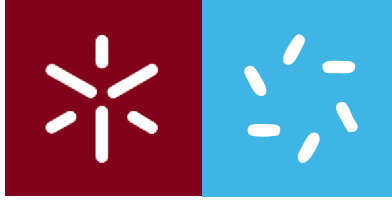


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Diana Rafaela Fernandes Soares

Evolução da microbiota do bago de uva durante a fermentação: efeitos da aplicação de suplementos de cálcio nas vinhas na sua abundância e diversidade



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Diana Rafaela Fernandes Soares

**Evolução da microbiota do bago de uva
durante a fermentação: efeitos da aplicação
de suplementos de cálcio nas vinhas na sua
abundância e diversidade**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Viviana Maria Varajão Martins
e do
Professor Doutor Hernâni Varanda Gerós

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-Compartilhalgal

CC BY-NC-SA

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Parte deste trabalho originou a seguinte publicação:

Martins V, Costa L*, Soares R*, Ayogu P, Teixeira A, Gerós H (2021) A catalogue of cultivable yeasts from the microbiota of grape berries cv. Vinhão and Loureiro. PLOS One (em revisão).

*estes autores contribuíram de forma equivalente para este trabalho

Este trabalho foi apoiado pelo “Contrato-Programa” UIDB/04050/2020 financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, FCT I.P. O trabalho contou ainda com o apoio da FCT, CCDR-N (Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Norte de Portugal) e Fundos Europeus (FEDER/POCI/COMPETE2020) através dos projetos GrapeMicrobiota (PTDC /BAA-AGR/2691/2020), AgriFood XXI (NORTE -01-0145-FEDER-000041), BerryPlastid (PTDC/BIA-FBT/28165/2017 e POCI-01-0145-FEDER-028165) e MitiVineDrought (PTDC /BIA-FBT/30341/2017 e POCI-01-0145-FEDER-030341). Este trabalho beneficiou das atividades em rede do laboratório colaborativo CoLAB VINES & WINES e do projeto Fleurs locales (SOE4/P5/F1011).



Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todos os docentes da Escola de Ciências que acompanharam o meu percurso académico e contribuíram, de uma forma direta ou indireta, para a minha formação. Em particular, um especial obrigado à Doutora Viviana Martins, por ter aceite o convite para orientar a presente dissertação e por todo o tempo disponibilizado, pois sem dúvida que este trabalho não teria sido possível de concretizar sem a sua ajuda, e ao Professor Doutor Hernâni Gerós pela oportunidade que me deu em desenvolver o presente trabalho, por todo o apoio e disponibilidade prestada.

Em seguida gostaria de agradecer aos meus amigos e colegas mais próximos que fizeram parte destes últimos anos e, com quem tive o privilégio de trabalhar e partilhar bons momentos. A eles desejo toda a sorte, sucesso e felicidade do mundo.

Por fim aos meus pais e irmã, e a todos os familiares que me apoiaram e incentivaram sempre deixo um enorme obrigada.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Evolução da microbiota do bago de uva durante a fermentação: efeitos da aplicação de suplementos de cálcio nas vinhas na sua abundância e diversidade

Resumo

Os suplementos à base de cálcio têm sido amplamente utilizados com vista ao aumento da firmeza dos frutos e da sua resistência a condições climáticas adversas. Estudos recentes do nosso grupo de investigação revelaram que o cálcio modifica as propriedades da película do bago de uva e a sua constituição química. Uma vez que a superfície do bago oferece um ambiente físico favorável ao crescimento de microrganismos, antecipamos que o cálcio afeta a microflora do bago. O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização do efeito do cálcio na microbiota cultivável do bago de uva e o seu efeito ao longo da fermentação do mosto. Pretendemos isolar e caracterizar diferentes espécies de levedura e explorar a sua tolerância a diferentes fatores de stresse abiótico. Videiras da casta “Vinhão” foram pulverizadas com uma solução de CaCl_2 ao longo do desenvolvimento do fruto e posteriormente foram realizadas microvinificações à escala laboratorial. Os resultados mostraram que o tratamento com cálcio conduziu a uma diminuição no conteúdo de antocianinas totais, bem como a uma repressão da expressão do gene *WUFGT* que codifica uma enzima envolvida na biossíntese destes metabolitos. A evolução da fermentação impactou a composição da comunidade microbiana. Com efeito, *Hanseniaspora uvarum* foi a espécie dominante nos mostos não fermentados (e, portanto, na microbiota dos bagos), enquanto *Pichia kudriavzevii* domina a meio do processo fermentativo. Paralelamente, estudos de crescimento em meio líquido mostraram que *P. kudriavzevii* é mais tolerante ao etanol. Os resultados relevaram também que os tratamentos com cálcio na vinha influenciaram a microbiota do bago e dos mostos parcialmente fermentados, diminuindo significativamente a sua abundância e modificando a sua diversidade. Em particular, o tratamento favoreceu o crescimento de *Metschnikowia* nos bagos e de *P. kudriavzevii* nos mostos parcialmente fermentados. Ensaio realizados com as espécies de levedura isoladas mostraram que *Metschnikowia* sp. é mais tolerante ao cobre e *Starmerella bacillaris* e *H. uvarum* são mais suscetíveis ao stresse osmótico. Os resultados suportaram ainda que as leveduras *P. kudriavzevii* e *Metschnikowia* sp. poderão ser benéficas na indústria vinícola, contribuindo de forma distinta para as propriedades organoléticas do vinho.

Palavras-chave: Cálcio; Fermentação; Microbiota do bago de uva, Stresse abiótico; *Vitis vinifera*.

Evolution of grape berry microbiota during fermentation: effects of the application of calcium supplements in vines on its abundance and diversity

Abstract

Calcium-based supplements have been widely used to increase fruit firmness and fruit resistance to adverse climate conditions. Recent studies by our research group have revealed that calcium modifies the properties of the grape berry skin and its chemical constitution. Since the surface of the grape berry provides a favorable physical environment for the growth of microorganisms, we anticipate that calcium affects the berry microflora. The main goal of the present work was to characterize the effect of calcium on the cultivable microbiota of grape berry and its effect throughout the fermentation of the must. We intend to isolate and characterize different yeast species and explore their tolerance to different abiotic stress factors. Vines of the “Vinhão” variety were sprayed with a CaCl_2 solution throughout the fruit's development and microvinifications were carried out at a laboratory scale. The results showed that calcium treatment led to a decrease in the total anthocyanin content, as well as a repression of the expression of the *VvUFGT* gene that encodes an enzyme involved in the biosynthesis of these metabolites. The evolution of the fermentation impacted the composition of the microbial community. Indeed, *Hanseniaspora uvarum* was the dominant species in the unfermented musts (thus, in the grape berry microbiota), while *Pichia kudriavzevii* dominates midway through the fermentation process. In parallel, growth studies in liquid medium showed the highest ethanol tolerance of *P. kudriavzevii*. The results also revealed that treatments with calcium in the vineyard influenced the microbiota of the berry and partially fermented musts, significantly reducing their abundance and modifying their diversity. In particular, the treatment favored the growth of *Metschnikowia* in the berries and of *P. kudriavzevii* in the partially fermented musts. Tests carried out with the isolated yeast species showed that *Metschnikowia* sp. is more tolerant to copper and *Starmerella bacillaris* and *H. uvarum* are more susceptible to osmotic stress. The results also supported that the yeasts *P. kudriavzevii* and *Metschnikowia* sp. may have relevant potential the wine industry, contributing in a distinct way to the organoleptic properties of the wine.

Keywords: Abiotic stress; Calcium; Fermentation; Grape berry microbiota; *Vitis vinifera*.

Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xiii
1. Introdução	1
1.1. Relevância económica, social e cultural de <i>Vitis vinifera</i> e do vinho.....	1
1.2. O bago de uva: composição e desenvolvimento.....	2
1.3. O papel do cálcio na integridade dos frutos.....	5
1.4. Efeito do cálcio na composição fenólica do bago de uva.....	7
1.5. A comunidade microbiana do bago de uva.....	8
1.5.1. Evolução da microbiota ao longo do desenvolvimento do bago de uva.....	9
1.5.2. Fatores que influenciam a comunidade microbiana do bago de uva.....	11
1.6. Do bago de uva ao vinho: o processo fermentativo e a formação de compostos aromáticos.....	11
1.6.1. Fatores que influenciam o processo fermentativo.....	15
1.7. Objetivos.....	17
2. Material e métodos	18
2.1. Aplicação de cálcio em videiras da casta “Vinhão”.....	18
2.1.1. Microvinificações.....	18
2.2. Quantificação de parâmetros bioquímicos-chave no bago de uva.....	19
2.2.1. Quantificação de açúcares redutores.....	19
2.2.2. Quantificação dos fenólicos totais.....	19
2.2.3. Quantificação das antocianinas.....	20
2.3. Estudo da expressão de genes do metabolismo secundário e do transporte de açúcares por PCR em tempo real.....	20
2.4. Crescimento e isolamento de leveduras em meio diferencial.....	21
2.5. Identificação das espécies de levedura.....	22
2.5.1. Amplificação da região ITS por PCR.....	22
2.5.2. Purificação do DNA e sequenciação.....	23
2.5.3. <i>Blast</i> das sequências ITS na base de dados NCBI.....	23
2.6. Efeito de fatores de stresse no crescimento das leveduras.....	23
2.7. Curvas de crescimento em glucose e potencial fermentativo de espécies selecionadas.....	24
3. Resultados	26

3.1.	Efeito do cálcio no teor de açúcares redutores, compostos fenólicos e antocianinas totais e na expressão de genes chave	26
3.2.	Efeito do cálcio na comunidade microbiana cultivável do bago de uva	27
3.3.	Avaliação do crescimento de espécies de levedura selecionadas sob condições de stresse .	33
3.4.	Perfil de crescimento e potencial fermentativo de espécies de leveduras selecionadas.....	36
4.	Discussão	39
4.1.	A aplicação exógena de cálcio não afeta o conteúdo em açúcares redutores e fenólicos totais no bago de uva, mas diminui a concentração de antocianinas	39
4.2.	<i>Hanseniaspora uvarum</i> predomina no mosto não fermentado e <i>Pichia kudriavzevii</i> prevalece no mosto parcialmente fermentado.....	39
4.3.	O cálcio diminui a abundância de leveduras no mosto e no vinho e modifica a sua diversidade	41
4.4.	<i>Metschnikowia</i> sp. destaca-se pela sua tolerância ao cobre e <i>Starmerella bacillaris</i> e <i>Hanseniaspora uvarum</i> pela sensibilidade ao stresse osmótico.....	42
4.5.	Capacidade fermentativa e potencial biotecnológico de <i>Pichia kudriavzevii</i> e de <i>Metschnikowia</i> sp.	43
5.	Conclusão	44
6.	Referências Bibliográficas	45

Lista de figuras

Figura 1. Regiões vitivinícolas em Portugal. Adaptado de Wines of Portugal (2019).....	1
Figura 2. Estrutura de um bago de uva maduro. Adaptado de Conde et al. (2007).	2
Figura 3. Desenvolvimento do bago de uva após a floração. Fase I: crescimento do fruto; Fase II: fase de latência; Fase III: amadurecimento do fruto. Adaptado de Kennedy (2002).	3
Figura 4. Formação de ligações cruzadas entre as pectinas da parede celular mediadas pelo cálcio. Adaptado de Yamamoto et al. (2011).....	6
Figura 5. Firmeza de bagos de maduros cv. “Vinhão” após tratamento das videiras com suplementos à base de cálcio (+ Ca) ou na ausência de cálcio (- Ca) ao longo da época de frutificação, nas estações de 2017 e 2018. Os valores de força / tensão estão indicados para os testes de compressão e perfuração, respetivamente. Os asteriscos indicam significância estatística em comparação com o controlo (- Ca): * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. Adaptado de Martins et al. (2020b).	6
Figura 6. Microscopia eletrónica de varrimento da superfície de bagos de uva maduros cv. “Vinhão” após tratamento das videiras com cálcio (+ Ca) ou na ausência de cálcio (- Ca) ao longo da época de frutificação, nas estações de 2017 e 2018. Imagens representativas mostram detalhes sobre a estrutura da lenticela, rachaduras e grau de colonização fúngica. Adaptado de Martins et al. (2020b)..	7
Figura 7. Efeitos da aplicação exógena de cálcio no perfil polifenólico do bago de uva e na expressão de genes-chave do metabolismo secundário. Adaptado de Martins et al. (2020c).	8
Figura 8. Consumo de açúcar (linha contínua) e produção de etanol (linha tracejada) ao longo da fermentação alcoólica conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 4072 em condições laboratoriais. Adaptado de Conde et al. (2007).	12
Figura 9. Perfil aromático de vinhos cv. “Vinhão”. As diferentes classes de compostos voláteis estão representadas em percentagem da composição volátil total. Adaptado de Martins et al. (2015).	14
Figura 10. Metodologia e principais resultados do estudo de Martins et al. (2020a) relativo ao efeito da aplicação de cálcio nas vinhas no perfil aromático do vinho.	17
Figura 11. Estrutura da região do transportador transcrito interno (ITS) da matriz do gene ribossomal 5,8S. Adaptado de Shaw et al. (2002).	22
Figura 12. Concentração de açúcares redutores, compostos fenólicos e antocianinas totais em bagos de uva colhidos de videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ao longo da época de frutificação ou sem tratamento (controlo). Os resultados encontram-se expressos pela média \pm desvio padrão e o asterisco indica diferenças estatisticamente significativas determinadas pelo teste t-Student. *, $P \leq 0.05$ ($n = 4$).	26
Figura 13. Expressão de genes-chave envolvidos no transporte de açúcares e no metabolismo secundário de bagos de uva colhidos de videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ao longo da época de frutificação ou sem tratamento (controlo). Estão indicados os níveis de transcritos de genes codificantes de transportadores de sacarose (<i>VvSUC11</i>), de hexoses (<i>VvHT3</i>) e de monossacarídeos (<i>VvTMT1</i>), e das enzimas fenilalanina amónia liase (<i>VvPAL1</i>), chalcona sintase (<i>VvCHS3</i>) e UDP glicose: flavonoide-3-O -glucosiltransferase (<i>VvUGT</i>). Os níveis de expressão foram normalizados para os níveis de transcrição do gene de referência <i>VvGAPDH</i> . Os resultados encontram-se expressos pela média \pm desvio padrão e o asterisco indica diferenças estatisticamente significativas determinadas pelo teste t-Student. *, $P \leq 0.05$ ($n = 4$).	27
Figura 14. Cultura de microrganismos presentes em 100 μ L de mosto antes do início da fermentação (t=0) diluído 100 vezes e a meio da fermentação (t=9) diluído 2500 vezes de bagos de uva colhidos de	

videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ou sem tratamento (controlo), após 5 dias de crescimento em meio diferencial WL. Imagens representativas de 3 réplicas biológicas.	28
Figura 15. Número total de colónias presentes em 1 mL de mosto antes do início da fermentação (t=0) e a meio da fermentação (t=9) de bagos de uva colhidos de videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ou sem tratamento (controlo), após 5 dias de crescimento em meio diferencial WL. Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão das contagens obtidas de 3 réplicas biológicas, e o asterisco indica diferenças estatisticamente significativas determinadas pelo teste t-Student: *, $P \leq 0.05$	29
Figura 16. Produtos de PCR da região ITS de diferentes isolados de levedura (poços 1-11) visualizados após eletroforese em gel de agarose. Poço M: marcador de pesos moleculares.....	29
Figura 17. Características microscópicas (DIC; escala = 10 µm) (A) e morfologia macroscópica (B) das 8 espécies de levedura isoladas de mosto antes do início da fermentação e a meio da fermentação de bagos cv. “Vinhão”.....	31
Figura 18. Composição das comunidades microbianas presentes nos mostos antes do início da fermentação (t=0) e a meio da fermentação (t=9) de bagos de uva colhidos de videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ou sem tratamento (controlo). Os resultados representam a média dos valores obtidos para 3 réplicas biológicas.	32
Figura 19. Heat map referente ao crescimento de 5 espécies de levedura cultivadas em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de CaCl ₂ .2H ₂ O. Para cada concentração, está indicado o rácio entre o valor de biomassa observado na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), 14 h após a incubação. Os valores apresentados representam a média de 2 réplicas biológicas. Na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).	33
Figura 20. Heat map referente ao crescimento de 5 espécies de levedura cultivadas em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de etanol. Para cada concentração, está indicado o rácio entre o valor de biomassa observado na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os valores apresentados representam a média de 2 réplicas biológicas. Na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).	34
Figura 21. Heat map referente ao crescimento de 5 espécies de levedura cultivadas em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de CuSO ₄ .5H ₂ O. Para cada concentração, está indicado o rácio entre o valor de biomassa observado na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os valores apresentados representam a média de 2 réplicas biológicas. Na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).	35
Figura 22. Heat map referente ao crescimento de 5 espécies de levedura cultivadas em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de PEG 6000. Para cada concentração, está indicado o rácio entre o valor de biomassa observado na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os valores apresentados representam a média de 2 réplicas biológicas. Na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).	36
Figura 23. Crescimento, consumo de glucose e produção de etanol de <i>Pichia kudriavzevii</i> . As células foram cultivadas em meio mineral suplementado com 2% de glucose utilizada como fonte de carbono,	

a 24 °C e pH 4,5. Os resultados representam a média ± DP de valores obtidos para 2 réplicas biológicas.**37**

Figura 24. Crescimento, consumo de glucose e produção de etanol de *Metschnikowia* sp.. As células foram cultivadas em meio mineral suplementado com 2% de glucose utilizada como fonte de carbono, a 24 °C e pH 4,5. Os resultados representam a média ± DP de valores obtidos para 2 réplicas biológicas.**37**

Figura 25. Crescimento, consumo de glucose e produção de etanol de *Saccharomyces cerevisiae*. As células foram cultivadas em meio mineral suplementado com 2% de glucose utilizada como fonte de carbono, a 24 °C e pH 4,5. Os resultados representam a média ± DP de valores obtidos para 2 réplicas biológicas.**38**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais microrganismos encontrados no bago de uva verde e maduro.....	10
Tabela 2. Microrganismos com maior impacto na qualidade final do vinho.	13
Tabela 3. Sequências dos <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) utilizadas no ensaio de qPCR. Adaptado de Martins et al. (2021a).	21
Tabela 4. Resultados da análise BLAST das sequências ITS dos 11 isolados de levedura selecionados. Para cada isolado, estão apresentados os valores de E, de percentagem de identidade e de <i>query coverage</i> para a espécie com melhor <i>ranking</i>	30

1. Introdução

1.1. Relevância económica, social e cultural de *Vitis vinifera* e do vinho

A videira (*Vitis vinifera*. L) é uma planta perene e nativa da área sul da cordilheira do Cáucaso e do mar Cáspio, que detém no presente uma importância socioeconómica elevada (Arroyo-García, 2006; Conde et al., 2007; Serrano et al., 2017). A domesticação desta espécie ocorreu a partir de populações selvagens de *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*, a partir de genótipos hermafroditas e de técnicas de propagação vegetativa, que proporcionaram a formação de bagos maiores e mais doces, com cores atrativas (Arroyo-García, 2006).

Os primeiros relatos de cultivo de vinha remontam à Idade do Cobre e início da Idade do Bronze (3500-2300 A.C.) na zona do vale do rio Jordão (Aradhya et al., 2003). No presente, esta atividade agrícola encontra-se amplamente distribuída: a área vitivinícola mundial ascende a 7,4 milhões de ha (Gouvinhas et al., 2019; OIV, 2019). Em Portugal, o seu cultivo representa um dos principais setores económicos, encontrando-se dividido em 14 regiões vinícolas: Vinho Verde, Trás-os-Montes, Porto e Douro, Távora-Varosa, Bairrada, Dão e Lafões, Beira interior, Lisboa, Tejo, Península de Setúbal, Alentejo, Algarve, Açores e Madeira (**Figura 1**; Wines of Portugal, 2019). O vinho detém uma longa história intimamente associada à da agricultura e, com o decorrer do tempo influenciou a geografia, economia, arqueologia, história, mitologias e religiões, artes e tradições, direito e medicina. Hoje, esta bebida ocupa um lugar único na maioria das sociedades, decorrente do seu amplo valor económico e cultural (Marsit e Dequin, 2015).



Figura 1. Regiões vitivinícolas em Portugal. Adaptado de Wines of Portugal (2019).

1.2. O bago de uva: composição e desenvolvimento

O bago de uva é rico em açúcares, fibras e minerais, incluindo ferro, fósforo, magnésio e potássio, e contém uma elevada concentração de flavonóides e outros compostos polifenólicos, como o resveratrol, reconhecido pelas suas propriedades antioxidantes (Paul e Shaha, 2004; Tabeshpour et al., 2018). O bago de uva é constituído por três tecidos principais: a película, a polpa e as sementes (**Figura 2**; Conde et al., 2007; González-Barreiro et al., 2015).

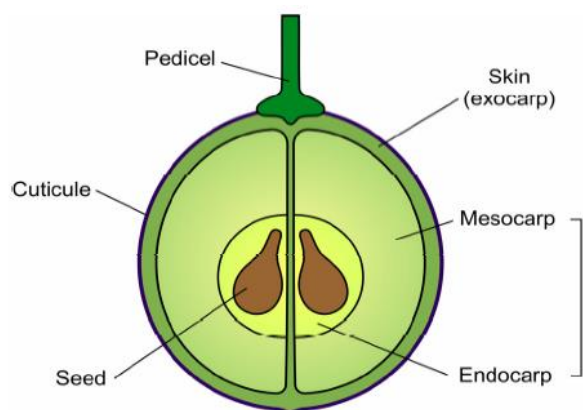


Figura 2. Estrutura de um bago de uva maduro. Adaptado de Conde et al. (2007).

O bago apresenta um padrão de crescimento sigmóide (González-Barreiro et al., 2015). O seu desenvolvimento é um processo dinâmico, dividido em três etapas essenciais, que inclui uma série complexa de alterações bioquímicas e moleculares, induzindo modificações no tamanho, composição, cor, textura, sabor e suscetibilidade a agentes patogénicos (**Figura 3**; Conde et al., 2007; Serrano et al., 2017). Durante o crescimento inicial do fruto, etapa I, observa-se o aumento do tamanho dos bagos, principalmente por ação da divisão celular. Nesta fase ocorre acumulação de ácidos orgânicos, principalmente málico e tartárico, taninos e ácidos hidroxicinâmicos (Deluc et al., 2007; Serrano et al., 2017). Os ácidos málico e tartárico conferem frescura ao vinho, sendo, desta forma, críticos para a sua qualidade, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos são precursores de fenóis voláteis e estão envolvidos em reações de escurecimento (González-Barreiro et al., 2015).

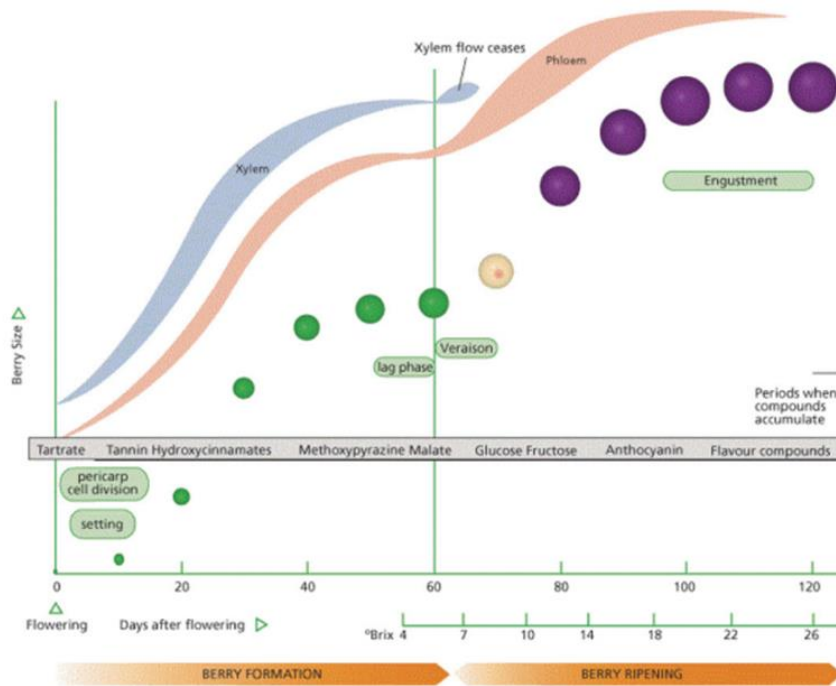


Figura 3. Desenvolvimento do bago de uva após a floração. Fase I: crescimento do fruto; Fase II: fase de latência; Fase III: amadurecimento do fruto. Adaptado de Kennedy (2002).

A etapa II é uma fase de latência na qual não ocorre crescimento do bago (Roubelakis-Angelakis, 2001). No final desta etapa ocorre a fase de pintor, ou *véraison*, onde ocorrem importantes alterações fisiológicas e bioquímicas (Serrano et al., 2017). A fase de pintor antecede um segundo período de crescimento à custa da expansão das células do mesocarpo. Simultaneamente, ocorre acumulação de açúcares, majoritariamente glicose e frutose, bem como um declínio do conteúdo em ácidos orgânicos e um aumento do conteúdo em compostos fenólicos (Roubelakis-Angelakis, 2001; Deluc et al., 2007; González-Barreiro et al., 2015). Assim, embora o primeiro período de crescimento contribua para a qualidade final do bago, é na segunda fase de crescimento onde se verifica uma enorme acumulação de solutos-chave (Conde et al., 2007).

Os compostos fenólicos sintetizados no bago de uva destacam-se pela sua contribuição em parâmetros como a cor, adstringência, textura, propriedades antioxidantes e antimicrobianas e sabor do bago e do vinho (Teixeira et al., 2013). Esta classe de metabolitos distribui-se por dois grupos, em compostos não-flavonóides, como os ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, fenóis voláteis e stilbenos, e em compostos flavonóides, onde se destacam as flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-ols e antocianinas (Teixeira et al., 2013). Enquanto os ácidos hidroxicinâmicos e os flavan-3-ols se distribuem por todos os tecidos do bago de uva, os stilbenos e ácidos hidroxibenzóicos encontram-se unicamente nas sementes e películas dos frutos (Teixeira et al., 2013; Gouot et al., 2019). Por outro

lado, compostos flavonóides como as antocianinas e flavonóis são exclusivos da película dos bagos de uva (González-Barreiro, 2015).

A videira num ambiente em mudança

Apesar da videira ser cultivada em todo o mundo, a produção vitícola ocorre em regiões do globo com padrões climáticos bastante específicos, geralmente a uma temperatura 25-35 °C e humidade relativa de 60-70% (Hunter e Bonnardot, 2011; Zhang et al., 2018). Assim, pequenas oscilações na temperatura sazonal podem determinar a qualidade do vinho e modificar o tamanho dos bagos. Temperaturas mais elevadas originam frutos maduros com baixo teor de ácido e elevado conteúdo de açúcares, enquanto temperaturas mais baixas podem comprometer o amadurecimento completo dos frutos, traduzindo-se num vinho mais ácido e desequilibrado (Teixeira et al., 2013; Mozell e Thach, 2014; Serrano et al., 2017; Costa et al., 2020). As modificações decorrentes no tamanho dos bagos podem igualmente afetar a qualidade do vinho. Com efeito, vinhos provenientes de castas com bagos pequenos contêm uma maior proporção de compostos derivados das películas dos frutos, nomeadamente stilbenos, ácidos hidroxibenzóicos, antocianinas e flavonóis, comparativamente aos vinhos de castas com bagos maiores, uma vez que estes possuem uma relação entre a área superficial e o volume inferior à dos bagos de menor tamanho (Teixeira et al., 2013; Conde et al., 2015; González-Barreiro, 2015).

Outro fator ambiental relevante consiste na disponibilidade de água, que influencia o crescimento e a produtividade vitícola. Atualmente, a implementação crescente de sistemas de rega deficitária na vinha para combater o stresse hídrico estival, mais acentuado no contexto atual de alterações climáticas, tem permitido manter a produtividade sem comprometer a qualidade dos frutos e do vinho garantindo, em simultâneo, uma gestão mais eficiente do uso de água (Conde et al., 2007; Chacón-Vozmediano et al., 2021).

O aumento da frequência, intensidade e duração de eventos extremos, como como chuvas intensas, inundações e ciclones, podem igualmente comprometer a qualidade da uva e do vinho (Füssel, 2017; Masson-Delmotte et al., 2018; Masson-Delmotte et al., 2020). Em particular, chuvas intensas antes da colheita podem originar o rachamento dos frutos, aumentando a sua predisposição a infeções, e conseqüentemente, perdas de produtividade e qualidade (Davaranpanah et al., 2018; Martins et al., 2020a). O fenómeno de rachamento dos frutos, como a romã, a maçã, o bago de uva, a cereja e o tomate não se encontra completamente esclarecido, mas presume-se que resulte de um aumento do influxo de água no fruto de algumas espécies mais suscetíveis (Correia et al., 2018; Davaranpanah et al.,

2018; Correia et al., 2020). Assim, os produtores têm recorrido à aplicação de suplementos à base de cálcio em diferentes tipos de frutos, antes e após a colheita, com o objetivo de aumentar a sua tolerância ao stresse abiótico e de prolongar o seu tempo de vida na prateleira (Martín-Diana et al., 2007; Winkler e Knoche, 2019). De entre as diferentes formas de cálcio, destacam-se o cloreto, o carbonato e o citrato de cálcio como as mais utilizadas, no entanto a seleção da fonte de cálcio apropriada é dependente de fatores como a sua biodisponibilidade e solubilidade (Martín-Diana et al., 2007; Martins et al., 2015).

A videira é reconhecidamente sensível a diferentes tipos de doenças. Dentro das patologias mais comuns distinguem-se o míldio e o oídio, causadas pelos fungos *Erysiphe necator* e *Plasmopara viticola*, respetivamente (Carisse, 2016; Lu et al., 2020). O oídio caracteriza-se por danos diretos (perdas da colheita) e indiretos (redução do vigor) na vinha, normalmente consequentes do rachamento e envelhecimento dos frutos, do aparecimento de lesões nos brotos e folhas e da queda precoce das mesmas (Gadoury et al., 2012; Lu et al., 2020). O míldio encontra-se maioritariamente associado a infeções nas inflorescências e cachos, podendo também reduzir o vigor das videiras e induzir alterações na quantidade e qualidade dos frutos (Carisse, 2016). Além das patologias mencionadas, a podridão cinzenta, causada pelo fungo *Botrytis cinerea* e a flavescência dourada, causada pelo fitoplasma *Candidatus Phytoplasma vitis* também representam ameaças ao cultivo da vinha (Serrano et al., 2017; Teixeira et al., 2020). Contudo, a incidência de doenças não depende exclusivamente do ambiente, mas também do genótipo, pelo que cultivares diferentes apresentam suscetibilidades distintas (Wilcox et al., 2015).

1.3. O papel do cálcio na integridade dos frutos

O cálcio tem um papel essencial na parede celular, onde está envolvido na formação de ligações cruzadas entre as pectinas, que constituem 50% da massa da parede das células vegetais, proporcionando uma estrutura rígida e firme (**Figura 4**; Davarpanah et al., 2018; Yu et al., 2020a).

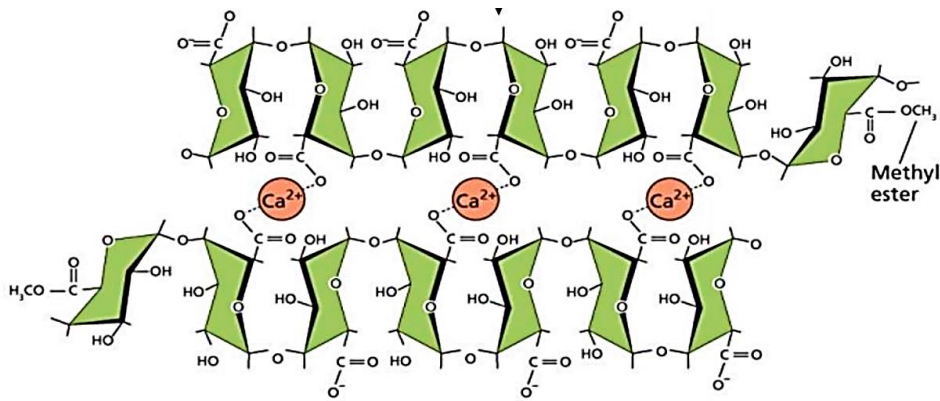


Figura 4. Formação de ligações cruzadas entre as pectinas da parede celular mediadas pelo cálcio. Adaptado de Yamamoto et al. (2011).

Estudos de campo demonstraram que a aplicação de suplementos de cálcio nas vinhas revelou-se eficaz no aumento da rigidez, firmeza e manutenção da qualidade dos frutos, diminuindo a incidência de fissuras na sua superfície (**Figuras 5 e 6**; Ciccacese et al., 2013; Martins et al., 2018, 2020b; Yu et al., 2020a). Estudos de microscopia eletrônica de varrimento mostraram que o cálcio reduz a quantidade de fungos filamentosos na superfície do fruto (**Figura 6**; Martins et al., 2020b). Estes resultados constituíram um ponto de partida para a realização do presente trabalho de tese, na medida em que foi sugerido pela primeira vez que o cálcio afeta a microbiota do fruto.

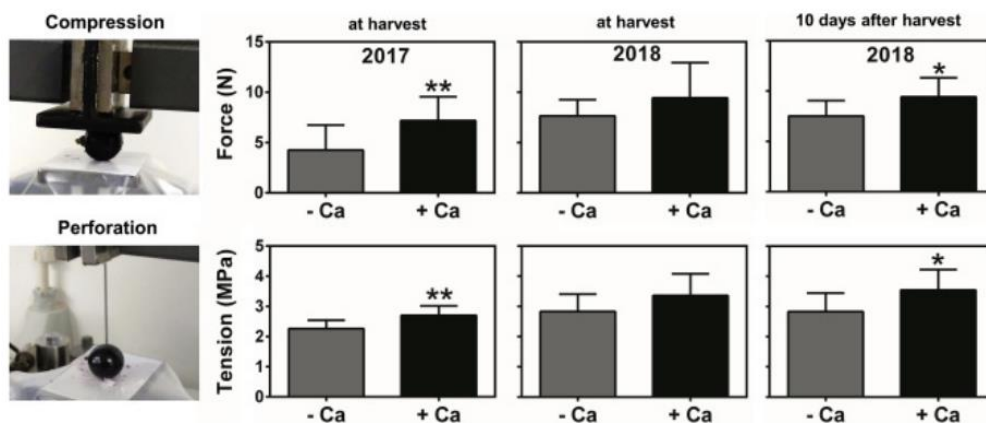


Figura 5. Firmeza de bagos de maduros cv. "Vinhão" após tratamento das videiras com suplementos à base de cálcio (+ Ca) ou na ausência de cálcio (- Ca) ao longo da época de frutificação, nas estações de 2017 e 2018. Os valores de força / tensão estão indicados para os testes de compressão e perfuração, respetivamente. Os asteriscos indicam significância estatística em comparação com o controlo (- Ca): * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. Adaptado de Martins et al. (2020b).

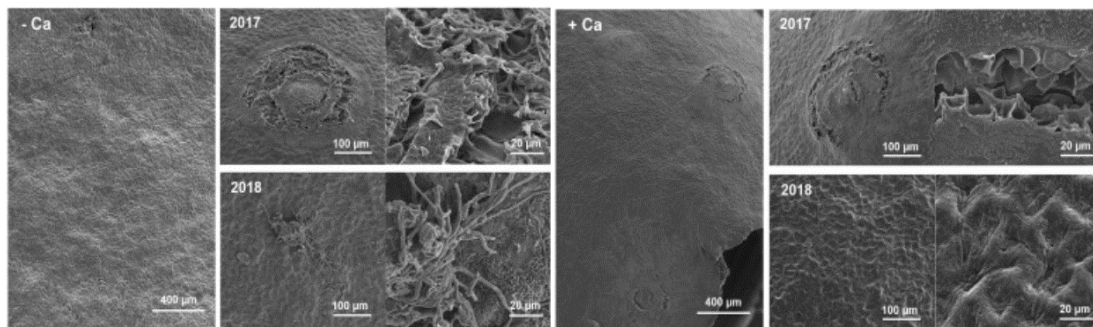


Figura 6. Microscopia eletrônica de varrimento da superfície de bagos de uva maduros cv. “Vinhão” após tratamento das videiras com cálcio (+ Ca) ou na ausência de cálcio (- Ca) ao longo da época de frutificação, nas estações de 2017 e 2018. Imagens representativas mostram detalhes sobre a estrutura da lenticela, rachaduras e grau de colonização fúngica. Adaptado de Martins et al. (2020b).

No mesmo estudo foi ainda mostrado que as transformações estruturais observadas no fruto são acompanhadas por modificações na expressão de genes que codificam enzimas-chave na parede celular, incluindo a inibição da expressão de genes que controlam a degradação de pectina, *PG1* e *PG2*, e a estrutura da cutícula, *CER9* e *CYP15* (Martins et al., 2020b).

Além da sua conhecida função estrutural, o cálcio pode ter um papel protetor contra doenças como a podridão cinzenta (Ciccarese et al., 2013). A eficiência deste elemento no controlo da patologia pode ser atribuída a uma ação direta do macronutriente sobre o agente patogénico, envolvendo a inibição das poligalacturonases fúngicas que degradam a parede celular vegetal. O cálcio pode ainda atuar indiretamente ao estimular mecanismos de resistência endógena, por meio da estimulação da síntese de fitoalexinas e de outros compostos fenólicos (Ciccarese et al., 2013; Martins et al., 2020a).

1.4. Efeito do cálcio na composição fenólica do bago de uva

Dado o seu papel como principal mensageiro secundário, o cálcio desempenha funções na regulação da pressão osmótica e divisão das células, na resposta ao stress e no desenvolvimento e diferenciação dos tecidos vegetais (Martins et al., 2012a; Hocking et al., 2016). Ensaio realizados em videiras cv. “Vinhão” mostraram que a aplicação exógena de cálcio diminui o conteúdo em fenólicos totais do bago de uva (Martins et al., 2020c). Contudo, ocorre um aumento da síntese de stilbenos, particularmente de *E*-resveratrol, *E*-piceid e *E*- ϵ -viniferina, dos flavonóis, quercetina-3-*O*-glicosídeo 2 e quercetina-3-*O*-glicuronídeo 2 e de flavan-3-ols. As modificações observadas estão associadas à sobre-expressão dos genes *STS* e *FLS1*, que codificam as enzimas stilbeno sintase e flavonol sintase, respetivamente (**Figura 7**; Martins et al., 2020c). A aplicação exógena de cálcio conduz também a

uma redução do conteúdo em antocianinas, consistente com a repressão da expressão do gene *UFGT* que codifica a enzima UDP-glicose: flavonóide-3- O- glucosiltransferase, que catalisa o passo limitante da via de biossíntese das antocianinas.

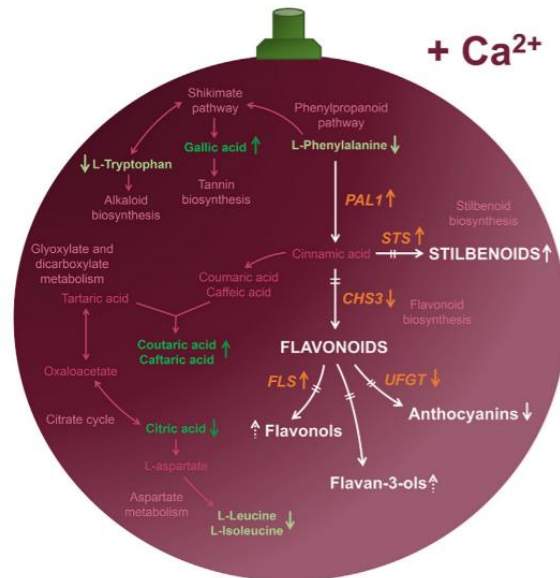


Figura 7. Efeitos da aplicação exógena de cálcio no perfil polifenólico do bago de uva e na expressão de genes-chave do metabolismo secundário. Adaptado de Martins et al. (2020c).

Em outras variedades de videira foi mostrado que a aplicação de cálcio promove a biossíntese e acumulação de antocianinas no bago, pela estimulação do gene *UFGT* (Zhu et al., 2019; Yu et al., 2020b).

1.5. A comunidade microbiana do bago de uva

A superfície do bago de uva oferece um ambiente físico favorável ao crescimento de microrganismos (Čadež et al., 2010; Barata et al., 2012; Camilo, 2014). Uma fração destes seres vivos encontra-se unicamente presente nos bagos, enquanto outros sobrevivem e desenvolvem-se ao longo da fermentação vinícola, originando o consórcio microbiano do vinho (Anagnostopoulos et al., 2019). A relação da videira com a respetiva comunidade microbiana condiciona o seu desenvolvimento e crescimento, assim como a produção e a qualidade do vinho, que se reflete na sua complexidade sensorial (Kecskeméti et al., 2016; Pinto e Gomes, 2016).

As interações videira-microrganismo podem ser denominadas de prejudiciais, benéficas ou neutras, consoante a espécie de microrganismo e o seu efeito na planta (Pinto e Gomes, 2016). A comunidade

microbiana do bago compreende leveduras, bactérias e fungos filamentosos com diferentes características metabólicas e fisiológicas (Pinto et al., 2015).

As leveduras representam um dos principais grupos de microrganismos intervenientes no processo de vinificação, desenvolvendo-se na superfície dos bagos (Čadež et al., 2010; Kántor et al., 2015). Estas integram as classes *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Deuteromycetes* e categorizam-se como *Saccharomyces* e não *Saccharomyces*, contribuindo para as diferentes características do vinho, sabor e *bouquet*, como descrito na secção seguinte (Kántor et al., 2017; Mateo et al., 2020). Além das suas particularidades benéficas, estes microrganismos podem ainda produzir efeitos indesejados no vinho, alterando as suas características finais. Um exemplo é a produção de metabolitos como o ácido acético (Camilo et al., 2014).

As bactérias acéticas e lácticas presentes no vinho são provenientes do bago de uva e do equipamento da adega (Camilo, 2014; Kántor et al., 2015). As bactérias acéticas encontraram-se regularmente relacionadas com a deterioração do vinho, oxidando o etanol em ácido acético ou acetado de etilo (Barata et al., 2012; Camilo, 2014). No entanto, a recorrência a boas práticas vitícolas e de higienização das cubas é essencial, possibilitando o controlo destas espécies bacterianas (Barata et al., 2012). Em contrapartida, bactérias lácticas estão envolvidas na fermentação maloláctica, um modelo fermentativo que se traduz na descarboxilação do ácido málico a ácido láctico (Belda et al., 2017). A fermentação maloláctica conduz à desacidificação da maioria dos vinhos tintos e alguns vinhos brancos (o ácido láctico é mais fraco que o ácido málico), e para o desenvolvimento de uma estabilidade microbiana, de forma a tornar este produto mais palatável (Camilo, 2014; Belda et al., 2017).

Como referido no ponto 1.2, os fungos filamentosos são caracterizados pela produção de um complexo enzimático responsável pela degradação de substratos específicos e pela biossíntese de metabolitos secundários e substâncias voláteis, encontrando-se vulgarmente associados a doenças (Ding et al., 2019; Kačániová et al., 2020).

1.5.1. Evolução da microbiota ao longo do desenvolvimento do bago de uva

A comunidade microbiana presente nos bagos de uva é mutável ao longo do processo de desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, refletindo-se em modificações na diversidade e proporção das diferentes leveduras, bactérias e fungos (**Tabela 1**; Kántor et al., 2017; Kačániová et al., 2020).

Tabela 1. Principais microrganismos encontrados no bago de uva verde e maduro.

Fase de desenvolvimento	Microrganismo	Espécie/ Gênero	Referência
Verde	Leveduras	<i>Rhodotorula</i> sp.	Fleet (2003); Kačániová et al. (2020)
		<i>Cryptococcus</i> sp.	
		<i>Candida</i> sp.	
		<i>Rhodosporidium babjevae</i>	Renouf et al. (2005)
		<i>Rhodosporidium</i> sp.	
		<i>Sporobolomyces</i> sp.	
		<i>Sporodiobolus</i> sp.	
	<i>Bulleromyces</i> sp.		
	Bactérias	<i>Pseudomonas</i> sp.	Martins et al. (2012b)
		<i>Oenococcus oeni</i>	Renouf et al. (2005)
Fungos filamentosos	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fleet (2003); Renouf et al. (2005); Kačániová et al. (2020)	
Maduro	Leveduras	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Fleet (2003); Barata et al. (2012); Kačániová et al. (2020)
		<i>Metschnikowia</i> sp.	
		<i>Pichia</i> sp.	Renouf et al. (2005); Barata et al. (2012)
		<i>Saccharomyces</i> sp.	Renouf et al. (2005)
		<i>Candida</i> sp.	Renouf et al. (2005); Barata et al. (2012)
		<i>Cryptococcus</i> sp.	Renouf et al. (2005)
		<i>Rhodotorula</i> sp.	
		<i>Rhodosporidium</i> sp.	
		<i>Sporobolomyces</i> sp.	
		<i>Sporodiobolus</i> sp.	
	<i>Bulleromyces</i> sp.		
	Bactérias	<i>Micrococcus</i> sp.	Martins et al. (2012b)
		<i>Oenococcus oeni</i>	Renouf et al. (2005)
		<i>Gluconobacter oxydans</i>	
	Fungos filamentosos	<i>Cladosporium</i> sp.	Liu e Howell (2020)
<i>Epicoccum</i> sp.			

As populações dos microrganismos que colonizam os bagos aumentam durante o processo de maturação, alcançando níveis mais elevados em frutos maduros (Martins et al., 2012b; Martins et al.,

2014a). Este aumento populacional pode ser consequência do aumento dos níveis de açúcares no fruto maduro, podendo também estar relacionado com a redução do nível de fitofármacos (Martins et al., 2014a; Carmichael et al., 2019).

1.5.2. Fatores que influenciam a comunidade microbiana do bago de uva

A diversidade da microbiota que coloniza o bago de uva pode variar de acordo com a origem geográfica e condições climáticas da vinha, com o tipo de cultivar e com as práticas de cultivo, em particular relacionadas com a utilização de herbicidas, fertilizantes, pesticidas e fungicidas (Milanović et al., 2013; Anagnostopoulos et al., 2019; Gao et al., 2019; Liu et al., 2019). Num estudo recente, a diversidade fúngica mostrou-se dependente da variedade e dos fatores geográficos (altitude, latitude e longitude) e climáticos (secas e períodos desprovidos de geada), enquanto a composição da comunidade bacteriana variou apenas com as condições geográficas e com o tipo de cultivar (Gao et al., 2019). Outros resultados traduziram uma maior abundância e diversidade de leveduras em bagos amostrados de vinhas tratadas com fungicidas convencionais (de síntese), comparativamente ao tratamento com fungicidas à base de cobre, comprovando a influência das práticas de cultivo nas comunidades microbianas do bago de uva (Milanović et al., 2013).

1.6. Do bago de uva ao vinho: o processo fermentativo e a formação de compostos aromáticos

As leveduras são imprescindíveis durante o processo de fermentação alcoólica do mosto, convertendo os açúcares, principalmente frutose e glucose, em álcool (**Figura 8**; Conde et al., 2007; Pinto et al., 2015). Assim, quase todo o açúcar pode ser fermentado em álcool, originando um vinho seco (concentração de açúcar residual <4 g/L), meio-seco (concentração de açúcar entre 12-45 g/L) ou doce (concentração de açúcar >45 g/L), (Conde et al., 2007). A fermentação alcoólica do mosto pode decorrer de forma espontânea, pela microflora endógena do bago de uva, ou ser induzida por culturas *starter* (Carpena et al., 2021). As culturas *starter* podem ser simples - uma estirpe de levedura -, competindo com as estirpes não *Saccharomyces* naturalmente presentes no mosto, ou culturas mistas - duas ou mais estirpes de levedura-, que normalmente originam vinhos com um teor alcoólico inferior, mas com uma complexidade aromática superior (Carpena et al., 2021).

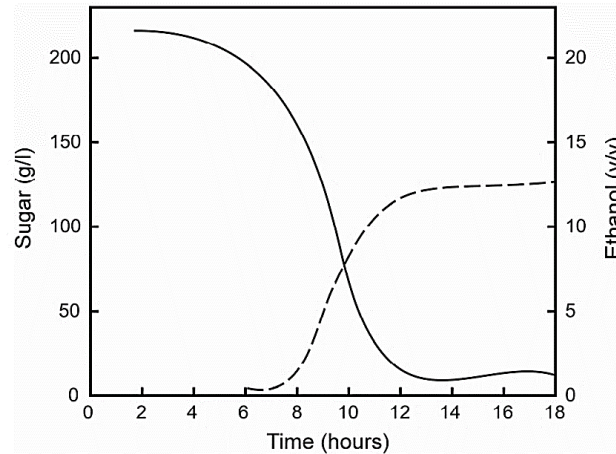


Figura 8. Consumo de açúcar (linha contínua) e produção de etanol (linha tracejada) ao longo da fermentação alcoólica conduzida por *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072 em condições laboratoriais. Adaptado de Conde et al. (2007).

Historicamente, a espécie mais utilizada no processo fermentativo dos vinhos é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como resultado das suas características peculiares, que incluem um elevado metabolismo e cinética fermentativa, baixa produção de ácido acético, elevada tolerância ao etanol e dióxido de enxofre e produção de compostos aromáticos agradáveis (Carpena et al., 2021). A comunidade de leveduras existente no vinho inclui ainda a presença de microrganismos com particularidades relevantes (**Tabela 2**). Por exemplo, *Hanseniaspora uvarum* contribui para a produção mais diversificada de compostos voláteis e *Starmerella bacillaris* para uma acidificação natural do vinho (Englezos et al., 2015; Tristezza et al., 2016).

Tabela 2. Microrganismos com maior impacto na qualidade final do vinho.

Microrganismo	Espécie	Caraterísticas	Referência
Leveduras	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Elevada capacidade fermentativa; Impacto significativo no sabor e aroma do vinho (redução da acidez volátil e aumento dos carateres varietais e frutados dos vinhos)	Varela e Borneman (2017); Benito et al. (2019)
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Pode aumentar a concentração de glicerol em fermentações combinadas; Detém capacidade para reduzir o conteúdo de ácido málico (10%), acetaldeído (10 mg/L) e etanol até 1%	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Contribui para a desacidificação dos vinhos, reduzindo a concentração de ácido málico	Varela e Borneman, (2017)
	<i>Starmarella bacillaris</i>	Apresenta um caráter frutofílico; Produção de baixas concentrações de etanol e ácido acético; Aumento da concentração de glicerol, sensação na boca e sabor dos vinhos	Englezos et al. (2015); Varela e Borneman (2017); Benito et al. (2019)
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Aumento da produção de compostos voláteis (atividade enzimática de β -glucosidase e β -xilusidase); Promove um sabor do vinho mais intenso e melhorias na sua complexidade aromática	Tristezza et al. (2016); Varela e Borneman (2017); Benito et al. (2019)
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Contribui para acidificação de vinhos (capacidade de produção de ácido láctico)	Varela e Borneman (2017); Benito et al. (2019)
Bactérias lácticas	<i>Oenococcus oeni</i>	Principal espécie associada à fermentação malolática do vinho; Produção de diacetil (confere aroma amanteigado aos vinhos); Contribuição com aromas frutados ou a verniz	Camilo (2014); Cappello et al. (2017); Brizuela et al. (2019)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Frequentemente envolvida na fermentação malolática; possui uma gama diversificada de enzimas que afetam positivamente as propriedades organolépticas e sabor do vinho: glicosidases, β -glicosidases, esterases, descarboxilases de ácido fenólico e citrato-liases	
	<i>Pediococcus parvulus</i>	Contribuição com efeitos prejudiciais na qualidade do vinho: formação de aminas biogénicas	Cappello et al. (2017)
	<i>Pediococcus damnosus</i>	Contribuição com efeitos prejudiciais na qualidade do vinho: formação de aminas biogénicas e produção de glucano (aumento da viscosidade do vinho principalmente quando este já se encontra encubado)	Camilo (2014) Cappello et al. (2017)
Bactérias acéticas	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Principais bactérias acéticas encontradas no vinho; Produção de ácido acético	Bartowsky e Henschke (2008); Sengun e Karabiyikli (2011)
	<i>Acetobacter aceti</i>		
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>		

Bactérias lácticas e acéticas contribuem igualmente para os diferentes atributos do vinho (**Tabela 2**). Como referido anteriormente, a fermentação malolática interfere essencialmente nas propriedades organoléticas e no envelhecimento do vinho, conferindo particularidades benéficas à bebida, ao passo que a acética se caracteriza pelo seu impacto negativo no processo de vinificação (Pinto et al., 2015).

O perfil aromático do vinho é conferido por centenas de compostos voláteis, em concentrações que oscilam entre vários mg/L a alguns ng/L (**Figura 9**; Martins et al., 2014b; Rubio-Bretón et al., 2019). A fração volátil dos vinhos é altamente complexa e a quantidade e a classe dos compostos que a integram são influenciadas por diferentes fatores, incluindo a casta, o *terroir*, o estado de maturação do bago de uva, as práticas vitícolas, as técnicas de processamento do mosto e as estratégias de fermentação e de armazenamento do vinho. Além destes fatores, a libertação e a perceção do aroma encontram-se ainda dependentes de aspetos físicos e ambientais, como a temperatura do vinho (Rubio-Bretón et al., 2019).

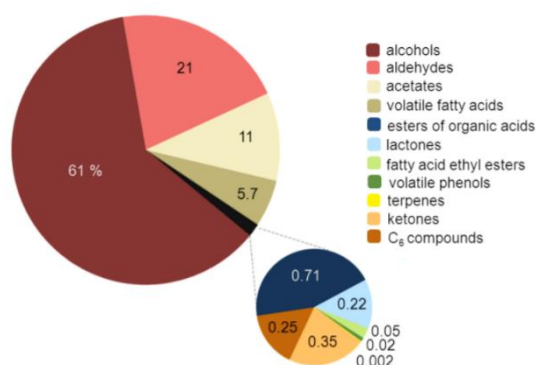


Figura 9. Perfil aromático de vinhos cv. “Vinhão”. As diferentes classes de compostos voláteis estão representadas em percentagem da composição volátil total. Adaptado de Martins et al. (2015).

Aromas varietais ou primários provêm do metabolismo dos bagos de uva (Rubio-Bretón et al., 2019). Estes dependem da casta e são influenciados pelas condições edáficas e climáticas da vinha, assim como pelas práticas vitícolas adotadas, que impõe diferentes condições de cultivo (Rubio-Bretón et al., 2019; Carpena et al., 2021). Por este motivo, é possível que aromas provenientes da mesma casta apresentem características distintas (Carpena et al., 2021). Dentro das diferentes substâncias aromáticas encontradas nos bagos de uva, destacam-se os álcoois monoterpénos pela sua contribuição no aroma e sabor, fornecendo aromas frutados, florais e cítricos ao vinho (Carpena et al., 2021).

Aromas fermentativos ou secundários incluem todos os compostos voláteis do vinho produzidos durante o processo de vinificação, numa fase inicial pela fermentação alcoólica e posteriormente no decorrer da fermentação malolática (Rubio-Bretón et al., 2019). Os compostos aromáticos oriundos

destes processos representam, geralmente, a maior proporção do aroma do vinho e integram os grupos dos álcoois, ácidos, ésteres, compostos de carbono, compostos de enxofre, lactonas e fenóis voláteis (Belda et al., 2017; Rubio-Bretón et al., 2019; Carpena et al., 2021). No entanto, tendo em conta o seu contributo no aroma dos vinhos, a maioria dos estudos foca-se apenas nos álcoois superiores e respetivos acetatos e nos ácidos gordos e seus ésteres etílicos.

Por fim, aromas de envelhecimento ou terciários derivam da última fase do processo de produção de vinho, onde o armazenamento do produto final é o principal responsável pela transferência de aromas e sabores (Carpena et al., 2021). Esta etapa caracteriza-se como o período mais longo envolvido na produção de vinho, onde se consolidam os atributos adquiridos anteriormente e se acrescentam as novas propriedades, especialmente se o vinho adotar o método de envelhecimento tradicional em barris de madeira, construídos a partir de diferentes espécies de carvalho (Rubio-Bretón et al., 2019; Carpena et al., 2021). Durante o envelhecimento em barris de carvalho, as madeiras transferem uma grande diversidade de compostos aromáticos para o vinho. Essas substâncias voláteis extraídas são essencialmente compostos de furfural, como guaiacol, carvalho ou uísque-lactona, vanilina ou siringaldeído (Belda et al., 2017). Além da madeira, compostos derivados de microrganismos, como polissacarídeos, aminoácidos livres e peptídeos, podem também contribuir para a composição do vinho durante o seu processo de envelhecimento (Belda et al., 2017).

1.6.1. Fatores que influenciam o processo fermentativo

O processo fermentativo é influenciado por diversos parâmetros, incluindo a temperatura, o tempo de contacto com a película do fruto, a flora microbiana interveniente e os tratamentos da vinha (Conde et al., 2007). A temperatura de fermentação representa uma das principais variáveis ambientais na modificação dos padrões de qualidade do produto final (López-Malo et al., 2013). Temperaturas baixas (10-15 °C) estão associadas com a produção e retenção de compostos voláteis relacionados com o aroma, sendo, portanto, utilizadas em fermentações para a produção de vinhos com sabores mais pronunciados, com maior complexidade aromática (López-Malo et al., 2013; Liu et al., 2018). No entanto, este processo fermentativo é lento (Liu et al., 2018). Em contrapartida, a temperaturas mais elevadas o crescimento das leveduras fermentativas é maior e o esgotamento dos açúcares traduz-se num teor alcoólico genericamente mais elevado (Liu et al., 2018).

O tempo de contacto da película com a fração líquida do mosto influencia o modelo fermentativo, modificando o conteúdo fenólico dos vinhos, uma vez que os compostos fenólicos são mais abundantes nas películas (Eisenman, 1999). A maioria dos compostos responsáveis pela pigmentação

e sabor é extraída nos primeiros quatro dias de fermentação, enquanto a extração dos taninos se prolonga durante mais tempo (Eisenman, 1999).

O processo fermentativo caracterizado pelo elevado teor de açúcar (no início da fermentação), baixo pH e conteúdo em azoto assimilável, condições de anaerobiose e, frequentemente, elevados níveis de sulfitos exerce uma pressão seletiva sobre comunidade microbiana residente, induzindo modificações nos padrões de biodiversidade destes organismos (Marsit e Dequin, 2015; Ciani et al., 2016; van Wyk et al., 2019). Desta forma, com o decorrer da fermentação, espécies como a *S. cerevisiae* tornam-se predominantes devido à sua maior tolerância ao etanol (van Wyk et al., 2019).

As práticas vitivinícolas constituem também um parâmetro determinante na qualidade do vinho, na medida em que afetam a composição dos bagos e do mosto. Por exemplo, a aplicação de calda bordalesa nas vinhas influencia o processo fermentativo, resultando numa conversão dos açúcares redutores significativamente mais lenta (Martins et al., 2015). Além disso, o sulfato de cobre induz um decréscimo na concentração de álcoois superiores e de ésteres de ácidos orgânicos, bem como um aumento significativo da concentração de acetatos e do conteúdo de ésteres etílicos de ácidos gordos e propanoato e hexanoato de etilo, podendo influenciar o aroma final do vinho (Martins et al., 2015).

Por outro lado, estudos recentes demonstraram que a aplicação de suplementos de cálcio nas vinhas, com vista ao aumento da firmeza dos frutos, origina modificações na composição do mosto, afetando também o perfil volátil do vinho (Martins et al., 2020a). Os resultados mostraram que cálcio não afeta o processo de fermentação alcoólica induzido pela inoculação do mosto com uma estirpe de *S. cerevisiae*, modificando apenas o progresso de fermentação espontânea conduzido pela microbiota nativa do bago de uva, afetando compostos associados a aromas varietais e fermentativos do vinho. De um modo geral, os vinhos provenientes de bagos de uva de plantas tratadas com suplementos à base de cálcio apresentam um maior conteúdo de acetatos, álcoois e monoterpenóis e uma menor quantidade de fenóis voláteis, níveis de β -damascenona, benzaldeído e γ -nonalactona, que pode ser relevante do ponto de vista enológico (**Figura 10**; Martins et al. 2020a).

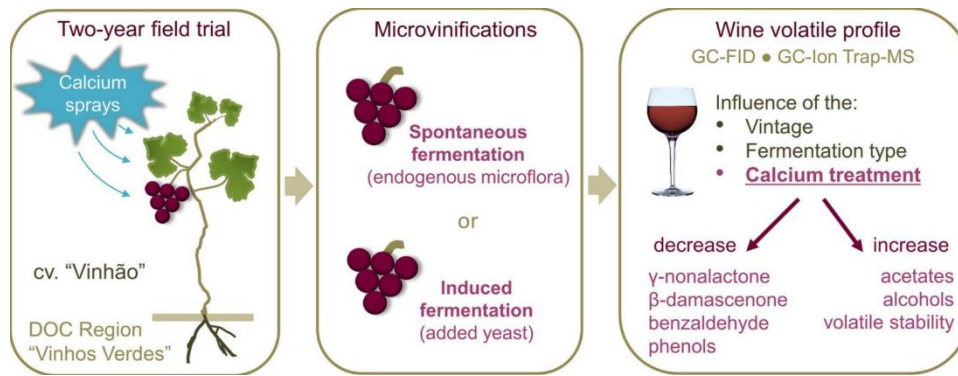


Figura 10. Metodologia e principais resultados do estudo de Martins et al. (2020a) relativo ao efeito da aplicação de cálcio nas vinhas no perfil aromático do vinho.

1.7. Objetivos

Estudos recentes conduzidos pelo nosso grupo de investigação demonstraram que a aplicação de cálcio em videiras da casta "Vinhão" reduz a incidência de fungos filamentosos na superfície do bago de uva, em consequência da redução de fissuras e do aumento da firmeza do fruto. Em paralelo, foi ainda observado que o cálcio modifica a composição fenólica do bago de uva e afeta o processo fermentativo, sugerindo que a microbiota do fruto pode ser substancialmente modificada. O objetivo do presente projeto consistiu então em caracterizar o efeito do cálcio na comunidade microbiana do bago de uva durante a fermentação, bem como em avaliar o efeito de fatores de stresse abiótico em estirpes selecionadas da população microbiana, com vista à identificação de estirpes tolerantes com potencial interesse enológico.

2. Material e métodos

2.1. Aplicação de cálcio em videiras da casta “Vinhão”

Videiras jovens da casta “Vinhão” localizadas numa vinha comercial da região dos Vinhos Verdes [coordenadas: N41°28'28" latitude, W8°34'59" longitude, 165 m altitude], foram tratadas, no ano de 2020, com uma solução de 2% (m/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,1% (v/v) Silwet L-77, utilizado como surfactante, de acordo com o método previamente otimizado pela equipa de investigação (Martins et al., 2020a, c). O tratamento consistiu na pulverização da parte aérea das videiras ao longo da época de frutificação, num total de três aplicações; a primeira foi efetuada na fase de bago de ervilha (E-L 31; Coombe, 1995), a segunda na fase de pintor (E-L 33) e a última na fase madura (E-L 38), uma semana antecedente à colheita. Em paralelo, plantas controlo foram pulverizadas com uma solução que incluía apenas o agente surfactante (Silwet L-77). As videiras controlo e as tratadas com cálcio foram cultivadas sob o mesmo microclima e submetidas aos mesmos tratamentos fitossanitários de rotina com Topaze® e Ridomil Gold® R WG (Syngenta Portugal LDA., Lisbon, Portugal), atendendo às indicações dos fornecedores. Estudos anteriores comprovaram que o método de aplicação de cálcio nas videiras conduz a um aumento de até 50% da concentração de cálcio na película dos bagos, e de até 14% nos respetivos mostos (Martins et al., 2020a, c).

2.1.1. Microvinificações

Três cachos maduros foram aleatoriamente colhidos de cada videira, num total de dezoito cachos por tratamento. Os cachos foram esmagados manualmente e os mostos preparados consoante o método tradicional de produção dos Vinhos Verdes, em escala laboratorial, conforme descrito por Martins et al. (2015, 2020b). Foram realizadas 3 réplicas biológicas por tratamento. As fermentações ocorreram a 24 °C de forma espontânea, desencadeadas exclusivamente pela microflora endógena do bago de uva. Para caracterização da microbiota foram recolhidas alíquotas de mosto antes da fermentação (t=0) e nove dias após o início da fermentação (t=9), correspondendo à fase intermédia da fermentação, em que 50% dos açúcares do bago foram convertidos em etanol (6%), conforme descrito por Martins et al. (2020b). Não foram recolhidas amostras no final da fermentação (t=18) uma vez que nesta fase a quantidade de leveduras viáveis é muito reduzida devido à elevada concentração de etanol no vinho (11%) (Martins et al., 2020b).

2.2. Quantificação de parâmetros bioquímicos-chave no bago de uva

2.2.1. Quantificação de açúcares redutores

Os bagos de uva foram inicialmente macerados em azoto líquido e guardados a -80 °C até posterior processamento das amostras. A concentração dos açúcares redutores no bago de uva foi determinada com o reagente ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS), segundo o método descrito por Miller (1959). O procedimento tem como base a formação de um complexo de cor castanho-alaranjado, por redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5 nitrosalicílico pelos açúcares redutores, que é proporcional à concentração de açúcares redutores na amostra. Assim, numa primeira fase prepararam-se extratos aquosos de 200 mg de peso fresco do fruto utilizando 1,5 mL de H₂O. Após homogeneização dos extratos, as amostras foram centrifugadas durante 5 min a 18 000 *g*, a fim de recolher o sobrenadante. Em seguida adicionaram-se 250 µL de uma solução de DNS a 250 µL de sobrenadante diluído 20 vezes em H₂O. Após 3 min de fervura arrefeceram-se as amostras em gelo, de forma a parar a reação, e acrescentaram-se 4,5 mL de água fria. Em paralelo foi preparado um branco, tendo em conta a pigmentação das amostras. Para isso ferveu-se inicialmente a solução de DNS e, só após o seu arrefecimento foram adicionados os extratos, tendo em conta que nesse momento já não haveria reação com os açúcares redutores, garantindo assim que a absorvância resultante da cor dos bagos seria descontada à absorvância do complexo formado entre os açúcares e o DNS. Foram preparadas 4 réplicas biológicas por condição. A absorvância das amostras foi registada no comprimento de onda de 540 nm, utilizando um espectrofotómetro Thermo Spretronic Genesys 20. A concentração em açúcares redutores das amostras foi calculada através de uma curva de calibração construída com soluções de glucose de concentrações conhecidas, com a equação: $Abs_{(540\text{ nm})} = [glucose] \text{ (mg/mL)} \times 0,3952 - 0,0105$.

2.2.2. Quantificação dos fenólicos totais

Os fenólicos totais presentes nos bagos de uva foram quantificados com base no método de colorimetria de Folin-Ciocalteau (Waterhouse, 2002). A 200 mg de peso fresco de bagos de uva macerados foi adicionado 1 mL de metanol 100%, e os extratos foram centrifugados durante 3 min a 18 000 *g* para recolha do sobrenadante. A 10 µL do sobrenadante foram adicionados 1,5 mL de água ultrapura e 100 µL do reagente de Folin. Após homogeneização da mistura no vórtex, foram adicionados 300 µL de Na₂CO₃ e as amostras foram incubadas durante 15 min no escuro, à temperatura ambiente. A absorvância das amostras foi registada no comprimento de onda de 765 nm. A quantificação foi realizada em 4 réplicas biológicas por condição. A concentração de fenólicos totais

foi calculada através de uma curva de calibração contruída com soluções de ácido gálico de concentração conhecida, com a equação: $Abs_{(765\text{ nm})} = \mu\text{g de ácido gálico} \times 0,295 + 0,02248$, onde Abs corresponde à absorvância registada.

2.2.3. Quantificação das antocianinas

O conteúdo de antocianinas totais foi avaliado através de uma adaptação do método do pH diferencial (Nicoué et al., 2007). A extração das antocianinas foi realizada a partir de 200 mg de peso fresco de bagos macerados utilizando 1 mL de metanol 100%. As amostras foram posteriormente centrifugadas durante 3 min a 18 000 *g* e os sobrenadantes diluídos 5 vezes em metanol 100%. A cada 100 μL de amostra foram adicionados 900 μL de KCl a 25 mM (pH 1,0). Após homogeneização no vórtex, foi lida a absorvância das amostras no comprimento de onda de 520 nm. A quantificação foi realizada em 4 réplicas biológicas por condição.

A concentração de antocianinas totais foi obtida a partir da equação [**antocianinas totais**] (mg/L) = $Abs(520\text{ nm}) \times Mw \times 1000 \varepsilon \times c$, onde Mw é o peso molecular da malvidina-3-*O*-glucosídeo, ε é o coeficiente de absorção molar da malvidina-3-*O*-glucosídeo e c corresponde ao comprimento que o feixe de luz atravessa (1 cm).

2.3. Estudo da expressão de genes do metabolismo secundário e do transporte de açúcares por PCR em tempo real

Reações quantitativas de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em quadruplicado conforme descrito por Martins et al. (2018, 2020a, 2021a), utilizando DNA complementar (cDNA) previamente preparado através do RNA isolado e purificado dos bagos de uva de plantas controlo ou tratadas com cálcio. Para cada amostra foram utilizados 5 μL de Xpert Fast SYBR Master Mix (Grip Research Solutions), 0,3 μL de cada *primer*, 1 μL de cDNA e 3,4 μL de água ultrapura, perfazendo um volume total de 10 μL . As condições de PCR utilizadas foram adaptadas de Martins et al. (2018) e consistiram em: 5 min a 95 °C + 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C. A fluorescência foi medida no final de cada ciclo de amplificação.

Para o estudo da expressão génica foram selecionados genes envolvidos no metabolismo secundário e previamente estudados em bagos cv. “Vinhão”, nomeadamente o gene codificante da enzima fenilalanina amônia liase (*VvPAL1*), chalcona sintase (*VvCHS3*) e UDP-glicose:flavonoide-3-*O*-glucosiltransferase (*VvUGT*) e genes envolvidos nas etapas essenciais do transporte de açúcares no bago de uva, incluindo genes que codificam transportadores de dissacarídeos (*VvSUC11*) e

(monossacarídeos *VvHT3* e *VvTMT1*) (Martins et al., 2021a). As sequências de *primers* dos genes utilizados no ensaio encontram-se representadas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Sequências dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) utilizadas no ensaio de qPCR. Adaptado de Martins et al. (2021a).

Via	Gene	Sequência 5'-3'
Metabolismo secundário	<i>VvPAL1</i>	F CCGAACCGAATCAAGGACTG R GTTCCAGCCACTGAGACAAT
	<i>VvCHS3</i>	F TCGCATCACAATAGCGAAC R CAGGGAAGCTGCCATGTATT
	<i>VvUFGT</i>	F TGCAGGGCCTAACTCACTCT R GCAGTCGCCTTAGGTAGCAC
Transporte de açúcares	<i>VvSUC11</i>	F TGTGCCAATCTCAAGTCTGCC R CCTGGGCTGCTGTTATGCTT
	<i>VvHT3</i>	F TAATCGAACGGGGATCAAG R CCCCCAGAAATCAATAAACTC
	<i>VvTMT1</i>	F GTTGCCGTCAACTTCGCAAC R GAAGGAATTTAGCTATGGCAGAG

A especificidade das reações de PCR foi verificada através de curvas de dissociação após o final de cada reação qPCR, através do aquecimento dos produtos de PCR de 65 a 95 °C. A expressão dos genes alvo foi normalizada utilizando o gene de referência *VvGAPDH*, codificante da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, previamente validado (Reid et al., 2006). Os dados foram analisados com base no método $\Delta\Delta Cq$ no CFX Manager Software 3.1 (Bio-Rad laboratories, Inc.).

2.4. Crescimento e isolamento de leveduras em meio diferencial

Aliquotas de mosto não fermentado (t=0) e de mosto parcialmente fermentado (t=9) foram diluídas 100 vezes e 2500 vezes, respectivamente, em dH₂O estéril e plaqueadas em meio diferencial WL (*Wallerstein Laboratory Medium*) constituído por 0,45 g/L de hidrolisado de caseína, 4 g/L de extrato de levedura, 50 g/L de glucose, 0,57 g/L de KH₂PO₄, 0,43 g/L de KCl, 35 mg de CaCl₂, 0,12 g/L de MgSO₄, 0,25 g/L de FeCl₃, 0,25 g/L de MnSO₄, 0,22 g/L de corante verde de bromocresol e 20 g/L de agar, suplementado com 0,005% do antibiótico cloranfenicol, de forma a inibir o crescimento de

bactérias, e 0,02% de bifenil para inibir o crescimento de fungos filamentosos (Pallmann et al., 2001). A contagem das colónias foi efetuada cinco dias após incubação das placas a 25 °C. Foram selecionados modelos únicos de cada colónia e isolados para meio WL fresco, de forma a obter culturas puras, conforme descrito por Pallmann et al. (2001).

2.5. Identificação das espécies de levedura

2.5.1. Amplificação da região ITS por PCR

Os *primers* universais ITS1 e ITS4 foram utilizados para amplificar a região da unidade de repetição de DNA ribossomal (rDNA), que inclui o gene de RNA ribossomal (rRNA) 5,8S e os espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2 (**Figura 11**), com vista a facilitar a posterior identificação dos microrganismos em estudo (Pryce et al., 2003).

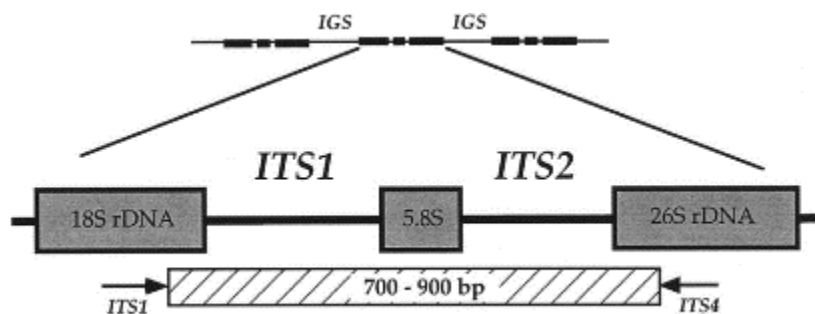


Figura 11. Estrutura da região do transportador transcrito interno (ITS) da matriz do gene ribossomal 5,8S. Adaptado de Shaw et al. (2002).

Colónias isoladas foram recolhidas diretamente para tubos de PCR e o rompimento das células decorreu durante 1 min no microondas a 600 W. A cada tubo foram depois adicionados 30 µL de uma mistura de reação PCR contendo 0,45 µM de *primer forward* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), 0,45 µM de *primer reverse* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 15 µL de NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYtech, Lda.) e 14,1 µL de H₂O ultrapura estéril. Em paralelo, preparou-se uma reação de controlo negativo, formada apenas pela mistura de reação PCR. As condições de PCR utilizadas foram adaptadas de Esteve-Zarzoso et al. (1999) e consistiram em: desnaturação inicial da cadeia dupla de DNA a 95 °C durante 15 min + 35 ciclos com desnaturação a 94 °C durante 30 s, hibridação dos *primers* a 55,5 °C durante 30 s e extensão da cadeia a 72 °C durante 1 min + extensão final a 72 °C durante 10 min.

Para confirmar a amplificação da região desejada, 5 µL dos produtos de PCR foram sujeitos a uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE 0.5x contendo corante de DNA Xpert Green (Grisp Research Solutions), permitindo a visualização das bandas de DNA sob luz UV.

2.5.2. Purificação do DNA e sequenciação

A purificação do DNA teve como base o método de extração e precipitação de DNA com isopropanol. Desta forma, adicionaram-se 80 µL de isopropanol 75% (v/v) a 20 µL dos produtos de PCR e centrifugaram-se as amostras durante 30 min a 18 000 *g*, após repousarem 15 min à temperatura ambiente. Em seguida decantou-se o sobrenadante das amostras, adicionaram-se 150 µL de isopropanol 75% (v/v) ao *pellet* e efetuou-se nova centrifugação durante 1 min. Esta última parte do método foi repetida uma vez. Por fim, foi decantado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensionado em 10 µL de H₂O ultrapura. A concentração de DNA e o respetivo grau de pureza em cada amostra foi calculada com o auxílio de um espectrofotómetro Nanodrop. As amostras foram depois enviadas para sequenciar numa empresa especializada, segundo o método de sequenciação de DNA de Sanger, utilizando o *primer* ITS4.

2.5.3. Blast das sequências ITS na base de dados NCBI

As sequências de DNA obtidas foram sujeitas a *Blast* na base de dados NCBI para identificação do microrganismo a que pertenciam. A identificação das espécies foi realizada de acordo com o maior grau de homologia obtido, estimado pelo *E-value*, pela percentagem de identidade e pelo grau de *query coverage*.

2.6. Efeito de fatores de stresse no crescimento das leveduras

O estudo da influência de fatores de stresse no crescimento das leveduras focou-se nas 5 espécies mais abundantes nos mostos não fermentados e parcialmente fermentados, nomeadamente, *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Starmerella bacillaris*, *Metschnikowia* sp. e *Pichia terricola*. Foram preparados pré-inóculos de culturas puras em meio YPD.

Com vista ao estudo da resistência das espécies isoladas ao cloreto de cálcio, as leveduras foram inoculadas a uma $DO_{600\text{ nm}} = 0,1$ em meio líquido YPD (1% extrato de levedura, 1% peptona e 1% dextrose) suplementado com cloranfenicol (0,005% (p/v) etanol) e com concentrações crescentes de CaCl₂·2H₂O: 0, 0,2, 2, 10, 20 e 40 g/L de. As concentrações foram selecionadas com base na gama de valores quantificados em bagos “Vinhão” (0,2 g/L) e na concentração da solução de CaCl₂ aplicada nas

videiras (20 g/L) (Martins et al., 2020a, c). As culturas foram incubadas durante 14 h a 24 °C e agitação mecânica de 230 rpm. O crescimento celular foi avaliado através da medição da DO a 600 nm.

O mesmo procedimento foi utilizado para avaliar o efeito de outros fatores de stresse no crescimento das leveduras, nomeadamente o sulfato de cobre utilizado como fungicida na agricultura biológica ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg/L, o stresse osmótico simulado com PEG 6000 (Polietilenoglicol 6000) a 5, 10 e 20% e o etanol a 3, 6 e 10%. A gama de concentrações utilizadas no stresse induzido pelo cobre teve como referência o estudo realizado por Martins et al. (2015) onde as concentrações de 250 e 1000 mg/L representavam um valor de 8 vezes superior ao encontrado em mostos de bagos tratados com calda bordalesa e a um valor 20 vezes inferior ao encontrado na formulação da calda bordalesa, respetivamente. Por sua vez, as concentrações de etanol foram selecionadas com base no estudo de Martins et al. (2020a), onde 10% equivalia ao valor máximo obtido em vinhos da casta "Vinhão". Por fim, a gama de valores do tratamento com PEG 6000 foi semelhante à utilizada por Silambarasan et al. (2019), onde o objetivo era avaliar stresse osmótico em levedura. Todos os compostos químicos foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich. Para cada espécie foi determinado o rácio entre a densidade celular na presença do fator de stresse e no controlo (sem tratamento). Os resultados foram representados sob a forma de *heat map* com a média dos valores obtidos para duas réplicas biológicas.

2.7. Curvas de crescimento em glucose e potencial fermentativo de espécies selecionadas

Pré-inóculos de *Metschnikowia* sp., *Pichia kudriavzevii* e *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe isolada de bagos de uva da casta "Vinhão" em anos anteriores e utilizada no presente trabalho como referência para a fermentação alcoólica) foram preparados em 15 mL de meio mineral sintético composto por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5% p/v), KH_2PO_4 (0.5%, p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05%, p/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.013%, p/v), glucose (2%), vitaminas e micronutrientes, com pH 4,5, consoante o método descrito por Silva et al. (2004). Após incubação a 24 °C durante 14 h com agitação mecânica de 200 rpm, foram preparadas culturas com $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.1$ num volume final de 100 mL de meio mineral fresco. As culturas preparadas em duplicado foram incubadas nas mesmas condições e a sua densidade ótica foi registada a cada 2 h ao longo de 55 h, para realização de curvas de crescimento e determinação da taxa específica de crescimento (μ) e do tempo de duplicação (Td) de cada espécie.

O potencial fermentativo das espécies foi avaliado através do registo do consumo de glucose do meio de cultura e da formação de etanol e/ou ácido acético, quantificados pela técnica de HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência). Para o efeito, alíquotas do meio de cultura foram desproteinizadas com ácido perclórico a 60%, numa proporção de 3:1, e analisadas num cromatógrafo LaChrom Elite -DEMO (Hitachi) equipado com coluna Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) da Phenomex, mantida a 40 ° C, com 2,5 mM de H₂SO₄ como fase móvel, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. A concentração de glucose, etanol e ácido acético nas amostras foi determinada através da análise do tempo de retenção e área do respetivo pico dos cromatogramas, por comparação com os cromatogramas de soluções-padrão de glucose (5, 10, 15 e 20 g/L), etanol (1, 3, 6 e 10% (v/v)) e ácido acético (1, 3, 6 e 10% (v/v)).

3. Resultados

3.1. Efeito do cálcio no teor de açúcares redutores, compostos fenólicos e antocianinas totais e na expressão de genes chave

Os resultados mostraram que a aplicação exógena de cálcio em videiras da casta “Vinhão” não afetou significativamente os níveis de açúcares redutores dos bagos maduros, que atingiram cerca de 200 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso fresco (**Figura 12**). De igual forma, a concentração de fenólicos totais não foi significativamente afetada pelo tratamento com cálcio. Em contraste, verificou-se que a concentração de antocianinas foi 2,5 vezes inferior em bagos de videiras tratadas com cálcio, comparativamente aos controlos.

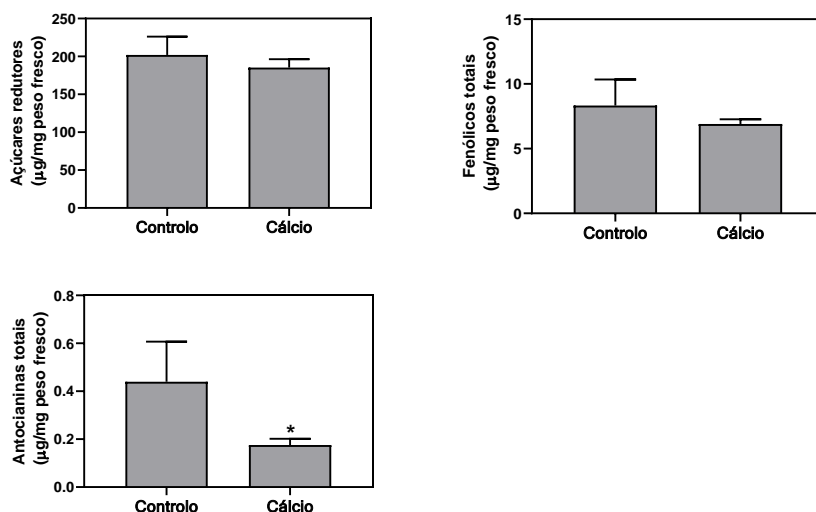


Figura 12. Concentração de açúcares redutores, compostos fenólicos e antocianinas totais em bagos de uva colhidos de videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ao longo da época de frutificação ou sem tratamento (controlo). Os resultados encontram-se expressos pela média \pm desvio padrão e o asterisco indica diferenças estatisticamente significativas determinadas pelo teste *t-Student*. *, $P \leq 0.05$ ($n = 4$).

A análise da expressão de genes envolvidos no transporte de açúcares do bago mostrou que o tratamento com cálcio não afetou significativamente os níveis de transcritos de *VvSUC11*, *VvHT3* e *VvTMT1*, envolvidos no transporte de dissacarídeos e de monossacarídeos (**Figura 13**). O tratamento com cálcio também não influenciou significativamente os níveis de expressão de *VvPAL1*, codificante da enzima fenilalanina amónia liase que catalisa o primeiro passo da via dos fenilpropanóides. A expressão de *VvCHS3*, que codifica a chalcone sintase envolvida na biossíntese de flavonóides, também não foi afetada. Em contraste, verificou-se uma repressão de 18% da expressão do gene *VvUGT* envolvido no passo limitante da biossíntese de antocianinas.

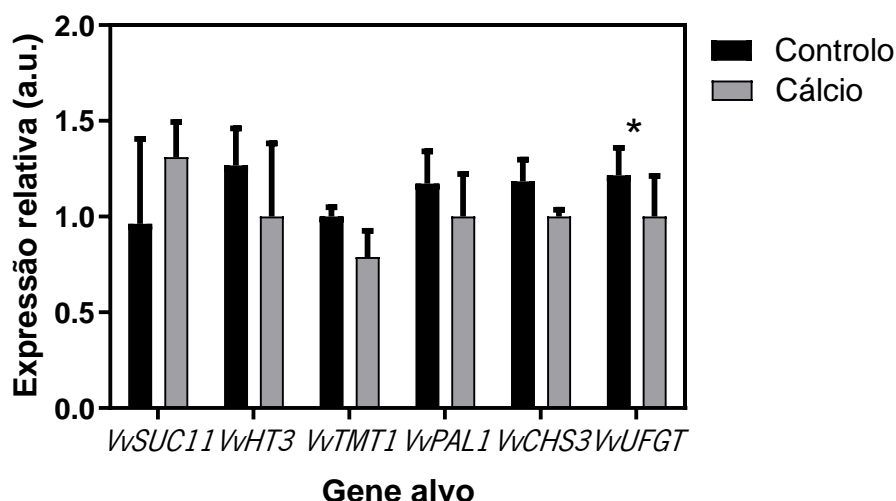


Figura 13. Expressão de genes-chave envolvidos no transporte de açúcares e no metabolismo secundário de bagos de uva colhidos de videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ao longo da época de frutificação ou sem tratamento (controlo). Estão indicados os níveis de transcritos de genes codificantes de transportadores de sacarose (*VvSUC11*), de hexoses (*VvWHT3*) e de monossacarídeos (*VvTMT1*), e das enzimas fenilalanina amónia liase (*VvPAL1*), chalcona sintase (*VvCHS3*) e UDP glicose: flavonóide-3-O -glucosiltransferase (*VvUFGT*). Os níveis de expressão foram normalizados para os níveis de transcrição do gene de referência *VvGAPDH*. Os resultados encontram-se expressos pela média \pm desvio padrão e o asterisco indica diferenças estatisticamente significativas determinadas pelo teste t-Student. *, $P \leq 0.05$ ($n = 4$).

3.2. Efeito do cálcio na comunidade microbiana cultivável do bago de uva

Ensaio de crescimento em meio diferencial WL permitiram avaliar o efeito do tratamento com cálcio na abundância e diversidade de microrganismos que colonizam o bago de uva (no mosto não fermentado) e na evolução da população microbiana ao longo da fermentação. Como se observa na **Figura 14**, verificou-se, de um modo geral, uma menor abundância de microrganismos no mosto não fermentado ($t=0$), do que 9 dias após o início da fermentação ($t=9$). O tratamento com cálcio nas vinhas resultou ainda numa visível redução do número de colónias, tanto no início, como a meio da fermentação.

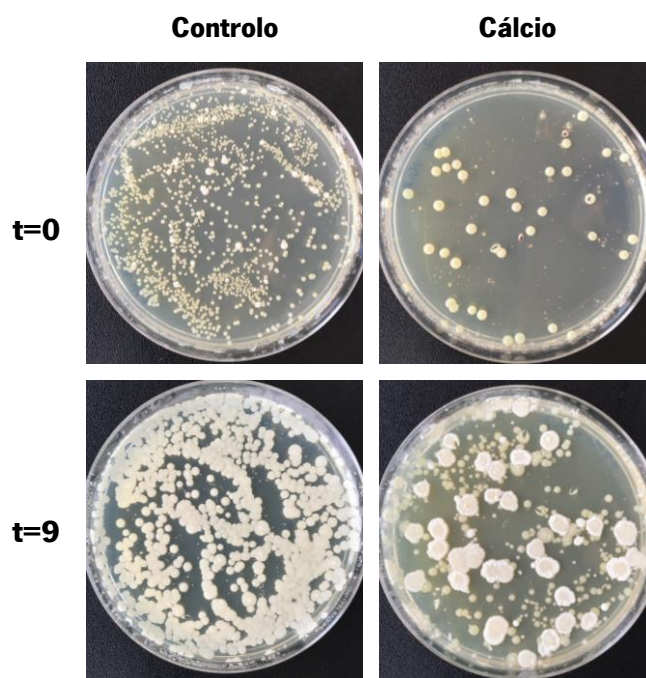


Figura 14. Cultura de microrganismos presentes em 100 μL de mosto antes do início da fermentação ($t=0$) diluído 100 vezes e a meio da fermentação ($t=9$) diluído 2500 vezes de bagos de uva colhidos de videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ou sem tratamento (controlo), após 5 dias de crescimento em meio diferencial WL. Imagens representativas de 3 réplicas biológicas.

Após contagem das colónias em três replicados de cada cultura, foi possível estimar que nas amostras controlo houve um aumento de 28 vezes do número total de colónias 9 dias após o início da fermentação (mosto parcialmente fermentado), relativamente ao mosto não fermentado ($t=0$). Verificou-se ainda que o tratamento com cálcio reduziu em 78% a quantidade total de colónias nos mostos não fermentados (**Figura 15**). A meio da fermentação, o número total de colónias foi 41% inferior nos mostos de uvas amostradas de videiras tratadas com cálcio relativamente ao controlo, no entanto as diferenças não foram estatisticamente significativas.

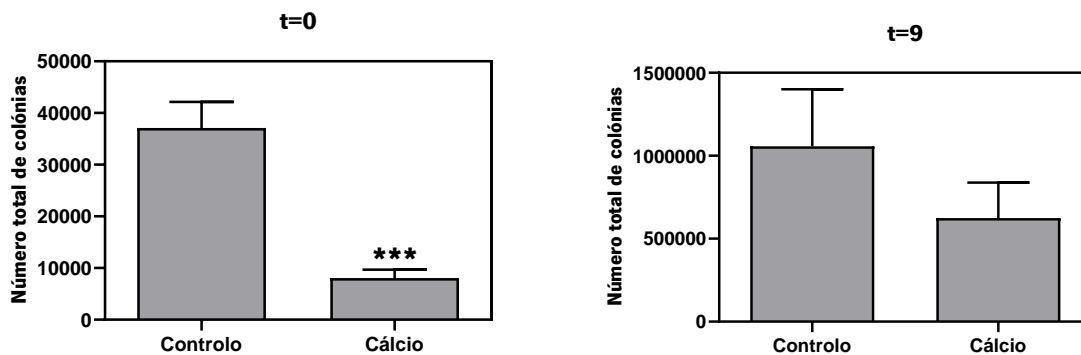


Figura 15. Número total de colônias presentes em 1 mL de mosto antes do início da fermentação (t=0) e a meio da fermentação (t=9) de bagos de uva colhidos de videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ou sem tratamento (controlo), após 5 dias de crescimento em meio diferencial WL. Os valores apresentados representam a média \pm desvio padrão das contagens obtidas de 3 réplicas biológicas, e o asterisco indica diferenças estatisticamente significativas determinadas pelo teste t-Student. *, $P \leq 0.05$.

Com vista à identificação das diferentes espécies de levedura presentes em cada amostra, foi amplificada por PCR a região ITS de exemplares de cada tipo de colónia, com os *primers* universais ITS1 e ITS4. A eletroforese em gel de agarose dos produtos PCR permitiu confirmar que a amplificação foi bem-sucedida (**Figura 16**). Foi ainda confirmada a ausência de amplificação numa reação de PCR sem molde de DNA (levedura), validando o controlo negativo e a fiabilidade da amplificação das restantes amostras (resultado não apresentado).

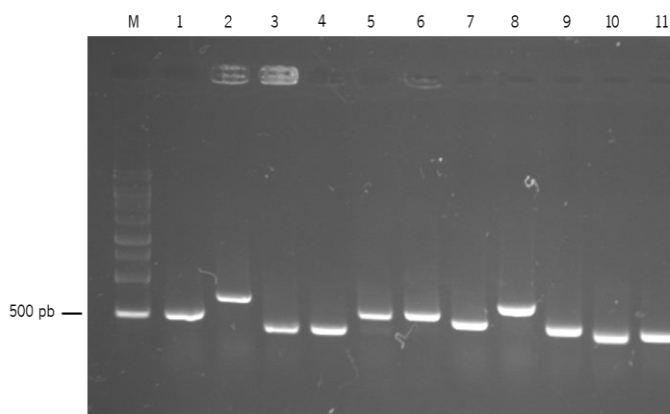


Figura 16. Produtos de PCR da região ITS de diferentes isolados de levedura (poços 1-11) visualizados após eletroforese em gel de agarose. Poço M: marcador de pesos moleculares.

Após purificação dos produtos de PCR e sua sequenciação por Sanger, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados Genbank do NCBI, com vista à identificação das espécies. De um modo geral, a ferramenta BLAST do NCBI foi eficiente na

identificação das espécies microbianas, permitindo distinguir 8 espécies diferentes entre os 11 isolados selecionados para sequenciação (**Tabela 4**). Os resultados apresentaram uma percentagem de identidade superior a 90% para a maioria das sequências e um *query coverage* entre os 45% (isolado nº 3) e os 98% (isolado nº 4). Além disso, os baixos valores de E refletiram a significância dos resultados, reforçando o seu grau de certeza. Apenas para o género *Metschnikowia* não foi possível fazer uma identificação ao nível da espécie.

Tabela 4. Resultados da análise BLAST das sequências ITS dos 11 isolados de levedura selecionados. Para cada isolado, estão apresentados os valores de E, de percentagem de identidade e de *query coverage* para a espécie com melhor *ranking*.

Isolado nº	Espécie	Valor de E	Percentagem de identidade	<i>Query coverage</i>
1	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0	87,80%	65%
2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0	99,86%	86%
3	<i>Metschnikowia</i> sp.	4 ⁻¹⁶⁵	98,24%	45%
4	<i>Candida intermedia</i>	8 ⁻¹⁷⁷	98,87%	98%
5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	98,76%	64%
6	<i>Sporobolomyces roseus</i>	0	89,97%	54%
7	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0	95,35%	86%
8	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0	99,57%	96%
9	<i>Starmerella bacillaris</i>	0	99,76%	88%
10	<i>Metschnikowia</i> sp.	3 ⁻¹⁶¹	97,65%	46%
11	<i>Pichia terricola</i>	0	99,74%	82%

Após identificação dos microrganismos que compõem a microbiota do mosto e do vinho, foi construído um catálogo com a sua caracterização fenotípica, ao nível microscópico e macroscópico (**Figura 17**).

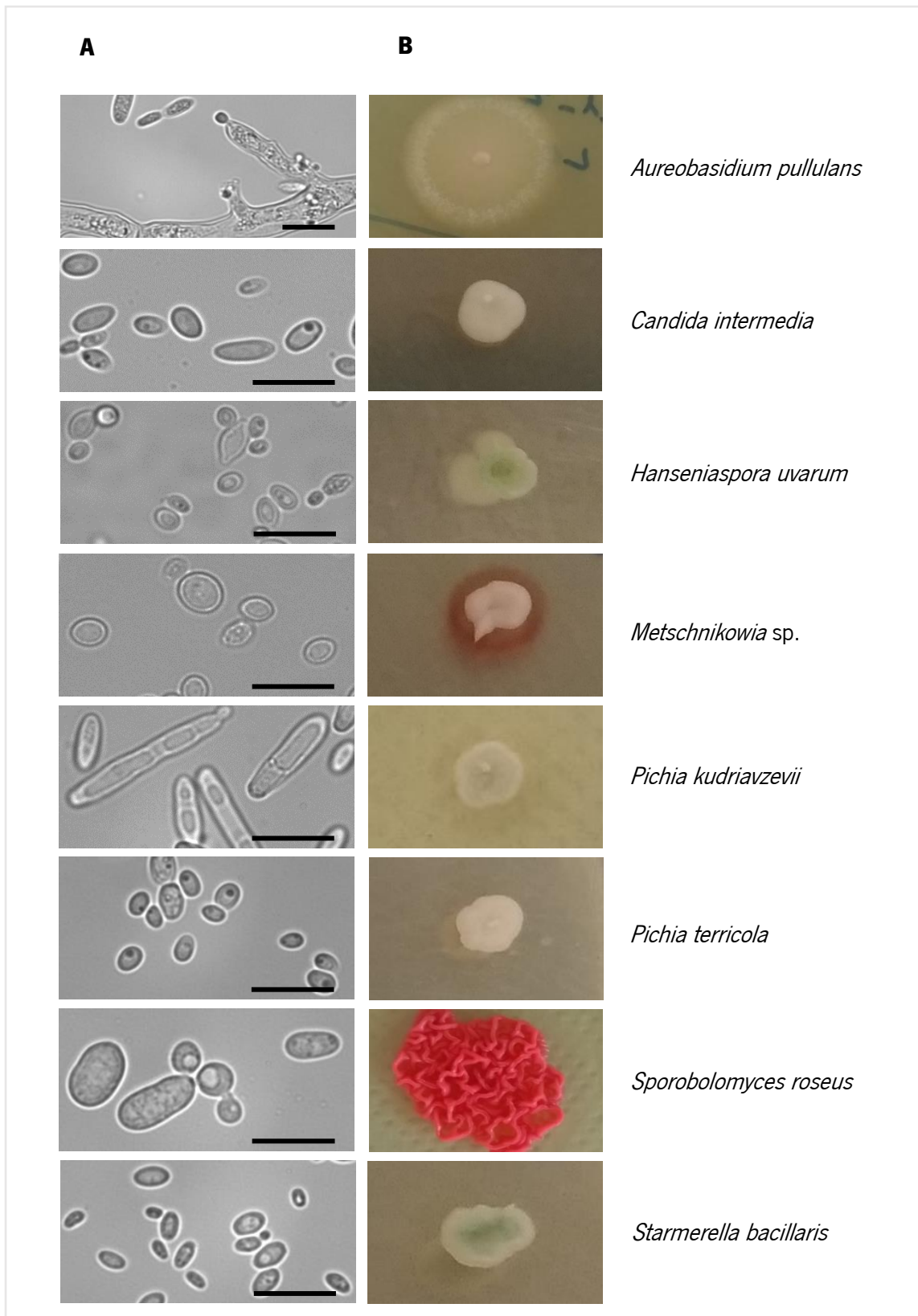


Figura 17. Características microscópicas (DIC; escala = 10 µm) (A) e morfologia macroscópica (B) das 8 espécies de levedura isoladas de mosto antes do início da fermentação e a meio da fermentação de bagos cv. "Vinhão".

Posteriormente à identificação das espécies de levedura foi possível avaliar a sua evolução ao longo do processo fermentativo, bem como o efeito do tratamento de cálcio na sua abundância relativa (**Figura 18**). Os resultados demonstraram diferenças na composição das comunidades presentes no mosto antes do início da fermentação (t=0) e a meio da fermentação (t=9). Com efeito, as espécies *Aureobasidium pullulans*, *Candida intermedia* e *Sporobolomyces roseus* foram identificadas unicamente no mosto não fermentado, enquanto *Pichia terricola* e *Starmerella bacillaris* foram apenas identificadas no mosto a meio da fermentação. Verificou-se ainda que as espécies *Hanseniaspora uvarum* e *Metschnikowia* sp. predominavam no mosto não fermentado (85-93% de abundância relativa), ao passo que *Pichia kudriavzevii* e *Hanseniaspora uvarum* dominavam a meio da fermentação (65-97% de abundância relativa).

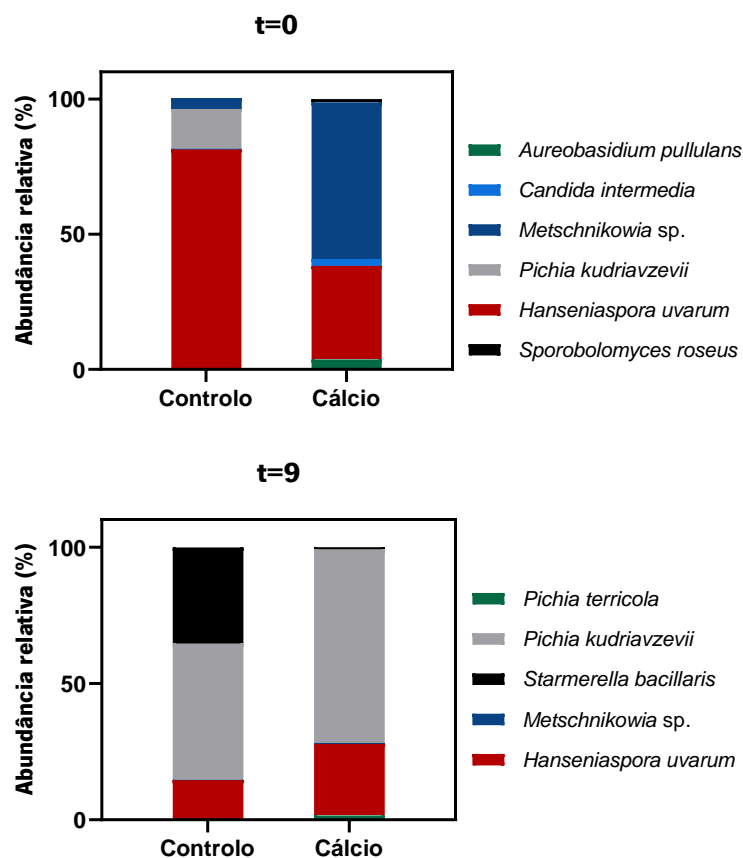


Figura 18. Composição das comunidades microbianas presentes nos mostos antes do início da fermentação (t=0) e a meio da fermentação (t=9) de bagos de uva colhidos de videiras cv. “Vinhão” tratadas com cálcio ou sem tratamento (controlo). Os resultados representam a média dos valores obtidos para 3 réplicas biológicas.

Foi ainda observada a presença exclusiva de *S. roseus* (12%) nos mostos não fermentados de bagos tratados com cálcio e de *P. kudriavzevii* (15%) nos mostos controlo. O tratamento com cálcio

conduziu a um decréscimo de 57% na dominância da espécie *H. uvarum*, comparativamente ao controlo, assim como um aumento considerável da proporção de *Metschnikowia* sp. (14 vezes), *C. intermedia* (8 vezes) e *A. pullulans* (14 vezes). Por outro lado, verificou-se a presença de *P. terricola* unicamente nos mostos parcialmente fermentados de bagos tratados com cálcio, um decréscimo de 98% na dominância de *S. bacillaris* e um aumento da abundância relativa de *H. uvarum* (2 vezes), *P. kudriavzevii* (1,5 vezes) e *Metschnikowia* sp. (2 vezes) face a este tratamento.

3.3. Avaliação do crescimento de espécies de levedura selecionadas sob condições de stresse

O efeito de fatores de stresse específicos foi avaliado no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes no mosto não fermentado e parcialmente fermentado. De um modo geral, verificou-se uma inibição do crescimento de todas as espécies na presença de concentrações de cálcio superiores a 2 g/L ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (**Figura 19**), incluindo *P. kudriavzevii* cujo crescimento foi afetado mesmo em concentrações abaixo dessa gama. Esta espécie revelou ser a mais sensível ao cálcio, seguida de *P. terricola*, tendo-se verificado uma inibição quase total do seu crescimento (94-97%) na presença de 40 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O crescimento de todas as espécies selecionadas foi ainda inibido em cerca de 54% na presença de 20 g/L deste composto. Adicionalmente, verificou-se que a espécie mais tolerante ao cálcio é *S. bacillaris*.

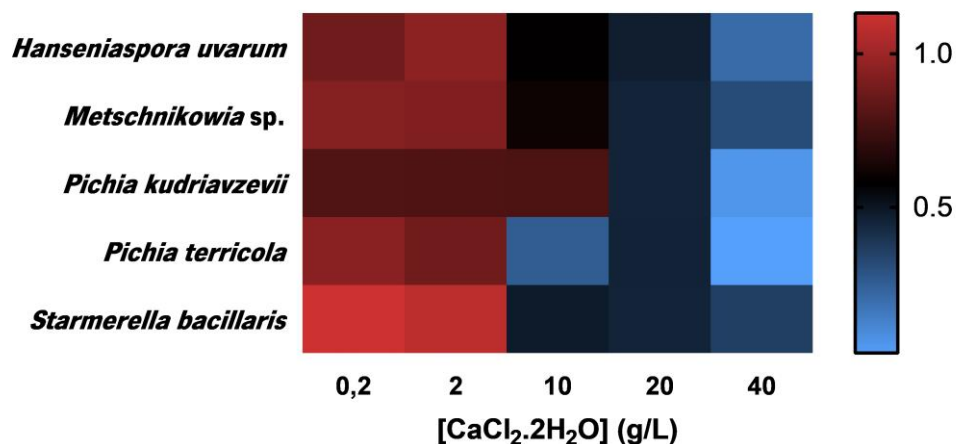


Figura 19. Heat map referente ao crescimento de 5 espécies de levedura cultivadas em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Para cada concentração, está indicado o rácio entre o valor de biomassa observado na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), 14 h após a incubação. Os valores apresentados representam a média de 2 réplicas biológicas. Na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).

Relativamente à tolerância ao etanol por parte das leveduras isoladas, foi observado uma correlação negativa entre o crescimento microbiano e o aumento da concentração de etanol, verificando-se que para concentrações de etanol equivalentes ou superiores a 6% o crescimento de todos os microrganismos foi fortemente inibido (**Figura 20**).

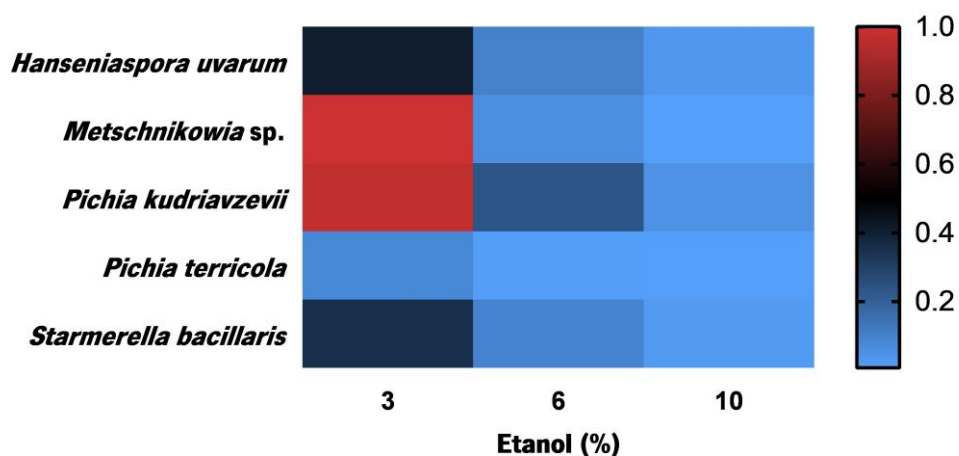


Figura 20. Heat map referente ao crescimento de 5 espécies de levedura cultivadas em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de etanol. Para cada concentração, está indicado o rácio entre o valor de biomassa observado na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os valores apresentados representam a média de 2 réplicas biológicas. Na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).

As espécies *P. kudriavzevii* e *Metschnikowia sp.* exibiram a menor suscetibilidade ao etanol, não sendo o seu crescimento afetado em concentrações de 3%. Os resultados mostraram ainda que *P. terricola* é a mais sensível a este metabolito.

Na **Figura 21** encontram-se os resultados relativos ao crescimento microbiano na presença de sulfato de cobre, o princípio ativo da calda bordalesa. Os resultados mostraram que *Metschnikowia sp.* apresentou uma grande tolerância ao sulfato de cobre na gama de concentrações testada, tendo ocorrido uma estimulação do crescimento. Verificou-se ainda que *S. bacillaris* é a espécie mais sensível ao cobre, seguida de *P. terricola*.

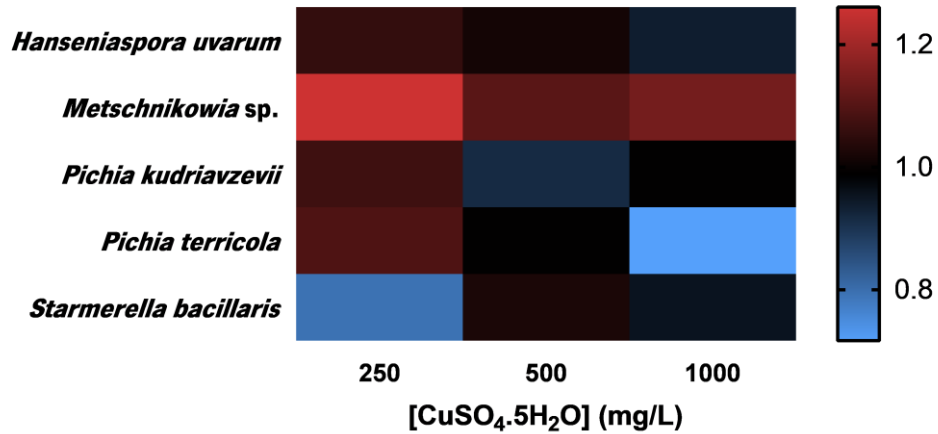


Figura 21. Heat map referente ao crescimento de 5 espécies de levedura cultivadas em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Para cada concentração, está indicado o rácio entre o valor de biomassa observado na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os valores apresentados representam a média de 2 réplicas biológicas. Na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).

Por último, foi testado o efeito do stresse osmótico no crescimento microbiano, simulado pela adição de PEG 6000 ao meio de cultura. Os resultados mostraram concentrações de PEG 6000 iguais ou inferiores a 10% não limitaram significativamente o crescimento das leveduras. Concentrações superiores conduziram a uma inibição do crescimento de *H. uvarum* e *S. bacillaris* em cerca de 88%, sendo o crescimento das restantes espécies afetado apenas em 36%, relativamente ao crescimento na ausência do fator de stresse.

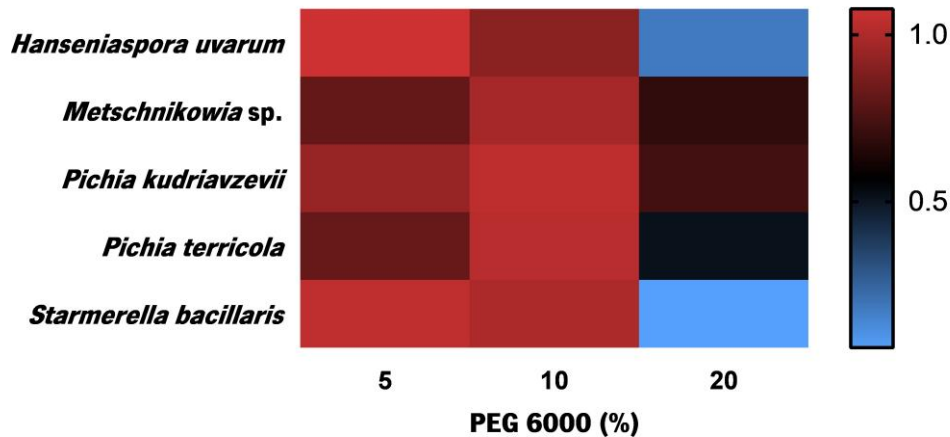


Figura 22. Heat map referente ao crescimento de 5 espécies de levedura cultivadas em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de PEG 6000. Para cada concentração, está indicado o rácio entre o valor de biomassa observado na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os valores apresentados representam a média de 2 réplicas biológicas. Na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).

3.4. Perfil de crescimento e potencial fermentativo de espécies de leveduras selecionadas

O perfil de crescimento em meio mineral com glicose e a capacidade fermentativa das espécies *P. kudriavzevii* e *Metschnikowia sp.* foi avaliado em detalhe, com vista a aferir o seu potencial biotecnológico, dado serem as mais tolerantes ao etanol de acordo com os resultados do presente estudo. Para fins comparativos, avaliou-se também o perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, isolada de mostos “Vinhão” de anos anteriores, uma vez que é considerada o modelo de eleição da fermentação alcoólica. *P. kudriavzevii* apresentou uma taxa específica de crescimento (μ) de $0,46 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de duplicação (Td) de 1,49 h (**Figura 23**). O crescimento de *Metschnikowia sp.* foi mais lento, comparativamente ao de *P. kudriavzevii*, traduzido pelo valor de μ de $0,32 \text{ h}^{-1}$ e Td de 2,12 h (**Figura 24**). Por sua vez, a levedura *S. cerevisiae* apresentou um valor de μ de $0,26 \text{ h}^{-1}$ e o Td de 2,569115 h (**Figura 25**). Durante o crescimento de *P. kudriavzevii* verificou-se produção de etanol, cujo valor máximo atingido foi de 2,5 g/L entre as 18 h e as 30 h de crescimento (**Figura 23**). A produção de etanol também observada no decorrer do crescimento de *Metschnikowia sp.*, alcançado o valor máximo de 4 g/L às 55 h. Para esta espécie microbiana foi ainda verificada produção de ácido acético a partir das 39 h, atingindo um valor máximo de 0,58 g/L (**Figura 24**). A produção de etanol por *S. cerevisiae* atingiu um valor máximo de 6 g/L às 23 h (**Figura 25**).

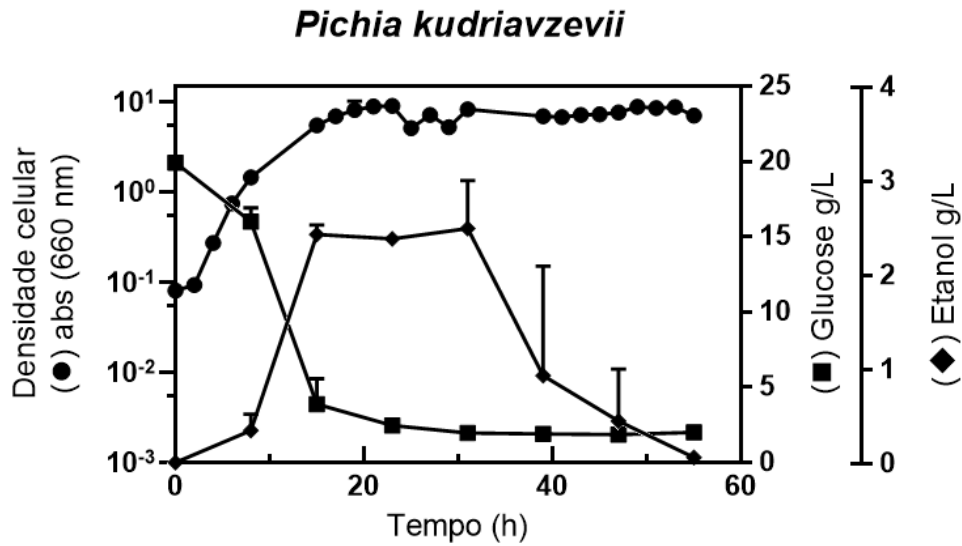


Figura 23. Crescimento, consumo de glucose e produção de etanol de *Pichia kudriavzevii*. As células foram cultivadas em meio mineral suplementado com 2% de glucose utilizada como fonte de carbono, a 24 °C e pH 4,5. Os resultados representam a média ± DP de valores obtidos para 2 réplicas biológicas.

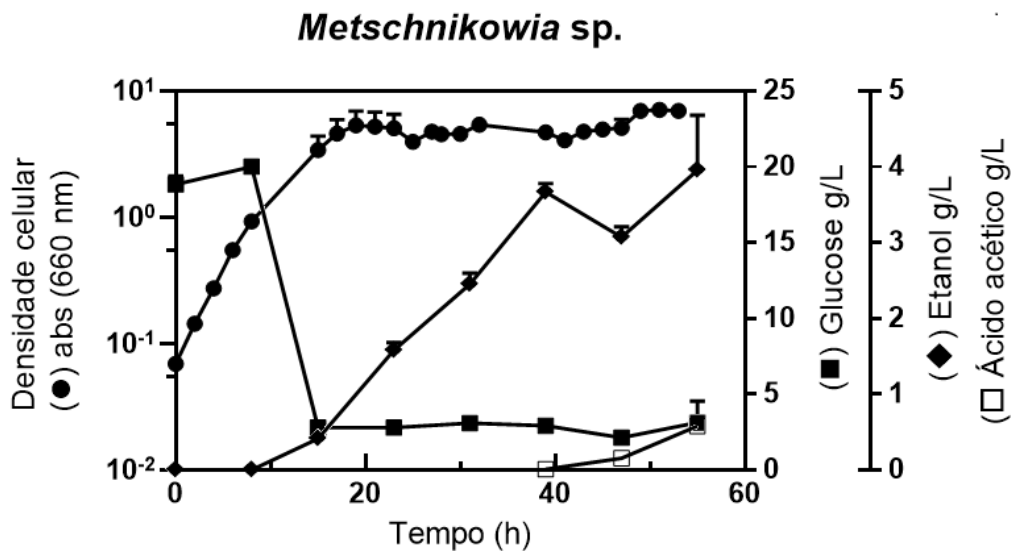


Figura 24. Crescimento, consumo de glucose e produção de etanol de *Metschnikowia* sp.. As células foram cultivadas em meio mineral suplementado com 2% de glucose utilizada como fonte de carbono, a 24 °C e pH 4,5. Os resultados representam a média ± DP de valores obtidos para 2 réplicas biológicas.

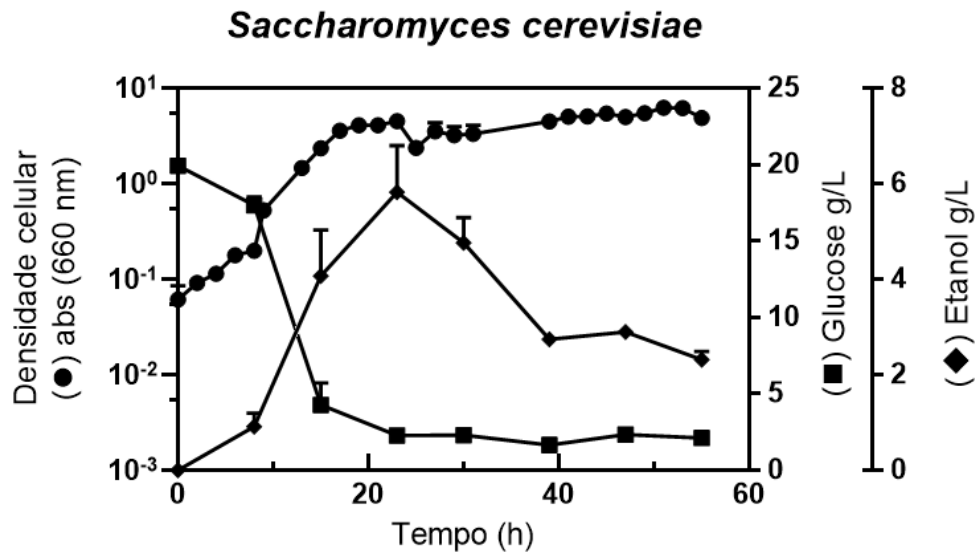


Figura 25. Crescimento, consumo de glucose e produção de etanol de *Saccharomyces cerevisiae*. As células foram cultivadas em meio mineral suplementado com 2% de glucose utilizada como fonte de carbono, a 24 °C e pH 4,5. Os resultados representam a média ± DP de valores obtidos para 2 réplicas biológicas.

4. Discussão

4.1. A aplicação exógena de cálcio não afeta o conteúdo em açúcares redutores e fenólicos totais no bago de uva, mas diminui a concentração de antocianinas

O conteúdo de açúcares redutores, compostos fenólicos e antocianinas totais são considerados indicadores-chave para a qualidade do bago de uva e do vinho (Teixeira et al., 2013). A observação de que a aplicação exógena de cálcio nas vinhas não afetou significativamente a concentração de açúcares redutores e de fenólicos totais encontra-se em conformidade com ensaios anteriores, realizados nas mesmas vinhas no ano de 2018 (Martins et al., 2020a). De acordo com estes resultados, no presente trabalho não foram observadas modificações na expressão dos genes *VvSUC11*, *VvHT3* e *VvTMT1*, que codificam transportadores de açúcares, nem na expressão do *VvPAL1* e *VvCHS3*, codificantes de enzimas envolvidas no início das vias de biossíntese dos fenilpropanóides e dos flavonoides, face ao tratamento com cálcio (Teixeira et al., 2013). A diminuição observada no conteúdo de antocianinas nos bagos maduros de videiras tratadas com cálcio, também se encontra em concordância com resultados anteriores do nosso grupo de investigação (Martins et al., 2020c). Resultados semelhantes foram obtidos numa experiência realizada com suspensões celulares tintureiras cv. “Gamay” onde se observou uma menor pigmentação das células quando subcultivadas em meio suplementado com cloreto de cálcio (Martins et al., 2018). Uma análise metabolómica dirigida mostrou que o cálcio inibe a biossíntese de antocianinas desde a fase de pintor, diminuindo significativamente a concentração de conjugados de petunidina, cianidina, peonidina e malvidina, incluindo a malvidina-3-O-glucosídeo, a antocianina mais abundante no bago de uva (Martins et al., 2020a). Este efeito deverá estar relacionado com a repressão da enzima *UFGT* na presença de elevadas concentrações de cálcio, reportada em suspensões celulares tintureiras, ao nível da atividade e da expressão do gene *VvUFGT* (Martins et al., 2018; Martins et al., 2020c; Yu et al., 2020b). Os resultados descritos podem ter um impacto relevante do ponto de vista enológico em castas de uvas tintas, uma vez que um menor conteúdo em antocianinas pode depreciar a qualidade do vinho tinto.

4.2. *Hanseniaspora uvarum* predomina no mosto não fermentado e *Pichia kudriavzevii* prevalece no mosto parcialmente fermentado

O presente trabalho focou-se na microbiota cultivável do bago de uva, em linha com os objetivos gerais do projeto GrapeMicrobiota (FCT - PTDC/BAA-AGR/2691/2020) que visa o isolamento e

utilização de estirpes nativas na produção de vinhos regionais com elevada tipicidade. Os resultados mostraram um aumento da população microbiana com o decorrer da fermentação espontânea em paralelo com uma diminuição da sua diversidade. Estas observações refletem as características fenotípicas das diferentes espécies presentes, como a sua capacidade fermentativa e o seu grau de tolerância à limitação de oxigénio e às elevadas concentrações de etanol (Marsit e Dequin, 2015). No presente trabalho verificou-se que *Hanseniaspora uvarum* é a espécie cultivável mais abundante no mosto não fermentado de uvas do cultivar “Vinhão”, em linha com resultados anteriores em mostos das castas “Grenache” (del Carmen Portillo e Mas, 2016) e de várias castas portuguesas (Pinto et al., 2015). Noutro estudo realizado em bagos de uva amostrados de onze castas distintas (Kántor et al., 2017) verificou-se igualmente uma maior abundância deste género, bem como a presença dos géneros *Metschnikowia*, *Pichia* e *Candida*, assemelhando-se aos resultados do presente trabalho.

As modificações observadas na composição da comunidade microbiana ao longo da evolução do processo fermentativo corroboram estudos anteriores que reportam uma diminuição gradual da abundância relativa de *Hanseniaspora* e o decréscimo ou desaparecimento de outros taxa incluindo *Metschnikowia* (Pinto et al., 2015; del Carmen Portillo e Mas, 2016). Num ensaio onde foi avaliada a diversidade de leveduras em vinhas de casta “Cabernet Sauvignon”, foi observado que *H. uvarum* é a segunda espécie mais abundante a meio de uma fermentação espontânea, em harmonia com os resultados obtidos no presente trabalho, demonstrando que esta espécie pode ser co-dominante em ambas as fases, inicial e intermédia (Bagheri et al., 2015). O aumento da abundância relativa de *Pichia kudriavzevii* com o decorrer da fermentação, observado no presente estudo, deve estar relacionado com a sua maior tolerância ao etanol (Wang & Liu, 2013). Com efeito, os ensaios realizados com as espécies isoladas mostraram que esta espécie é mais tolerante ao etanol, comparativamente às restantes leveduras cultiváveis do bago identificadas no presente trabalho. Nas amostras de mosto semi-fermentado do presente estudo foi ainda identificada a espécie *Starmerella bacillaris*, tal como descrito em estudos anteriores em vinhos cv. “Cabernet Sauvignon” (Bagheri et al., 2015).

Em oposição, não foi detetada a presença de *Saccharomyces cerevisiae* no mosto não fermentado e a meio da fermentação. Estudos anteriores mostraram que a população de *S. cerevisiae* nos bagos de uva é bastante reduzida, geralmente em valores inferiores a 50 UFC/ mL de mosto, contribuindo de forma extremamente limitada para a fermentação espontânea (Ciani et al., 2004; Kántor et al., 2017). A fonte primária de *S. cerevisiae* nos vinhos advém do contacto dos mostos de uvas com as superfícies do equipamento da adega, que abrigam esta espécie microbiana (le Jeune et al., 2006). No entanto,

como já referido na Introdução, *S. cerevisiae* predomina na fase final da fermentação alcoólica, devido às suas características competitivas face aos restantes microrganismos (van Wyk et al., 2019).

4.3. O cálcio diminui a abundância de leveduras no mosto e no vinho e modifica a sua diversidade

A diminuição da microbiota cultivável observada nos mostos não fermentados e parcialmente fermentados de uvas de videiras tratadas com cálcio pode estar relacionada com o papel direto deste elemento na redução da biodiversidade da microbiota do bago por modificações ultraestruturais e bioquímicas ao nível da película (Martins et al., 2020b). Com efeito, o exocarpo consiste na principal barreira física de defesa do bago contra agentes patogénicos (Fresno e Munné-Bosch, 2021) e, em bagos saudáveis, impede o acesso dos microrganismos aos açúcares e nutrientes, dificultando o seu crescimento e propagação (Fleet, 2003; Liu et al., 2017). Num cultivar de melão foi observada uma diminuição na taxa de libertação de etileno após tratamento com CaCl_2 , retardando o amadurecimento dos frutos e afetando negativamente a reprodução e disseminação de microrganismos (Zhang et al., 2019). Os tratamentos com cálcio reduzem o decaimento de bagos de uva após a colheita, por aumento da atividade de enzimas antioxidantes e estimulação dos genes envolvidos no reforço da parede celular e na defesa contra agentes patogénicos (Martins et al., 2021a). Um estudo recente do nosso grupo de investigação revelou ainda que o tratamento com cálcio induz modificações na composição das ceras cuticulares, que são substratos da microbiota (Martins et al., 2021c).

Sendo o cálcio o principal mensageiro celular, o seu efeito direto no metabolismo dos microrganismos isolados deve também ser equacionado. Quando as células de levedura são estimuladas pelo cálcio, o aumento da concentração de cálcio nas mitocôndrias promove a produção de ATP, aumentando a atividade da cadeia respiratória e estimulando o crescimento celular (Brookes et al., 2004). Este mecanismo poderá ser a principal razão da estimulação do crescimento celular de *S. bacillaris* quando cultivada na presença de concentrações de 0,2 e 2 g/L de CaCl_2 . Em concentrações superiores, o crescimento das leveduras foi inibido, o que pode estar relacionado com a sobrecarga da matriz mitocondrial pelo cálcio e consequente aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS), comprometendo a viabilidade celular (Brookes et al., 2004; Li et al., 2021).

4.4. *Metschnikowia* sp. destaca-se pela sua tolerância ao cobre e *Starmerella bacillaris* e *Hanseniaspora uvarum* pela sensibilidade ao stresse osmótico

O cobre tem sido amplamente utilizado na agricultura biológica, como princípio ativo de fungicidas como a calda bordalesa. No entanto, o seu efeito em microrganismos desejáveis, como as leveduras presentes nos bagos, permanece pouco estudado (Grangeteau et al., 2017). Os resultados dos ensaios *in vitro* realizados no presente estudo revelaram que concentrações de cobre até 250 mg/L induziram crescimento da maioria das espécies isoladas, possivelmente devido ao papel deste micronutriente como cofator de numerosas enzimas e catalisador de reações redox em diversas vias metabólicas essenciais ao crescimento (Falih, 1998; Zimdars et al., 2019). O papel benéfico deste oligoelemento foi evidenciando a baixas concentrações (100 µg/mL) (Falih, 1998). Por outro lado, o excesso de cobre pode originar espécies reativas de oxigénio que ocasionam peroxidação de lípidos membranares, comprometendo a integridade da membrana, oxidação de proteínas e clivagem de moléculas de DNA e RNA, reduzindo conseqüentemente a vitalidade da levedura (Jia et al., 2015; Zimdars et al., 2019). Com efeito, os resultados do presente estudo mostraram que concentrações de cobre acima de 500 mg/L impactavam negativamente o crescimento das leveduras, com exceção de *Metschnikowia* sp. A maior tolerância de leveduras deste género ao cobre corrobora estudos anteriores (Vadkertiová e Sláviková, 2006; Mukherjee et al., 2017). A taxa de absorção de Cu²⁺ varia consoante a espécie microbiana, pelo que organismos distintos apresentam diferentes comportamentos na presença de uma dada concentração de cobre (Gava et al., 2016).

Ensaio de campo analisaram as comunidades de leveduras residentes nas superfícies dos bagos de uva de castas “Verdicchio” e “Montepulciano” cultivadas em modo de agricultura biológica (tratamentos com fungicidas à base de cobre) ou convencional, baseados em tratamentos fitossanitários com compostos de síntese à base de triazóis (Agarbati et al., 2019). Os resultados revelaram que o tipo de tratamento não influenciou a abundância relativa de *H. uvarum* em ambas as variedades. Em oposição, os tratamentos em modo de agricultura biológica impactaram favoravelmente as espécies *S. bacillaris* e *P. terricola* presentes em bagos de uva cv. “Montepulciano”, e negativamente a abundância de *Metschnikowia pulcherrima* (Agarbati et al., 2019). Foi também observada uma maior abundância de *M. pulcherrima* em bagos de uva cv. “Verdicchio” sujeitos a tratamentos com fungicidas sintéticos (Milanović et al., 2013).

Por sua vez, o PEG 6000 foi utilizado no presente estudo como simulador de stresse osmótico, associado na vinha a condições de secura ou aos elevados teores de açúcar encontrados nas fases

iniciais da fermentação. Os resultados do presente estudo mostraram que concentrações de PEG 6000 até 10% não afetam o crescimento de qualquer espécie isolada, mostrando que estas são mais resistentes ao stresse osmótico do que outras leveduras do bago de uva como *Rhodotorula* sp., conforme descrito em estudos anteriores (Silambarasan et al., 2019).

4.5. Capacidade fermentativa e potencial biotecnológico de *Pichia kudriavzevii* e de *Metschnikowia* sp.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboraram a capacidade das leveduras *P. kudriavzevii* e *Metschnikowia* sp. conduzirem fermentações dirigidas. À semelhança de *S. cerevisiae*, ambas as espécies apresentaram capacidade fermentativa, produzindo etanol através do consumo de açúcares, exibindo ainda uma maior tolerância à presença deste álcool, em relação a outras espécies microbianas residentes no bago de uva.

A utilização de leveduras não *Saccharomyces* é uma estratégia adotada no setor vinícola de forma a aumentar a autenticidade dos vinhos e a melhorar a sua complexidade aromática (**Tabela 2**). *P. kudriavzevii* contribuiu para a desacidificação dos vinhos, aumentando o seu pH em cerca de 0,3 unidades (Varela e Borneman, 2017; Vicente et al., 2021), enquanto a utilização de espécies do género *Metschnikowia* pode aumentar a concentração de enzimas hidrolíticas, nomeadamente glicosidases, proteases e pectinases, com capacidade para interferir com as propriedades sensoriais e tecnológicas do vinho (Vicente et al., 2020). Em inoculações sequenciais de *S. cerevisiae* com *P. kudriavzevii* apresenta capacidade em reduzir o teor alcoólico dos vinhos (cerca de 30%) e influenciar a sua complexidade aromática, aumentando os ésteres de acetato (cerca de 30%) e álcoois superiores (cerca de 20%) e diminuindo o conteúdo de ácidos gordos (cerca de 40%) e álcoois C6 (cerca de 40%) (Vicente et al., 2021). Por sua vez, a inoculação sequencial de *S. cerevisiae* com a espécie *M. pulcherrima* melhorou a complexidade dos vinhos espumantes, possibilitando o aumento da persistência da espuma, um fator importante a nível visual, e modificações no perfil aromático, aumentando os seus aromas fumados e florais (González-Royo et al., 2015). A produção de ácido acético observada no decorrer do crescimento de *Metschnikowia* sp. poderá derivar da utilização de etanol pela levedura como fonte de carbono e energia (Freer, 2002).

5. Conclusão

O presente trabalho explorou os efeitos da utilização de suplementos à base de cálcio na abundância e diversidade da microbiota do bago de uva e na sua evolução durante a fermentação. A construção de um catálogo com as espécies microbianas nativas de bagos de uva cv. “Vinhão” da região DOC Vinhos Verdes permitiu aferir o efeito de diferentes fatores de stresse abiótico nas espécies isoladas.

Os resultados do presente estudo suportam o efeito benéfico da utilização de suplementos à base de cálcio nas vinhas através da manutenção do estado de saúde dos frutos, potencialmente resultante da diminuição de microrganismos patogénicos associados a doenças, bem como da estimulação do crescimento de *Pichia kudriavzevii* e *Metschnikowia* sp., microrganismos com um perfil biotecnológico relevante na enologia. No entanto, a nível bioquímico, o tratamento com cálcio conduziu a um decréscimo no conteúdo de antocianinas totais do bago, podendo afetar a qualidade final de vinhos tintos.

Foram ainda identificados microrganismos que podem ser utilizados como marcadores de resposta ao stresse abiótico em vinhas, nomeadamente *Metschnikowia* sp. que apresentou uma maior tolerância ao cobre, e *Starmerella bacillaris* e *Hanseniaspora uvarum* que apresentaram uma maior suscetibilidade ao stresse osmótico.

O presente estudo abriu perspetivas para a utilização das espécies nativas numa diversidade de aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de vinhos com reflexão do *terroir* através da realização da fermentação por um cocktail de espécies autóctones selecionadas.

6. Referências Bibliográficas

- Agarbati, A., Canonico, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2019). The impact of fungicide treatments on yeast biota of "Verdicchio" and "Montepulciano" grape varieties. *PLoS One*, 14(6), e0217385.
- Anagnostopoulos, D. A., Kamilari, E., & Tsaltas, D. (2019). Contribution of the microbiome as a tool for estimating wine's fermentation output and authentication. In *Advances in Grape and Wine Biotechnology* (Chap. 6, pp. 97-106). IntechOpen.
- Aradhya, M. K., Dangl, G. S., Prins, B. H., Boursiquot, J. M., Walker, M. A., Meredith, C. P., & Simon, C. J. (2003). Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. *Genetics Research*, 81(3), 179-192.
- Arroyo-García, R., Ruiz-García, L., Bolling, L., Ocete, R., Lopez, M. A., Arnold, C., Ergul, A., Söylemezo Lu, G., Uzun, H. I., Cabello, F., Ibáñez, J., Aradhya, M. K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J. L., Costantini, L., Gorislavets, S., Grando, M. S., Klein, P. O. R., McGovern, P. E., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikirios, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K. A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., Este, P., Troshin, L., Malpica, J. M., Lefort, F., & Martines-Zapater, J. M. (2006). Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology*, 15(12), 3707-3714.
- Bagheri, B., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2015). The diversity and dynamics of indigenous yeast communities in grape must from vineyards employing different agronomic practices and their influence on wine fermentation. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(2), 243-251.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259.
- Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 60-70.
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. (2017). Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules*, 22(2), 189.
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019). The influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters. *Fermentation*, 5(3), 54.
- Brizuela, N., Tymczynszyn, E. E., Semorile, L. C., La Hens, D. V., Delfederico, L., Hollmann, A., & Bravo-Ferrada, B. (2019). *Lactobacillus plantarum* as a malolactic starter culture in winemaking: a new (old) player?. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 10-18.
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(4), C817-C833.
- Čadež, N., Zupan, J., & Raspor, P. (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research*, 10(5), 619-630.
- Camilo, S. F. (2014). Origem e disseminação dos microrganismos do vinho (Dissertação de Mestrado não editada). Universidade de Lisboa, Portugal.
- Cappello, M. S., Zapparoli, G., Logrieco, A., & Bartowsky, E. J. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 16-27.

- Carisse, O. (2016). Development of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) under northern viticulture conditions: influence of fall disease incidence. *European Journal of Plant Pathology*, 144(4), 773-783.
- Carmichael, P. C., Siyoum, N., Chidamba, L., & Korsten, L. (2019). Exploring the microbial communities associated with *Botrytis cinerea* during berry development in table grape with emphasis on potential biocontrol yeasts. *European Journal of Plant Pathology*, 154(4), 919-930.
- Carpena, M., Fraga-Corral, M., Otero, P., Nogueira, R. A., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Secondary aroma: influence of wine microorganisms in their aroma profile. *Foods*, 10(1), 51.
- Chacón-Vozmediano, J. L., Martínez-Gascueña, J., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., García-Navarro, F. J., & Jiménez-Ballesta, R. (2021). Effects of water stress on the phenolic compounds of 'Merlot' grapes in a semi-arid mediterranean climate. *Horticulturae*, 7(7), 161.
- Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., & Martini, A. (2004). Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85(2), 159-164.
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 555.
- Ciccarese, A., Stellacci, A. M., Gentilesco, G., & Rubino, P. (2013). Effectiveness of pre-and post-veraison calcium applications to control decay and maintain table grape fruit quality during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 135-141.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S., & Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1, 1-22.
- Conde, A., Regalado, A., Rodrigues, D., Costa, J. M., Blumwald, E., Chaves, M. M., & Gerós, H. (2015). Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 889-906.
- Coombe, B. G. (1995). Growth stages of the grapevine: adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1(2), 104-110.
- Correia, S., Schouten, R., Silva, A. P., & Gonçalves, B. (2018). Sweet cherry fruit cracking mechanisms and prevention strategies: a review. *Scientia Horticulturae*, 240, 369-377.
- Correia, S., Santos, M., Glińska, S., Gapińska, M., Matos, M., Carnide, V., Schouten, R., Silva, A. P., & Gonçalves, B. (2020). Effects of exogenous compound sprays on cherry cracking: skin properties and gene expression. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7), 2911-2921.
- Costa, C., Graça, A., Fontes, N., Teixeira, M., Gerós, H., & Santos, J. A. (2020). The interplay between atmospheric conditions and grape berry quality parameters in Portugal. *Applied Sciences*, 10(14), 4943.
- Davarpanah, S., Tehranifar, A., Abadía, J., Val, J., Davarynejad, G., Aran, M., & Khorassani, R. (2018). Foliar calcium fertilization reduces fruit cracking in pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani). *Scientia Horticulturae*, 230, 86-91.
- Del Carmen Portillo, M., & Mas, A. (2016). Analysis of microbial diversity and dynamics during wine

- fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 317-321.
- Deluc, L. G., Grimplet, J., Wheatley, M. D., Tillet, R. L., Quilici, D. R., Osborne, C., Schooley, D. A., Schlauch, K. A., & Cramer, G. R. (2007). Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics*, 8(1), 429.
- Ding, S., Li, N., Cao, M., Huang, Q., Chen, G., Xie, S., Zhang, J., Cheng, G., & Li, W. (2019). Diversity of epiphytic fungi on the surface of Kyoho grape berries during ripening process in summer and winter at Nanning region, Guangxi, China. *Fungal Biology*, 123(4), 283-289.
- Eisenman, L. (1999). The winemaking process. In *The Home Winemakers Manual* (Chap. 1, pp. 1-5). L'author.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., & Cocolin, L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations. *International Journal of Food Microbiology*, 199, 33-40.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and evolutionary microbiology*, 49(1), 329-337.
- Falih, A. M. (1998). Comparative toxicity of heavy metals to some yeasts isolated from Saudi Arabian soil. *Bioresource technology*, 64(3), 193-198.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22.
- Freer, S. N. (2002). Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 271-275.
- Fresno, D. H., & Munné-Bosch, S. (2021). Differential tissue-specific jasmonic acid, salicylic acid, and abscisic acid dynamics in sweet cherry development and their implications in fruit-microbe interactions. *Frontiers in plant science*, 12, 77.
- Füssel, H. M. (Ed.). (2017). Changes in the climate system. In *Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2016: an indicator-based report*. *European Environment Agency*.
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L. A. N. C. E., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., & Milgroom, M. G. (2012). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular plant pathology*, 13(1), 1-16.
- Gao, F., Chen, J., Xiao, J., Cheng, W., Zheng, X., Wang, B., & Shi, X. (2019). Microbial community composition on grape surface controlled by geographical factors of different wine regions in Xinjiang, China. *Food Research International*, 122, 348-360.
- Gava, A., Ficagna, E., Rossato, S. B., Cisilotto, B., Miotto, S. P., & Gabbi, H. T. (2016). Change in kinetic parameters of commercial yeast in the presence of copper fungicides. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 7, p. 02029). EDP Sciences.
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(2), 202-218.

- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Joan Miguel, C., & Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*, 240(5), 999-1012. ISO 690.
- Gouot, J. C., Smith, J. P., Holzapfel, B. P., Walker, A. R., & Barril, C. (2019). Grape berry flavonoids: a review of their biochemical responses to high and extreme high temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 70(2), 397-423.
- Gouvinhas, I., Queiroz, M., Rodrigues, M., & Barros, A. I. (2019). Evaluation of the phytochemistry and biological activity of grape (*Vitis vinifera* L.) stems: Toward a sustainable winery industry. In *Polyphenols in Plants*, 381-394.
- Grangeteau, C., David, V., Herve, A., Guilloux-Benatier, M., & Rousseaux, S. (2017). The sensitivity of yeasts and yeasts-like fungi to copper and sulfur could explain lower yeast biodiversity in organic vineyards. *FEMS yeast research*, 17(8), fox092.
- Hocking, B., Tyerman, S. D., Burton, R. A., & Gilliham, M. (2016). Fruit Calcium: transport and physiology. *Frontiers in Plant Science*, 7, 569.
- Hunter, J. J., & Bonnardot, V. (2011). Suitability of some climatic parameters for grapevine cultivation in South Africa, with focus on key physiological processes. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32(1), 137-154.
- Jia, B., Liu, X., Zhan, J., Li, J., & Huang, W. (2015). The effect of proanthocyanidins on growth and alcoholic fermentation of wine yeast under copper stress. *Journal of food science*, 80(6), M1319-M1324.
- Kačániová, M., Eftimová, Z. M., Brindza, J., Felšöciová, S., Ivanišová, E., Žiarovská, J., Kluz, M., & Terentjeva, M. (2020). Microbiota of Tokaj grape berries of slovak regions. *Erwerbs-Obstbau*, 62 (1), 25-33.
- Kántor, A., Kačániová, M., & Kluz, M. (2015). Natural microflora of wine grape berries. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2020, 32-36.
- Kántor, A., Mareček, J., Ivanišová, E., Terentjeva, M., & Kačániová, M. (2017). Microorganisms of grape berries. In *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 71(6), 502-508.
- Kecskeméti, E., Berkelmann-Löhnertz, B., & Reineke, A. (2016). Are epiphytic microbial communities in the carposphere of ripening grape clusters (*Vitis vinifera* L.) different between conventional, organic, and biodynamic grapes?. *PloS one*, 11(8), e0160852.
- Kennedy, J. (2002). Understanding grape berry development. Practical Winery & Vineyard. Consultado em 26 de janeiro de 2021. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/257198648>.
- Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., & Lollier, M. (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 23(8), 709-716.
- Li, G., Fu, W., Deng, Y., & Zhao, Y. (2021). Role of calcium/calcineurin signalling in regulating intracellular reactive oxygen species homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 12(9),

1311.

- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2017). Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(4), 856-873.
- Liu, M., Yang, K., Qi, Y., Zhang, J., Fan, M., & Wei, X. (2018). Fermentation temperature and the phenolic and aroma profile of persimmon wine. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(3), 269-275.
- Liu, D., Zhang, P., Chen, D., & Howell, K. S. (2019). From the vineyard to the winery: how microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2679.
- Liu, D., & Howell, K. (2020). Community succession of the grapevine fungal microbiome in the annual growth cycle. *Environmental Microbiology*.
- López-Malo, M., Querol, A., & Guillamon, J. M. (2013). Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvareum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. *PLoS one*, 8(3), e60135.
- Lu, W., Newlands, N. K., Carisse, O., Atkinson, D. E., & Cannon, A. J. (2020). Disease risk forecasting with Bayesian learning networks: application to grape powdery mildew (*Erysiphe necator*) in Vineyards. *Agronomy*, 10(5), 622.
- Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15(7), fov067.
- Martín-Diana, A. B., Rico, D., Frias, J. M., Barat, J. M., Henehan, G. T. M., & Barry-Ryan, C. (2007). Calcium for extending the shelf life of fresh whole and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(4), 210-218.
- Martins, G., Miot-Sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Soulas, G., & Masneuf-Pomarède, I. (2012b). Grape berry bacterial microbiota: impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*, 158(2), 93-100.
- Martins, V., Cunha, A., Gerós, H., Hanana, M., Blumwald, E. (2012a). Mineral compounds in the grape berry. In *The Biochemistry of the Grape Berry* (Chap. 2, pp. 23-43). Bentham Science.
- Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., & Masneuf-Pomarède, I. (2014a). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 21-28.
- Martins, V. M. V. (2014b). Copper impacts in grapevine (*Vitis vinifera* L.): molecular, biochemical and biotechnological approaches. (Tese de Douturamento). Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Portugal.
- Martins, V., Teixeira, A., & Gerós, H. (2015). Changes in the volatile composition of wine from grapes treated with Bordeaux mixture: a laboratory-scale study. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(3), 425-429.
- Martins, V., Garcia, A., Costa, C., Sottomayor, M., & Gerós, H. (2018). Calcium-and hormone-driven regulation of secondary metabolism and cell wall enzymes in grape berry cells. *Journal of Plant Physiology*, 231, 57-67.

- Martins, V., Billet, K., Garcia, A., Lanoue, A., & Gerós, H. (2020c). Exogenous calcium deflects grape berry metabolism towards the production of more stilbenoids and less anthocyanins. *Food Chemistry*, 313, 126123.
- Martins, V., Garcia, A., Alinho, A. T., Costa, P., Lanceros-Méndez, S., Costa, M. M. R., & Gerós, H. (2020b). Vineyard calcium sprays induce changes in grape berry skin, firmness, cell wall composition and expression of cell wall-related genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150, 49-55.
- Martins, V., Lopez, R., Garcia, A., Teixeira, A., & Gerós, H. (2020a). Vineyard calcium sprays shift the volatile profile of young red wine produced by induced and spontaneous fermentation. *Food Research International*, 131, 108983.
- Martins, V., Soares, C., Spormann, S., Fidalgo, F., & Gerós, H. (2021a). Vineyard calcium sprays reduce the damage of postharvest grape berries by stimulating enzymatic antioxidant activity and pathogen defense genes, despite inhibiting phenolic synthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 48-55.
- Martins, V., Szakiel, A., Pączkowski, C., Teixeira, A., Gerós, H. (2021c) The restructuring of grape berry waxes by calcium changes the surface microbiota. *Food Research International*, em revisão.
- Martins, V., Unlubayir, M., Teixeira, A., Lanoue, A., & Gerós, H. (2021b). Exogenous calcium delays grape berry maturation in the white cv. Loureiro while increasing fruit firmness and flavonol content. *Frontiers in Plant Science*, 1880.
- Masson-Delmotte, V., Pörtner, H., Skea, J., Zhai, P., Roberts, D., Shukla, P. R., Pirani, A., Pidcock, R., Chen, Y., Lonnoy, E., Moufouma-Okia, W., Connors, S., Zhou, X., Maycock, T., Tignor, M., Péan, C., Matthews, J. B. R., Gomis, M. I., & Waterfield, T. (2018). Aquecimento Global de 1,5°C: Relatório especial do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) sobre os impactos do aquecimento global de 1,5°C acima dos níveis pré-industriais e respectivas trajetórias de emissão de gases de efeito estufa, no contexto do fortalecimento da resposta global à ameaça da mudança do clima, do desenvolvimento sustentável e dos esforços para erradicar a pobreza. *Intergovernmental Panel on Climate Change*. Consultado em 21 de janeiro de 2021. Disponível em <https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2019/07/SPM-Portuguese-version.pdf>.
- Masson-Delmotte, V., Pörtner, H., Skea, J., Buendía, E. C., Zhai, P., Roberts, D., Shukla, P. R., Slade, R., Ferrat, M., Neogi, S., Pereira, J., Kissick, K., Connors, S., Haughey, E., Pathak, M., Vyas, P., Belkacemi, M., Diemen, R., Luz, S., Petzold, J., Huntley, E., & Malley, J. (2020). Climate Change and Land: an IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. *Intergovernmental Panel on Climate Change*. Consultado em 26 de janeiro de 2021. Disponível em https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/4/2020/02/SPM_Updated-Jan20.pdf.
- Mateo, J. J., Garcerà, P., & Maicas, S. (2020). Unusual non-*Saccharomyces* yeasts isolated from unripened grapes without antifungal treatments. *Fermentation*, 6(2), 41.
- Milanović, V., Comitini, F., & Ciani, M. (2013). Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 240-246.
- Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mozell, M. R., & Thach, L. (2014). The impact of climate change on the global wine industry: challenges

- & solutions. *Wine Economics and Policy*, 3(2), 81-89.
- Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K. J., Lievens, B., & Thevelein, J. M. (2017). Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-19.
- Nicoué, E. E., Savard, S., & Belkacemi, K. (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5626-5635.
- OIV. (2019). 2019 Statistical report on world vitiviniculture. *International Organisation of Vine and Wine Intergovernmental Organisation*. Consultado em 26 de janeiro de 2021. Disponível em <https://oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>.
- Pallmann, C. L., Brown, J. A., Olineka, T. L., Cocolin, L., Mills, D. A., & Bisson, L. F. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(3), 198-203.
- Paul, D. K., & Shaha, R. K. (2004). Citrus fruits in the northern region of Bangladesh. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2), 238-242.
- Pinto, C., & Gomes, A. C. (2016). *Vitis vinifera* microbiome: from basic research to technological development. *BioControl*, 61(3), 243-256.
- Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: a landscape from diferente Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*, 6, 905.
- Pryce, T. M., Palladino, S., Kay, I. D., & Coombs, G. W. (2003). Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Medical mycology*, 41(5), 369-381.
- Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., & Lund, S. T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC plant biology*, 6(1), 1-11.
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. L. I. N. E. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316-327.
- Roubelakis-Angelakis, K. A. (Ed.). (2001). Grape berry mineral composition in relation to vine water status & leaf area/ fruit ratio. In *Molecular biology & biotechnology of the grapevine* (Chap. 3, pp. 57-58). Springer Science & Business Media.
- Rubio-Bretón, M. P., Salinas, M. R., Nevares, I., Pérez-Álvarez, E. P., Álamo-Sanza, M. D., Marín San Román, S., Alonso, G. L., & Garde-Cerdán, T. (2019). Recent advances in the study of grape and wine volatile composition: varietal, fermentative and ageing aroma compounds. *Food Aroma Evolution*, 439.
- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22 (5), 647-656.
- Serrano, A., Espinoza, C., Armijo, G., Inostroza-Blancheteau, C., Poblete, E., Meyer-Regueiro, C., Arce, A., Parada, F., Sentibañez, C., & Arce-Johnson, P. (2017). Omics approaches for understanding grapevine berry development: regulatory networks associated with endogenous processes and

- environmental responses. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1486.
- Shaw, A. J., & McDaniel, S. F., Werner, O., & Ros, R. M. (2002). Phylogeography and phylodemography. *The bryologist*, 105(3), 373-383.
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P., & Kannan, V. R. (2019). Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. *International journal of biological macromolecules*, 121, 55-62.
- Silva, P., Cardoso, H., & Gerós, H. (2004). Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/ Dekkera* spp. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(1), 65-72.
- Tabeshpour, J., Mehri, S., Shaebani Behbahani, F., & Hosseinzadeh, H. (2018). Protective effects of *Vitis vinifera* (grapes) and one of its biologically active constituents, resveratrol, against natural and chemical toxicities: a comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2164-2190.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., & Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711-18739.
- Teixeira, A., Martins, V., Frusciante, S., Cruz, T., Noronha, H., Diretto, G., & Gerós, H. (2020). Flavescence dorée-derived leaf yellowing in grapevine (*Vitis vinifera* L.) is associated to a general repression of isoprenoid biosynthetic pathways. *Frontiers in Plant Science*, 11, 896.
- Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., & Grieco, F. (2016). The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. *Frontiers in Microbiology*, 7, 670.
- Vadkertiová, R., & Sláviková, E. (2006). Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *Journal of basic microbiology*, 46(2), 145-152.
- Van Wyk, N., Grossmann, M., Wendland, J., Von Wallbrunn, C., & Pretorius, I. S. (2019). The whiff of wine yeast innovation: strategies for enhancing aroma production by yeast during wine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(49), 13496-13505.
- Varela, C., & Borneman, A. R. (2017). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, 34(3), 111-128.
- Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., & Benito, S. (2020). The genus *Metschnikowia* in enology. *Microorganisms*, 8(7), 1038.
- Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1196.
- Wang, C., & Liu, Y. (2013). Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. *Food microbiology*, 33(2), 172-177.
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 21-36.
- Wilcox, W. F., Gubler, W. D., & Uyemoto, J. K. (2015). Compendium of grape diseases, disorders, and pests. *The American Phytopathological Society*.
- Wines of Portugal. (2021). Regiões Vitivinícolas. Wines of Portugal. Consultado em 26 de janeiro de 2021Disponível em <http://www.winesofportugal.info/pagina.php?codNode=18012>.

- Winkler, A., & Knoche, M. (2019). Calcium and the physiology of sweet cherries: a review. *Scientia Horticulturae*, 245, 107-115.
- Yamamoto, E. L. M., de Araújo Ferreira, R. M., de Oliveira Fernandes, P. L., Albuquerque, L. B., & de Oliveira Alves, E. (2011). Função do cálcio na degradação da parede celular vegetal de frutos. *Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável*, 6(2), 6.
- Yu, J., Zhu, M., Bai, M., Xu, Y., Fan, S., & Yang, G. (2020a). Effect of calcium on relieving berry cracking in grape (*Vitis vinifera* L.) 'Xiangfei'. *PeerJ*, 8, e9896.
- Yu, J., Zhu, M., Wang, M., Xu, Y., Chen, W., & Yang, G. (2020b). Transcriptome analysis of calcium-induced accumulation of anthocyanins in grape skin. *Scientia Horticulturae*, 260, 108871.
- Zhang, K., Chen, B. H., Yan, H. A. O., Rui, Y. A. N. G., & WANG, Y. A. (2018). Effects of short-term heat stress on PSII and subsequent recovery for senescent leaves of *Vitis vinifera* L. cv. Red Globe. *Journal of integrative agriculture*, 17(12), 2683-2693.
- Zhang, Q., Dai, W., Jin, X., & Li, J. (2019). Calcium chloride and 1-methylcyclopropene treatments delay postharvest and reduce decay of New Queen melon. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Zhu, M., Yu, J., Tang, W., Fan, S., Bai, M., Chen, M., & Yang, G. (2019). Role of calcium in regulating anthocyanin accumulation in 'Manicure Finger' grape berries. *Scientia Horticulturae*, 256, 108585.
- Zimdars, S., Schrage, L., Sommer, S., Schieber, A., & Weber, F. (2019). Influence of glutathione on yeast fermentation efficiency under copper stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(39), 10913-10920.