%, não sendo assim possível, através deste método, determinar a identidade de uma estirpe através do espectro.

Estes resultados demonstram que utilizando a análise por PLS-DA também não é possível distinguir estirpes diferentes de 4 microplacas analisadas em simultâneo. Esta dificuldade pode dever-se a um conjunto de erros sistemáticos que provocam a

falta de reprodutibilidade destas análises que, com as condições tecnológicas e de análise matemática atuais, não são possíveis de eliminar.

3.3. Análise de isolados isogênicos da estirpe comercial Zymaflore VL1

Para determinar até que ponto seria possível distinguir isolados geneticamente muito semelhantes, foram analisados nove isolados da estirpe Zymaflore VL1, que originaram de uma vinha próxima de uma adega onde esta estirpe comercial foi utilizada durante anos consecutivos. Como referência, foi utilizada a estirpe-mãe VL1, conforme esta estirpe é obtida na empresa produtora, bem como a estirpe laboratorial S288c (Tabela 2.1).

As estirpes foram inoculadas em 4 microplacas do mesmo lote com meio YPD preparado no mesmo dia, para verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos nas diferentes microplacas. Cada estirpe teve 8 réplicas por microplaca, conforme esquematizado na Figura 3.19. Dessas 8, foram obtidos espectros das 4 em que se observou um melhor crescimento.

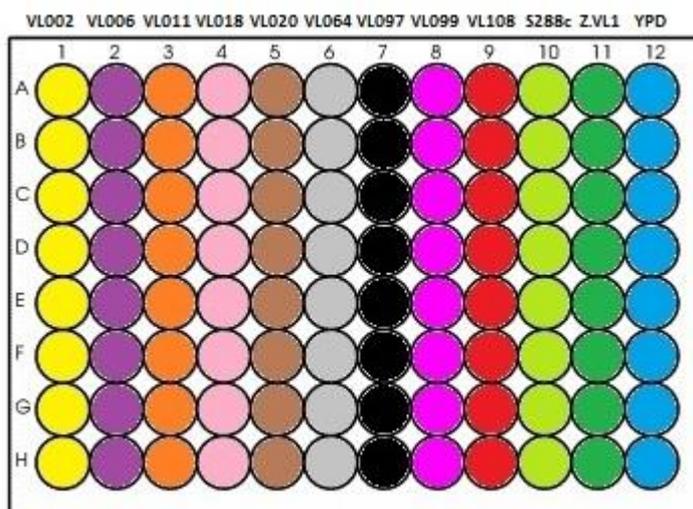


Figura 3.19 – Representação esquemática de uma microplaca. A cada estirpe inoculada corresponde uma cor, com a exceção da última coluna (coluna 12) que contém apenas meio YPD agarizado (azul). Cada estirpe foi inoculada em 8 poços. As estirpes utilizadas são: VL002 (amarelo), VL006 (roxo), VL011 (laranja), VL018 (rosa), VL020 (castanho), VL064 (cinza), VL097 (preto), VL099 (magenta), VL108 (vermelho), S288c (verde) e Zymaflore VL1 (verde escuro).

Os espectros foram obtidos na zona dos 450 – 850 nm (Figura 3.20). A nível espectral não são observadas diferenças significativas, procedendo-se, portanto, à

análise por RPCA. A RPCA foi realizada com duas componentes: PC1, representando 87,0% da variabilidade, e PC2, com 10,8% da variabilidade.

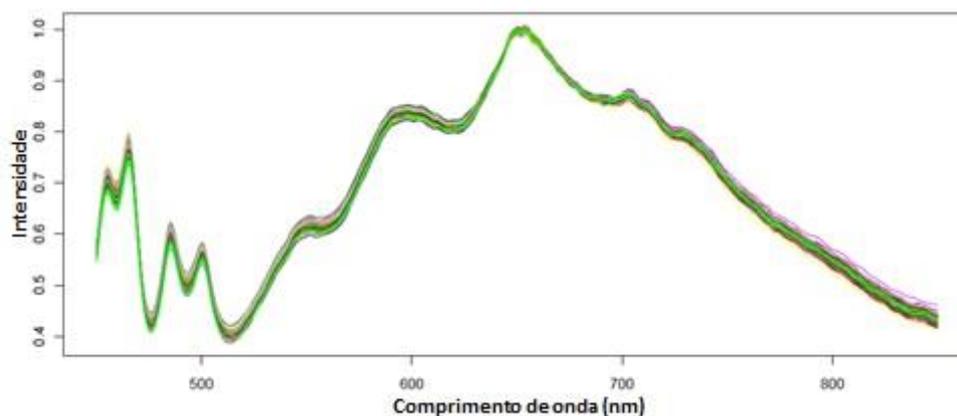


Figura 3.20 – Espectros UV-Vis-SWNIR de 4 microplacas do mesmo lote com meio YPD preparado no mesmo dia inoculadas com as estirpes VL002 (amarelo), VL006 (roxo), VL011 (laranja), VL018 (rosa), VL020 (castanho), VL064 (cinzento), VL097 (preto), VL099 (magenta), VL108 (vermelho), S288c (verde) e Zymaflore VL1 (verde escuro).

A Figura 3.21 e a Figura 3.22 representam a relação entre estas duas componentes na RPCA das 4 microplacas e de cada microplaca individualmente, respetivamente. Em ambas as figuras, de uma maneira geral, verifica-se uma boa reprodutibilidade das réplicas dos diferentes isolados e uma separação entre os agrupamentos de cada isolado. Na Figura 3.21 observa-se um agrupamento para cada conjunto de espectros de uma microplaca. Estes resultados são semelhantes aos obtidos na análise anterior às 11 estirpes diferentes. Na Figura 3.22, a relação entre os diferentes isolados (a distância entre cada uma no gráfico) é, de um modo geral, diferente em cada microplaca. Estas diferenças entre microplacas observadas nas duas figuras dever-se-ão às mesmas razões apontadas na análise a estirpes diferentes. Na Figura 3.21, algumas microplacas apresentam uma distinção pouco nítida entre alguns isolados diferentes, sendo que na Figura 3.22 essa distinção já é mais nítida para cada microplaca. A estirpe S288c é uma estirpe geneticamente mais diferente dos restantes isolados, contudo esta estirpe encontra-se em todos os gráficos de RPCA próxima dos restantes isolados.

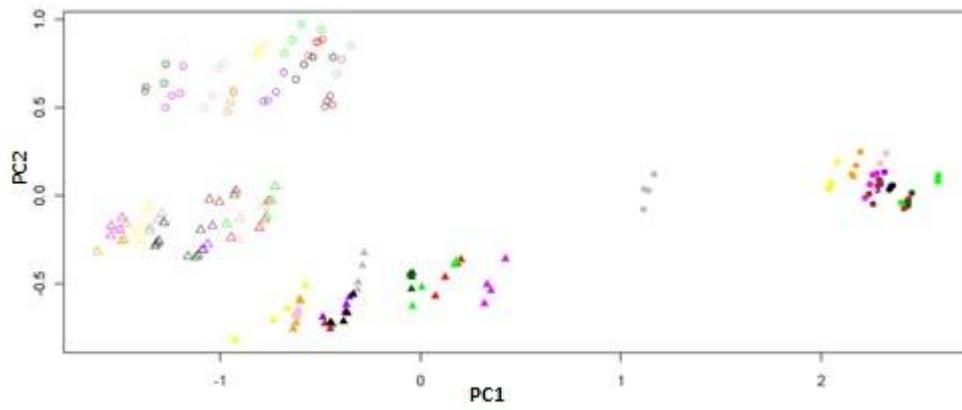


Figura 3.21 – Análise de componentes principais para os espectros de VL002 (amarelo), VL006 (roxo), VL011 (laranja), VL018 (rosa), VL020 (castanho), VL064 (cinzento), VL097 (preto), VL099 (magenta), VL108 (vermelho), Zymaflore VL1 (verde escuro) e S288c (verde) em 4 microplacas (Δ , \blacktriangle , \circ e \bullet).

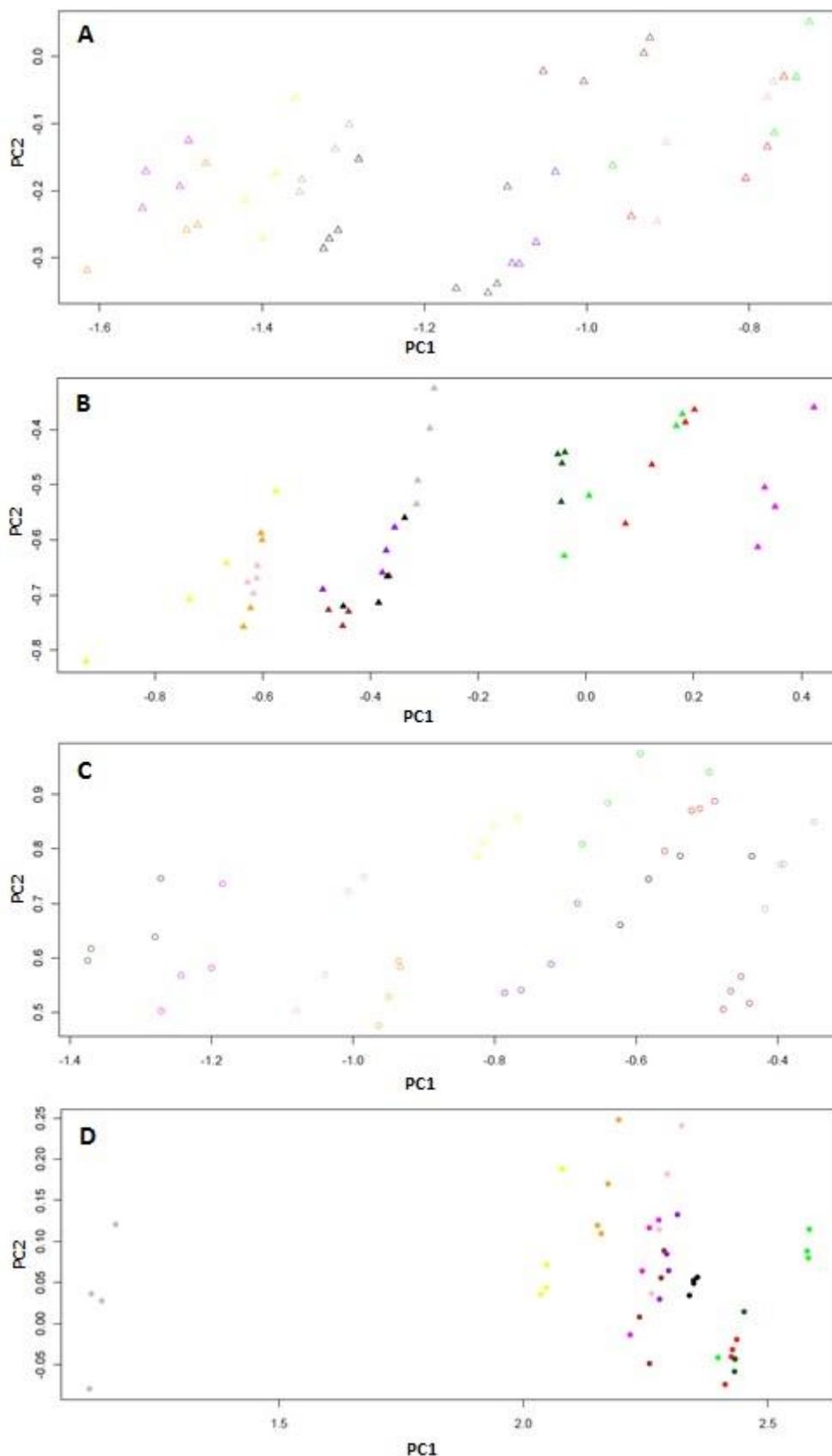


Figura 3.22 – Análise de componentes principais para os espectros de VL002 (amarelo), VL006 (roxo), VL011 (laranja), VL018 (rosa), VL020 (castanho), VL064 (cinzento), VL097 (preto), VL099 (magenta), VL108 (vermelho), Zymaflore VL1 (verde escuro) e S288c (verde) em 4 microplacas: A (Δ), B (\blacktriangle), C (\circ) e D (\bullet).

3.4. Análise espectral de uma estirpe durante o tempo de crescimento

Nas análises anteriores, colocou-se a hipótese de que a diferença temporal de aquisição dos espectros entre as diferentes microplacas poderia interferir com as análises espectrais das estirpes interferindo depois com os resultados obtidos. Para verificar este fator, inoculou-se numa microplaca com YPD a estirpe S288c em diferentes poços e realizaram-se as aquisições espectrais de duas em duas horas durante 3 dias, como esquematizado na Figura 3.23. Devido aos danos causados pelo feixe de luz durante as leituras ao crescimento da estirpe na microplaca, cada leitura teve que ser realizada num poço diferente da microplaca.

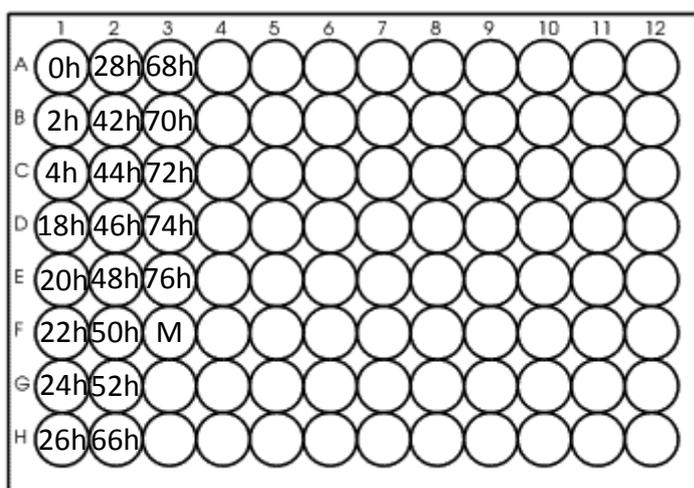


Figura 3.23 – Representação esquemática de uma microplaca. Localização do poço correspondente a cada tempo em que se realizou uma leitura do espectro da estirpe S288c e a leitura do espectro do meio YPD (M).

Na Figura 3.24 observam-se os espectros da estirpe S288c obtidos na região dos 450 – 850 nm nos diferentes tempos de aquisição e o espectro do meio YPD. Neste intervalo espectral observa-se um espectro semelhante ao do meio YPD que corresponde ao tempo 0 h de crescimento da estirpe S288c. Dois espectros correspondentes aos tempos 2 h e 4 h de crescimento já apresentam algumas diferenças em relação ao espectro do meio e do de 0 h de crescimento. Dois outros conjuntos de espectros são ainda observáveis neste gráfico, sendo um correspondente às aquisições ocorridas entre as 18 h e as 28 h de crescimento e o outro às aquisições ocorridas entre as 42 h e as 76 h. Para comprovar estas observações, realizou-se uma análise por RPCA dos espectros. Duas componentes

foram utilizadas nesta análise: a PC1 que representa 97,50% da variabilidade e a PC2 com 1,98%.

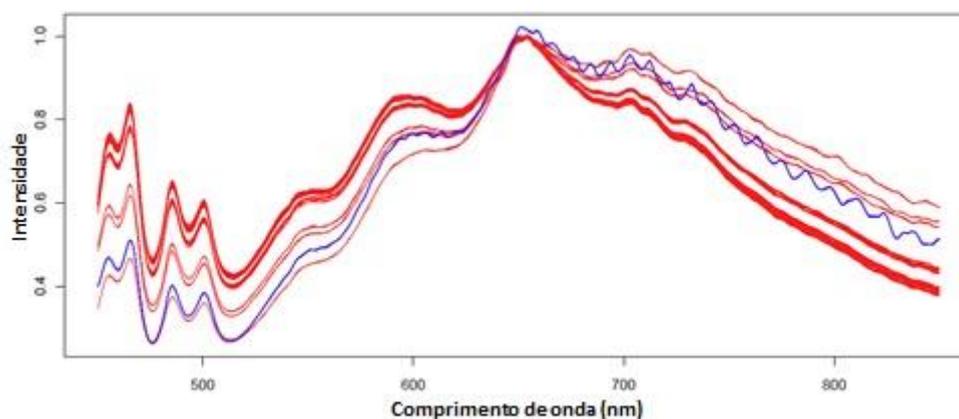


Figura 3.24 – Espectros UV-Vis-SWNIR da estirpe S288c em diferentes tempos de crescimento (vermelho) e do meio YPD (azul).

Na Figura 3.25 encontra-se a representação gráfica da relação entre as duas componentes principais, sendo possível observar um resultado semelhante ao que já se tinha observado nos espectros. O espectro de 0 h de crescimento encontra-se próximo do espectro do meio YPD, os espectros de 2 h e 4 h de crescimento encontram-se agrupados e localizados entre o agrupamento dos espectros do meio YPD e 0 h de crescimento e os agrupamentos dos espectros dos restantes tempos de crescimento. Os espectros com um crescimento entre 18 h e 28 h encontram-se agrupados e os espectros com um crescimento entre as 42 h e as 76 h encontram-se noutra agrupamento. Estes resultados indicam que existem diferenças significativas nos espectros durante o crescimento das estirpes até, pelo menos, as 42 h de crescimento, a partir da qual, até completar os 3 dias de crescimento, não se observam diferenças significativas. Portanto, uma análise realizada ao longo do 3º dia de crescimento, como as que se realizaram nas análises das estirpes e dos isolados anteriores, não interfere nos resultados obtidos, sendo um fator que se pode excluir como sendo uma causa para as diferenças encontradas na análise de espectros em diferentes microplacas.

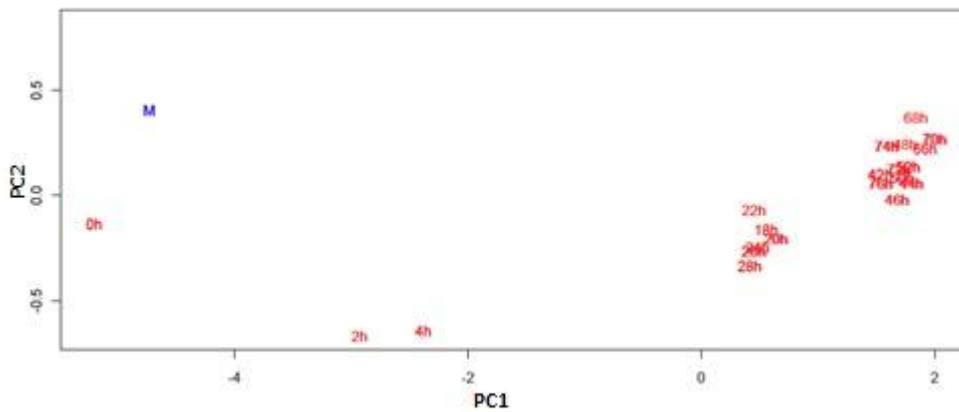


Figura 3.25 – Análise de componentes principais para os espectros da estirpe S288c em diferentes tempos de crescimento (vermelho) e do meio YPD (azul).

3.5. Análise de mutantes de deleção de *S. cerevisiae* (coleção EUROSCARF)

O passo seguinte foi tentar verificar se era possível distinguir isolados com base em alterações à membrana originadas por mutações de deleção em genes que codificam proteínas membranares. Para isso, foram utilizadas as estirpes W303,jen1Δ, W303,ady2Δ e W303,gup1Δ (Tabela 2.1), que possuem deleções nas proteínas membranares transportadoras de lactato, acetato e glicerol, respetivamente, juntamente com a estirpe selvagem W303, que não possui qualquer deleção.

Nesta experiência, uma microplaca com meio YPD agarizado, inoculada com as 4 estirpes foi utilizada, cada uma tendo 8 réplicas, conforme esquematizado na Figura 3.26. Das 8 réplicas de cada estirpe, foram obtidos espectros das 4 que tiveram um melhor crescimento.

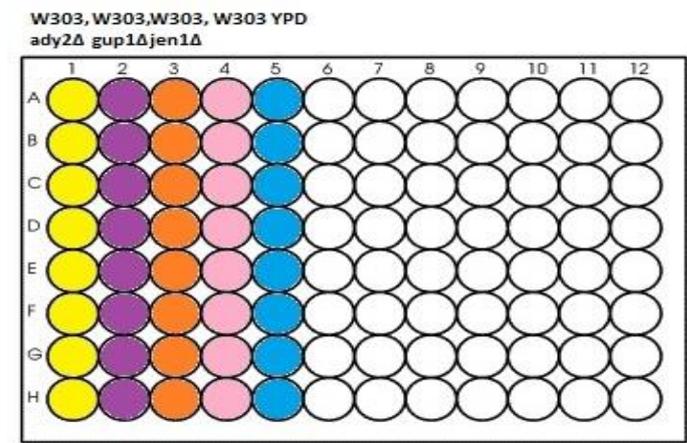


Figura 3.26 – Representação esquemática de uma microplaca. A cada estirpe inoculada corresponde uma cor, com a exceção da coluna 5 que contém apenas meio YPD agarizado (azul). Cada estirpe foi inoculada em 8 poços. As estirpes utilizadas são: W303,ady2Δ (amarelo), W303,gup1Δ (roxo), W303,jen1Δ (laranja) e W303 (rosa).

Como se pode observar na Figura 3.27, existe uma grande semelhança espectral a olho nu, não sendo possível distinguir estas estirpes. Procedeu-se à determinação do número de componentes a ser utilizada na RPCA. A RPCA foi realizada com duas componentes: PC1, representando 97,40% da variabilidade, e PC2, com 1,08%. Observa-se que as réplicas de cada estirpe ficaram bem agrupadas e que houve uma separação nítida entre os conjuntos de réplicas de cada estirpe (Figura 3.28).

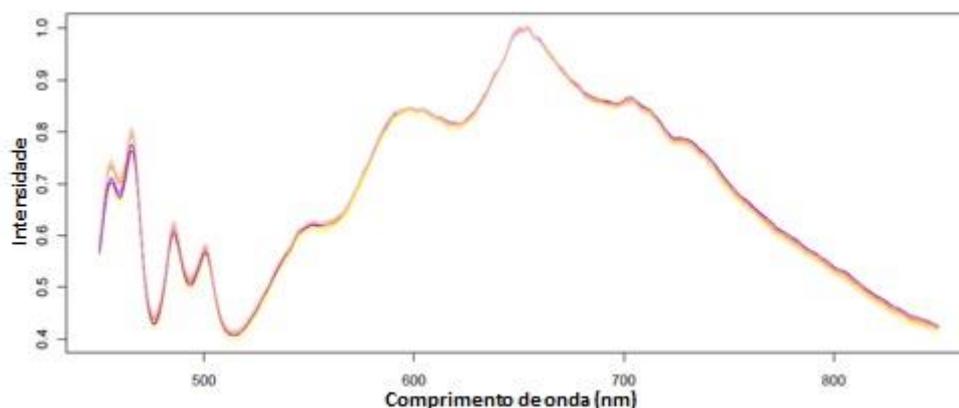


Figura 3.27 – Espectros UV-Vis-SW NIR das estirpes W303 (amarelo), W303,jen1Δ (roxo), W303,ady2Δ (laranja) e W303,gup1Δ (rosa), inoculadas numa microplaca com YPD, tendo cada estirpe 4 réplicas.

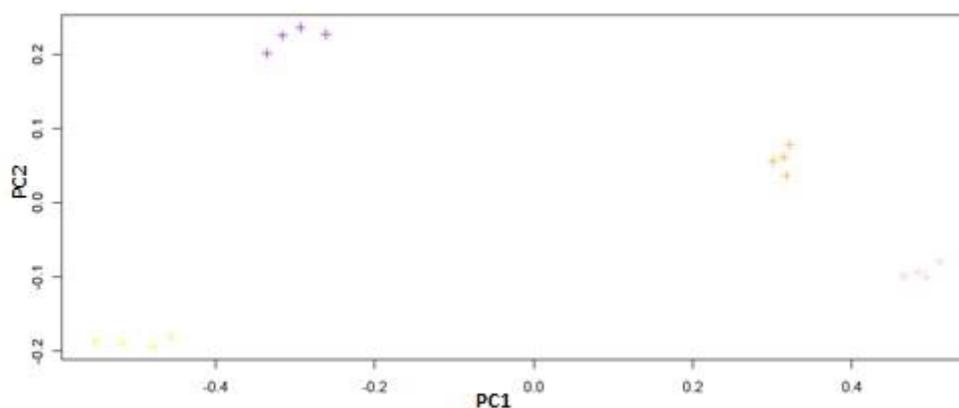


Figura 3.28 – Análise de componentes principais dos espectros das estirpes W303 (+), W303,jen1Δ (+), W303,ady2Δ (+) e W303,gup1Δ (+).

Utilizando esta metodologia foi possível com esta experiência distinguir entre as diferentes estirpes mutantes e selvagem. Contudo, tendo em conta as experiências anteriores com as estirpes diferentes e os isolados da estirpe Zymaflore VL1, este resultado não deverá ser reproduzível se realizado em outra microplaca e esta

distinção que se verifica nesta análise entre as estirpes mutantes e selvagem poderá não dever-se somente a diferenças espectrais causadas pela diferente composição membranar, mas também a variações na quantidade de meio presente em cada poço.

3.6. Análise espectral de estirpes desconhecidas de *S. cerevisiae* e correspondência com dados de tipagem molecular

Em todas as experiências realizadas até agora, a identidade de cada estirpe que foi analisada era conhecida. Para validar este método espectroscópico é necessário verificar a possibilidade de se conseguir distinguir isolados da estirpe *S. cerevisiae* sem ter um conhecimento prévio da sua identidade. Assim, os isolados S01, S02, S13, S22 e S24 foram analisados para verificar se esta técnica espectroscópica conseguiria determinar quantas estirpes diferentes detetava e comparar com os resultados dos perfis interdelta realizados previamente (Figura 3.29).

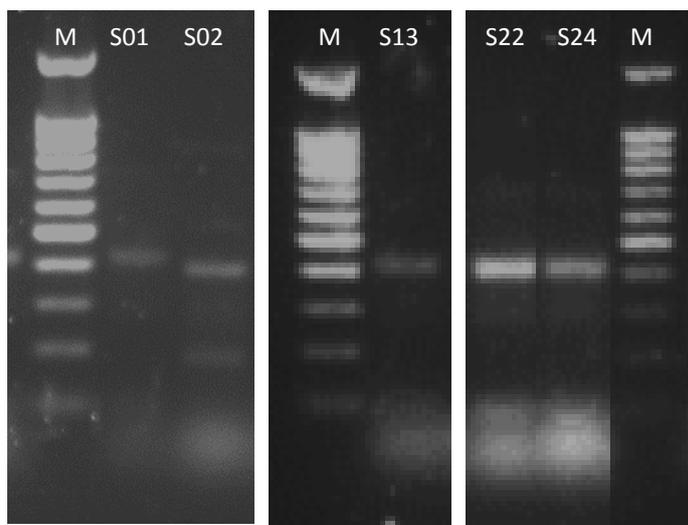


Figura 3.29 – Perfis interdelta realizados obtidos das estirpes S01, S02, S13, S22 e S24.

Uma microplaca com meio YPD agarizado, inoculada com os 5 isolados foi utilizada, cada uma tendo 8 réplicas, conforme esquematizado na Figura 3.30. Das 8 réplicas de cada estirpe, foram obtidos espectros das 4 que tiveram um melhor crescimento.

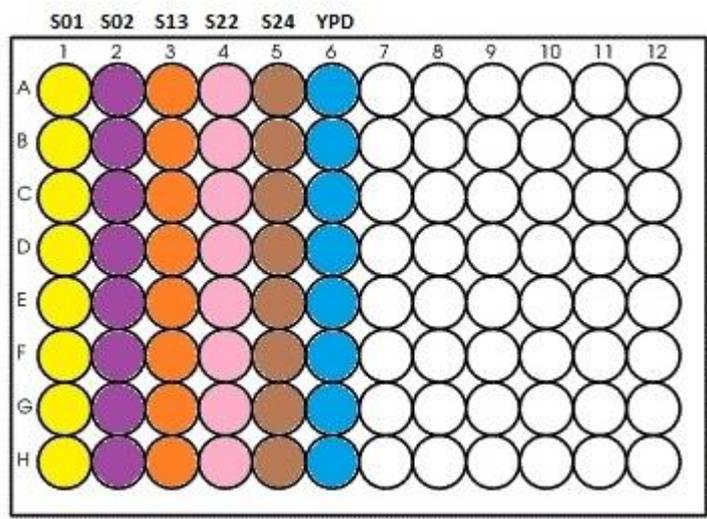


Figura 3.30 – Representação esquemática de uma microplaca. A cada estirpe inoculada corresponde uma cor, com a exceção da coluna 6 que contém apenas meio YPD agarizado (azul). Cada estirpe foi inoculada em 8 poços. As estirpes utilizadas são: S01 (amarelo), S02 (roxo), S13 (laranja), S22 (rosa) e S24 (castanho).

Os espectros destes isolados foram adquiridos (Figura 3.31), sendo os espectros obtidos muito semelhantes entre eles. Foi necessário recorrer à análise por RPCA utilizando duas componentes que totalizavam 97,68% da variância (PC1 com 96,60% e PC2 com 1,08%). Segundo o gráfico obtido da RPCA (Figura 3.32), os isolados S02 e S22 parecem representar a mesma estirpe e os restantes isolados representariam, cada um, uma estirpe diferente. Quando se compara estes resultados com os dos perfis interdelta, verifica-se que não são coincidentes. Nos perfis interdelta (Figura 3.29), os isolados S01, S13, S22 e S24 possuem o mesmo perfil e o isolado S02 possui um perfil diferente, ou seja, o isolado S02 será uma estirpe e os restantes isolados serão uma estirpe diferente.

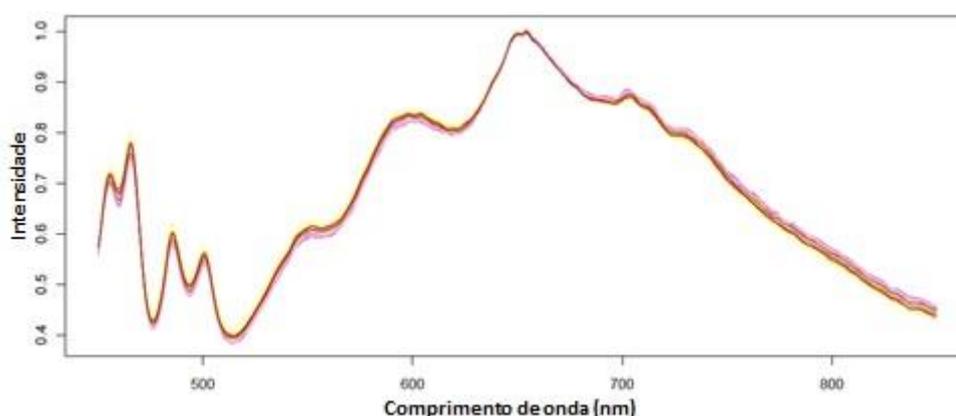


Figura 3.31 – Espectros UV-Vis-SWNIR dos isolados S01 (amarelo), S02 (roxo), S13 (laranja), S22 (rosa) e S24 (castanho), inoculadas numa microplaca com YPD, tendo cada estirpe 4 réplicas.

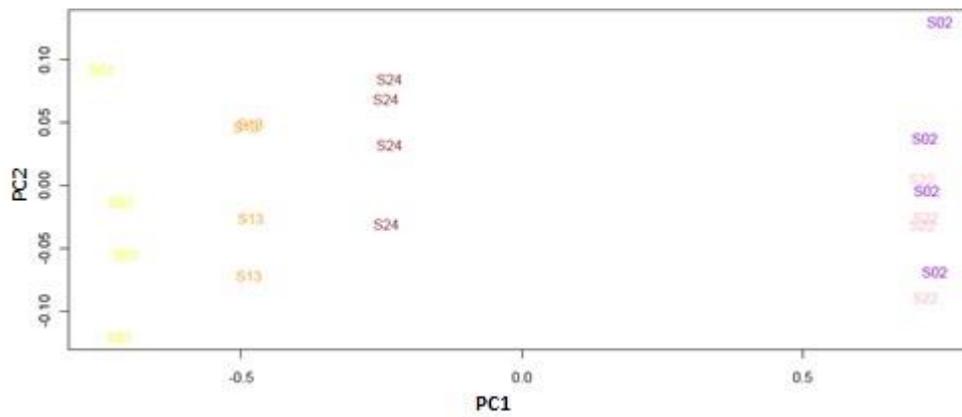


Figura 3.32 – Análise de componentes principais dos espectros dos isolados S01 (amarelo), S02 (roxo), S13 (laranja), S22 (rosa) e S24 (castanho).

Com base nos resultados da análise espectral e dos perfis interdelta verifica-se então que esta técnica, na situação atual, não poderá ser utilizada para distinguir estirpes cuja identidade seja desconhecida.

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

O objetivo deste estudo foi realizar um ensaio espectrométrico miniaturizado e de alto rendimento para a análise de estirpes de *S. cerevisiae* inoculadas em microplaca de 96 poços. Vários conjuntos de estirpes foram analisados: estirpes de origens de isolamento e localização geográfica diferentes; isolados isogênicos da estirpe comercial Zymaflore VL1; estirpes com deleções em genes que codificam proteínas membranares; e estirpes desconhecidas.

Uma análise espectroscópica exploratória utilizando análise por RPCA foi realizada nas diferentes experiências. Nas análises realizadas em cada microplaca individualmente, as estirpes de origens de isolamento e localização geográfica diferentes e os isolados da estirpe Zymaflore VL1 (Tabela 2.1) apresentaram uma boa reprodutibilidade das réplicas e estavam, na sua maioria, bem distintas no gráfico da análise por RPCA (Figura 3.13 e Figura 3.22). Contudo, em ambas as experiências, numa análise comparativa entre 4 microplacas com o mesmo conjunto de estirpes verificou-se que as diferenças espectrais representadas no gráfico da análise por RPCA entre cada microplaca eram diferentes (Figura 3.17 e Figura 3.22), não havendo reprodutibilidade dos resultados de microplaca para microplaca analisada. Além disso, quando se juntavam as 4 microplacas analisadas num único gráfico de análise por RPCA, as estirpes iguais presentes nas diferentes microplacas não se agrupavam, na sua maioria (Figura 3.16 e Figura 3.21). Quando se comparou a semelhança espectral das estirpes diferentes com a sua origem de isolamento e localização geográfica era esperado observar-se semelhanças espectrais entre estirpes com maior proximidade geográfica e/ou provenientes de origens de isolamentos semelhantes, pois poderiam ter uma composição bioquímica intracelular e membranares mais semelhantes. Contudo, não foram observadas relações entre a semelhança espectral e a proximidade geográfica ou a origem de isolamento. Na análise aos isolados da estirpe Zymaflore VL1, apesar da semelhança genética entre eles, a estirpe S288c incluída nesta análise não era espectralmente mais diferente em relação aos isolados, encontrando-se próximo de determinados isolados (Figura 3.22). Estes resultados sugerem a presença de fatores que estejam a interferir com a aquisição espectral das estirpes. A diferença na composição entre microplacas foi tida em conta na altura da realização dos ensaios preliminares, tendo-se verificado que microplacas de dois diferentes lotes apresentavam diferenças espectrais (Figura 3.7-A). A composição do meio YPD utilizado também foi analisada previamente, tendo-se verificado que meios preparados em alturas diferentes apresentam espectros distintos (Figura 3.7-B), possivelmente devido aos limites do equipamento utilizado durante a preparação dos meios. A quantidade de meio presente em cada poço também poderá interferir com a leitura

espectroscópica da estirpe. Este facto já tinha sido observado num trabalho realizado com a espectroscopia UV-Vis-SWNIR para distinção de estirpes [37], em que a espessura do meio presente na placa interferia com as leituras espectroscópicas por causar um efeito de dispersão da luz. A espessura da cultura também foi tida em conta neste trabalho [37] como uma medida para melhorar a qualidade do sinal, pois uma cultura mais espessa impede que uma maior quantidade de feixe de luz penetre no meio o que vai aumentar a qualidade do espectro da estirpe diminuindo a interferência do meio. Este fator não foi analisado durante a realização das experiências, tendo-se só verificado se a cultura preenchia completamente o poço da microplaca. A diferença temporal ocorrida entre as leituras das diferentes microplacas foi considerada também como uma possível causa para a falta de reprodutibilidade entre as microplacas, mas uma análise realizada com a estirpe S288c ao longo de 76 h mostrou que não ocorriam diferenças espectrais significativas entre as 42 h e 76 h de crescimento (Figura 3.25), tendo este fator sido descartado.

Na análise das estirpes com deleções em genes que codificam proteínas da membrana celular, obteve-se uma boa distinção entre as diferentes estirpes mutantes e a estirpe selvagem (Figura 3.28). Mas este resultado pode não ser reprodutível se se repetir a experiência, tendo em conta os resultados das análises às estirpes diferentes e aos isolados da estirpe Zymaflore VL1.

Na análise de validação deste método espectroscópico, o número de estirpes determinado por análise espectroscópica não correspondeu ao determinado pela análise dos perfis interdelta (Figura 3.29 e Figura 3.32). Através da análise por RPCA dos espectros, poder-se-ia dizer que dos 5 isolados analisados havia 4 estirpes diferentes, considerando-se dois dos isolados a mesma estirpe. Contudo os perfis interdelta indicam que só existiam 2 estirpes, sendo 4 dos isolados a mesma estirpe. Estes resultados indicam que esta técnica espectroscópica não pode, no estado atual, ser utilizada para determinar o número de estirpes diferentes presente em diferentes isolados, mesmo que analisados na mesma microplaca.

O suporte utilizado é ideal à realização das leituras espectroscópicas em microplaca, pois permite realizar leituras num ambiente isolado da luz exterior e a sonda fica verticalmente bem colocada, evitando mudanças de ângulo da posição da sonda na altura da leitura minimizando os efeitos de dispersão. As microplacas que foram utilizadas neste trabalho são feitas de poliestireno que absorve a luz UV impedindo que se utilize esta zona espectral na análise, apesar de ser uma importante zona discriminatória. Uma maneira de atenuar os efeitos provocados pela microplaca na região do UV será utilizar microplacas transparentes ao UV. Com este tipo de microplacas, diminui-se a interferência que ocorre nesta região do espectro com microplacas “comuns”, sendo que esta região espectral poderia ser incluída na

análise, o que possivelmente melhorava a distinção entre estirpes diferentes e/ou agrupava melhor as réplicas das diferentes estirpes.

No estado atual da espectroscopia, as técnicas espectroscópicas FTIR e Raman têm sido as preferidas na identificação de microrganismos, devido às atualizações tecnológicas que têm ocorrido nas últimas décadas e ao crescimento da base de dados espectrais de microrganismos. Contudo, a maioria das análises são realizadas recorrendo à destruição parcial ou mesmo total da amostra a analisar, pois necessitam que esta passe por um processo de preparação para poder ser analisada.

Atualmente, as técnicas existentes para distinção e identificação de estirpes de microrganismos estão dependentes de reagentes (PCR) e equipamentos caros ou são metodologias demoradas (análise bioquímica).

A técnica espectroscópica desenvolvida neste trabalho como método para aquisição e análise de espectros de estirpes de *S. cerevisiae*, é muito fácil de utilizar, pouco dispendiosa, rápida na obtenção de resultados e não necessita que as amostras sejam destruídas. Só necessita de reagentes para a preparação do meio e os consumíveis necessários para a análise são bastante económicos e fazem parte do que é habitual encontrar num laboratório de microbiologia. A utilização de microplacas para a aquisição de espectros permite uma análise a um grande número de estirpes na mesma experiência, sendo necessário 4 réplicas por estirpe para uma análise mais viável. Assim, esta é uma técnica onde o valor gasto por amostra é muito baixo, principalmente quando comparado com os consumíveis e reagentes utilizados nos métodos de análise genética. Para uma melhor aquisição do espectro da amostra, é necessário que a cultura esteja bem desenvolvida e o poço bem preenchido, sendo este passo o mais demorado nesta metodologia.

Sendo uma técnica no início do seu desenvolvimento, verificou-se a ocorrência de vários problemas sistemáticos nas experiências realizadas. Estes eram inerentes ao material utilizado, variação na composição das microplacas e do meio. Algumas soluções já foram apresentadas para tentar minimizar essas influências, no sentido de se conseguir obter resultados mais fiáveis e reprodutíveis. Um ensaio adicional que se poderia fazer seria obter espectros de estirpes através da colocação de uma porção de cultura diretamente numa superfície espelhada, diminuindo assim qualquer fator externo relacionado com o meio ou a microplaca. Os espectros obtidos serviriam de comparação para as experiências seguintes realizadas com estirpes em microplaca com meio já com algumas das soluções indicadas aqui colocadas em prática.

Através desta técnica, foi, portanto, possível distinguir estirpes de diferentes origens de isolamento e localizações geográficas, isolados geneticamente muito semelhantes e estirpes com deleções em genes que codificam proteínas da

membrana celular, desde que a experiência fosse realizada na mesma microplaca preenchida com meio feito no mesmo dia. Mesmo sendo possível esta distinção, as semelhanças espectrais não se relacionaram com as semelhanças genéticas das estirpes.

CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

1. Burns, D.A. and E.W. Ciurczak, *Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition. Practical Spectroscopy*. 2007: CRC Press.
2. Dziuba, B., et al., *Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis*. International Dairy Journal, 2007. **17**(3): p. 183-189.
3. Pavia, D.L., G.M. Lampman, and G.S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*. Third ed. 2001: Thomson Learning.
4. Workman Jr., J. and A. Springsteen, *Applied Spectroscopy: A Compact Reference for Practitioners*. 1998: Academic Press.
5. Gauglitz, G. and T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy*. 2003: WILEY-VCH.
6. Anderson, R.J., D.J. Bendell, and P.W. Groundwater, *Organic Spectroscopic Analysis*. 2004: The Royal Society of Chemistry.
7. Owen, T., *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*. 2000: Agilent Technologies.
8. Stuart, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. 1st ed. 2004, London: John Wiley & Sons, Ltd.
9. Workman, J., *The Handbook of Organic Compounds*. Vol. 3. 2000: ACADEMIC PRESS.
10. de Villiers, A., et al., *Analytical techniques for wine analysis: an African perspective; a review*. Anal Chim Acta, 2012. **730**: p. 2-23.
11. Cozzolino, D., et al., *Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy*. Journal of near Infrared Spectroscopy, 2006. **14**(5): p. 279-289.
12. Pereira, A.C., et al., *Development of a fast and reliable method for long- and short-term wine age prediction*. Talanta, 2011. **86**: p. 293-304.
13. Santos, A.O., et al., *Grape Quality Mapping for Vineyard Differential Harvesting*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2012. **55**(2): p. 193-204.
14. MARTINS, R., V.V. LOPES, and A.C.S. FERREIRA, *WinePAT : Facing the Complexity of Grape Quality Management and Delivering an High-throughput Device*. Alabe 2009 - a inovação no sector vitivinícola, 2009.
15. Urbano-Cuadrado, M., et al., *Near infrared reflectance, spectroscopy and multivariate analysis in enology - Determination or screening of fifteen parameters in different types of wines*. Analytica Chimica Acta, 2004. **527**(1): p. 81-88.
16. Kennedy, J.A., *Grape and wine phenolics: Observations and recent findings*. Ciencia E Investigacion Agraria, 2008. **35**(2): p. 107-120.
17. Fernandez-Novales, J., et al., *Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines*. Food Research International, 2009. **42**(2): p. 285-291.
18. Di Egidio, V., et al., *NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation*. European Food Research and Technology, 2010. **230**(6): p. 947-955.
19. Cozzolino, D., H.E. Smyth, and M. Gishen, *Feasibility study on the use of visible and near-infrared Spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(26): p. 7703-7708.
20. Liu, L., et al., *Geographic classification of Spanish and Australian tempranillo red wines by visible and near-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(18): p. 6754-6759.
21. Carreto, L., et al., *Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity*. BMC Genomics, 2008. **9**.
22. Schuller, D. and M. Casal, *The genetic structure of fermentative vineyard-associated Saccharomyces cerevisiae populations revealed by microsatellite analysis*. Antonie Van

- Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2007. **91**(2): p. 137-150.
23. Schuller, D., et al., *Genetic characterization of commercial Saccharomyces cerevisiae isolates recovered from vineyard environments*. Yeast, 2007. **24**(8): p. 625-636.
 24. vanderVossen, J. and H. Hofstra, *DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: Development and implementation*. International Journal of Food Microbiology, 1996. **33**(1): p. 35-49.
 25. Almarashi, J.F.M., et al., *Raman Spectroscopy of Bacterial Species and Strains Cultivated under Reproducible Conditions*. Spectroscopy-an International Journal, 2012. **27**(5-6): p. 361-365.
 26. Koluman, A., G. Celik, and T. Unlu, *Salmonella identification from foods in eight hours: A prototype study with Salmonella Typhimurium*. Iranian journal of microbiology, 2012. **4**(1): p. 15-24.
 27. Stephen, K.E., et al., *Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) for the discrimination of Arthrobacter strains based on variations in cell surface composition*. Analyst, 2012. **137**(18): p. 4280-4286.
 28. Tang, M.J., et al., *Characterization and analysis of mycobacteria and Gram-negative bacteria and co-culture mixtures by Raman microspectroscopy, FTIR, and atomic force microscopy*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(5): p. 1577-1591.
 29. Santos, C., et al., *Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts*. Research in Microbiology, 2010. **161**(2): p. 168-175.
 30. Kim, S., et al., *Differentiation of crude lipopolysaccharides from Escherichia coli strains using Fourier transform infrared Spectroscopy and chemometrics*. Journal of Food Science, 2006. **71**(2): p. M57-M61.
 31. Dziuba, B. and B. Nalepa, *Identification of Lactic Acid Bacteria and Propionic Acid Bacteria using FTIR Spectroscopy and Artificial Neural Networks*. Food Technology and Biotechnology, 2012. **50**(4): p. 399-405.
 32. Laskin, A.I., S. Sariaslani, and G.M. Gadd, *ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY*. Vol. 70. 2010, Burlington: Academic Press.
 33. Rosch, P., et al., *Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-Raman spectroscopy: application to clean-room-relevant biological contaminations*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(3): p. 1626-37.
 34. Maquelin, K., et al., *Rapid identification of Candida species by confocal Raman microspectroscopy*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(2): p. 594-600.
 35. Maquelin, K., et al., *Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium*. Anal Chem, 2000. **72**(1): p. 12-9.
 36. Cozzolino, D., et al., *Combining near infrared spectroscopy and multivariate analysis as a tool to differentiate different strains of Saccharomyces cerevisiae: a metabolomic study*. Yeast, 2006. **23**(14-15): p. 1089-96.
 37. Silva, J.S., et al., *Feasibility of yeast and bacteria identification using UV-VIS-SWNIR difusive reflectance spectroscopy*. Biosignals 2008: Proceedings of the First International Conference on Bio-Inspired Systems and Signal Processing, Vol 1, ed. P. Encarnacao and A. Veloso. 2008, Setubal: Insticc-Inst Syst Technologies Information Control & Communication. 25-32.
 38. Pretorius, I.S., *Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking*. Yeast, 2000. **16**(8): p. 675-729.
 39. Goffeau, A., et al., *Life with 6000 genes*. Science, 1996. **274**(5287): p. 546, 563-7.
 40. Landry, C.R., et al., *Ecological and evolutionary genomics of Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Ecology, 2006. **15**(3): p. 575-591.
 41. Nielsen, J. and M.C. Jewett, *Impact of systems biology on metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, 2008. **8**(1): p. 122-31.

42. Cavalieri, D., et al., *Evidence for S-cerevisiae fermentation in ancient wine*. Journal of Molecular Evolution, 2003. **57**: p. S226-S232.
43. Barnett, J.A., *A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880*. Yeast, 2000. **16**(8): p. 755-71.
44. Fugelsang, K.C. and C.G. Edwards, *WINE MICROBIOLOGY: Practical Applications and Procedures*. Second ed. 2007: Springer.
45. Fleet, G.H., *Wine yeasts for the future*. FEMS Yeast Res, 2008. **8**(7): p. 979-95.
46. Lambrechts, M.G. and I.S. Pretorius, *Yeast and its importance to wine aroma - a review*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2000. **21**: p. 97-129.
47. Schuller, D. and M. Casal, *The use of genetically modified Saccharomyces cerevisiae strains in the wine industry*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. **68**(3): p. 292-304.
48. Lurton, L., et al., *INFLUENCE OF THE FERMENTATION YEAST-STRAIN ON THE COMPOSITION OF WINE SPIRITS*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1995. **67**(4): p. 485-491.
49. Romano, P., et al., *Metabolic diversity of Saccharomyces cerevisiae strains from spontaneously fermented grape musts*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2003. **19**(3): p. 311-315.
50. Schuller, D., et al., *Ecological survey of Saccharomyces cerevisiae strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal*. Fems Microbiology Ecology, 2005. **51**(2): p. 167-177.
51. Valero, E., et al., *Biodiversity of Saccharomyces yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts*. Fems Yeast Research, 2007. **7**(2): p. 317-329.
52. Fay, J.C. and J.A. Benavides, *Evidence for domesticated and wild populations of Saccharomyces cerevisiae*. Plos Genetics, 2005. **1**(1): p. 66-71.
53. Franco-Duarte, R., et al., *Genotyping of Saccharomyces cerevisiae strains by interdelta sequence typing using automated microfluidics*. Electrophoresis, 2011. **32**(12): p. 1447-1455.
54. Franco-Duarte, R., et al., *Computational approaches for the genetic and phenotypic characterization of a Saccharomyces cerevisiae wine yeast collection*. Yeast, 2009. **26**(12): p. 675-692.
55. Schuller, D., et al., *Genetic Diversity and Population Structure of Saccharomyces cerevisiae Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions*. Plos One, 2012. **7**(2).
56. Ocean Optics, *SpectraSuite users manual*, 2007, URL: <http://www.oceanoptics.com>, Ocean Optics, Inc. World Headquarters.
57. R-Project, *R: A programming environment for data analysis and graphics*, 2010, URL: <http://www.r-project.org>.
58. Martins, R.C., et al., *Relevant principal component analysis applied to the characterisation of Portuguese heather honey*. Natural Product Research, 2008. **22**(17): p. 1560-1582.
59. Naes T, et al., *A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. 2002, Chichester, UK: NIR Publications.
60. Vinzi, V.E., et al., *Handbook of Partial Least Squares: Concepts, Methods and Applications*. 2010: Springer.
61. Paiva, S., et al., *Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2004. **21**(3): p. 201-210.
62. Holst, B., et al., *GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology, 2000. **37**(1): p. 108-124.

63. Casal, M., et al., *The lactate-proton symport of Saccharomyces cerevisiae is encoded by JEN1*. Journal of Bacteriology, 1999. **181**(8): p. 2620-2623.
64. Schuller, D., et al., *Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **231**(1): p. 19-26.