



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**METABOLÔMICA DO VINHO DE LEVEDURADO PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA
DE MASSAS**

Tamires Marques Faria

Orientador: Dra. Mariana Dias Moreira

Co-orientador: Dr. Carlos Alberto Labate

Ouro Branco
Junho/2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

METABOLÔMICA DO VINHO DE LEVEDURADO PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA
DE MASSAS

Tamires Marques Faria

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João del Rei

Orientador: Dra. Mariana Dias Moreira

Co-orientador: Dr. Carlos Alberto Labate

Ouro Branco
Junho/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**METABOLÔMICA DO VINHO DE LEVEDURADO PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA
DE MASSAS**

Tamires Marques Faria

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Dra. Mariana Dias Moreira – Orientador

Dr. Carlos Alberto Labate – examinador 1

Dra. Isabel Cristina Braga Rodrigues – examinador 2

Ouro Branco, 21/06/2018

Sumário

RESUMO.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVO	11
2.1. Objetivos específicos.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Etanol no Brasil	13
3.2. Processo de fermentação para a produção do etanol	14
3.3. Contaminação do processo	17
3.4. Metabólitos primários	18
3.5. Metabolômica	18
3.6. Espectrometria de massas - MS.....	19
3.7. Cromatografia gasosa – GC.....	20
3.8. GC-MS	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Aquisição das amostras	23
4.2. Extração de metabólitos e derivatização	23
4.3. Análise de metabólitos pelo GC/MS.....	24
4.4. Processamento de dados.....	25
4.5. Análise estatística dos dados	25
5. RESULTADOS	27
5.1. Análise Estatística dos parâmetros de eficiência da fermentação (EFIFERM), viabilidade celular e contaminação pelo Teste t.	27
5.2. Análise estatística dos metabólitos obtidos das análises de vinho em relação à eficiência da fermentação (EFIFERM)	29
5.3. Análise estatística dos metabólitos obtidos das análises de vinho em relação viabilidade celular.....	32
5.4. Análise estatística dos metabólitos obtidos das análises de vinho em relação à contaminação bacteriana	35
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO	41

8. REFÊNCIAS	43
--------------------	----

Lista de Figuras

Figura 1: Representação do processo fermentativo de batelada alimentada com reciclo celular adotado pelas destilarias brasileiras.....	16
Figura 2: Representação do processo fermentativo contínuo com reciclo celular adotado pelas destilarias brasileiras	16
Figura 3: Diagrama de blocos representando o sistema de funcionamento do espectrômetro de massas	20
Figura 4: Diagrama de blocos representando o sistema de funcionamento do espectrômetro de massas	21
Figura 5: Análise estatística pelo método de PLS-DA dos metabólitos abundantes nas análises dos grupos com alta e baixa eficiência na fermentação.....	30
Figura 6: Metabólitos importantes selecionados pelo Teste t com limite de 0,05. Os círculos rosas representam metabólitos acima do limite. Os valores p foram transformados por $-\log_{10}$ para que os metabólitos mais significativos (com valores de p menores) sejam plotados na parte superior do gráfico	31
Figura 7: Análise estatística pelo método de PLS-DA dos metabólitos abundantes nas análises dos grupos com alta e baixa viabilidade celular	33
Figura 8: Metabólitos significativos selecionados pelo Teste t com limite de 0,05. Os círculos rosas representam metabólitos acima do limite. Os valores p foram transformados por $-\log_{10}$ para que os metabólitos mais significativos (com valores de p menores) sejam plotados na parte superior do gráfico	35
Figura 9: Análise estatística pelo método de PLS-DA dos metabólitos abundantes nas amostras dos grupos com altos e baixos níveis de contaminação do vinho	36
Figura 10 Metabólitos importantes selecionados pelo Teste t com limite de 0,05. Os círculos rosa representam metabólitos acima do limite. Os valores p foram transformados por $-\log_{10}$ para que os metabólitos mais significativos (com valores de p menores) sejam plotados na parte superior do gráfico.	38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resultado Teste t feito com valores da eficiência da fermentação (EFIFEM)	27
Tabela 2: Resultado do Teste t para viabilidade celular	28
Tabela 3: Resultado Teste t para contaminação do vinho	28
Tabela 4: Metabólitos potencialmente significativos nas situações de alta e baixa eficiência da fermentação.....	31
Tabela 5: Metabólitos potencialmente significativos nas situações de alta e baixa viabilidade celular	34
Tabela 6: Metabólitos potencialmente significativos nas situações de alta e baixa contaminação bacteriana	37

RESUMO

A indústria produtora de etanol tem ganhado cada vez mais espaço no cenário econômico brasileiro. No entanto, o processo fermentativo que tem a cana-de-açúcar como a principal matéria-prima para o substrato (caldo), ainda encontra fatores limitantes que diminuem a eficiência do bioprocessamento. O principal é a contaminação bacteriana, que pode causar floculação e formação de espuma. Além de diminuir o rendimento da fermentação, devido ao consumo de açúcares pelas bactérias. E consequentemente, a produção de ácidos (principalmente acético e láctico) por bactérias contaminantes pode prejudicar a viabilidade celular das leveduras que realizam a fermentação. Neste contexto o seguinte trabalho teve como objetivo realizar a metabolômica do vinho de levedurizado coletado em uma usina produtora de etanol em diferentes dias, e identificar os metabólitos presentes em dias de alto e baixo nível dos seguintes parâmetros pertinentes a fermentação sendo eles: eficiência da fermentação, viabilidade celular e contaminação. Para isto foi utilizado a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS), usando a metodologia de extração de metabólitos extracelular. Através do estudo dos dados gerados, utilizando a análise estatística foi possível identificar perfis metabólicos diferentes no vinho ao comparar com as situações estabelecidas. Os metabólitos identificados no estudo, foram os mesmo encontrados na literatura em trabalhos realizados em escala laboratorial, mesmo com a complexidade biológica que é o ambiente industrial. Isso significa, serem futuramente importantes biomarcadores para o monitoramento do processo fermentativo.

Palavras-chaves: Fermentação, Metabolômica, Eficiência da fermentação, Viabilidade celular, Contaminação bacteriana

1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 70, quando foi implementado o programa Proálcool a produção de etanol, tendo a cana-de-açúcar como a matéria-prima para o processo fermentativo tem ganhado espaço no cenário econômico brasileiro. Ao decorrer dos anos, a indústria ganhou investimentos científicos e tecnológicos para suprir a demanda que aumentou ainda mais com a criação da tecnologia dos carros “Flex”. Assim, o etanol passou a ser uma alternativa aos combustíveis fósseis, cujo o mercado é dominado por poucos países e seus preços flutuam constantemente. E diminuindo também a emissão dos gases GEE (gases do efeito estufa). (LOPES et al., 2016).

O etanol é produzido a partir da fermentação alcoólica, um bioprocessamento realizado por leveduras, que são organismos unicelulares com alta capacidade fermentativa que convertem os açúcares em álcool e CO₂. Há uma ampla variedade de matérias-primas que podem ser utilizadas como substratos para a fermentação, estas podem ser divididas em 3 grupos principais. As que contêm grande quantidade de açúcar facilmente fermentescíveis (cana-de-açúcar, beterraba, sorgo), o grupo que engloba os amidos (milho, arroz, trigo) e por fim o grupo celulósicos (palha de milho, espigas de milho, bagaço de cana). No Brasil, tradicionalmente temos como matéria-prima para a produção do etanol, o caldo de cana-de-açúcar. Geralmente, incorporado com melaço, que são depositados em grandes biorreatores conhecidos também como dornas, e com a adição das leveduras. Após a fermentação temos origem ao mosto fermentado que em seguida é centrifugado para a separação da biomassa celular e assim dando origem ao vinho de levedurado, que será então destilado para separação do etanol (ALEXANDRINO, 2012).

Grande parte das melhorias vieram principalmente dos investimentos feitos na ciência e tecnologia, para otimizar e melhorar os processos de produção de etanol. Como por exemplo, a seleção de leveduras que são mais eficientes e possuem uma maior resistência ao ambiente de estresse, que são submetidas durante a fermentação. Outro grande avanço, foi em garantir uma melhor qualidade da matéria-prima, graças ao melhoramento genético e melhores técnicas de cultivo e colheita da cana-de-açúcar (BONATELLI, 2016).

Mesmo com os avanços, a indústria sucroalcooleira ainda encontra fatores limitantes aos seus processos, principalmente o fermentativo que é feito em condições não assépticas e por isso geralmente sujeito à contaminação por microrganismos

indesejáveis, como bactérias e leveduras selvagens. Altos índices de contaminação trazem uma perda significativa na produção do etanol. A produção de ácidos orgânicos (como o acético, láctico, succínico) por bactérias heterofermentativas, prejudicam a viabilidade de celular das leveduras o que acarreta em baixo rendimento fermentativo, além de consumirem os açúcares que iriam para a formação de etanol. Pode também, trazer problemas como floculação, aparecimento de espumas que geram um custo maior para a produção, devido ao uso de antibióticos e antiespumantes (BREXÓ; SANT'ANA, 2018).

Para o estudo dos metabólitos primários relacionados ao processo fermentativo, como por exemplo etanol, glicerol, açúcares, entre outras substâncias, a técnica analítica da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas vem sendo utilizada. A sensibilidade desta técnica que permite a identificação de uma série de moléculas que ajudam a traçar o perfil metabólico ocorrido na fermentação (BONATELLI, 2016).

O presente trabalho teve como objetivo a identificação dos principais metabólitos diferenciais abundantes em amostras de vinho analisada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas GC/MS.

2. OBJETIVO

O objetivo principal do trabalho foi a identificação dos principais metabólitos presentes em amostras de vinho, analisados por cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas.

2.1. Objetivos específicos

Usar os metabólitos identificados nas análise do vinho e estabelecer relação aos parâmetros pertinentes a fermentação sendo eles: Eficiência da fermentação, viabilidade celular e contaminação bacteriana para os dias que as amostras foram coletadas. Também pretende-se verificar a eficiência da metodologia para a análise dos metabólitos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Etanol no Brasil

As primeiras tentativas de uso do etanol no Brasil teve início no começo do século XX. Com as primeiras experiências nas usinas produtoras de açúcar nordestinas de misturar o álcool à gasolina comum. Essa foi uma maneira encontrada para driblar a falta de combustível fóssil, cada vez mais escasso por causa da segunda guerra mundial (MARCOCCIA, 2007)

Na década de 70, com a crise o petróleo, quando o barril alcançou preços altíssimos, o Brasil se viu na busca por soluções alternativas ao uso destes combustíveis. Foi então intensificado o uso e produção de etanol com o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Na sua primeira fase em 1975, foi incorporado à gasolina comum 20% de etanol, o percentual limite para que os carros com poucas modificações funcionassem de maneira eficiente. Na segunda fase em 1979, tem-se início a fabricação dos primeiros carros movidos a etanol (LOPES et al., 2016).

No fim da década de 80, houve uma grande retração no preço do petróleo e o açúcar voltou a ter seu preço valorizado. Estes fatores levaram o governo parar com as ações do Proálcool e não fornecer os subsídios necessários para equilibrar os preços do etanol em relação à gasolina. Assim a fabricação de veículos que funcionavam com etanol foi extremamente reduzida. Sua retomada se deu em 2003, com o surgimento de carros com tecnologia Flex, cujo os motores funcionam utilizando, álcool, gasolina ou uma mistura de ambos (DONKE, 2016).

Em 2004, foi o começo de uma competitividade entre os preços do etanol e da gasolina, devido à alta do petróleo no cenário internacional e o desenvolvimento da tecnologia de carros “Flex”. Graças à essa tecnologia, o consumidor pode escolher o combustível que mais lhe convenha, além de substituir o uso de aditivos tóxicos à gasolina e melhorar a qualidade do ar de vários centros urbanos, e consequentemente diminuir a dependência pelo petróleo e a emissão dos gases GEE (gases de efeito estufa) (LOPES et al., 2016).

Na safra de 2015/2016, a produção brasileira de etanol foi cerca de 30 bilhões de litros, dos quais 3 bilhões foram exportados, gerando um ganho de US\$ 1 bilhão.

Em relação à emissão de CO₂, o Brasil emitiu em 2014 em média 0,581 Gt na atmosfera, enquanto que a emissão mundial teve uma média de 35,5 Gt (RAGHAVENDRAN et al., 2017).

3.2. Processo de fermentação para a produção do etanol

Atualmente, para a produção de etanol, o bioprocesso conhecido também como fermentação alcoólica ou etánolica, é a principal via industrial utilizada. Este processo é realizado por leveduras, que são organismos unicelulares com metabolismo facultativo. Quando na falta de oxigênio realizam a fermentação e convertem os açúcares de seus substratos em etanol, energia, biomassa, CO₂ entre outros subprodutos (LOPES et al., 2016).

Há uma ampla variedade de matérias-primas que podem ser utilizadas como substratos para a fermentação, estas podem ser divididas em 3 grupos principais. As que contém grande quantidade de açúcar facilmente fermentescíveis pelas leveduras (cana-de-açúcar, beterraba, sorgo), o grupo que engloba os amidos (milho, arroz, trigo) e por fim o grupo celulósico (palha de milho, espigas de milho, bagaço de cana). Nestes dois últimos grupos há necessidade da hidrólise dos polissacarídeos antes da fermentação, encarecendo assim o processo de produção (ALEXANDRINO, 2012; CAVALHEIRO, 2013).

No Brasil, a principal matéria-prima utilizada para a produção de etanol é a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). A cana após chegar na usina é prensada, e o caldo extraído pode ser utilizado diretamente como substrato para a fermentação. Outra alternativa é o melaço, resíduo da produção de açúcar, que pode ser diluído com água ou misturado com o caldo. Essa mistura, em muitas usinas se torna uma escolha eficiente, pois a incorporação do melaço ao caldo de cana adiciona nutrientes que melhoram o desempenho da fermentação (BASSO et al., 2011; WALKER, 2011).

No contexto industrial, a levedura mais utilizada entre os microrganismos fermentativos para a produção de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta espécie consegue tolerar pH relativamente baixos, deixando a fermentação menos susceptível à contaminações bacterianas, além de proporcionar alto rendimento na fermentação, e de sua capacidade de suportar altos níveis de etanol (KASAVI et al., 2012; TESFAW; ASSEFA, 2014).

Para uma melhoria no processo de produção de etanol de primeira geração foram isoladas as estirpes de leveduras PE-2 e CAT-1. Foram avaliadas por muitos anos, e concluiu-se que estas leveduras são capazes sobreviver as condições industriais e competir com as leveduras selvagens, sendo então as mais utilizadas hoje nas destilarias brasileiras. O que não acontece com as leveduras de panificação que apesar de ser de fácil aquisição e baixo custo, não conseguem competir com as leveduras selvagens e sobreviver em ambientes estressantes como são as dornas de fermentação industrial. (ALEXANDRINO, 2012; BASSO et al., 2008; CAVALHEIRO, 2013).

O processo de fermentação para a produção de etanol ocorrem em biorreatores de grande capacidade com cerca de 0,5 a 3 milhões de litros, também conhecidos como dornas. Neles são depositados os substratos, podendo estes ser como dito anteriormente, o caldo de cana, o melaço diluído ou a mistura de ambos, que contém cerca de 18 a 22% de açúcares redutores totais, juntamente com as leveduras. O tempo de fermentação dura cerca de 6-12 horas, considerado relativamente curto em comparação com outras matérias-primas utilizadas. Ao final da fermentação, tem-se o mosto fermentado como produto final. Este é centrifugado para que ocorra a separação da biomassa celular, e então temos o vinho de levedurado, que é enviado para a etapa de destilação (BONATELLI, 2016; ZANARDI; JUNIOR, 2001).

A condução do processo fermentativo pode ser classificada de maneiras diferentes, sendo contínua ou descontínua. O processo conduzido de maneira descontínua pode também variar em relação ao tipo de alimentação. Podendo ser classificado como simples (batelada) ou descontínuo alimentado (batelada alimentada). No processo descontínuo simples, o substrato e as leveduras são depositados até completar o volume total da dorna no início da fermentação, isto pode levar a baixos níveis de rendimentos. Já o de batelada alimentada representado na Figura 1 é adotado por cerca de 85% das destilarias brasileiras, a adição do substrato com a leveduras se dá no decorrer do processos de fermentação. O processo contínuo (Figura 2) é utilizado por cerca de 15% das usinas. É caracterizado por ter os biorreatores ligados em série e ter a alimentação, a retirada do vinho, assim como a adição das leveduras executadas de forma contínua. (BONATELLI, 2016; VASCONCELOS, 2017).

Em ambos os processos temos o reciclo celular sendo utilizado em grande parte das usinas ao final da fermentação. Esta técnica consiste em coletar as células usadas no ciclo fermentativo por centrifugação, depois recebem um tratamento com ácido e são reutilizadas em um novo ciclo (BASSO et al., 2011; LOPES et al., 2016)

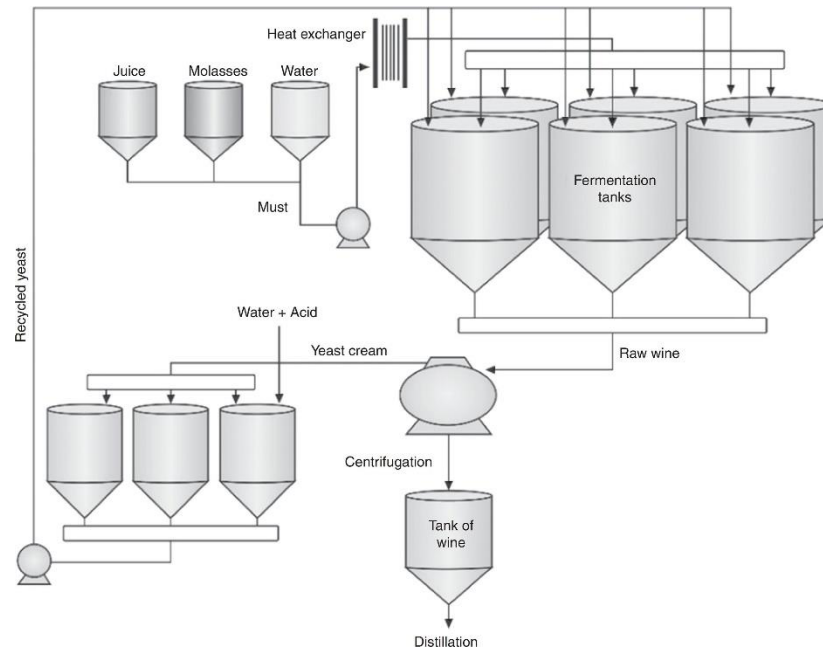


Figura 1: Representação do processo fermentativo de batelada alimentada com reciclo celular adotado pelas destilarias brasileiras
Fonte: LOPES et al. 2016

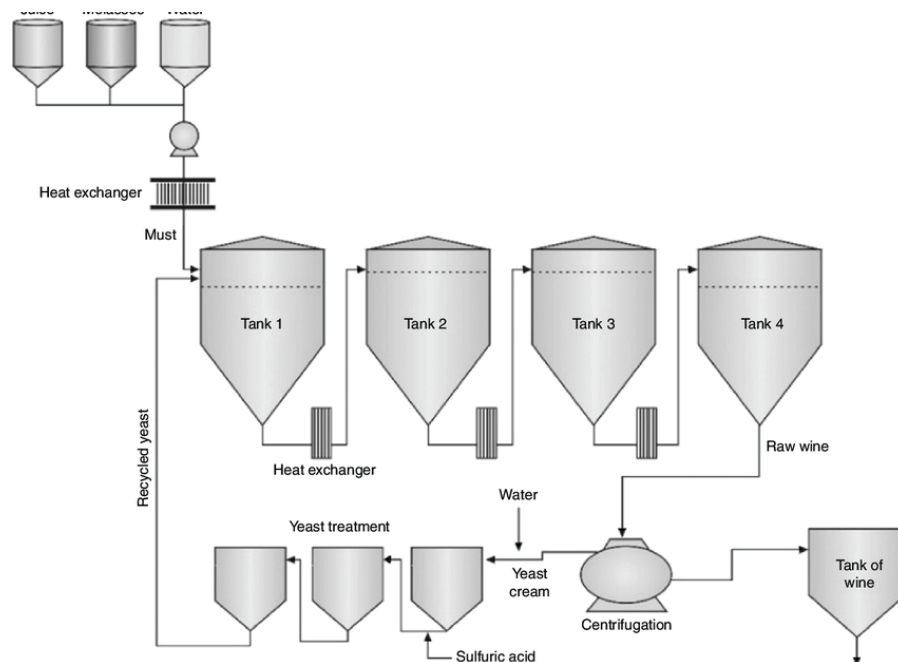


Figura 2: Representação do processo fermentativo contínuo com reciclo celular adotado pelas destilarias brasileiras

3.3. Contaminação do processo

O processo fermentativo nas destilarias, normalmente é afetado pela contaminação de bactérias ou de leveduras selvagens, devido ao grande volume que operam e sujeito à ambientes que não se encontram em condições assépticas. Apesar de todo investimento técnico-científico no decorrer dos anos, a contaminação no processo fermentativo é ainda um fator limitante no rendimento para a produção de etanol (BREXÓ; SANT'ANA, 2018; BASSO et al., 2011).

A contaminação bacteriana causa um maior desvio de açúcares para a produção de metabólitos bacterianos, como ácido láctico e acético. Estes que influenciam a viabilidade celular das leveduras, e ainda podem causar a floculação e formação de espumas. Fatores que contribuem para uma queda significativa no rendimento do processo de produção de etanol. Segundo BREXÓ (2018) uma contaminação na fermentação acima de 10^7 unidades formadores de colônia (UFC/mL) é responsável pela queda de 1 a 5% por dia na produção de etanol. A contaminação bacteriana pode também ocasionar problemas operacionais na planta industrial, como a produção de gomas que, muitas vezes causam entupimentos nas tubulações. Quando se tem altos índices de contaminação, o gasto com antiespumantes e antibióticos aumenta os custos de produção.

De acordo com CHERUBIN (2003), os grupos de microrganismos contaminantes encontrados nas destilarias são a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como as do gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*.

No processo fermentativo, os maiores prejuízos são causados pelas bactérias lácticas (BLs), com destaques para os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, e as espécies *L. fermentum* e *L. helveticus*. A redução do rendimento no processo de fermentação pela contaminação destas bactérias se dá quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico. Consequentemente, duas moléculas de etanol são deixadas de ser produzidas. Sem contar o fato do ácido láctico ser tóxico para as

leveduras, causando uma redução no número de células de leveduras vivas no processo (CHERUBIN, 2003; GOMES, 2009).

3.4. Metabólitos primários

Metabolismo celular se define pelas somas das reações interconectadas, sejam elas catabólicas ou anabólicas, que são reguladas por enzimas, nas quais ocorrem as transformações das moléculas orgânicas (NELSON; COX, 2014).

São considerados metabólitos, produtos intermediários ou finais das reações enzimáticas, sendo os maiores indicadores de atividades bioquímicas de um organismo (ALONSO et al., 2015). Os conjunto dessas pequenas moléculas vindo das rotas centrais metabólicas que ocorrem em todas as células e acompanham o curso da evolução, são chamados metabólitos primários. Estas moléculas são solúveis em água, podendo ser polares ou carregadas. Compreendem este grupo os nucleotídeos, os aminoácidos mais comuns, os açúcares e seus derivados fosforilados e os ácidos carboxílicos (NELSON; COX, 2014).

São importantes informativos de estados fisiológicos e também patológicos tornando-se, assim, fortes biomarcadores para alterações nas estruturas celulares (ZHANG et al., 2018). Segundo Piazza e colaboradores (2018), os estados nutricionais, assim como as condições ecológicas e de estresse influenciam níveis de milhares de metabólitos, assim estas moléculas mediam sinais para diversos eventos moleculares.

3.5. Metabolômica

Metaboloma, segundo Nelson e Cox (2014) pode ser definido como um conjunto de pequenas moléculas em uma célula que estão sob uma série de condições específicas. A ciência da família das “ômicas”, que é voltada para uma análise sistemática com um fornecimento qualitativo e quantitativo dos metabólitos presentes em um determinado organismo é chamada de Metabolômica (ABDELNUR, 2011).

A metabolômica pode ser utilizada para diferentes estudos. Como a busca por alterações metabólicas do organismo que está submetido às condições de estresse induzido, sendo ele de origem química, física ou biológica. Nestes casos a diferença nas amostras, que se encontram em condições ecofisiológicas diferentes são feitas pela identificação de subconjuntos dos metabólitos. Para identificar e quantificar estes compostos temos, de acordo com as características de cada classe de moléculas, equipamentos e metodologias diferentes (ABDELNUR, 2011; FUNARI et al., 2013).

Nos estudos metabolômicos encontramos dois tipos de análise: análise de metabólitos segmentadas ou também chamada de análises direcionadas, onde temos como objetivo um grupo de metabólitos intracelular (GAO; XU, 2015). Utilizando este tipo de análise XIA et al. (2013) conseguiram identificar metabólitos envolvidos diretamente com a síntese do tracolimo, um fármaco imunossupressor produzido por fermentação industrial pelas espécies de leveduras *Streptomyces*. Muitos destes metabólitos identificados pela primeira vez forneceram potenciais pontos de regulação para a manipulação externa.

Outra forma de análise também existente é a não-segmentada que é usada como uma estratégia para perfilar os metabólitos existentes no meio extracelular (ZHANG et al., 2018). ZHA e colaboradores (2014) realizou um estudo utilizando a técnica da metabolômica não-segmentadas para a identificação de inibidores que reduzem o rendimento da fermentação em hidrolisado de biomassa celular.

3.6. Espectrometria de massas - MS

Uma das ferramentas que está sendo comumente usada para a abordagem de dados metabolômicos é espectrometria de massas (MS), por ser um instrumento sensível e possuir uma maior capacidade de identificar moléculas em amostras biológicas complexas (ABDELNUR, 2011). No espectrômetro de massas, primeiramente ocorre a ionização das moléculas, depois estas movem-se em um campo elétrico são detectadas e analisadas. Os dados em cada ponto do tempo são gerados com espectros de massa diferentes em relação à sua massa/carga (m/z) (ABDELNUR, 2011; LIU; LOCASALE, 2017). O equipamento é dividido em quatro partes importantes para realização das análises, são elas: sistema de introdução da amostra, fonte de ionização, analisador e detector, como mostrado na figura 3 (IGLESIAS, 2012).

Para uma melhor identificação das amostras de moléculas biológicas complexas, um sistema de introdução que faz uso da separação por cromatografia é acoplado ao espectrômetro de massas. Estes por sua vez, podem ser a cromatografia-liquida (LC-MS), cromatografia-gasosa (GC-MS) ou a eletroforese-capilar (CE-MS), que proporcionam uma separação antes da amostra ir para a fonte de ionização (GAO; XU, 2015).

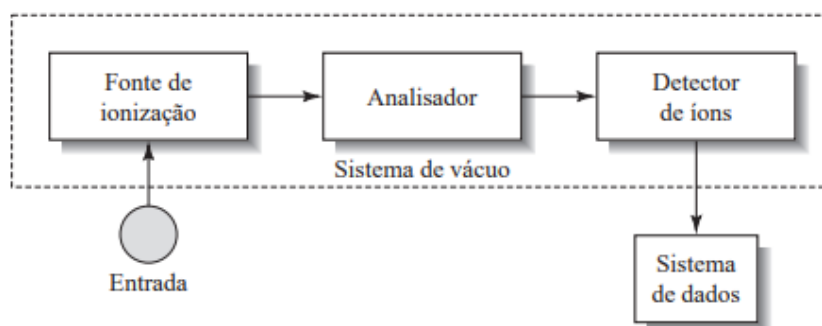


Figura 3: Diagrama de blocos representando o sistema de funcionamento do espectrômetro de massas

Fonte: SKOOG, 2006

3.7. Cromatografia gasosa – GC

A cromatografia gasosa é uma técnica usada para a separação de gases e substâncias voláteis sem que ocorra a decomposição. Nela temos na fase móvel um gás que ao contrário de outras cromatografias, não interage com as moléculas da amostra em análise. E a fase estacionária geralmente um líquido, mas em alguns casos pode ser um sólido, que está contido em uma coluna (SKOOG et al., 2006).

Na cromatográfica gasosa cujo o fluxograma é demonstrado na figura 4. Temos a introdução da amostra que é vaporizada antes da injeção da fase móvel, que é o gás de arraste, podendo ser ele hidrogênio, oxigênio ou argônio. Assim, o gás se desloca pela coluna, arrastando os componentes da amostra. As substâncias de maiores interações com a fase estacionarias ficam retidas por mais tempo separando-se assim das que possuem menores interações. Dessa forma, à medida que as moléculas eluem da coluna são analisadas pelo detector, dependendo do equipamento também podem ser quantificadas (REGIANI et al. 2013).

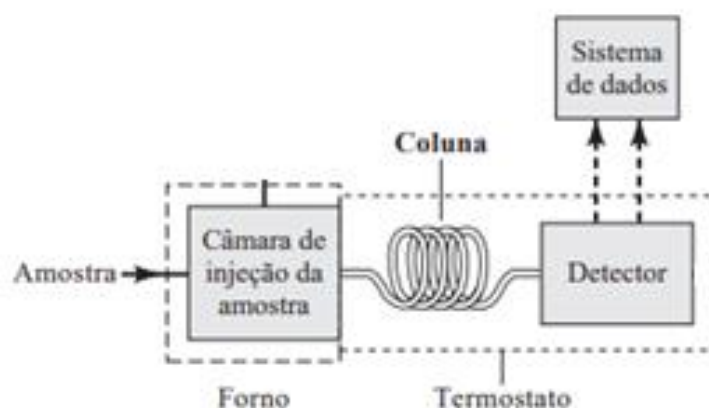


Figura 4: Diagrama de blocos representando o sistema de funcionamento do espectrômetro de massas
 Fonte: SKOOG, 2006

Uma questão para que as amostras sejam eluídas na coluna do GC é ela ser volátil na faixa de temperatura que o equipamento trabalha. Com isso, moléculas com o peso molecular alto, que requerem altas temperaturas para volatiliza-las, decompondo a coluna do GC, não podendo assim serem analisadas pelo equipamento. As moléculas pequenas, no entanto altamente polares como o caso dos açúcares e aminoácidos, que necessitam de alta energia para quebrar as ligações intermoleculares para então serem vaporizadas, também não podem ser analisadas pelo GC. No entanto para contornar a situação faz uso das técnicas de derivatização química com agentes trimetilsililantes nas amostras, antes de serem analisadas. Onde temos a conversão dos grupos polares em grupos com porções menos polares, afetando assim favoravelmente as características de adsorção e pressão de vapor, tornando a molécula alvo volátil podendo assim ser analisada (KAAL; JANSSEN, 2008).

3.8. GC-MS

No método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) este método tem-se tornado muito útil na análise de metabólitos. Pois, tem a vantagem de fornecer dados com alta resolução e análises eficientes. Pois temos a combinação do alto poder de separação da cromatografia gasosa, juntamente com a

identificação das moléculas com base em uma medição precisa da sua massa (ŠPÁNIK; MACHYŇÁKOVÁ, 2018).

Uma das fontes de ionização mais usadas nos equipamentos de GC/MS é a de impacto por elétrons (IE). Na qual um feixe de elétrons de alta energia (tipicamente de 70 eV) bombardeando as moléculas e produzindo fragmentos. Estes podem ser íons positivos, íons negativos e espécies neutras. Então temos os íons positivos sendo movidos para o analisador por meio da força eletrostática. No analisador que se encontra também em condições de vácuo, temos a separação dos íons de acordo com sua m/z , que pode ser feita de diferentes maneiras dependendo do tipo de equipamento. Os tipos mais comuns dos analisadores são o quadrupolo, *Ion trap* ou TOF. Na última etapa, depois dos íons terem atravessado o analisador eles chegam ao detector, onde após uma colisão eles conseguem ser detectados. Com estes choques é gerada uma corrente elétrica que posteriormente será registrada, acumulada e convertida em um sinal no espectrômetro de massas (SKOOG, 2006; REGIANI et al. 2013).

Dentre as vantagens de usar o equipamento GC/MS para análises metabolômicas, tem-se: uma tecnologia robusta e amadurecida com tempo de uso, com sua alta sensibilidade consegue-se uma ampla cobertura de metabólitos nas análises, e principalmente para este tipo de equipamento tem-se grande banco de dados e softwares para a identificação dos metabólitos. Em contrapartida, podemos também citar alguns aspectos negativos por exemplo, não é adequado para moléculas não voláteis ou termicamente fragilizadas, necessitando assim em alguns casos da etapa de derivatização. as análises são demoradas, uma média de 20 a 30 minutos por amostra (GAO; XU, 2015; WISHART, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aquisição das amostras

Neste trabalho as amostras de vinho de levedurado foram cedidas pela empresa de açúcar e álcool da região de Piracicaba – SP durante os meses de junho, setembro e outubro da safra de 2015/2016. Todos os experimentos, assim como o processamento dos dados foram realizados no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, localizado no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, durante os meses de outubro/2017 a março/2018. Sob a orientação do professor Dr. Carlos Alberto Labate.

Para uma análise comparativa, as amostras de vinho foram divididas em dois grupos (alto e baixo nível), em relação aos parâmetros de eficiência da fermentação, viabilidade celular e contaminação bacteriana. Os valores destes parâmetros foram fornecidos pela própria usina, com base nas metodologias lá realizadas. Assim, conseguimos identificar e comparar os metabólitos potencialmente significativos. As amostras foram processadas com 3 replicatas técnicas, não foi possível obter replicatas biológicas pela complexidade do ambiente industrial.

4.2. Extração de metabólitos e derivatização

As amostras de vinho coletadas na usina foram centrifugadas à 4°C, por 15 minutos à 16000g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado para posterior extração dos metabólitos.

Seguindo o protocolo proposto por Bonatelli (2016) para a extração de metabólitos 200 µL de vinho foram adicionados a 500 µL de solução composta de metanol (MeOH), água (250 µL de cada) e 500 µL de diclorometano (CH₂Cl₂). Juntamente com os solventes foram adicionados os padrões internos: ácido succínico, ácido mirístico e ácido palmítico, para a marcação isotópica. Em seguida as amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto. Para a separação das frações polares, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4°C. As frações polares foram coletadas e filtradas com o filtro de Whatmann de 0,2 µm e cerca de 300 µL foi transferido para novos vials.

A análise no GC/MS foi realizada após a liofilização de 200 µL das amostras a -50°C por 3 horas em um liofilizador (ModulyoD Freze Dryer Thermo). A derivatização,

que é a diminuição das frações polares para frações polares menores, com isso diminuir o ponto de ebulição e não danificar o equipamento. Foi realizada adicionando 30 µL de metoxiamina (15 µL/ µL) em piridina, agitadas no vórtex por 1 mim e depois deixadas reagindo por 16 horas no escuro a temperatura ambiente. Após o tempo da reação foram adicionados 30 µL de MSTFA (N-metiltrimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) para a silação, e deixadas por mais 1 hora reagindo em temperatura ambiente. Em seguida 30 µL de heptano com 15 ng/µL de metil-esterato foram adicionados para finalizar a reação e as amostras serem analisadas pelo GC/MS.

4.3. Análise de metabólitos pelo GC/MS

Para realização das análises, o material derivatizado foi injetado em um cromatógrafo gasoso 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). As amostras foram injetadas de maneira automática com auxílio de um injetor *Split/Splitless* na função *Splitless* e um amostrador também automático (auto sampler-CTC Combi Pal Xt Duo CTC, Analytics AG, Switzerland). A temperatura de injeção da amostra foi de 280°C e o fluxo *purge* do septo foi de 20 mL/mim e com duração de 60 segundos. A vazão do gás hélio foi constante pela coluna com o fluxo de 1 mL/mim. A temperatura de primeira coluna foi mantida por 2 minutos à 80°C, e depois aumentada em 15°C a cada minuto até atingir a temperatura de 305°C, temperatura esta mantida por mais 10 minutos.

O eluente foi inserido no equipamento CG x GC-TOFMS (Pegasus 4D, Leco, St. Joseph, US) e para possibilitar o cálculo para o tempo de retenção uma série de n-alcenos (C₁₂ – C₄₀) foram utilizadas. A fonte ionizadora é equipada com duas colunas de sílica fundidas sendo que a coluna da primeira dimensão (DB 5-Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA) tem 20 m de comprimento (com 0,18 mm de diâmetro interno x 0,18 µm de filme). A coluna da segunda dimensão (RXT-17, Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) tem 0,84 m de comprimento (com o diâmetro interno de 0,10 mm x 0,10 µm de filme). As temperaturas da linha de transferência e da fonte de ionização foram ajustada para 280°C e 250°C respectivamente. A geração dos íons foi feita por um feixe de elétrons de 70 eV em uma corrente de ionização de 2,0

mA. Com a voltagem do detector ajustada para 1500 V, foram registrados 10 espectros por segundo em uma faixa de m/z de 45 e 800.

4.4. Processamento de dados

Os dados foram processados da seguinte maneira: primeiramente os cromatogramas gerados foram processados pelo software ChormatOF v.4.51, onde a correção das linha base foi feita e também a transformação dos arquivos que foram gerados pelo equipamento para o formato *netCDF*. Para realizar a desconvolução dos picos cromatográficos, obtenção do índice de retenção (RI), a retificação do tempo de retenção (RT), assim como o alinhamento dos picos com a biblioteca de dados *Golm Metabolome Database* (GMD) (<http://gmd.mpimpgolm.mpg.de/>) e assim identificação dos metabólitos, foi utilizado o pacote TargetSearch no ambiente R (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009).

Após este procedimento os dados foram gerados em formato de texto (.txt) e depois convertidos para do formato Excel, onde conseguimos realizar uma maior filtragem dos dados. Assim foram considerados válidos os metabólitos com espectros de similaridade (*scores*) superior a 600 e também os metabólitos que possuíam três ou mais massas características iguais. Também foram excluídos metabólitos da classe dos siloxano e derivados, estes pertencentes a coluna cromatográfica. Após serem ordenados por ordem alfabética, foi feita também a soma dos metabólitos que possuíam números de identidade diferentes, contudo possuíam o mesmo nome. Ao final do processamento e filtragem dos dados foi feita a normalização dos metabólitos pelos valores da contagem iônica total (TIC) de cada amostra.

4.5. Análise estatística dos dados

Primeiramente em relação as análises estatísticas dos parâmetros usados para a diferenciação das amostras, foi utilizado o Teste t de Student (YANG-CHUN et al. 2017) e foi verificado que realmente temos uma variância entre os grupos.

As análises estatísticas dos dados processados foram feitas utilizando o programa online *MetaboAnalyst* 4.0 (disponível em: <http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>) (XIA et al., 2009). Como os dados já haviam sido normalizados pelo TIC, somente foi feito a transformação logarítmica (log

2) e escalonamento por Pareto (OANCEA; PIRJOL; ANDREI, 2018; PACKARD, 2017).

5. RESULTADOS

5.1. Análise Estatística dos parâmetros de eficiência da fermentação (EFIFERM), viabilidade celular e contaminação pelo Teste t.

Para podermos comparar os metabólitos nas condições de altos e baixos níveis de EFIFERM (eficiência da fermentação), viabilidade e contaminação do vinho. Primeiramente precisamos saber se os valores destes parâmetros são diferentes estatisticamente, Para isto, usamos o Teste t também conhecido como Teste t de Student. Nesse tipo de análise estatística quando o valor de p for menor que o valor de limite (α) que é de 0,05 temos uma diferença estatística significativa entre os grupos analisados (FENG; HUANG; MA, 2017).

Para a separação dos grupos com relação a EFIFERM definimos que, amostras coletadas em dia que a EFIFERM foi menor que 87% são consideradas como de baixa eficiência de fermentações e amostras coletadas no dia em que a EFIFERM foi maior de 87% foram consideradas como de alta eficiência de fermentação.

A tabela abaixo (Tabela 1) mostra o resultado do Teste t realizado para verificar se a diferença entre as amostras com relação a estes dois níveis é estatisticamente significativa.

Tabela 1: Resultado Teste t feito com valores da eficiência da fermentação (EFIFEM)		
Média	92.268	85.03
Variância	12.2079	3.391733
Observações	20	4
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	8	
Stat t	5.993644	
P(T<=t) bi-caudal	0.000326	
t crítico bi-caudal	2.306004	

Para análises das amostras quanto a viabilidade celular definimos de maneira semelhante a eficiência da fermentação. No entanto, amostras coletas em dias que a viabilidade celular foi menor que 70% foram consideradas de baixa viabilidade. Já amostras coletadas quando a viabilidade foi superior a 70% foram consideradas de

alta viabilidade. Na tabela abaixo, temos o resultado do Teste t para a avaliação das diferenças estatísticas entre os grupos.

Tabela 2: Resultado do Teste t para viabilidade celular

Média	77.9305	64.82
Variância	23.1535	6.1165
Observações	20	5
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	13	
Stat t	8.496535	
P(T<=t) bi-caudal	1.15E-06	
t crítico bi-caudal	2.160369	

Para o parâmetro de contaminação também foram feitas análises de maneira semelhante às anteriores. Amostras coletadas em dias que a contaminação bacteriana foi inferior a 10^7 /mL determinamos como de baixa contaminação, e amostras de dias que a contaminação foi superior a de 10^7 /mL determinamos como de alta contaminação. Assim também temos o resultado do Teste t (Tabela 3) para a verificação da análise estatística.

Tabela 3: Resultado Teste t para contaminação do vinho

Média	0.372778	1.573333
Variância	0.064927	0.469547
Observações	18	6
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	5	
Stat t	-4.19598	
P(T<=t) bi-caudal	0.008522	
t crítico bi-caudal	2.570582	

Em todos os casos percebemos que há um valor de p menor que um alfa (α) com um valor de 0,05. Assim, confirmamos que há uma diferença estatística entre os grupos que as amostras foram classificadas.

5.2. Análise estatística dos metabólitos obtidos das análises de vinho em relação à eficiência da fermentação (EFIFERM)

Após o processamento dos dados, identificação dos metabolitos e das normalizações feitas, foi gerada uma planilha com o total de 307 metabólitos resultantes das 82 amostras, as quais separamos de acordo como mostrado no item 5.1.

Para avaliarmos as possíveis distinções dos metabólitos entre os grupos em análises metabolômicas, fazemos o uso de técnicas de análises estatísticas multivariadas, devido à complexidade de variáveis geradas pelo processamento de dados. Como descrito anteriormente para a realização destas análises usamos o software online Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>).

A Figura 3 mostra a separação dos grupos de alta e baixa EFIFERM. Estes resultados são demonstrados por análise estatística discriminante por mínimos quadrados (PLS-DA). Na PLS-DA temos o uso do método da regressão linear para maximizar a separação dos grupos e identificar os possíveis marcadores que acarretam esta diferença (WORLEY; POWERS, 2015) .

É possível observar pela Figura 3 da análise PLS-DA que há uma tendência de separação entre os grupos. No entanto por este método não foi possível identificar os metabólitos diferentes, pois os valores de R^2 e Q^2 foram bem pequenos 0,25 e 0,07 respectivamente. O que nos diz que este método não adequado para as amostras que foram analisadas.

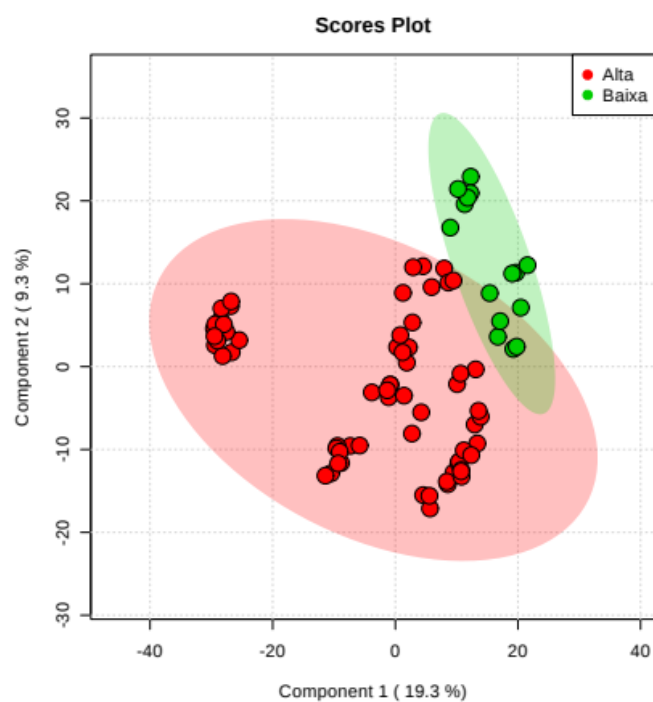


Figura 5: Análise estatística pelo método de PLS-DA dos metabólitos abundantes nas análises dos grupos com alta e baixa eficiência na fermentação

Então, para conseguirmos uma identificação dos principais metabólitos que acarretaram a diferença entre os grupos. Foi feito o Teste t para os dados processados, assim temos na Tabela 4 um total de 10 metabólitos principais que acarretaram a diferença entre os grupos de alta e baixa eficiência de fermentação.

Tabela 4: Metabólitos potencialmente significativos nas situações de alta de baixa eficiência da fermentação

	Peaks(mz/rt)	t.stat	p.value	-log10(p)	Metabólito
1	2150	3.8464	0.00024	3.617	<i>Isomaltitol</i>
2	742	3.8232	0.00026	3.5825	<i>Unknown</i>
3	321	3.6948	0.0004	3.3937	<i>Unknown</i>
4	1879	3.6938	0.00041	3.3922	<i>Unknown</i>
5	1090	-3.5604	0.00063	3.2003	<i>Frutose</i>
6	1189	-3.5306	0.0007	3.1579	<i>Unknown</i>
7	2189	3.4665	0.00086	3.0676	<i>Isomaltose</i>
8	1363	-3.4433	0.00092	3.0352	<i>Unknown</i>
9	548	-3.3048	0.00143	2.8445	<i>5-metil citosina</i>
10	1384	-3.2959	0.00147	2.8324	<i>Unknown</i>

Na Figura 6, também temos a representação dos mesmos metabólitos que podem ser considerados potencialmente significativos para a diferenciação dos grupos de amostras estudadas.

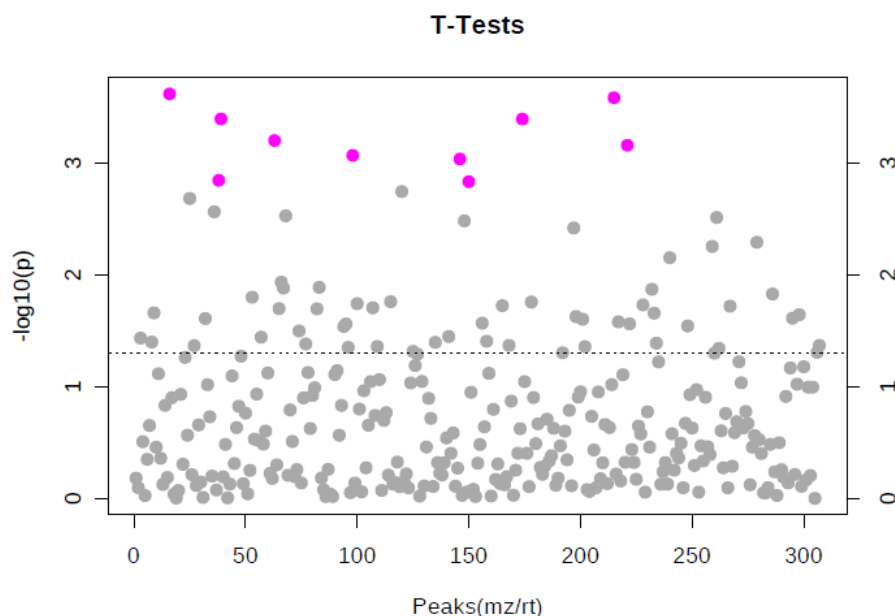


Figura 6: Metabólitos importantes selecionados pelo Teste t com limite de 0,05. Os círculos rosas representam metabólitos acima do limite. Os valores p foram transformados por -log10 para que os metabólitos mais significativos (com valores de p menores) sejam plotados na parte superior do gráfico

Entre os 10 metabólitos potencialmente significativos (Tabela 4) entre os dois grupos, 5 foram encontrados no grupo de alta EFIFERM. No entanto, 3 não foram identificados (*Unknown*) (IDs 321, 1879 e 742). Além destes, aparecem também os seguintes metabólitos, *alpha*-(1,6)-*Glucopyranosyl-D-glucitol* / *ilsomaltitol* (2150) e *isomaltose* (2189). Já no grupo classificado de baixa fermentação temos também 3 metabólitos não identificados (IDs 1363, 1384, 1189) e foram identificados os metabólitos *frutose* (1090) e 5-metil citosina (548).

5.3. Análise estatística dos metabólitos obtidos das análises de vinho em relação viabilidade celular.

De maneira semelhante às análises estatísticas da EFIFERM, foram feitas análises para a comparação dos grupos em relação a viabilidade celular. A Figura 7 mostra a separação dos grupos pelo método de PLS-DA. Nota-se que também há uma tendência de separação entre os grupos de alta e baixa viabilidade celular. No entanto, também por este método não foi possível identificar os metabólitos diferentes, pois os valores de R^2 e Q^2 foram baixos, 0,27 e 0,14 respectivamente.

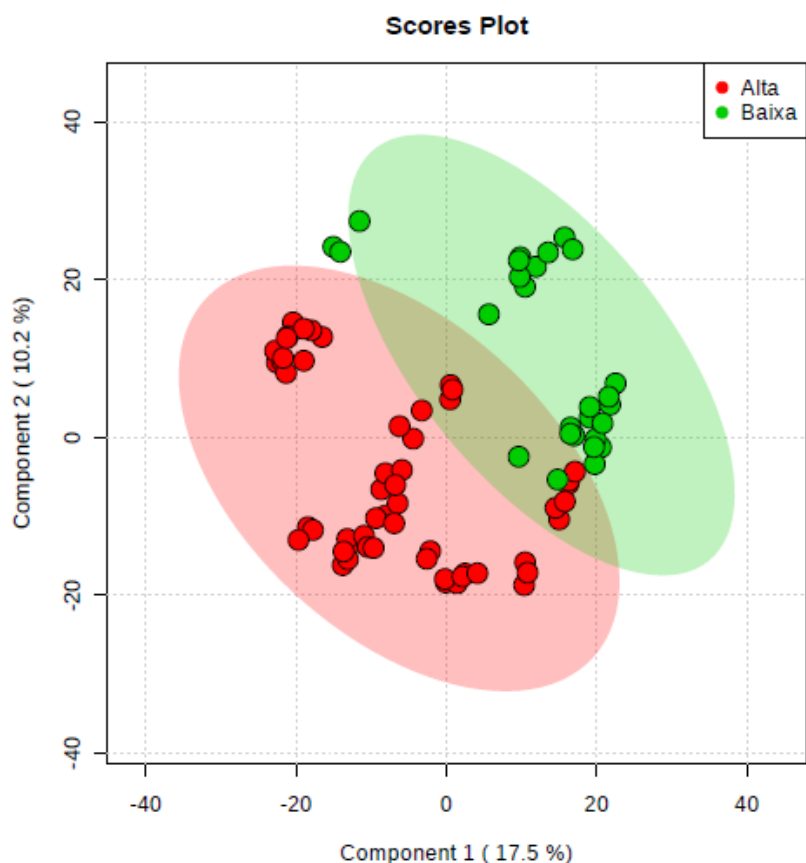


Figura 7: Análise estatística pelo método de PLS-DA dos metabólitos abundantes nas análises dos grupos com alta e baixa viabilidade celular

Para melhor perfilar os metabólitos abundantes, foi feita a análise estatística pelo Teste t, assim tem-se a relação destes metabólitos (Tabela 5). No total, foram encontrados 50 metabólitos em abundância nos dois grupos analisados. No entanto, reportamos apenas 15 preferencialmente abundantes cujos valores de p são os menores (Tabela 5).

Tabela 5: Metabólitos potencialmente significativos nas situações de alta e baixa viabilidade celular

	Peaks(mz/rt)	t.stat	p.value	-log10(p)	Metabólito
1	321	4.8144	6.98E-06	5.1563	<i>Unknown</i>
2	1307	4.4852	2.44E-05	4.6126	<i>Ácido galactônico</i>
3	1090	-4.4543	2.74E-05	4.5625	<i>Frutose</i>
4	1634	4.2291	6.26E-05	4.2034	<i>Unknown</i>
5	318	4.0368	0.00012	3.9048	<i>Perillyl alcohol</i>
6	587	-4.0323	0.00013	3.898	<i>3-hidroxi-ácido benzóico</i>
7	1363	-3.973	0.00016	3.8075	<i>Unknown</i>
8	1189	-3.9571	0.00016	3.7835	<i>Unknown</i>
9	942	-3.7499	0.00034	3.4743	<i>derivado similar à frutose</i>
10	1384	-3.6291	0.0005	3.2985	<i>Unknown</i>
11	2071	3.6227	0.00051	3.2894	<i>Unknown</i>
12	1806	3.5464	0.00066	3.1804	<i>Unknown</i>
13	923	-3.5389	0.00068	3.1697	<i>Unknown</i>
14	1903	3.5305	0.0007	3.1577	<i>Lactulose</i>
15	1586	-3.4683	0.00085	3.0701	<i>Unknown</i>

Na Figura 8, temos a representação dos metabólitos que podem ser considerados de maior abundância para a diferenciação dos grupos de alta e baixa viabilidade celular.

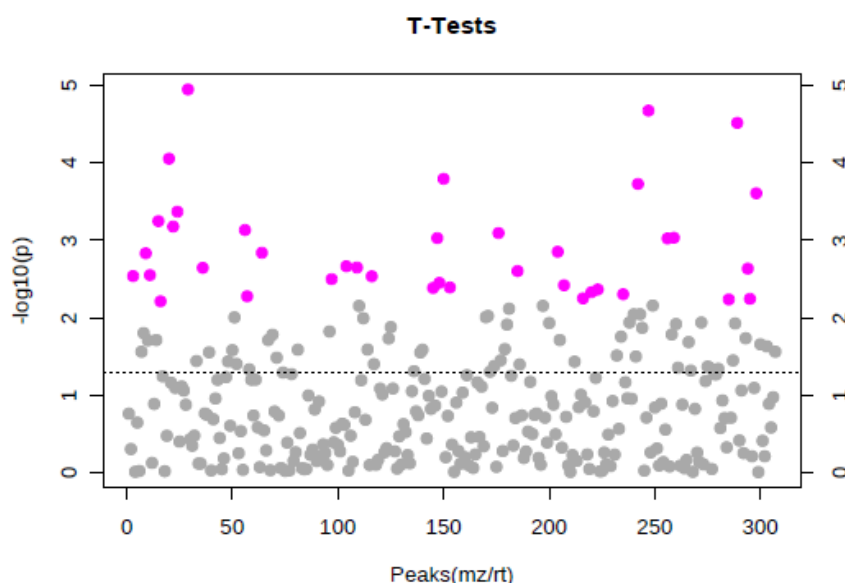


Figura 8: Metabólitos significativos selecionados pelo Teste t com limite de 0,05. Os círculos rosas representam metabólitos acima do limite. Os valores p foram transformados por $-\log_{10}(p)$ para que os metabólitos mais significativos (com valores de p menores) sejam plotados na parte superior do gráfico

Dentre os metabólitos potencialmente significantes no grupo de alta viabilidade, 5 deles não foram ainda identificados (*Unknown*) (IDs 321, 1363, 1806, 1634 e 2071). No entanto, temos identificação dos seguintes metabólitos: *Ácido galactônico* (1307), *Lactulose* (1903), *Perillyl alcohol* (318). No grupo de amostras com baixa viabilidade, temos 5 metabólitos não identificados (IDs 337, 1363, 1384, 1806 e 1189) e foram identificados os seguintes: *Frutose* (1090), *3-hidroxi-ácido benzóico* (587) e *derivado similar à frutose* (942).

5.4. Análise estatística dos metabólitos obtidos das análises de vinho em relação à contaminação bacteriana

Por fim, temos representado na Figura 9 a possível separação dos grupos quanto aos seus metabólitos em relação aos níveis de contaminação bacteriana pelo método estatístico PLS-DA. A análise foi feita de maneira semelhante às anteriores descritas nos itens 5.2 e 5.3. Nota-se também que há uma tendência de separação entre os grupos. No entanto, o mesmo aconteceu com os estudos anteriores. Por este método não foi possível identificar os metabólitos diferentes, pois os valores de R^2 e Q^2 também foram baixos, 0,48 e 0,41 respectivamente.

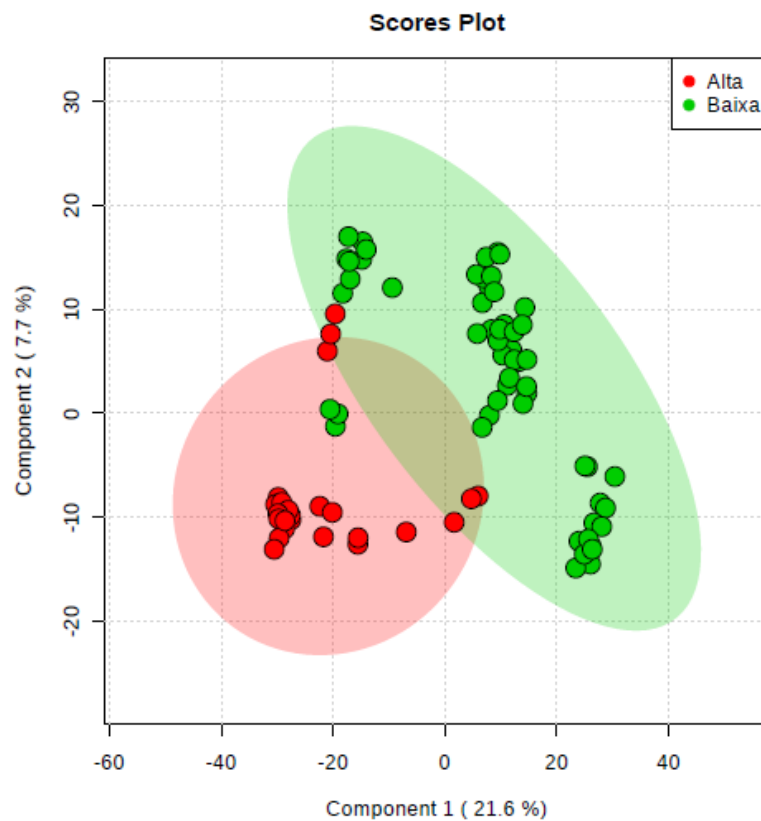


Figura 9: Análise estatística pelo método de PLS-DA dos metabólitos abundantes nas amostras dos grupos com altos e baixos níveis de contaminação do vinho

E do mesmo modo, como feito nos itens 5.2 e 5.3, para o conhecimento do provável perfil metabólico das amostras com relação a contaminação foi feito o Test t para os dados processados. Foram contabilizados 50 metabólitos, no entanto foram reportados somente os 15 que tiveram menor valor de p (Tabela 6).

Tabela 6: Metabólitos potencialmente significativos nas situações de alta e baixa contaminação bacteriana

	Peaks(mz/rt)	t.stat	p.value	-log10(p)	Metabólito
1	1549	-7.61	4.89E-11	10.311	<i>Unknown</i>
2	870	-7.59	5.36E-11	10.27	<i>Unknown</i>
3	861	7.068	5.53E-10	9.2572	<i>Unknown</i>
4	476	-6.8	1.78E-09	8.7487	<i>Unknown</i>
5	755	-6.29	1.67E-08	7.7773	<i>Unknown</i>
6	1017	6.231	2.11E-08	7.676	<i>Tagatose</i>
7	1691	5.724	1.80E-07	6.7449	<i>Mannose-6-phosphate</i>
8	1609	5.625	2.71E-07	6.5672	<i>Unknown</i>
9	270	5.574	3.35E-07	6.4756	<i>Maleic acid, 2-methyl</i>
10	548	5.542	3.81E-07	6.4194	<i>5-metil Citosina</i>
11	615	-5.51	4.35E-07	6.3612	<i>Unknown</i>
12	2200	5.489	4.73E-07	6.325	<i>Unknown</i>
13	1596	-5.43	5.92E-07	6.228	<i>Unknown</i>
14	2159	5.289	1.07E-06	5.9715	<i>Unknown</i>
15	1323	5.27	1.15E-06	5.9382	<i>Ácido glucônico</i>

Assim como anteriormente, temos a representação na Figura 10, os metabólitos considerados potencialmente significativos para a diferenciação dos grupos aos níveis de contaminação.

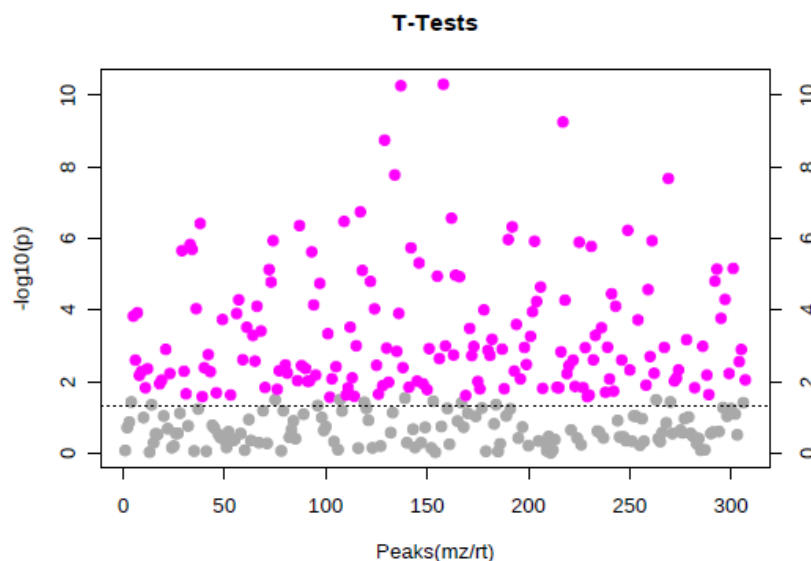


Figura 10 Metabólitos importantes selecionados pelo Teste t com limite de 0,05. Os círculos rosa representam metabólitos acima do limite. Os valores p foram transformados por $-\log_{10}(p)$ para que os metabólitos mais significativos (com valores de p menores) sejam plotados na parte superior do gráfico.

Dos metabólitos de menor p reportados do grupo de alta contaminação (Tabela 6), temos 4 ainda não identificados (IDs 861, 1609, 2159 e 2200) e 6 identificados sendo eles: *Tagatose* (1017), *Mannose-6-phosphate* (1691), *2-methyl Maleic acid* (270), *5-metil citosina* (548), *Ácido Glucônico* (1323). E nos metabólitos reportados pertencentes ao grupo de baixa contaminação temos 5 não identificados (IDs 870, 1549, 476, 615 e 755).

6. DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, a eficiência da fermentação em usinas que adotam o processo fermentativo contínuo está em torno de 87 a 89% (LOPES, 2016). No entanto este rendimento é afetado principalmente quando se tem altos índices de contaminação bacteriana, pois as bactérias competem com as leveduras pelos nutrientes do mosto, além do açúcar que é a fonte de carbono. Geram ainda ácidos orgânicos que são prejudiciais às leveduras, e consequentemente afetarão o rendimento da fermentação. Com isso, podemos observar a redução na viabilidade celular, pois nesta competição existente entre bactérias e leveduras, as bactérias se beneficiam por possuírem menor tempo de geração (GOMES, 2009).

Entre os metabólitos diferencialmente abundantes presentes no grupo de amostras que apresentaram alta eficiência de fermentação (EFIFERM), o metabólito de m/z 321, apesar de ser *Unknown* (não identificado), é detectado e quantificado, e pode ser considerado importante. Pois sua presença é detectada também em amostras que possuem alta viabilidade celular, podendo este metabólito exercer uma repressão sobre o crescimento bacteriano, como o efeito antibacteriano do ácido succínico elucidado por Basso e colaboradores (1997).

Outro metabólito que podemos ressaltar é a *Frutose*, presente nas amostras de baixa EFIFERM e de baixa viabilidade celular. Além do derivado semelhante identificado (m/z 942), também nas amostras de baixa viabilidade e de alta contaminação do mosto. A *Frutose* é um dos principais açúcares fermentescíveis metabolizado pela *S. cerevisiae* para a produção de etanol (WALKER, 2011). A presença deste metabólito reforça a ideia de que os açúcares não foram totalmente convertidos. Resultando assim, em um baixo rendimento que pode estar associado à presença de contaminantes. Esses resultados coincidem com os estudos feitos por BAYROCK (2004), que analisaram o efeito do estresse químico sobre a levedura quando esta se encontra sobre a presença de contaminantes.

Outro metabólito abundante que está presente tanto nas amostras de baixa EFIFERM, tanto em amostras de alta contaminação é o *5-metil citosina*, que indica a metilação do DNA. Devido às condições de estresse que as células se encontram na dorna de fermentação ocorrem mudanças epigenéticas, no caso a metilação do DNA, para se adequarem a situação que estão submetidas. A metilação ocorre tanto no DNA da *S. cerevisiae* quanto no DNA das bactérias contaminantes, segundo estudos

feitos por BONATELLI (2016) que caracterizou os metabólitos presentes em ensaios fermentativos com a *S. cerevisiae* CAT-1 na presença da bactéria contaminante *Lactobacillus fermentum* (I-2).

O metabólito de m/z 1363 que apesar de não ter sido identificado quimicamente, está presente em 3 situações estudadas no trabalho sendo elas: baixa EFIFERM, baixa viabilidade celular e alta contaminação bacteriana. Podendo ser considerado um possível marcador para uma situação onde os altos níveis de contaminação, acarretam uma baixa viabilidade celular e interferindo de maneira negativa no rendimento fermentativo, diminuindo a produção de etanol. Problema este que ainda é um desafio a ser superado nas destilarias.

Segundo Cherubin (2003), com o isolamento de bactérias contaminantes, identificou-se uma grande variedade de bactérias gram-positivas que predominam na contaminação bacteriana das dornas de fermentação. Também foi verificada a presença de gram-negativas como as dos gêneros *Acetobacter*, *Enterobacter* e *Gluconobacter*. A presença das bactérias gram-negativas *Acetobacter* e *Gluconobacter*, pode ser identificada pela presença do metabólito *Ácido glucônico*, encontrado nos grupos baixa viabilidade celular e alta contaminação. O *Ácido glucônico* é produzido pelas bactérias através da oxidação da glicose realizada pela enzima glicose desidrogenase (RAMACHANDRAN et al., 2006; SINGH; KUMAR, 2007).

Os estudos metabolômicos são de grande importância para o setor sucroalcooleiro, principalmente para o monitoramento do processo fermentativo. Pois uma vez identificados os metabólitos, esses irão contribuir para melhor entender a fisiologia da fermentação no ambiente industrial. Também será possível prevenir de maneira mais eficiente os problemas durante o processo, principalmente os ocasionados pela contaminação bacteriana.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos através das análise de metabolômica, pode-se concluir que há uma variação na composição química do vinho de levedurado, quando temos baixos e altos níveis de eficiência na fermentação, viabilidade celular e contaminação bacteriana.

Foi com os resultados deste estudo, a eficiência da metodologia GC/MS aplicada para as análises de metabolômica na fermentação. Uma vez que, parte dos metabólitos encontrados e identificados, mesmo a usina sendo um ambiente biológico complexo, são os mesmo encontrados em trabalhos realizados em escala laboratorial. Podendo estes futuramente serem considerados importantes biomarcadores para o monitoramento do processo fermentativo.

8. REFÊNCIAS

ABDELNUR, P. V. Metabolômica e Espectrometria de Massas. **Circular Técnica**, 10, p. 1–4, 2011.

ALEXANDRINO, N. **Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa**. 2012. 101 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÃ , A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. March, p. 1–20, 2015.

BASSO, L.C.; ALVES, D. M. G. ; AMORIM, H.V. The antibacterial action of succinic acid formation by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia, São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 77-82, 1997.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.

BASSO, L.C.; OLITTA, T.O.; NITSCHKE, S. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, n. April, 2011.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: Nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.

BONATELLI, M. L. Caracterização da comunidade bacteriana contaminante do processo fermentativo para produção de etanol e o impacto no metaboloma da fermentação. p. 1–129, 2016.

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. DE S. Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role? **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 231–244, 2018.

CAVALHEIRO, A. DE A. Análise dos mutantes de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria na resistência e produção de etanol. p. 78, 2013.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminação Bacteriana na Fermentação Alcoolica**. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, v. 1, p. 124, 2003.

CUADROS-INOSTROZA, Á. et al. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 1–12, 2009.

DONKE, A. C. G. Avaliação de desempenho ambiental e energético da produção de etanol de cana, milho e sorgo em uma unidade integrada, segundo a abordagem do ciclo de vida. p. 243, 2016.

FENG, Y.; HUANG, Y.; MA, X. The application of Student's t -test in internal quality control of clinical laboratory. **Frontiers in Laboratory Medicine**, v. 1, n. 3, p. 125–128, 2017.

FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

GAO, P.; XU, G. Mass-spectrometry-based microbial metabolomics: Recent developments and applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 3, p. 669–680, 2015.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**. 2009. 171 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

IGLESIAS, A. H. No TitleIntrodução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas. p. 1–13, 2012.

KAAL, E.; JANSSEN, H. G. Extending the molecular application range of gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 43–60, 2008.

KASAVI, C. et al. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 230–238, 2012.

LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics: A Primer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 274–284, 2017.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

MARCOCCIA, R. A. Participação do etanol brasileiro em uma nova perspectiva na matriz energética mundial. 2007.

Nelson, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIELSEN, J. C. et al. Correction to: Industrial antifoam agents impair ethanol fermentation and induce stress responses in yeast cells (Applied Microbiology and Biotechnology, (2017), 101, 22, (8237-8248), 10.1007/s00253-017-8548-2). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 513, 2018.

OANCEA, B.; PIRJOL, D.; ANDREI, T. A Pareto upper tail for capital income

distribution. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 492, p. 403–417, 2018.

PACKARD, G. C. Misconceptions about logarithmic transformation and the traditional allometric method. **Zoology**, v. 123, p. 115–120, 2017.

PIAZZA, I. et al. A Map of Protein-Metabolite Interactions Reveals Principles of Chemical Communication. **Cell**, v. 172, n. 1–2, p. 358–372.e23, 2018.

RAGHAVENDRAN, V. et al. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 110, n. 7, p. 971–983, 2017.

RAMACHANDRAN, S. et al. Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 185–195, 2006.

SINGH, O. V.; KUMAR, R. Biotechnological production of gluconic acid: Future implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 713–722, 2007.

SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**, tradução da 8ª edição norte americana, editora Thomson, 2006.

ŠPÁNIK, I.; MACHYŇÁKOVÁ, A. Recent applications of gas chromatography with high-resolution mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 1, p. 163–179, 2018.

TESFAW, A; ASSEFA, F. Current trends in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: substrate, inhibitor reduction, growth variables, coculture, and immobilization. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

VASCONCELOS, M.H.; DESENVOLVIMENTO. Desenvolvimento e análise econômica de modelos de biorrefinaria integrada 1G2G empregando pré-tratamento ácido diluído. p. 99, 2017.

WALKER, G.M. 125th anniversary review: Fuel alcohol: Current production and future challenges. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 1, p. 3–22, 2011.

WISHART, D.S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 9, p. 482–493, 2008.

WORLEY, B.; POWERS, R. HHS Public Access. v. 1, n. 1, p. 92–107, 2015.

XIA, M. et al. Enhanced FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by rational feeding strategies based on comparative metabolic profiling analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 10, p. 2717–2730, 2013.

ZANARDI, M. DOS S.; JUNIOR, E. F. DA C. Tecnologia e perspectiva da produção de etanol no Brasil. n. January 2016, p. 1–11, 2001.

ZHA, Y. et al. Identifying inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysates using an exometabolomics approach. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2014.

ZHANG, X. et al. The application of ion mobility mass spectrometry to metabolomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 42, p. 60–66, 2018.