



**Daniel Rego Mota**

**Avaliação do comportamento de *Brettanomyces  
bruxellensis* ao longo da cadeia de produção do  
vinho**



**Daniel Rego Mota**

**Avaliação do comportamento de *Brettanomyces bruxellensis* ao longo da cadeia de produção do vinho**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizado sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Professor Auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e coorientação da Doutora Ana Maria Rodrigues, Coordenadora Geral de Operações da Global Wines S.A.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Carlos Pedro Fontes Oliveira**  
professor auxiliar em regime laboral, Universidade de Aveiro

vogais

**Prof. Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira**  
professora auxiliar convidada, Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Maria Lopes Rodrigues Macena**  
Coordenadora Geral de Operações da Global Wines S.A.

## **Agradecimentos**

Ao concluir este trabalho, resta agradecer formalmente às pessoas que estiveram presentes, me acompanharam e apoiaram. Assim gostaria de expressar o meu agradecimento:

Ao Professor Doutor Artur Jorge Alves, por todo o conhecimento científico transmitido, pela sua inteira disponibilidade, por todo o seu apoio e amizade ao longo de todo este trabalho conjunto.

À Doutora Ana Rodrigues, por todo o conhecimento transmitido, por todo o apoio fornecido, pela sua amizade e por despertar em mim um interesse na investigação com o foco no setor empresarial.

À Inês Santos, por todo o conhecimento transmitido, pelo auxílio e explicação de diversos métodos utilizados, por toda a dedicação, atenção, apoio e compreensão que foram surgindo ao longo deste estágio.

À Carlota Silva e à Joana Luís, pela sua atenção contínua, pelo seu auxílio na execução de diversas metodologias, pelo seu apoio contínuo e pela amizade estabelecida no decorrer do estágio.

À Diana Marta e à Mariana pelo seu companheirismo, por todo o apoio, disponibilidade, grande amizade e por todos os convívios organizados.

A todos os restantes funcionários da GlobalWines, pela ajuda fornecida, pela compreensão, pelo seu conhecimento e pelas amizades estabelecidas desde o início do estágio, em particular ao Engenheiro Osvaldo Amado.

A todos os colegas do MICROLAB, pelo auxílio e apoio no desenvolvimento deste projeto, em particular à Sandra Hilário, ao Rafael Tavares e ao Frederico Leitão.

Aos meus familiares e amigos por estarem sempre tão presentes, me fornecerem todo o ânimo, ajuda e força para finalizar mais um capítulo. Em particular, aos meus pais por possibilitarem todas as oportunidades que surgiram na minha vida, com o seu trabalho e esforço incansável, ajuda, carinho e apoio incondicional. À Ana Maria pela sua imensa ajuda, carinho, companheirismo e força fornecida e apoio dado continuamente ao longo dos últimos 4 anos, mas em particular durante este estágio.

A todos o meu, Muito Obrigado.

resumo

A produção de vinho é uma das tecnologias mais antigas da humanidade, sendo atualmente considerada um dos processos biotecnológicos mais próspero ao nível comercial. O vinho surge de diversas reações bioquímicas, que se iniciam durante a maturação da uva e se estendem até ao engarrafamento, sendo os processos mais importantes na sua produção, as fermentações alcoólica e malolática, levadas a cabo por leveduras e bactérias lácticas, respetivamente.

Uma das maiores preocupações na Enologia é o problema de instabilidade causado por leveduras presentes no vinho, sendo denominadas leveduras de alteração. A espécie *Brettanomyces bruxellensis*, uma das leveduras de alteração é a maior causa de contaminação de vinhos tintos em todo o mundo e a responsável por diversas perdas económicas na indústria do vinho devido à sua capacidade de produzir etilfenóis, tais como o 4-etilfenol e 4-etilguaicol, responsáveis pelo aroma a “suor de cavalo”, indesejado pelo consumidor. Face a esta ocorrência nos vinhos, recorrem-se a metodologias que permitam a deteção e quantificação de *B. bruxellensis*, na indústria alimentar, sendo o mais recorrente para a análise de vinhos o cultivo em meio seletivo.

No entanto, os métodos clássicos de microbiologia, como cultura em placa ou a visualização de características morfológicas, como a observação microscópica não são suficientes por si só para a identificação de *B. bruxellensis*, daí que tenham de ser combinados com outras técnicas tais como técnicas de identificação molecular e PCR.

O intuito deste trabalho foi a deteção e quantificação de *B. bruxellensis* em todo o processo de vinificação, e a avaliação de técnicas enológicas que permitam o controlo da presença da levedura no vinho. Sendo assim, as amostras de uvas, vinhos e algumas águas de enxaguamento após higienização foram analisados pelos métodos, clássico de cultivo em meio seletivo e moleculares, a PCR e qPCR.

A análise clássica apresentou uma baixa reprodutividade na multiplicação da levedura em meio seletivo e por vezes não foi observado crescimento microbiano, que pode ser interpretado como ausência de *B. bruxellensis* na amostra, ou como um falso negativo, pois a levedura em certas condições ambientais poderá encontrar-se no estado viável, mas não cultivável.

A PCR e qPCR permitiram detetar e quantificar, respetivamente, a presença da levedura de interesse que nem sempre era detetada usando os métodos clássicos.

Observou-se a presença de *B. bruxellensis*, na maior parte das amostras de uvas, vinhos e águas de higienização, pela técnica PCR e foram quantificadas pela qPCR de modo a determinar a concentração de levedura presente, que foi calculada a partir de uma reta de calibração traçada com padrões de concentrações conhecidas de *B. bruxellensis*.

Após ter sido determinada a concentração da levedura, em todas as amostras, verificou-se que uma amostra de vinho possuía uma concentração de aproximadamente  $1,37 \times 10^5$  UFC/mL, encontrando-se assim na ordem de grandeza  $10^5$  UFC/mL, que corresponde, aproximadamente, à concentração mínima de *B. bruxellensis* necessária para dar origem ao carater “Brett” ao vinho, sendo, portanto, considerado como defeito. Todas as restantes amostras de vinho e uvas apresentaram concentrações de *B. bruxellensis*, abaixo de  $10^5$  UFC/mL.

## keywords

Wine; Winemaking; Fermentation; *Brettanomyces bruxellensis*; 4-ethylphenol; 4-ethylguaiacol; PCR; qPCR.

## abstract

Wine production is one of the oldest technologies in humanity, being one of the most prosperous biotechnological processes at the commercial level. The wine arises from several biochemical reactions, which begin with the maturation of the grape and extend to bottling, being the most important process in its production, alcoholic fermentation, and malolactic fermentation, conducted by yeasts and lactic bacteria, respectively.

One of the major concerns in Oenology is the problem of instability caused by yeasts present in wine, called altering yeasts. *Brettanomyces bruxellensis*, one of the yeasts of alteration is the largest cause of contamination of red wines worldwide and responsible for several economic losses in the wine industry due to its ability to produce ethylphenols, such as 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol, responsible for the aroma of "horse sweat", unwanted by the consumer. Due to this occurrence in wines, methodologies are being used to allow the discovery and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* in the food industry, being the most used for the analysis of wines the plate culture.

However, classical methods, such as plate culture or visualization of morphological characteristics, such as microscopic observation, are not sufficient when performed alone for the identification of *B. bruxellensis*, so they must be combined with other techniques such as molecular identification, and PCR.

The objective of this study was the detection and quantification of *B. bruxellensis* throughout the winemaking process, and to evaluate oenological technologies which would allow a better control of this yeast in wine. Thus the samples from grapes, wines and rinsing water after hygienization were analyzed by the classical method, culture in a selective medium and by molecular methods such as PCR and qPCR.

The classical method revealed low reproducibility of the yeast growth and mostly, it was not observed any growth whatsoever, which can be interpreted as absence of *B. bruxellensis* in the sample or as a false negative, due to this yeast being able to, under certain circumstances, undergo a state of viable but no culturable.

The PCR and qPCR techniques allow the detection and quantification, respectively, of *B. bruxellensis*, that not always was detected in the classical method.

It was observed the presence of *B. bruxellensis*, in most of the samples of grapes, wine and hygienization water, through PCR and they were quantified by qPCR, to determine the concentration of the yeast present, which was calculated by a calibration curve, determined by known concentrations of *B. bruxellensis*

After the concentration of *B. bruxellensis* was determined in all samples it was observed that one wine sample had, approximately, a concentration of  $1,37 \times 10^5$  UFC/mL, being in an order of magnitude of  $10^5$  UFC/mL, which is the minimum concentration of *B. bruxellensis* necessary to induce the "Brett" character to wine, considered as defect. All the remaining samples showed concentrations of *B. bruxellensis*, bellow  $10^5$  UFC/mL.

# Índice

Contextualização.....	1
1. Introdução.....	2
1.1. O Vinho.....	3
1.2. Processo de Vinificação .....	3
1.3. Microrganismos de alteração.....	4
1.3.1 <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .....	5
1.4. Prevenção de microrganismos indesejáveis .....	7
1.4.1. Higienização .....	7
1.4.2. Conservantes.....	8
1.4.3 Pasteurização.....	11
1.4.4 Filtração, clarificação e centrifugação.....	11
1.5 Detecção e identificação de <i>Brettanomyces</i> .....	12
1.5.1 Processo microbiológico clássico .....	12
1.5.2 PCR (Reação em cadeia da polimerase).....	13
Objetivo.....	18
2. Materiais e Métodos .....	19
2.1. Preparação do meio de cultura.....	20
2.2. Condições de crescimento .....	20
2.3. Recolha de amostras.....	20
2.3.1. Uvas.....	20
2.3.2. Vinhos .....	21
2.3.3. Superfícies e águas de enxaguamento .....	21
2.4. Análise microbiológica clássica .....	21
2.5. Extração de DNA .....	22
2.6. Análise PCR .....	22
2.7. Análise qPCR .....	23
3. Resultados e discussão.....	25
3.1. Análise microbiológica clássica .....	26
3.1.1. Uvas.....	26
3.1.2. Vinhos .....	31
3.1.3. Superfícies e águas de enxaguamento .....	32
3.2. Análise microbiológica por PCR.....	33
3.2.1. Avaliação da especificidade dos primers .....	33
3.2.2. Análise PCR das amostras .....	34
3.3. Análise microbiológica por qPCR.....	38
3.3.1 Uvas.....	38
3.3.2. Vinhos .....	39
3.3.3. Águas de enxaguamento após higienização .....	44

<b>4. Conclusão .....</b>	<b>45</b>
<b>5. Proposta de trabalho futuro .....</b>	<b>48</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>49</b>
<b>Apêndices.....</b>	<b>57</b>
<b>Apêndice A. Descrição de vinhos analisados.....</b>	<b>57</b>
<b>Apêndice B. Curvas de calibração da análise PCR.....</b>	<b>59</b>



# Índice de figuras

Figura 1. <i>Brettanomyces bruxellensis</i> visualizado por microscopia de contraste de fase com uma amplificação de 1000x (Adaptado de Fugelsang et al., 2007).....	5
Figura 2. Síntese de 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol por <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . (Adaptado de Chatonnet et al.,1992).....	6
Figura 3. Abundância relativa de SO <sub>2</sub> molecular a diferentes valores de pH. (Adaptado de Ough, 1993).....	9
Figura 4. Esquema de um ciclo da técnica PCR, criado no BioRender.....	14
Figura 5. Amplificação exponencial do gene na PCR, criado no BioRender.....	15
Figura 6. Representação gráfica de uma curva ideal de amplificação de PCR em tempo real, em negrito, e as respetivas fases. L – fase exponencial ou logarítmica; T- fase de transição ou linear; P- fase de plateau ou estacionária (Adaptado de Mackay et al.,2002).....	17
Figura 7. Alinhamento parcial das sequências do gene que codifica para 26S rRNA com os primers DBRUXF e DBRUXR. A sombreado estão as regiões de não identidade de <i>D. bruxellensis</i> . Números de acesso no GenBank: <i>D. bruxellensis</i> , U45738; <i>D. anomala</i> , U84244; <i>B. nanus</i> , U76197. Adaptado de Phister T. e Mills D. (2003).....	23
Figura 8. Determinação da curva de calibração a partir das amostras padrão com concentrações conhecidas. A linha representa a regressão linear do logaritmo da concentração de células na matriz pelo valor da média dos três replicados do Ct. A reta apresenta um R <sup>2</sup> de 0.933 e uma eficiência de amplificação (E) de 97,7%.....	24
Figura 9. Observação dos resultados obtidos após inoculação de 1 mL de amostra da solução de extração de uvas da casta Touriga Nacional, à superfície com um, dois e três dias de extração da amostra. A e B - primeiro dia; C e D - segundo dia; E e F - terceiro dia. ....	26
Figura 10. Observação dos resultados obtidos após inoculação de 1 mL de amostra da solução de extração de uvas da casta Encruzado, à superfície com um, dois e três dias de extração da amostra. A e B - primeiro dia; C e D - segundo dia; E e F - terceiro dia.....	27
Figura 11. Amostras em triplicado de Touriga Nacional com inoculação de 200 µL de amostra à superfície.....	28
Figura 12. Visualização das colónias de <i>B. bruxellensis</i> da Casta Touriga Nacional ao microscópio, que cresceram no meio seletivo a partir das amostras de uva (objetiva 40x).....	28
Figura 13. Amostras em triplicado de Encruzado com inoculação de 200 µL de amostra à superfície.....	29
Figura 14. Amostras em triplicado de Touriga Nacional (Major) incorporada com 500 µL de amostra.....	30
Figura 15. Amostras em triplicado de Touriga Nacional (Major) incorporada com 250 µL de amostra.....	30
Figura 16. Amostras em triplicado de Encruzado (Sede) incorporada com 500 µL de amostra. ....	30
Figura 17. Foto ilustrativa que demonstra os resultados obtidos de todos os vinhos analisados que se enquadram nas categorias: vinhos novos que foram desencubados com a fermentação alcoólica e malolática terminadas, vinhos em estágio em depósito, vinhos em estágio em depósito, vinhos em estágio em barricas e vinhos engarrafados. ....	32
Figura 18. Imagem de gel de eletroforese com os resultados obtidos pela PCR de modo a avaliar a eficácia dos primers. Ma- Marcador de 100 bp -1000 bp; A – DNA 1 de <i>Brettanomyces</i> ; B- DNA 2 de <i>Brettanomyces</i> ; C- Controlo negativo. ....	34
Figura 19. Gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras de uvas e vinhos. Colunas: Ma- marcador; T.N. 1-2 e Encruzado – amostras de uvas; A-M – amostras de diversos vinhos tintos. ....	35
Figura 20. Gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras de uvas e vinhos. Colunas: Ma- marcador; N-Z – amostras de diversos vinhos tintos. ....	36
Figura 21. Gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras de uvas e vinhos. Colunas: Ma- marcador; A1-J1 – amostras de diversos vinhos tintos; VT uvas T.N.1 – amostra de vinho formado a partir das uvas T.N.1; Águas H.1-H.6 – amostras de águas após higienização .....	37
Figura 22. Gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras de uvas e vinhos. Colunas: Ma- marcador; Águas H.7-H.9 – amostras de águas de enxaguamento após higienizações de depósitos; Branco – controlo negativo .....	37
Figura 23. Resultados qPCR da amplificação das amostras dos vinho A-Z, incluindo os padrões e controlo negativo, em triplicado. ....	39
Figura 24. Resultados qPCR da amplificação das amostras dos vinho A1-J1, incluindo os padrões e controlo negativo, em triplicado. ....	40
Figura 25. Melting curve correspondente à amplificação das amostras dos vinho A-Z incluindo os padrões e controlo negativo, em triplicado.....	43
Figura 26. Melting curve correspondente à amplificação das amostras dos vinho A-..., incluindo os padrões e controlo negativo, em triplicado.....	43
Figura B1. Curva de calibração traçada durante a análise qPCR das amostras dos vinhos A-Z. A equação da reta é $y = -3,379 x + 35,818$ e apresenta um R <sup>2</sup> = 0.933 e uma E = 97.7%. ....	59
Figura B2. Curva de calibração traçada durante a análise qPCR das amostras dos vinhos A1-J1. A equação da reta é $y = - 3,644 x + 35,577$ e apresenta um R <sup>2</sup> = 0,994 e uma E = 88,1 % .....	59

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Resultados de concentração de <i>B. bruxellensis</i> em amostras de uvas e vinho da casta Touriga Nacional e amostra de uvas da casta Encruzado.....	39
Tabela 2. Resultados de PCR quantitativo das diferentes amostras de vinho tinto, dos padrões de concentração conhecida e do controlo negativo.....	42
Tabela 3. Resultado das amostras de vinho, por qPCR, com concentração de <i>B. bruxellensis</i> próxima da concentração considerada como defeito.....	44
Tabela 4. Resultados das amostras de águas após higienização de depósitos obtidos por qPCR, de concentrações de <i>B. bruxellensis</i> . .....	44
Tabela A1. Descrição completa das análises realizadas aos vinhos tintos avaliados neste trabalho, através da técnica de análise a parâmetros físico-químicos, FTIR. ....	57
Tabela A2. Descrição completa das análises realizadas aos vinhos tintos avaliados neste trabalho, através da técnica de análise a parâmetros físico-químicos, FTIR. ....	58

## Abreviaturas

ATP - Adenosina trifosfato

DBDM - Meio diferencial Dekkera/Brettanomyces

DMDC - Dimetildicarbonato

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNApol - DNA polimerase

dNTPs – Desoxirribonucleotidos trifosfatados

FA - Fermentação alcoólica

FAD - Dinucleótido de flavina e adenina

FML - Fermentação malolática

NAD - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

qPCR – PCR quantitativo

RNA - Ácido ribonucleico

SO<sub>2</sub> - Dióxido de enxofre

VC - Viável e cultivável

VNC - Viável não cultivável

## **Contextualização**

Este estágio curricular, é parte integrante do Mestrado em Biotecnologia Alimentar, tendo sido desenvolvido um trabalho experimental, no laboratório das instalações da GlobalWines S.A., sediada em Carregal do Sal. A empresa, foi fundada em 1990, com o intuito de divulgar a nível nacional e internacional os vinhos do Dão. Rapidamente este projeto se estendeu às principais regiões vitivinícolas portuguesas, como o Douro, Alentejo, Bairrada, Estremadura e à região dos Vinhos Verdes. No Brasil também está representada, com o projeto ViniBrasil, situado no Vale de S. Francisco, produzindo vinhos únicos no Paralelo 8°.

A empresa engloba toda a produção de vinhos, desde a vinha, receção, vinificação, armazenamento e engarrafamento, sendo a sua aposta contínua na qualidade dos seus produtos.

## **1. Introdução**

## 1.1. O Vinho

O consumo de vinho pode ser visto como uma componente cultural de vários países, uma forma de entretenimento ou uma maneira de melhorar a saúde, uma vez que é considerado um alimento funcional, ou seja, um alimento que pode trazer benefícios para a saúde (Hasler, 1998; Bisson *et al.*, 2002). Muitos dos efeitos benéficos do vinho, especialmente do tinto, devem-se aos seus componentes, nomeadamente resveratrol, compostos fenólicos, quercetina e viniferina (Leifert e Abeywardena, 2008; Pérez-López *et al.*, 2009; Riedel *et al.*, 2012). No entanto deve ser consumido de forma moderada, uma vez que o excesso de álcool pode causar intoxicações e graves danos em diversos órgãos, nomeadamente o fígado (Mukamal e Rimm, 2008).

A produção de vinho é uma das tecnologias mais antigas da humanidade, sendo atualmente considerada como um dos processos biotecnológicos mais prósperos ao nível comercial (Inês *et al.*, 2008). A cultura do vinho continua muito presente, sendo realizados diversos eventos sociais de promoção e dinamização dos vinhos envolvendo encontros entre produtores, concursos e provas de vinhos.

O vinho português tem conseguido destacar-se a nível internacional por ser uma proposta única e diferenciadora, baseada na diversidade e singularidade das suas castas e dos seus *terroirs* (Instituto da Vinha e do Vinho, 2014).

## 1.2. Processo de Vinificação

O vinho é o resultado de diversas reações bioquímicas, que se iniciam durante a maturação da uva e se estendem até ao engarrafamento (Romano *et al.*, 2003). Este engloba uma heterogeneidade de microrganismos que interagem entre si, sendo considerado um produto elaborado, diferenciando-se assim dos produtos fabricados, os quais são caracterizados por misturas de várias matérias-primas (Rayess *et al.*, 2011). O vinho é o produto da fermentação de sumo de uva, principalmente devido à atuação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os microrganismos atuam principalmente na fermentação do vinho, onde metabolizam os açúcares da uva e outros componentes em

etanol, dióxido de carbono e centenas de produtos finais que, coletivamente contribuirão para a sutileza e singularidade de cada vinho (Fleet, 2003).

Os processos mais importantes na produção de vinho são a fermentação alcoólica (FA), conduzida pelas leveduras, e a fermentação malolática (FML), conduzida por bactérias láticas, nomeadamente *Oenococcus oeni* (Genisheva *et al.*, 2013).

Na FA, as leveduras são afetadas por condições físico-químicas como pH, concentração de açúcar, quantidade de compostos fenólicos, temperatura, quantidade de dióxido de enxofre adicionado e quantidade de oxigénio disponível (Bisson e Joseph, 2009). No final da fermentação alcoólica, inicia-se um processo secundário, designado FML, responsável pela descarboxilação de ácido L-málico em ácido L-lático, realizada pelas bactérias láticas presentes no vinho (Nisiotou, *et al.*, 2015). Este passo é essencial para a redução da acidez, para o aumento das características organoléticas, produzindo e modificando alguns aromas a fruta no vinho (Davis *et al.*, 1985), garantindo ainda o aumento da estabilidade microbiológica do vinho, uma vez que previne o crescimento secundário de bactérias láticas após engarrafamento. (Lonvaud-Funel, 1999; Versari *et al.*, 1999; Lerm *et al.*, 2010).

### **1.3. Microrganismos de alteração**

Uma das maiores preocupações na Enologia é o problema de instabilidade causado por leveduras presentes no vinho (Malfeito-Ferreira e Loureiro, 1995). Mesmo a espécie *S. cerevisiae* que é determinante na fermentação alcoólica, pode alterar o aroma do vinho em condições menos favoráveis (Hudelson, 2011). Entende-se por alteração microbiana de um vinho, a mudança da sua composição química por ação de determinados microrganismos, que pode influenciar as características organoléticas (Hudelson, 2011).

As principais leveduras de alteração do vinho são as pertencentes aos géneros *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

### 1.3.1 *Brettanomyces bruxellensis*

As leveduras associadas a mostos e vinhos podem ser esporogéneas ou não esporogéneas, sendo que as primeiras são capazes de formar esporos. A levedura *Brettanomyces* é a forma assexuada de *Dekkera* representado, na Figura 1 (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006)

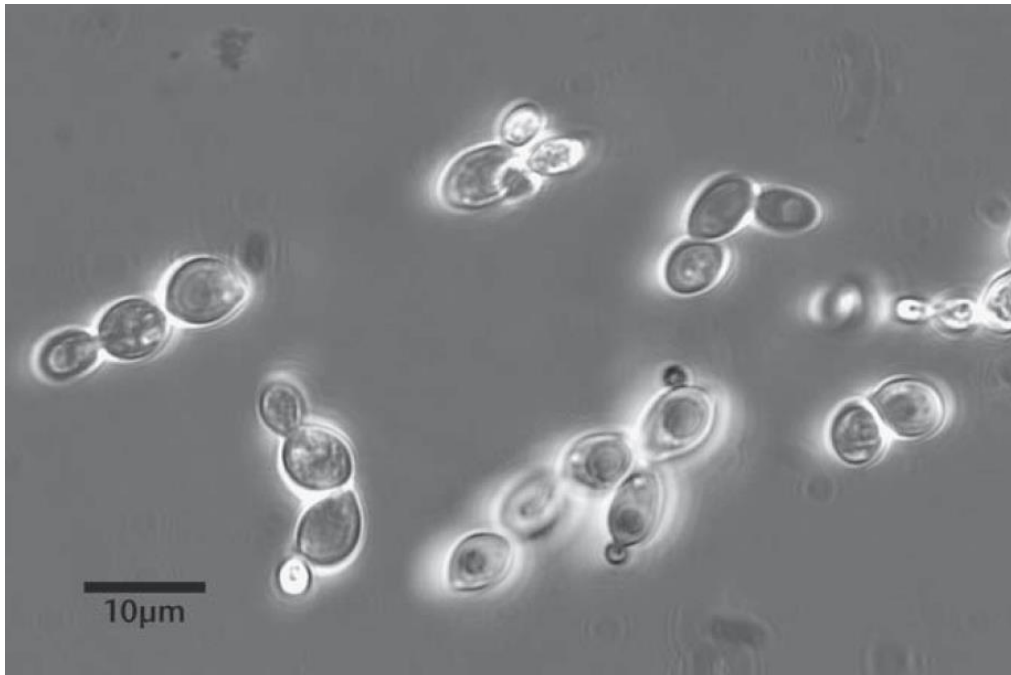


Figura 1. *Brettanomyces bruxellensis* visualizado por microscopia de contraste de fase com uma amplificação de 1000x (Adaptado de Fugelsang et al., 2007).

A espécie *B. bruxellensis* é a maior causa de contaminação de vinhos tintos em todo o mundo e a responsável por sérias perdas económicas na indústria do vinho devido à sua capacidade de produzir etilfenóis, tais como o 4-etilfenol e 4-etilguaiacol, a partir de ácidos fenólicos existentes na uva, representados na Figura 2 (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006). Estes compostos transmitem defeitos aromáticos descritos como “fenólico”, “estrebaria” ou “suor de cavalo” (Suárez et al., 2007).



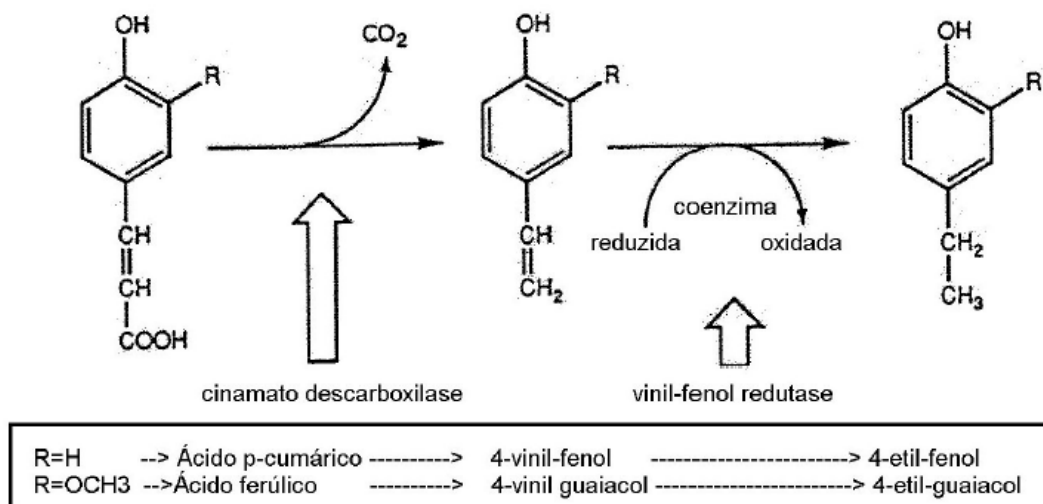


Figura 2. Síntese de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol por *Brettanomyces bruxellensis*. (Adaptado de Chatonnet et al.,1992)

Apesar do crescimento lento de *B. bruxellensis*, esta pode encontrar-se por vezes em condições favoráveis, como é o caso do envelhecimento em barricas quando o teor de nutrientes é limitado, as concentrações de SO<sub>2</sub> são baixas, o pH é elevado e as temperaturas estão geralmente acima de 15 °C (Suárez-Lepe e Iñigo-Leal, 2004; Suárez et al., 2007).

Esta levedura tem sido cada vez mais estudada visando compreender a sua capacidade de alteração/contaminação e estabelecer medidas de controlo (Suárez, et al., 2007). O limite sensorial para os etilfenóis é baixo, sendo perceptível se a sua concentração for aproximadamente 425 µg/L na proporção 1:10 4-etilguaiacol/4-etilfenol (Chatonnet et al.,1997; Suárez, et al., 2007) e mesmo pequenas quantidades podem reduzir seriamente a qualidade olfativa dos vinhos.

Têm vindo a ser desenvolvidos métodos moleculares específicos para identificação de leveduras do género *Brettanomyces* diretamente do vinho (Tessonnière et al., 2009). Métodos moleculares desenvolvidos por Agnolucci et al., (2010) mostraram que: (a) *B. bruxellensis* é a única espécie deste género encontrada em vinhos, (b) está sempre presente nas uvas, (c) todas as estirpes investigadas até agora têm a capacidade de produzir fenóis voláteis e (d) o nível de produção de fenóis varia entre estirpes.

O isolamento e caracterização de microrganismos a partir de vinho é realizado pressupondo que todas as células são capazes de se multiplicar e dar origem a uma população viável e cultivável num meio de crescimento específico. No entanto, face a fatores de stress como pressão osmótica, temperatura e concentração de oxigénio, os

microrganismos podem apresentar-se num estado viável não cultivável (VNC) denominado também como estado de latência. Estudos realizados por Du Toit *et al.* (2005), mostraram que este fenómeno de VNC em *B. bruxellensis* pode ser revertido para um estado cultivável quando as condições ambientais favoráveis são restabelecidas.

## **1.4. Prevenção de microrganismos indesejáveis**

### **1.4.1. Higienização**

Para prevenir a proliferação de microrganismos é necessário existir uma adequada higienização dos equipamentos utilizados na vinificação, a aplicação de conservantes e a utilização de processos físicos como a filtração do vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

A higienização dos equipamentos quando bem executada, permite não só a redução da maioria das contaminações, como também evitar contaminações cruzadas dentro do ambiente de adegas. A higienização é realizada geralmente com água quente e com agentes desinfetantes como soluções de sulfito ou ozono. Os produtos que contenham cloro na sua composição devem ser evitados, pois alguns microrganismos podem dar origem, através de reações secundárias utilizando precursores clorados, ao composto 2,4,6-Tricloroanisol responsável pelo gosto a rolha no vinho (Fugelsang e Edwards, 2007; Malfeito-Ferreira, 2014). A utilização de materiais de fácil higienização, como o aço inoxidável, permite uma maior eficiência no processo de limpeza. Materiais rugosos como o plástico, a borracha ou a madeira, dificultam a higienização, devido à elevada porosidade (Malfeito-Ferreira, 2010). O material mais difícil, ou quase impossível de higienizar corretamente é a madeira utilizada para a maturação de certos vinhos.

As barricas de carvalho são amplamente utilizadas particularmente para os vinhos tintos de alta qualidade, sendo que esta situação representa a maior dificuldade na prevenção da contaminação por *B. bruxellensis* (Malfeito-Ferreira, 2014). Recorrem-se a tratamentos com água quente, soluções de dióxido de enxofre e ozono como agentes de limpeza e desinfecção. No entanto, a sua eficácia é limitada devido à natureza porosa da madeira (Malfeito-Ferreira, 2010).

## 1.4.2. Conservantes

O controlo do crescimento e da atividade dos microrganismos de alteração exige uma boa compreensão da sua fisiologia, bioquímica e genética (Fleet, 2006). Desta forma, são utilizadas algumas formas de prevenção, recorrendo a conservantes e esterilizantes como por exemplo o dióxido de enxofre, o dimetildicabornato, a pasteurização, entre outros (Fugelsang e Edwards, 2007). Contudo, na indústria vinícola o mais utilizado é sem dúvida o dióxido de enxofre.

### 1.4.2.1 Dióxido de enxofre

O dióxido de enxofre ou anidrido sulfuroso, como é geralmente designado, é um aditivo usado em várias indústrias alimentares estando especialmente indicado para ser utilizado em alimentos de baixo pH, como sumos de frutos e outras bebidas. Nenhum outro aditivo apresenta um largo espectro de propriedades benéficas na vinificação e na conservação dos vinhos. O  $SO_2$  é um poderoso antioxidante que inibe oxidases, ao combinar-se com os produtos de oxidação, assegurando a inibição de grande parte dos microrganismos prejudiciais.

Na presença de água o  $SO_2$  apresenta um equilíbrio, dependente do pH, entre três formas, como é possível ver pelas Equações 1, 2 e 3: forma molecular ( $H_2SO_3$ ), ião bissulfito ( $HSO_3^-$ ) e ião sulfito  $SO_3^{2-}$ .



No entanto, como o pH dos vinhos está normalmente entre 3,0 - 4,0 a espécie predominante é o bissulfito, como ilustrado na Figura 3, sendo possível verificar a variação da quantidade presente de cada uma das 3 espécies de dióxido de enxofre, de acordo com o valor de pH. A espécie que terá a capacidade de inibir os microrganismos é a molecular, pois devido à inexistência de carga desta molécula, esta pode entrar na célula e sofrer uma dissociação provocada pelo pH citoplasmático dando origem ao ião bissulfito ou ião sulfato.

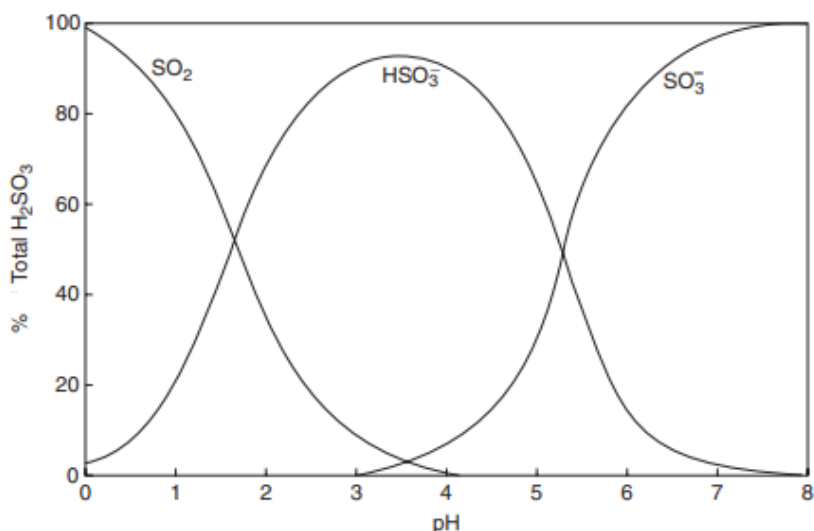


Figura 3. Abundância relativa de SO<sub>2</sub> molecular a diferentes valores de pH. (Adaptado de Ough, 1993).

À medida que a concentração de SO<sub>2</sub> diminui devido à tendência para o equilíbrio, mais SO<sub>2</sub> molecular entra na célula, aumentando assim a concentração intracelular. A inibição pode ocorrer por vários mecanismos, como por exemplo a rutura de pontes de dissulfeto das proteínas, tornando-as em componentes não assimiláveis, ou originando uma reação com cofatores como o NAD<sup>+</sup> e o FAD. Pode ainda reagir com ATP, e promover a remoção do grupo amina da citosina, transformando-o em uracilo e consequentemente aumentando a probabilidade de ocorrência de mutações letais (Ough, 1993). A concentração de SO<sub>2</sub> molecular necessária para impedir o crescimento celular varia de acordo com o mosto/vinho, o pH, a temperatura, o teor alcoólico, a população microbiana, bem como a sua diversidade, estado de crescimento, entre outros fatores. O SO<sub>2</sub> é usado na conservação de mostos, devido às suas capacidades redutoras, sendo capaz de reagir com variados compostos existentes nos mostos e vinhos.

No mosto ou vinho, é possível medir a concentração de SO<sub>2</sub> como estando na forma “livre” quando não está ligado a nenhum composto, ou na forma “combinada” quando ocorrem as reações já referidas. A soma destas duas parcelas permite obter a

concentração total de dióxido de enxofre no mosto/vinho. A fração livre tem uma capacidade antisséptica, capaz de inibir as bactérias do ácido láctico, bactérias do ácido acético e outras potenciadoras de doenças e defeitos nos vinhos. A resistência das leveduras a esta ação é variável, no entanto, é mais fraca nos vinhos do que nos mostos, devido à presença do etanol (Curvelo-Garcia, 1988). Na forma “combinada”, pode reagir irreversivelmente e dar origem à parte mais estável. Pode ainda reagir de forma reversível, dando origem a uma “reserva” de SO<sub>2</sub>, por se estabelecerem ligações mais instáveis que podem ser quebradas mais facilmente, libertando SO<sub>2</sub> quando a fração livre começa a diminuir. Entre os compostos que se ligam de forma irreversível pode-se destacar o etanol e outros compostos como aldeídos e cetonas (Curvelo-Garcia, 1988).

Segundo o Regulamento (UE) N° 2019/934 de 13 de março de 2019, no que respeita às práticas enológicas e às suas restrições, os vinhos que contêm SO<sub>2</sub> têm obrigatoriamente de informar no rótulo a adição do mesmo, pois este pode causar reações alérgicas, dando origem a vários problemas de saúde como dores de cabeça, irritação gástrica, náuseas, entre outros (Santos *et al.*, 2012).

O limite legal varia com a concentração de teor de açúcar no vinho bem como com a sua cor. Para vinho com < 5 g/L de teor em açúcares (expresso em glucose + frutose), o limite é ≤ 150 mg/L para os vinhos tintos e, no caso dos vinhos rosé e branco, o limite já é um pouco mais elevado, ≤ 200 mg/L. Nos vinhos com > 5 g/L de teor em açúcares, para vinhos tintos o limite é de ≤ 200 mg/L e para vinho branco e rosé a concentração deste conservante terá de ser ≤ 250 mg/L.

#### **1.4.2.2 Dimetildicarbonato**

O Dimetildicarbonato (DMDC) é um conservante utilizado na vinificação, particularmente ativo contra leveduras (Costa *et al.*, 2008), permitindo a conservação do vinho durante longos períodos de tempo. Diversos estudos têm evidenciado a capacidade inibitória do DMDC em leveduras, tais como *B. bruxellensis*.

Os efeitos antimicrobianos do DMDC resultam da inativação de enzimas (Ough, 1993), sendo que ocorre a desnaturação de enzimas fermentativas, nomeadamente gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a álcool desidrogenase. No entanto, apesar de eficaz este conservante requer uma boa homogeneização, para assegurar uma distribuição uniforme visto que este apenas é solúvel em água. O DMDC apresenta limites máximos

de utilização que constam no Regulamento (UE) N° 2019/934 de 13 de março de 2019, sendo de 200 mg/L.

### **1.4.3 Pasteurização**

A Pasteurização é um processo de inativação microbiana através da temperatura, pois esta tem um grande impacto na sobrevivência dos microrganismos, sendo que à medida que a temperatura aumenta progressivamente, afastando-se da temperatura ideal de crescimento (baixa ou alta), a atividade metabólica dos microrganismos e a sua capacidade de multiplicação fica comprometida (Delfini e Formica, 2001).

As temperaturas baixas têm consequências diferentes, comparativamente com as temperaturas altas. Enquanto as temperaturas baixas inibem o crescimento, sem destruir os microrganismos, as temperaturas acima do valor ideal de crescimento podem ter, à partida, um efeito de crescimento benéfico com a aceleração de alguns processos vitais. Todavia, no caso da Pasteurização, as temperaturas altas são altamente destrutivas, pois moléculas como proteínas, DNA e RNA são muito sensíveis a estas, causando a inibição do crescimento microbiano (Delfini e Formica, 2001).

### **1.4.4 Filtração, clarificação e centrifugação**

Procedimentos como clarificação e centrifugação levam à redução do material em suspensão, incluindo microrganismos. O uso de agentes clarificantes é geralmente dirigido para o melhoramento das características organoléticas do vinho através da remoção de microrganismos.

A técnica de filtração por terra de diatomáceas é feita atualmente durante o envelhecimento do vinho o que reduz drasticamente o número da população microbiana. No entanto as leveduras que se encontrem no estado viável, mas não cultivável apresentam dimensões menores e podem passar através de filtro de membranas de 0,45 µm de porosidade (Millet e Lonvaud-Funel, 2000). Para isto devem ser aplicados níveis mais elevados de tratamento com efeito estabilizante. Os processos de filtração e clarificação são tidos como processos indesejáveis na vinificação de vinhos de maior

qualidade apesar de apresentarem a capacidade de reduzir os níveis de *Brettanomyces* (Arvik e Henick-Kling, 2002).

Uma higienização rigorosa é importante depois de uma filtração estéril ou pasteurização a fim de evitar contaminações diretas, ou contaminações cruzadas. Quando o vinho está pronto para engarrafar, a filtração pré-engarrafamento é o procedimento mais comum para atingir a "esterilização", sendo o objetivo final a prevenção do crescimento microbiano nos vinhos engarrafados (Malfeito-Ferreira, 2010).

Alguns vinhos, particularmente tintos de elevada qualidade, não podem ser submetidos a tratamentos de filtração ou pasteurização por obedecerem a regras de qualidade restritas. No entanto, nestes casos, é necessária a aplicação de uma dose mais elevada de conservantes para evitar o desenvolvimento microbiano no produto engarrafado. Estes vinhos não filtrados são os mais frequentemente afetados pelo carácter “Brett” conferindo o característico odor a “suor de cavalo” e também mais suscetíveis à refermentação em garrafa (Malfeito-Ferreira, 2011).

## **1.5 Detecção e identificação de *Brettanomyces***

### **1.5.1 Processo microbiológico clássico**

Face à microbiota existente nos vinhos é necessário recorrer a metodologias que permitam a sua deteção e quantificação. São diversos os métodos utilizados com esse mesmo intuito na indústria alimentar, sendo o mais recorrente para a análise de vinhos, o cultivo em placa (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Para a deteção de leveduras de deterioração, têm sido desenvolvidos meios seletivos e/ou diferenciais. Os métodos clássicos de microbiologia, como cultura ou visualização das características morfológicas não são suficientes por si só para a identificação de *B. bruxellensis*, daí que tenham de ser combinados com outras técnicas como PCR e qPCR (Suárez *et al.*, 2007). *Brettanomyces bruxellensis* é uma levedura difícil de isolar a partir de fontes contaminadas, devido à baixa taxa de crescimento. Assim, o uso de meios de cultura seletivos e longos períodos de incubação são essenciais para a sua recuperação.

O método de filtração por membrana é o normalmente utilizado para enumerar espécies de deterioração uma vez que permite isolar um reduzido número de microrganismos a partir de um grande volume de amostra.

Esta metodologia pode gerar resultados falsos negativos, dado não garantir a detecção de células viáveis não cultiváveis e, torna-se ainda uma técnica limitante, quando se pretende o isolamento de *B. bruxellensis* dentro de uma vasta população heterogénea, e porque a levedura pode encontrar-se presente no vinho, mas com uma densidade celular muito reduzida, não sendo possível cultivar. No entanto, a baixa densidade celular, podem ser produzidos os fenóis voláteis responsáveis pelo carácter “Brett” no vinho (Arvik *et al.*, 2002).

O teste olfativo surge como uma nova abordagem na detecção da presença de *Brettanomyces*. Este teste baseia-se na adição do vinho ao meio de cultura seletivo (DBDM) permitindo um ambiente propício à produção de fenóis voláteis que são detetados olfativamente (Gerland, 2006). Ainda assim, cada vez mais a investigação recai em novas metodologias de detecção, quantificação e caracterização, procurando aumentar a rapidez e fiabilidade dos resultados. Para tal, são utilizadas técnicas moleculares, como a PCR e qPCR (Cocolin *et al.*, 2004; Renouf *et al.*, 2007; Gerland e Sarl, 2010; Morgan *et al.*, 2017).

### **1.5.2 PCR (Reação em cadeia da polimerase)**

A PCR foi concebida por Kary Mullis em 1983 (Saiki *et al.*, 1985) que desenvolveu um processo através do qual o DNA poderia ser multiplicado artificialmente através de ciclos repetidos de duplicação cuja reação seria catalisada pela enzima DNA polimerase.

O desenvolvimento da técnica da PCR otimizou o processo de clonagem devido a não necessitar de microrganismos vivos e permitir um aumento exponencial da quantidade de DNA amplificado de forma rápida e segura. Assim sendo, esta técnica revolucionou várias áreas tais como Biologia Molecular, Biotecnologia, Patologia, Farmácia e Medicina Forense (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A reação da PCR envolve três fases: a fase de desnaturação pelo calor, a fase de hibridização e a fase de extensão (Fig. 4).



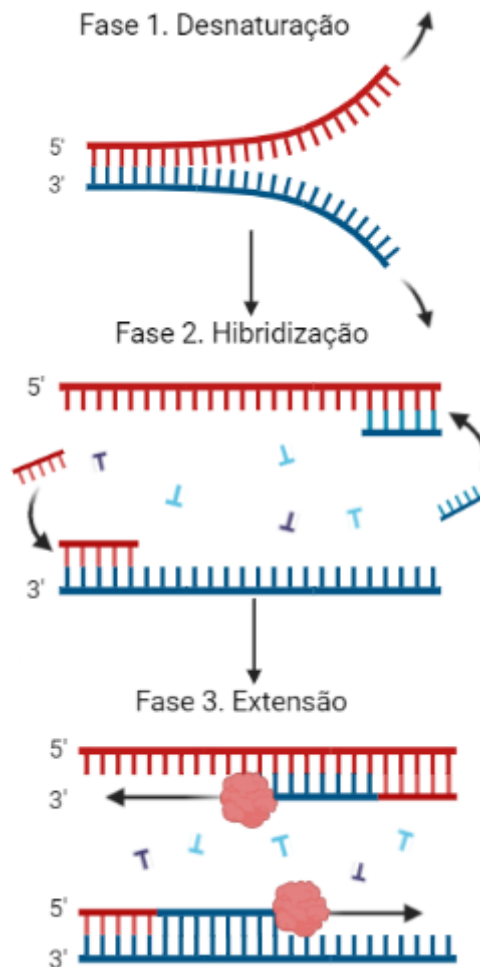


Figura 4. Esquema de um ciclo da técnica PCR, criado no BioRender.

Na primeira fase, ocorre a separação da dupla hélice de DNA por aquecimento a uma temperatura elevada (94°C-96°C), originando duas cadeias complementares (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A fase de hibridização dos primers (oligonucleótidos iniciadores) ocorre num certo intervalo de temperaturas, específica para cada primer em questão, onde estes se recombinaem com as duas cadeias de DNA com elevada especificidade. O par de primers liga-se exatamente à sequência complementar de DNA, indicando os pontos inicial e final da nova cópia de DNA que irá ser sintetizada no ciclo seguinte (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Durante a fase de extensão do DNA, a temperatura é elevada até ao intervalo 72°C a 76°C, que coincide com a temperatura a que a DNA polimerase tem o seu máximo de atividade. A DNA pol reconhece os locais onde os primers se ligaram com o DNA alvo, liga-se a eles e sintetiza a cadeia complementar utilizando os nucleótidos trifosfatados (dNTPs) que estão livres e em excesso na solução da reação. A extensão da cadeia de

DNA começa sempre na zona 3' do primer que corresponde à direção 5'-3' da DNA pol (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

No fim de um ciclo de PCR, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde, fazendo com que se dê um crescimento exponencial onde ao fim de n ciclos, se obtém  $2^n$  vezes mais cópias do que havia no início (Figura 5) (Delidow *et al.*, 1993).

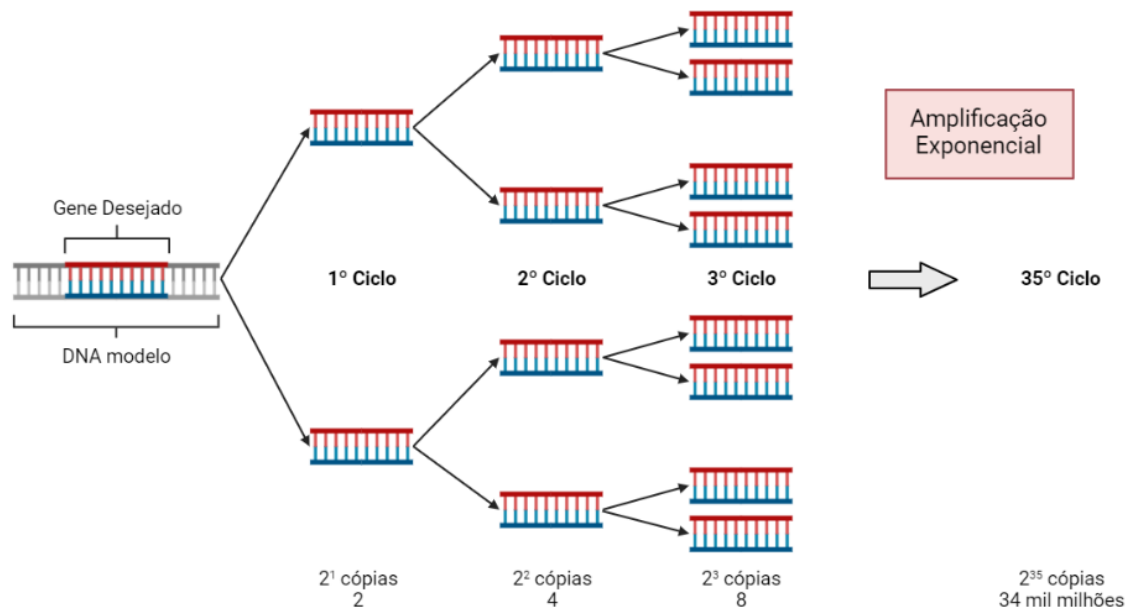


Figura 5. Amplificação exponencial do gene na PCR, criado no BioRender.

O produto da reação da PCR é normalmente visualizado através de eletroforese em gel. Outros métodos analíticos podem ser aplicados com a finalidade de detecção dos produtos da PCR, tais como: *Southern blotting*, ELAHA (enzyme-linked amplicon hybridization assay), ELOSA (enzyme-linked oligosorbent assay), entre outros (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A eletroforese em gel consiste na separação de moléculas com carga elétrica não nula, geralmente usada para separar proteínas e moléculas de DNA e RNA. Durante a aplicação de uma diferença de potencial, ocorre a migração de partículas que originam um conjunto de bandas. A visualização destas bandas é realizada através de radiação ultravioleta e só é possível devido à adição de um composto que, ao interagir com o DNA, se torna fluorescente. A seleção deste composto é determinante na medida em que, uns ligam-se preferencialmente ao DNA em vez do RNA e outros mostram maior afinidade ao DNA de cadeia dupla face ao de cadeia simples. O brometo de etídio é um exemplo de um composto fluorescente, que apresenta características mutagénicas e que é

largamente utilizado para a detecção de DNA/RNA em géis (Oliveira, 2009). Outro exemplo é o nitrato de prata, um composto também nocivo, que é utilizado em géis de poliacrilamida. No entanto, existem alternativas a estes compostos, como por exemplo o SYBR™ Green, um composto mais seguro que tem algumas vantagens tais como maior afinidade e maior sensibilidade para a detecção de pequenos fragmentos de cadeia simples, do que os compostos anteriormente descritos (Singer, *et al.*, 1994). O tamanho do produto é depois estimado por comparação das bandas com marcadores de massas moleculares previamente conhecidas (Chen e Janes, 2002).

O sucesso da amplificação de DNA pela técnica da PCR convencional está dependente de diversos fatores, como a presença de inibidores, a quantidade de DNA, o estado de degradação do DNA, entre outros. Assim, a necessidade de monitorizar em simultâneo a quantidade e qualidade do DNA amplificado levou ao desenvolvimento da PCR em tempo real.

A PCR em tempo real (RT-PCR), também conhecida como PCR quantitativa (qPCR), foi descrita pela primeira vez em 1993. O procedimento é semelhante à PCR convencional diferindo essencialmente numa característica inovadora: a possibilidade de quantificação em tempo real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação. Neste método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real (Heid *et al.*, 1996).

O sucesso da técnica rapidamente levou ao seu aperfeiçoamento. Para tal contribuíram, por exemplo, o desenvolvimento de sondas e a descoberta de que a *Taq* polimerase que contribui para uma hibridização específica, para um menor ruído e elimina a presença de falsos positivos.

O procedimento da qPCR apresenta três fases, semelhante à PCR convencional, a fase de desnaturação do DNA, a fase de hibridização e a fase de extensão. O corante utilizado liga-se às novas cadeias de DNA que se formaram e emite fluorescência no fim de cada ciclo PCR. A intensidade da fluorescência gerada, acima do ruído (Ct) é medida e utilizada para quantificar a quantidade de novas cadeias duplas de DNA formadas que podem ser representados graficamente como demonstrado na Figura 6.

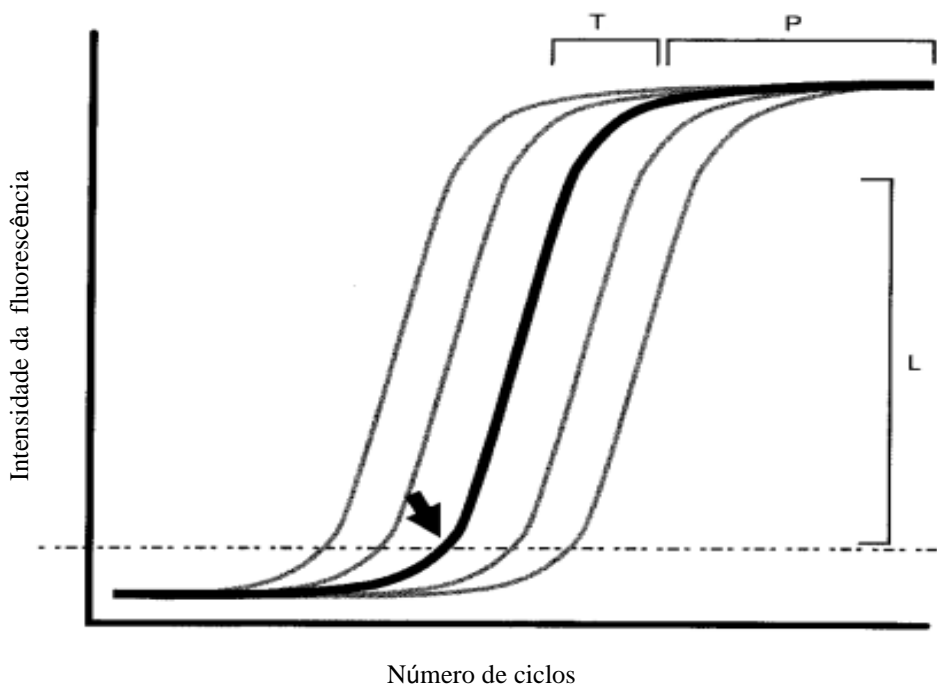


Figura 6. Representação gráfica de uma curva ideal de amplificação de PCR em tempo real, em negrito, e as respectivas fases. L – fase exponencial ou logarítmica; T- fase de transição ou linear; P- fase de plateau ou estacionária (Adaptado de Mackay et al.,2002)

A fase de crescimento exponencial é considerada a melhor para se estudar a reação devido à elevada eficiência registrada, uma vez que a relação entre a quantidade de produto e do input de DNA é mais consistente. Por este motivo, os dados de fluorescência são geralmente recolhidos desde o início do processo de amplificação.

A interpretação dos resultados obtidos pelos equipamentos obriga a que se definam conceitos específicos, como baseline, ponto  $C_T$  e threshold. A baseline corresponde ao limite mínimo de deteção de fluorescência, sendo considerado o “ruído de fundo” do equipamento, O ponto  $C_T$ , denominado na literatura como “cycle threshold”, corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detetável. Trata-se de um ponto a partir do qual a fluorescência detetada ultrapassa o limiar da fase inicial, conhecido como threshold, definido automaticamente pelo software do equipamento em função da baseline. O valor mínimo de  $C_T$  depende da quantidade inicial de moléculas no início do processo, o que significa que um menor número inicial de moléculas requer um maior número de ciclos para gerar um aumento exponencial do sinal da fluorescência que seja significativamente superior à baseline (Heid et al., 1996; Kubista et al., 2006; Mackay et al., 2007; Pelt-Verkuil et al., 2008).

## Objetivo

Este trabalho teve por objetivo determinar a presença da levedura *Brettanomyces bruxellensis* em diferentes pontos durante o processo de vinificação, sendo realizada a recolha de uvas, vinho e águas de enxaguamento após higienização. Foi realizada uma avaliação do melhor método de inoculação, para deteção de *B. bruxellensis* tendo sido posteriormente otimizado. Foram testadas diversos métodos de deteção de *B. bruxellensis*, sendo estes a inoculação por sementeira, a análise molecular PCR e a análise qPCR. Posteriormente foram avaliadas tecnologias enológicas que permitem o controle e prevenção da levedura *B. bruxellensis* na adega.

## **2. Materiais e Métodos**

## **2.1. Preparação do meio de cultura**

No isolamento de *B. bruxellensis* foi utilizado o meio diferencial DBDM (*Dekkera/Brettanomyces* differential medium), da marca Condalab, contendo 0.3 % azoto base de levedura, 0.001% de ciclohexamida, 0.01% ácido p-cumárico, 0.002% de verde de bromocresol, 0.01% cloranfenicol e 20% agar, com pH final de  $5,3 \pm 0,2$ .

Para realizar os ensaios PCR e qPCR, a levedura *B. bruxellensis* foi cultivada, a partir de amostras de vinho, no meio seletivo YPD contendo 20 g/L de glucose, 10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona e 25 g/L de agar, com pH final de  $4,8 \pm 0,2$ .

Todos os meios de cultivos foram esterilizados por autoclavagem, à temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente foram transferidos, num ambiente estéril, para placas de Petri com  $5,0 \pm 0,2$  cm de diâmetro.

## **2.2. Condições de crescimento**

A levedura *B. bruxellensis* foi inoculada em meio sólido e incubadas a 30 °C durante 5-7 dias. Para preparação de culturas-stock, as leveduras foram recultivadas em meio novo, incubadas a 30 °C por 5 dias.

Após o período de crescimento algumas placas foram guardadas a 4 °C no frigorífico, para armazenamento de curto prazo. Para armazenamento a longo prazo, algumas leveduras foram congeladas a - 80 °C, em criotubos, numa solução de glicerol.

## **2.3. Recolha de amostras**

### **2.3.1. Uvas**

Com o intuito de detetar a presença da levedura *B. bruxellensis* na vinha, foram recolhidas amostras de uvas, da casta tinta Touriga Nacional e da casta branca Encruzado, provenientes da zona do Dão. Obtiveram-se cerca de 50 bagos de uvas de cada amostra, colhidos com uma tesoura esterilizada com etanol a 70% (v/v) e transportadas até ao laboratório em sacos estéreis. Posteriormente, as uvas foram colocadas num frasco estéril, contendo 100 mL de uma solução isotónica (1 L de PBS + 2 µL de Tween 80). As amostras foram agitadas, manualmente em intervalos de 30 minutos, para otimizar a

lavagem dos bagos, de modo a garantir a extração dos microrganismos na solução de lavagem, para o seu cultivo em meio seletivo.

### **2.3.2. Vinhos**

Para a deteção de *B. bruxellensis* no vinho, foram selecionados de uma vasta gama de vinhos, 36 amostras para uma avaliação empírica. Estas tinham características variáveis, nomeadamente a sua proveniência, a sua idade, o tipo de tratamento em adega, o tipo de estágio (depósito e/ou barrica), a geografia da adega e o engarrafamento do vinho. Esta diversidade permite correlacionar quais as características propensas à multiplicação da levedura.

### **2.3.3. Superfícies e águas de enxaguamento**

Com o intuito de avaliar a presença de *B. bruxellensis* nas superfícies e águas de enxaguamento após higienização dos depósitos de vinhos, foram recolhidas amostras das superfícies interiores do depósito, com zaragatoas TS/5-42 estéreis, da marca Technical Service Consultants Ltd.

A ponta da zaragatoa é previamente mergulhada sobre o tampão presente no tubo, e é recolhida uma amostra da superfície. Esta é imediatamente inserida no tubo para que ocorra a dissolução dos microrganismos no líquido.

Após agitação, o conteúdo presente no tubo é filtrado por membrana, sendo que esta membrana é posteriormente colocada num meio de cultura seletivo, ao microrganismo que se pretende avaliar, para verificar a presença da *B. bruxellensis*.

Relativamente às águas de enxaguamento foram recolhidas em frascos previamente autoclavados, sofreram um processo de filtração por membrana, tendo sido esta colocada no meio de cultura seletivo.

## **2.4. Análise microbiológica clássica**

A técnica de inoculação com filtração por membrana é a análise microbiológica mais recorrente na indústria vitivinícola. A amostra de vinho, com cerca de 100 mL, é filtrada por uma membrana estéril de 47 mm de diâmetro, com porosidade de 0,45 µm,



que permite a passagem do vinho mas não dos microrganismos presentes (Milipore), utilizando uma bomba de vácuo. Após filtração, a membrana é colocada sobre o meio seletivo em placa, previamente autoclavado, sendo incubado numa estufa a 30 °C por 5-7 dias.

No entanto, devido à ineficácia de filtração das amostras, uma vez que o filtro colmatava e não permitia uma filtração adequada da amostra, foram avaliados outros métodos de inoculação em meio sólido, nomeadamente inoculação da amostra à superfície do meio e inoculação por incorporação da amostra no meio, com diferentes volumes e respetivas diluições. Posteriormente, as amostras foram incubadas numa estufa de acordo com os parâmetros previamente referidos.

Decorrido o tempo de incubação, a placa é retirada e avalia-se visualmente se ocorreu formação de colónias. Na presença de colónias, contam-se quantas estão presentes. Seguidamente é realizada uma visualização da morfologia da levedura no microscópio, para garantir que a levedura é da espécie *B. bruxellensis*.

## **2.5. Extração de DNA**

O DNA das amostras de uvas foi extraído utilizando o método CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamónio) de acordo com Möller *et al.* (1992). O CTAB provoca a lise celular das amostras quando incubado a 65 °C por 30 minutos.

A fase orgânica é depois separada, utilizando uma solução de clorofórmio-isoamilalcool (24:1). Após centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, retirou-se o sobrenadante e obteve-se o DNA extraído. O extrato foi precipitado com isopropanol a 3 M e purificado com duas lavagens sucessivas de etanol a 76 %.

A extração do DNA de todas as amostras foi realizada com recurso ao kit de extração “DNA PowerSoil® Isolation Kit”, de acordo com o protocolo do fornecedor.

## **2.6. Análise PCR**

Para deteção de *B. bruxellensis* por PCR, foram usados os primers DBRUXF e DBRUXR descritos por Phister e Mills (2003). Estes foram desenvolvidos a partir do

alinhamento das sequências do gene que codifica para RNA ribossomal 26S (26S rRNA), representado na Figura 7. Foi desenvolvido o alinhamento desta sequência para as cinco espécies mais predominantes do gênero *Dekkera* e *Brettanomyces* de acordo com as bases de dados GenBank e EMBL, foi observado, por Phister e Mills (2003), que os primers DBRUXF e DBRUXR demonstraram uma similaridade significativa apenas para *B. bruxellensis*.

	401	450
<b>Primer DBRUXF</b>	<b>GGATGGGTGCACCTGGTTTACAC</b>	
<i>D. bruxellensis</i>	CTCGTGGATGGGTGCACCTGGTTTACACTGGGCCAGCATCGGTTCTGGGA	
<i>D. anomalla</i>	CTCGTGGATGGGTGCACCTGGTTTACACTGGGCCAGCATCGGTTCTGGGA	
<i>B. naardenensis</i>	CCCCGTGGCGGGCGCTCCATCTTTTTACTGGGCCAGCATCGGTGCTGGGC	
<i>B. custersianus</i>	CCTTGTGGCGGGTGCCTCATTTTTACTGGGCCAGCGTGAGTTAGAAGG	
<i>S. cerevisiae</i>	TTGTGGTAGGGGAATCTCGCATTTTACTGGGCCAGCATGAGTTTGGTG	
<i>B. nanus</i>	AGCATCGGTTGGCGAAGAAGGATAAAGGTGTGGCAATGTGCCCTTCGGG	
	451	500
<b>Primer DBRUXR</b>	<b>CGGGGTTTCGTGAATGTGGCCCTTC</b>	
<i>D. bruxellensis</i>	GCCATATACGGGGTTCGTGAATGTGGCCCTTCGATTCTGTCCGAGGGTGT	
<i>D. anomalla</i>	GCCATATACGGGGCAGGC GAATGTGGCCCTTCGATTCTGTCCGAGGGTGT	
<i>B. naardenensis</i>	GGGACAGGAGGTTTCTGTGAATGTAGCCCTTC.....GGGG	
<i>B. custersianus</i>	GGATGAAAAGCGGGAACGAATGTAGCCTTCCTCCCTTTGGGAGAGGGGT	
<i>S. cerevisiae</i>	GCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCT	
<i>B. nanus</i>	GCGTTATAGGCGGCGACAGACTTCTCTTGGCGACCGAGGACTGCGGAAG	

Figura 7. Alinhamento parcial das sequências do gene que codifica para 26S rRNA com os primers DBRUXF e DBRUXR. A sombreado estão as regiões de não identidade de *D. bruxellensis*. Números de acesso no GenBank: *D. bruxellensis*, U45738; *D. anomalla*, U84244; *B. nanus*, U76197. Adaptado de Phister T. e Mills D. (2003).

## 2.7. Análise qPCR

A detecção e quantificação da levedura foi realizada através da técnica PCR quantitativo no Termociclador C1000 Touch Thermalcycler CFX96 Real-Time system da BioRad. Foi utilizado a NZYSpeedy qPCR Green master mix, da NZYTech®, de acordo com as instruções do fornecedor. A reação otimizada, realizada em placas óticas Thermo Scientific™ PCR Plate, de 96-poços, com um volume final de reação de 20 µL, incluindo 10 µL de NZYSpeedy master mix, 7,2 µL de água destilada MilliQ, 0,4 µL de cada primer (DBRUXF e DBRUXR) a 10 mM e 2 µL de DNA purificado. Cada reação foi realizada em triplicado.

As reações decorreram por 30 ciclos, com desnaturação a 95 °C por 10 s, hibridização a 60 °C por 20 s e desnaturação inicial a 95 °C por 3 min. O Ct, ou ciclo de

PCR onde ocorre o primeiro sinal de fluorescência, foi determinado automaticamente pelo sistema C1000 Touch Thermalcycler CFX96 Real-Time.

A partir de padrões com concentrações conhecidas ( $5,0 \times 10^4 - 5,0 \times 10^8$  UFC/mL), quantificados na Câmara de Neubauer, foi traçada uma reta de calibração presente na Figura 8, em que os valores do eixo das ordenadas representa o logaritmo da concentração e os valores do eixo das abcissas os valores de Ct, e determinada a eficiência de amplificação (E) pela equação  $E = 10^{-1/\text{declive}} - 1$ , como recomendado por Bustin *et al.* (2009).

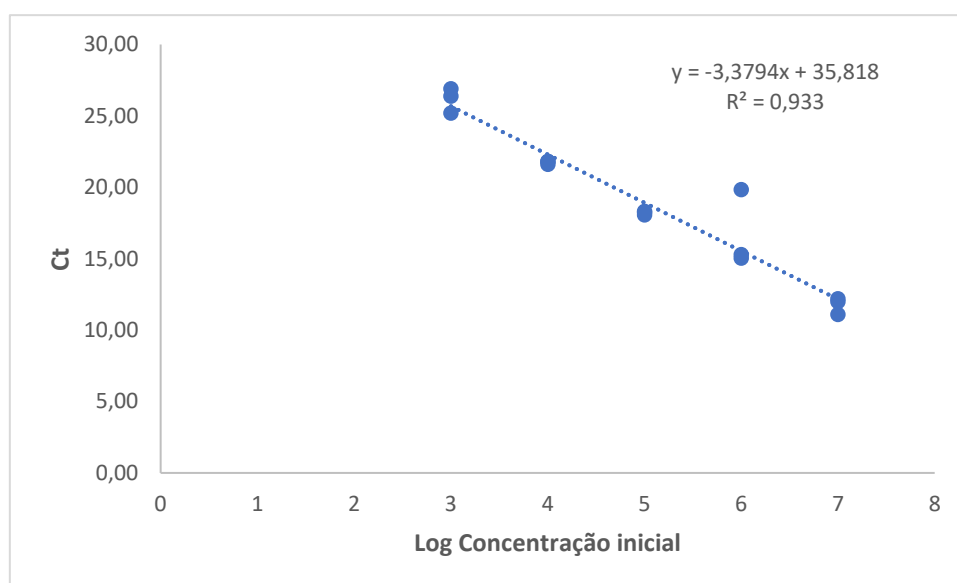


Figura 8. Determinação da curva de calibração a partir das amostras padrão com concentrações conhecidas. A linha representa a regressão linear do logaritmo da concentração de células na matriz pelo valor da média dos três replicados do Ct. A reta apresenta um  $R^2$  de 0.933 e uma eficiência de amplificação (E) de 97,7%.

De todas as amostras com concentração de *B. bruxellensis* desconhecidas, foi isolado aproximadamente 100  $\mu$ L de DNA através do kit de extração DNA PowerSoil<sup>®</sup> Isolation Kit, de acordo com o fornecedor. O DNA foi quantificado por qPCR como descrito acima, tendo sido cada amostra analisada em triplicado, incluindo o controle negativo e os padrões que atuaram como controle positivo, permitindo traçar curvas de calibração e determinar a eficiência de amplificação.

### **3. Resultados e discussão**

### 3.1. Análise microbiológica clássica

#### 3.1.1. Uvas

Num primeiro ensaio procedeu-se à inoculação direta de 1 mL da solução de extração das amostras de uvas à superfície, em triplicado, do meio DBDM sólido após um, dois e três dias de extração da levedura. Decorrido o período de incubação, observou-se que todas as placas (Figuras 9 e 10) apresentavam um sinal de contaminação indesejada, por outros microrganismos que não *B. bruxellensis*, indicada pelo aspeto do meio e pela alteração da sua cor inicial, que passou de azul-turquesa para tons de verde.

Uma vez que não se verificou diferença de resultados entre os diferentes períodos de extração, conclui-se que o tempo de extração da amostra não é um fator que contribua para a deteção microbiana da levedura e que a contaminação observada poderia estar relacionada com o volume de amostra inoculado.

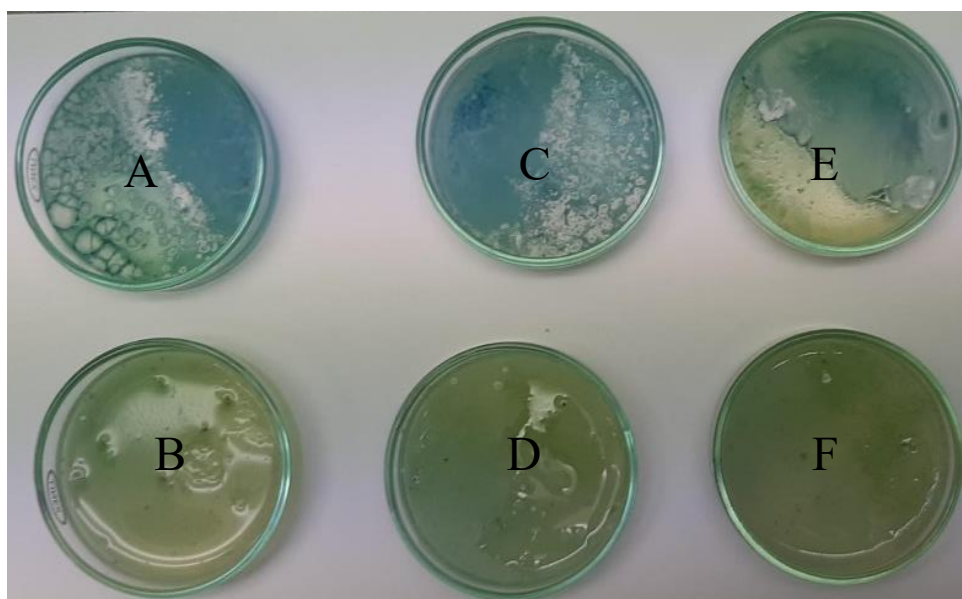


Figura 9. Observação dos resultados obtidos após inoculação de 1 mL de amostra da solução de extração de uvas da casta Touriga Nacional, à superfície com um, dois e três dias de extração da amostra. A e B - primeiro dia; C e D - segundo dia; E e F - terceiro dia.

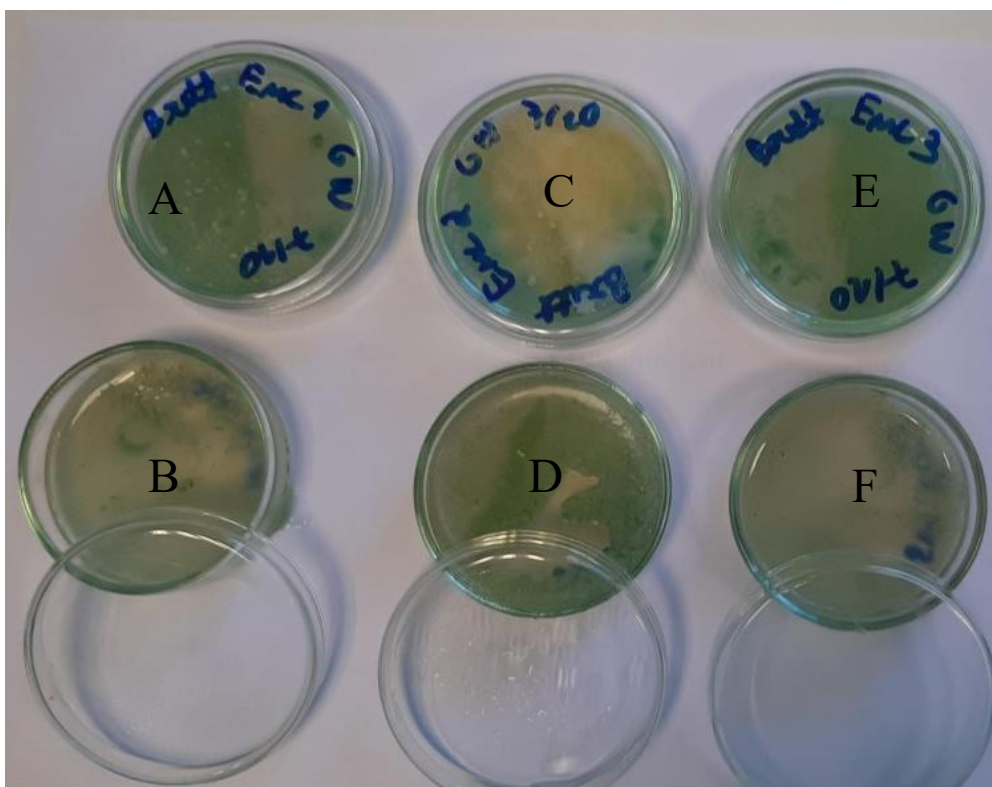


Figura 10. Observação dos resultados obtidos após inoculação de 1 mL de amostra da solução de extração de uvas da casta Encruzado, à superfície com um, dois e três dias de extração da amostra. A e B - primeiro dia; C e D - segundo dia; E e F - terceiro dia.

Dado aos resultados obtidos no primeiro ensaio, procedeu-se à diminuição do volume de inoculação para 200  $\mu$ L de amostra à superfície do meio, com o intuito de que uma menor amostragem permitisse observar o crescimento da levedura.

Em todas as placas com amostra das castas de Touriga Nacional, a cor manteve a tonalidade azul do meio e observou-se a formação de cerca de 8-9 colónias brancas, presente na Figura 11. Estas placas também apresentaram o odor característico da levedura de interesse, suor de cavalo, e foram posteriormente identificadas morfológicamente ao microscópio como sendo a levedura *B. bruxellensis* representado na Figura 12. Nas placas da casta Encruzado, houve alteração da cor do meio para tons amarelados e verificou-se apenas contaminação indesejada pela presença de fungos filamentosos demonstrado na Figura 13.

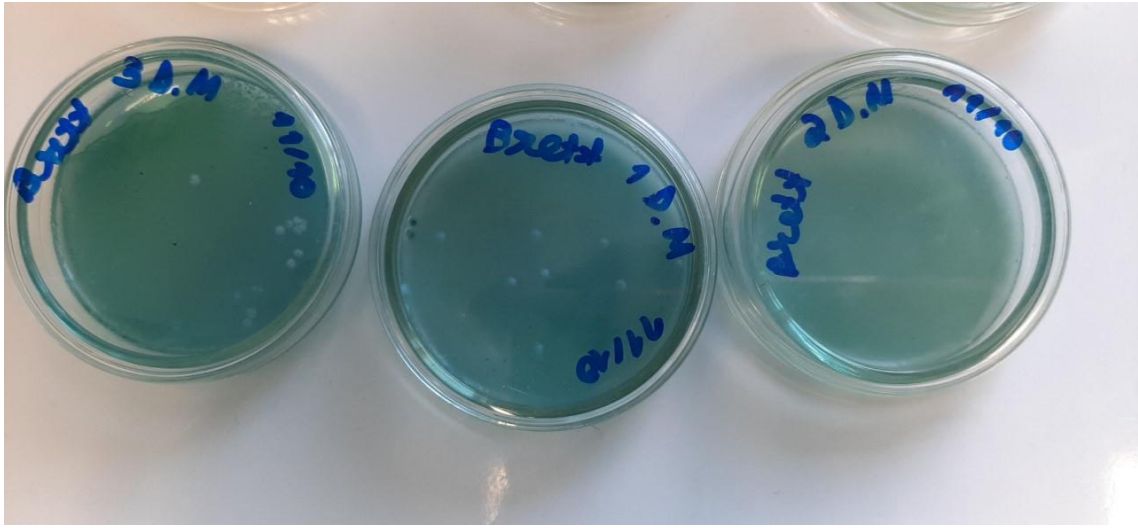


Figura 11. Amostras em triplicado de Touriga Nacional com inoculação de 200  $\mu$ L de amostra à superfície.



Figura 12. Visualização das colónias de *B. bruxellensis* da Casta Touriga Nacional ao microscópio, que cresceram no meio seletivo a partir das amostras de uva (objetiva 40x).

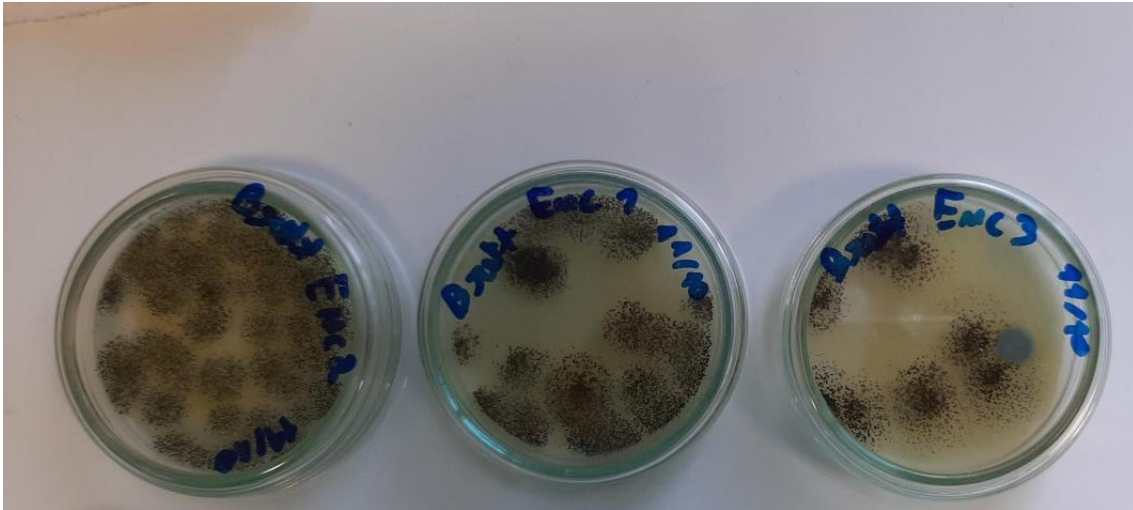


Figura 13. Amostras em triplicado de Encruzado com inoculação de 200  $\mu$ L de amostra à superfície.

Embora a técnica de inoculação da amostra à superfície do meio de cultura sólido após filtração por membrana seja a técnica comumente utilizada para a análise de vinhos, em paralelo com o segundo ensaio foi testado a inoculação por incorporação da amostra no meio sólido.

Na técnica por incorporação, foi adicionada amostra numa placa vazia estéril e seguidamente depositou-se o meio de cultura fundido sobre a amostra.

Nas amostras inoculadas por incorporação, o meio apresentou alteração para uma tonalidade verde em todas as castas. Na casta Touriga Nacional, verificou-se baixa carga microbiana e o meio não se encontrava distribuído de forma homogénea, apenas para esta casta foram testados dois volumes para incorporação, 250  $\mu$ L e 500  $\mu$ L, não tendo sido verificada diferença entre ambos, como demonstrado nas Figuras 14 e 15. No entanto, na casta Encruzado verificou-se elevada carga microbiana com crescimento de diferentes tipos de fungos como é possível verificar na Figura 16.



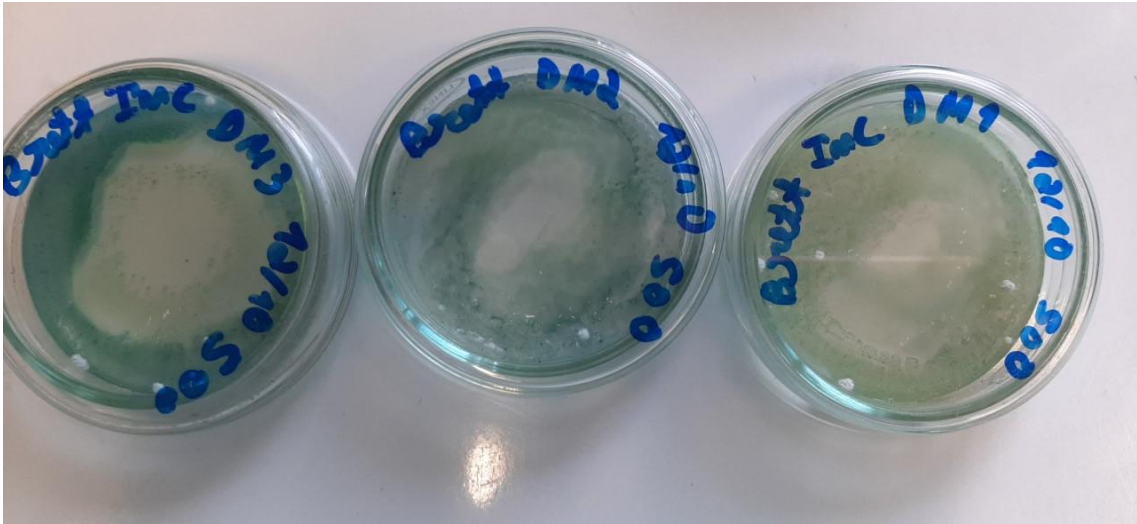


Figura 14. Amostras em triplicado de Touriga Nacional (Major) incorporada com 500 µL de amostra.

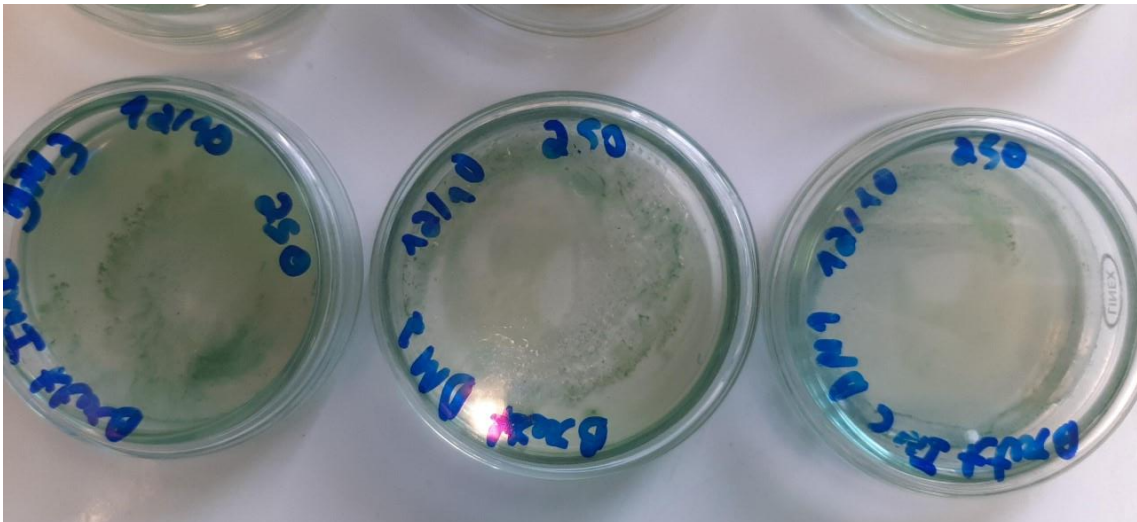


Figura 15. Amostras em triplicado de Touriga Nacional (Major) incorporada com 250 µL de amostra.

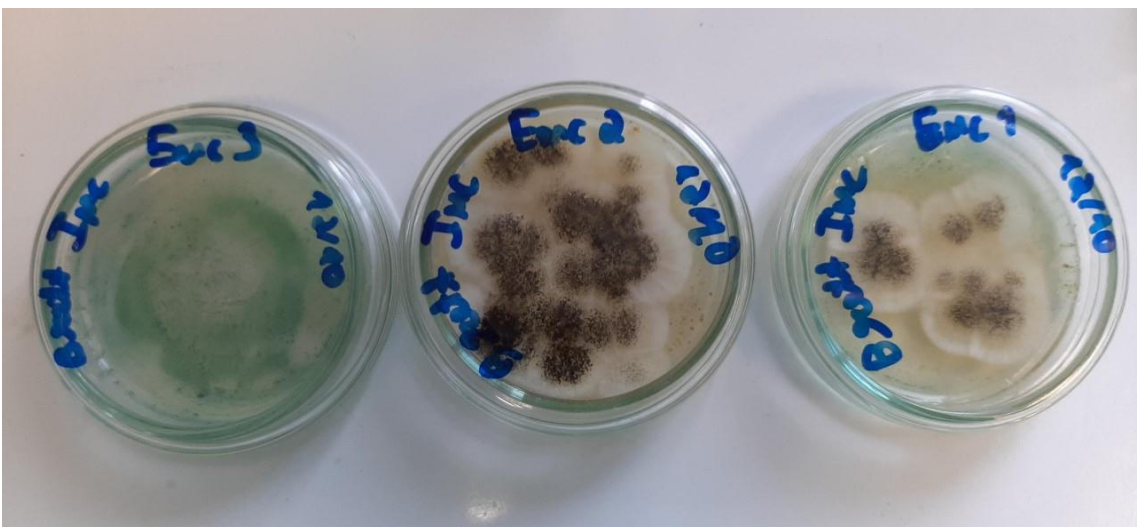


Figura 16. Amostras em triplicado de Encruzado (Sede) incorporada com 500 µL de amostra.

De modo a reduzir a carga microbiana observada no ensaio com 500 µL por incorporação da amostra, procedeu-se a um novo ensaio incorporando a amostra numa diluição de 10 vezes. No entanto, não se observou qualquer crescimento microbiano em nenhuma das três castas.

Após a realização dos ensaios anteriormente descritos, verificou-se que o segundo ensaio, a inoculação de 200 µL de amostra à superfície do meio sólido apresentou os resultados mais satisfatórios. Este foi o único ensaio onde se observou a formação de algumas colónias de *Brettanomyces* na casta tinta e onde foi possível comprovar a presença da levedura por observação ao microscópio.

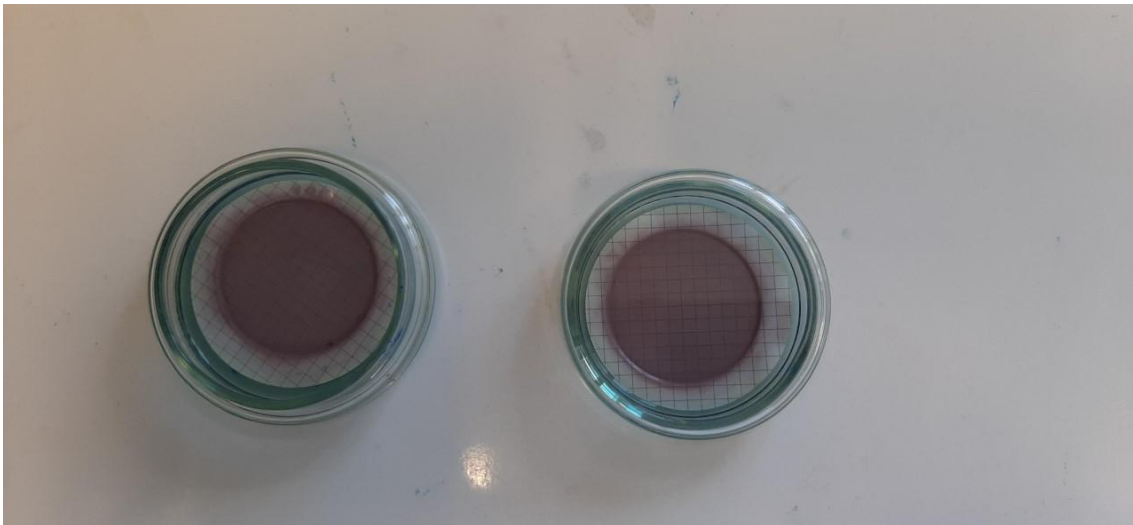
Ao comparar os dois volumes de amostras testados por inoculação à superfície (200 µL e 1 mL), os dados obtidos indicaram que inoculando um volume menor, ou seja, após diluição, foi possível obter placas de cultivo sem alteração da cor inicial do meio, sem alteração da estrutura sólida do meio e crescimento da levedura *B. bruxellensis*.

De um modo geral, os ensaios realizados pela técnica de inoculação por incorporação da amostra face à inoculação à superfície do meio sólido, não apresentaram resultados positivos uma vez que em todos eles se verificou alteração da cor, da estrutura do meio de cultura e a contaminação por crescimento microbiano de vários tipos de fungos não desejados.

### **3.1.2. Vinhos**

Após a análise de uvas, também foram realizados ensaios microbiológicos em vinho tinto com o intuito de detetar a presença da levedura neste tipo de matriz. Todos os vinhos foram analisados recorrendo à técnica de inoculação à superfície após filtração por membrana e posterior avaliação das placas cultivadas após incubação.

Deste modo, as análises foram organizadas em quatro categorias, os vinhos novos, que foram desencubados com a fermentação alcoólica e malolática terminadas, os vinhos em estágio em depósito, os vinhos em estágio em barricas e vinhos engarrafados. Porém de todos os vinhos analisados, não se registou crescimento de *B. bruxellensis* como é demonstrado na Figura 17.



*Figura 17. Foto ilustrativa que demonstra os resultados obtidos de todos os vinhos analisados que se enquadram nas categorias: vinhos novos que foram desencubados com a fermentação alcoólica e malolática terminadas, vinhos em estágio em depósito, vinhos em estágio em depósito, vinhos em estágio em barricas e vinhos engarrafados.*

A análise microbiológica clássica de cultivo em meio seletivo pode ser utilizada, em amostras de uvas e vinhos, para a deteção de *B. bruxellensis*. No entanto, pode não originar resultados devido ao estado de latência de levedura e à sua consequente incapacidade de multiplicação no meio, induzindo a um falso negativo. Para confirmar estes resultados, métodos de deteção mais eficazes devem ser utilizados.

### **3.1.3. Superfícies e águas de enxaguamento**

Para além das análises realizadas a uvas e ao vinho foram realizadas análises a zonas críticas nos depósitos (superfícies) e às águas de enxaguamento, que correspondem às águas de lavagem de um depósito após ter sido higienizado.

A avaliação das superfícies, consistiu na inoculação por contato, em meio seletivo DBDM, com a utilização de zaragatoas. A extremidade da zaragatoa foi mergulhada numa solução neutralizante e retirou-se uma amostra significativa de zonas críticas de higienização dos depósitos, como por exemplo as provadeiras, e voltou-se a mergulhar a zaragatoa na solução neutralizante. Esta solução foi diluída em água numa proporção 1:10 e procedeu-se à sementeira dos microrganismos no meio seletivo com recurso à filtração por membrana e incubados na estufa a 30 °C por 7 dias.

De modo a analisar as amostras de água de enxaguamento, recolheram-se em frascos Schott autoclavados cerca de 200 mL de água, antes e após a etapa de higienização. Seguidamente foram filtrados, por membrana, cerca de 100 mL e inoculadas no meio seletivo.

Passado o período de incubação das amostras de superfície e águas de enxaguamento não foi detetado o crescimento da *B. bruxellensis* em nenhuma amostra, sendo necessário realizar um teste mais específico e sensível para confirmar estes resultados ou demonstrar a presença da levedura.

## **3.2. Análise microbiológica por PCR**

### **3.2.1. Avaliação da especificidade dos primers**

Inicialmente foram testados os primers para a levedura *Brettanomyces bruxellensis*, isolada a partir de um vinho adquirido no mercado e inoculada no meio de cultura seletivo. Após incubação, e à amplificação do DNA pela técnica da PCR no equipamento “Thermocycler 3000”, com as seguintes condições, desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, desnaturação a 95 °C por 1 min, hibridização a 65 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1,5 min.

Os produtos de amplificação foram separados num gel de agarose com uma concentração de 1,5 % representadas na Figura 18, onde se encontra um marcador GeneRuler DNA Ladder Mix, de 100 bp a 1000 bp, da marca Thermo Scientific™, USA duas bandas de DNA de *B. bruxellensis* e um controlo negativo, que contém todos os componentes envolvidos na reação PCR, exceto o DNA que foi substituído por água.

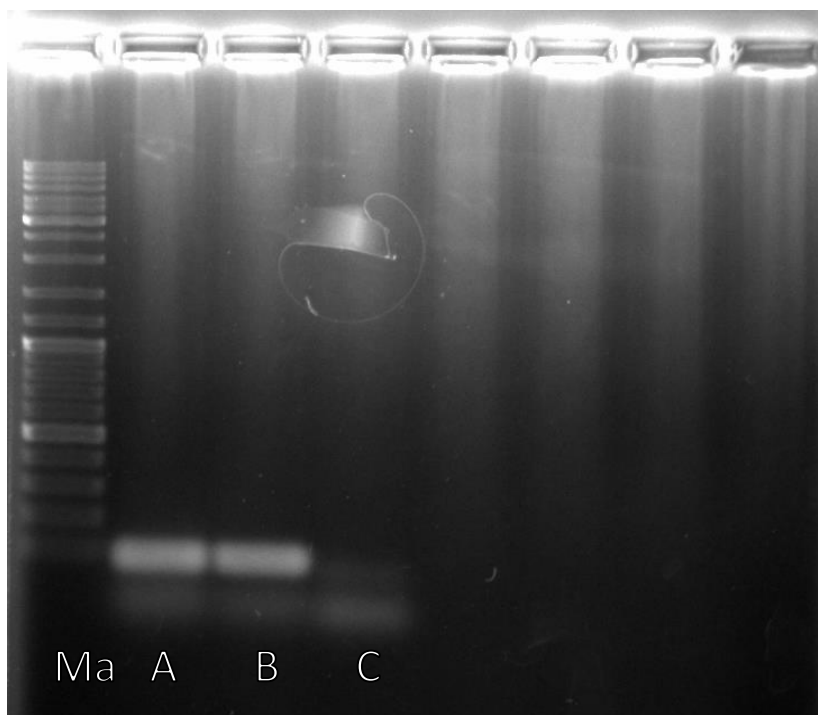


Figura 18. Imagem de gel de eletroforese com os resultados obtidos pela PCR de modo a avaliar a eficácia dos primers. Ma- Marcador de 100 bp -1000 bp; A – DNA 1 de *Brettanomyces*; B- DNA 2 de *Brettanomyces*; C- Controlo negativo.

Verificada a eficácia dos primers, procedeu-se à extração do DNA das amostras de vinho e de algumas amostras de água de higienização, retiradas após a higienização de um depósito, com recurso a um kit de extração, o “DNA PowerSoil® Isolation Kit”, de acordo com o protocolo do fornecedor. As amostras foram amplificadas por PCR de acordo com procedimento anteriormente descrito e corridas no gel de agarose a 2 %, estando sempre presente um marcador e o controlo negativo.

### 3.2.2. Análise PCR das amostras

A partir do DNA extraído das amostras de uvas e vinhos, previamente analisadas pela análise microbiológica clássica, foi amplificada a região que codifica para o gene *26S rRNA* por PCR, de acordo com os parâmetros previamente estabelecidos, e separada no gel de agarose a 2%, presente nas Figuras 19, 20, 21 e 22, tendo aplicado no gel um marcador, as diferentes amostras e o controlo negativo.

Observou-se que o controlo negativo não apresentou uma banda no gel de agarose, sendo o esperado por não conter DNA. Na Figura 19 é possível verificar que em todas as amostras de uvas e vinhos foi detetada a presença da *B. bruxellensis*.

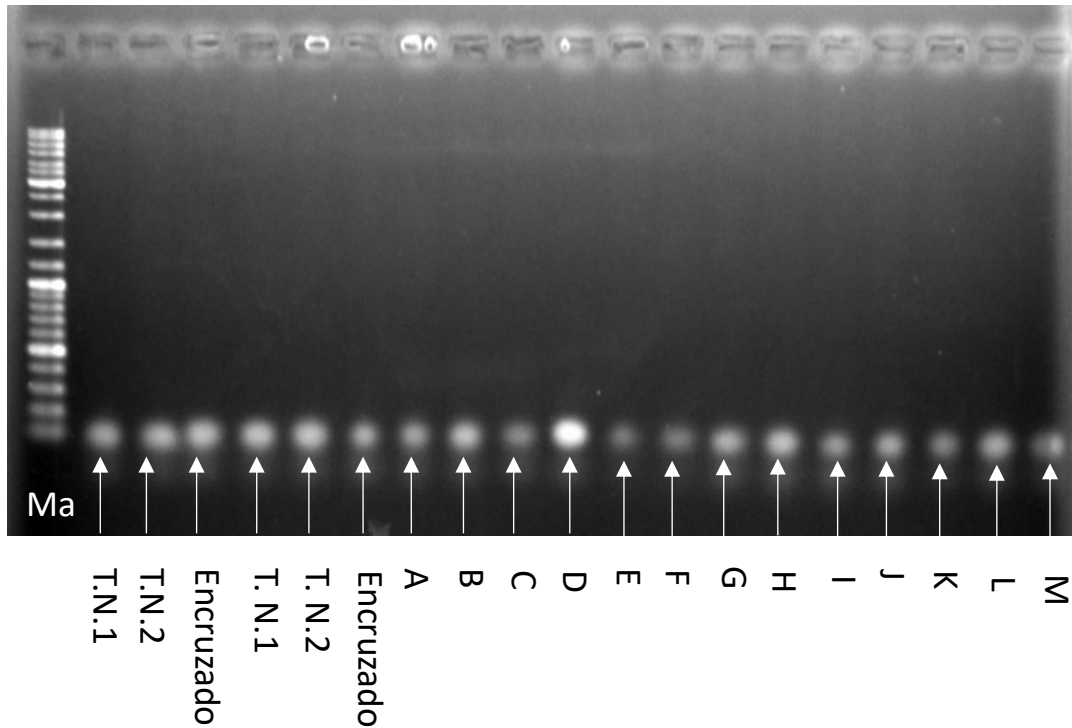
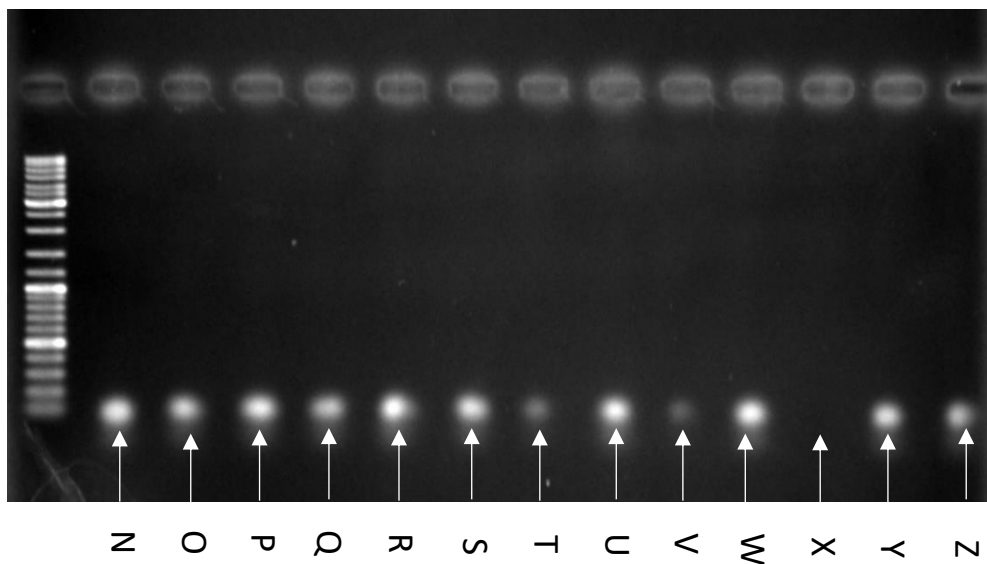


Figura 19. Gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras de uvas e vinhos. Colunas: Ma- marcador; T.N. 1-2 e Encruzado – amostras de uvas; A-M – amostras de diversos vinhos tintos.

Relativamente à Figura 20, observou-se que em todas as amostras de vinho foi detetada a presença da levedura, exceto na amostra X. Este resultado pode ser interpretado como a ausência da levedura no vinho, como um erro de pipetagem, num caso em que não foi pipetado DNA da amostra ou significar a concentração da levedura encontra-se abaixo do limite de deteção deste método.



*Figura 20. Gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras de uvas e vinhos. Colunas: Ma-  
marcador; N-Z – amostras de diversos vinhos tintos.*

Demonstrado na Figura 21, uma vez mais em todas as amostras de vinho analisadas foi detetada a presença da levedura, exceto no resultado da amostra A1 que é semelhante ao resultado da amostra X. No entanto neste gel e no da Figura 22, foram incluídas as amostras das águas de enxaguamento após higienização e observou-se a presença da levedura e o controlo negativo ou branco não originou banda.

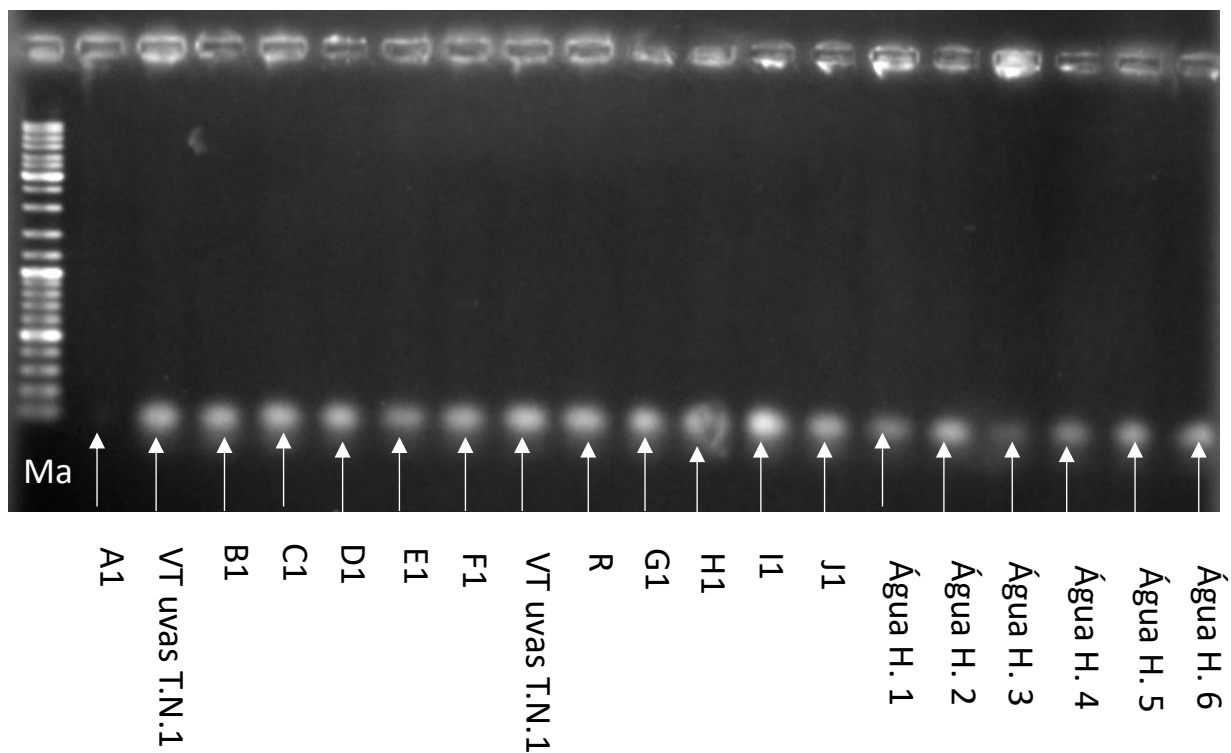


Figura 21. Gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras de uvas e vinhos. Colunas: Ma- marcador; A1-J1 – amostras de diversos vinhos tintos; VT uvas T.N.1 – amostra de vinho formado a partir das uvas T.N.1; Águas H.1-H.6 – amostras de águas após higienização

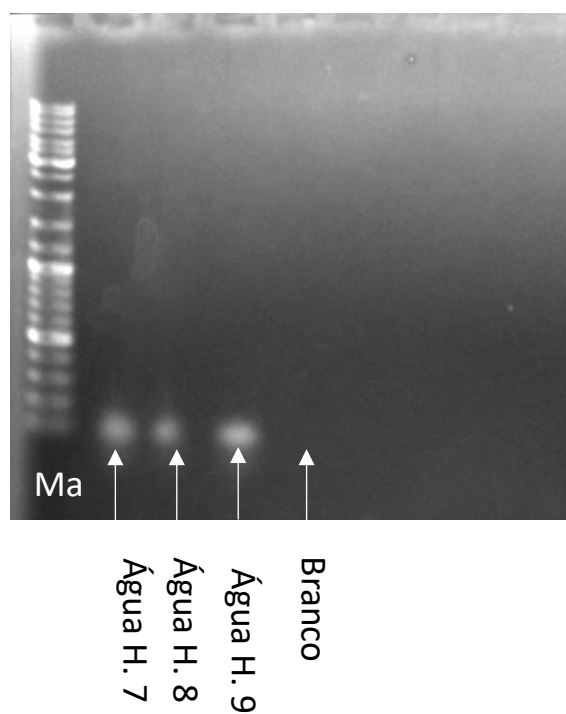


Figura 22. Gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras de uvas e vinhos. Colunas: Ma- marcador; Águas H.7-H.9 – amostras de águas de enxaguamento após higienizações de depósitos; Branco – controlo negativo



De uma forma geral, foi observado a presença da levedura na maior parte das amostras, incluindo águas de higienização, e como o controlo negativo não originou uma banda é possível confirmar que os resultados positivos resultaram da amplificação do DNA em questão e que não está presente algum contaminante, sendo possível também confirmar a especificidade dos primers.

Após comparação dos resultados obtidos por PCR com os níveis de SO<sub>2</sub> molecular dos vinhos, presente nas tabelas A1 e A2 do apêndice A, observou-se que as amostras que demonstraram a ausência de *B. bruxellensis*, apresentavam valores elevados de SO<sub>2</sub> molecular.

De acordo com Du Toit *et al.* (2005), a concentração necessária de SO<sub>2</sub> molecular, para a inibição do crescimento de *B. bruxellensis*, é aproximadamente 0,8 ppm. As amostras X e A1, que demonstraram ausência de levedura por PCR, apresentam concentrações de SO<sub>2</sub> molecular de aproximadamente 0,6 e 1,2 ppm, respetivamente, sendo estes próximos da concentração de inibição.

A deteção da levedura nas águas de higienização implica a presença da *B. bruxellensis* no depósito e como foi referido anteriormente é difícil a sua eliminação, mas é possível controlar os seus níveis de crescimento, nomeadamente alterando os níveis de SO<sub>2</sub>.

Apesar de terem sido obtidos resultados positivos a partir da análise PCR, tal só permite indicar se numa amostra era detetável a levedura ou não. Porém apenas a sua deteção não é suficiente para poder atuar da melhor forma e obter um melhor controlo sobre o vinho em questão, logo surge a necessidade de um método mais específico e que permita a quantificação da *B. bruxellensis*, auxilie a tomada de decisão por parte do enólogo responsável.

### **3.3. Análise microbiológica por qPCR**

#### **3.3.1 Uvas**

Tendo sido detetada a presença da levedura por PCR, foi determinada a sua concentração através da técnica qPCR, representada na Tabela 1, que permitiu concluir que a concentração inicial nas uvas era  $1,47 \times 10^2$  UFC/mL e que após todo o processo de vinificação, a concentração numa amostra de vinho proveniente das uvas da casta Touriga Nacional (T.N.1) aumentou uma ordem de grandeza para  $4,05 \times 10^3$  UFC/mL.

Como Agnolucci *et al.*, (2010) observou, estes resultados levam à conclusão de que a levedura está presente na uva, e que esta corresponde à sua forma de entrada na adega e conseqüentemente no depósito. Assim a sua concentração aumenta durante o processo de vinificação, pois ao longo deste são desenvolvidas as condições necessárias ao seu crescimento.

Tabela 1. Resultados de concentração de *B. bruxellensis* em amostras de uvas e vinho da casta Touriga Nacional e amostra de uvas da casta Encruzado.

Amostra	Ct	Concentração (UFC/mL)
Uvas T.N. 1	27,69	1,47E+02
Uvas T.N. 2	27,90	6,40E+03
Uvas Encruzado	28,00	6,09E+03
VT uvas T.N. 1	28,63	4,05E+03

### 3.3.2. Vinhos

Devido ao elevado número de amostras e no qPCR cada amostra é analisada em triplicado, foram obtidos dois gráficos que demonstram a amplificação do DNA das amostras, presente nas Figuras 23 e 24, cada um com a sua reta de calibração correspondente, demonstrada nas Figuras B1 e B2 do apêndice B, e onde observou-se que grande parte das amostras analisadas apresentava valores de Ct de aproximadamente 27 a 29 o que corresponde a valores de concentração na ordem de grandeza de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL, como se pode verificar na Tabela 2.

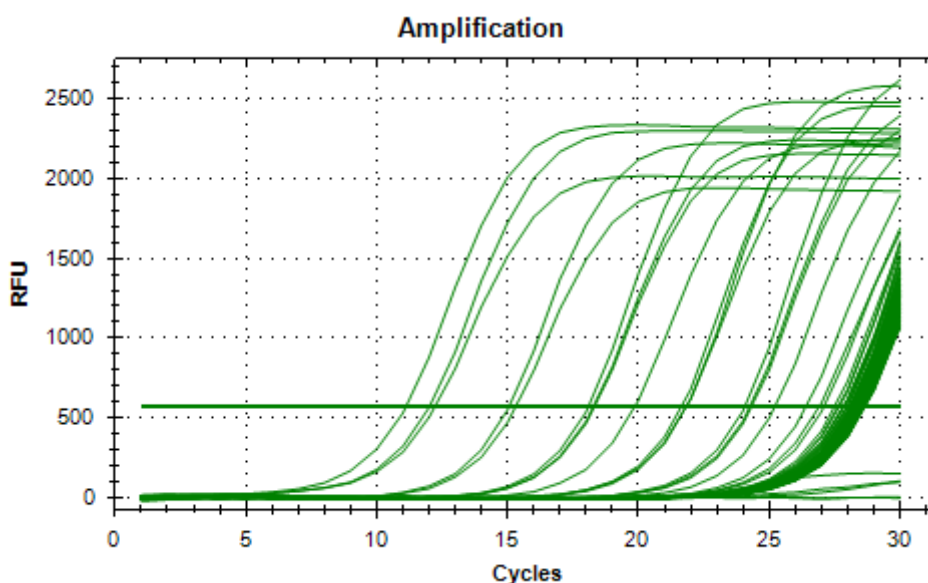


Figura 23. Resultados qPCR da amplificação das amostras dos vinho A-Z, incluindo os padrões e controlo negativo, em triplicado.

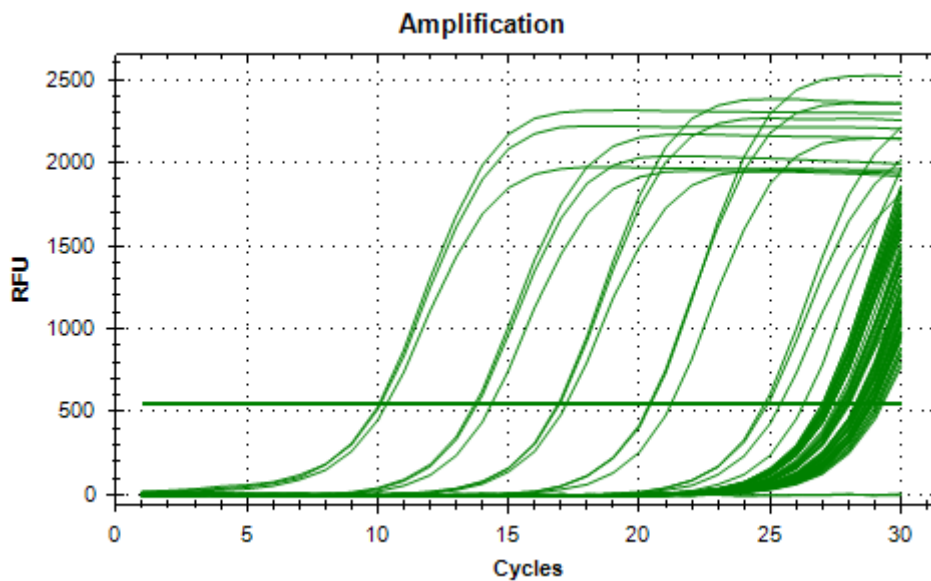


Figura 24. Resultados qPCR da amplificação das amostras dos vinho A1-J1, incluindo os padrões e controlo negativo, em triplicado.

Com o intuito de confirmar a especificidade dos primers neste método foram traçadas as curvas de desnaturação (melting curve) correspondentes que permitem avaliar a dissociação da cadeia dupla de DNA dando origem a um pico de intensidade de fluorescência. O esperado é obter um pico de intensidade para os padrões, por ser uma cultura pura, numa determinada temperatura e obter valores semelhantes para as amostras com concentrações desconhecidas, no entanto isto não se verificou como é possível observar nas figuras 25 e 26.

O controlo negativo assim como a maior parte das amostras, exceto a amostra N que apresentou duas amplificações com temperaturas de desnaturação diferentes dos valores dos padrões, o que resultou em dois picos de maior intensidade de fluorescência.

Surgiu a hipótese de haver uma contaminação das amostras, uma possível formação de dímeros dos primers, aquando da sua preparação prévia à análise qPCR, ou a erros de pipetagem. Apesar desta dupla amplificação, o pico de maior intensidade

corresponde ao alvo sendo possível detetar e quantificar a concentração de *B. bruxellensis* nas amostras.

Tabela 2. Resultados de PCR quantitativo das diferentes amostras de vinho tinto, dos padrões de concentração conhecida e do controlo negativo.

<b>Amostra</b>	<b>Ct</b>	<b>Concentração (UFC/mL)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Ct</b>	<b>Concentração (UFC/mL)</b>
<b>Negativo</b>	28,30	8,38E+03	<b>P</b>	28,07	9,95E+03
<b>Padrão 10<sup>8</sup></b>	11,77	5,00E+08	<b>Q</b>	27,99	1,04E+04
<b>Padrão 10<sup>7</sup></b>	16,73	5,00E+07	<b>R</b>	28,81	3,59E+03
<b>Padrão 10<sup>6</sup></b>	18,21	5,00E+06	<b>S</b>	28,39	7,90E+03
<b>Padrão 10<sup>5</sup></b>	21,74	5,00E+05	<b>T</b>	28,21	8,95E+03
<b>Padrão 10<sup>4</sup></b>	26,16	5,00E+04	<b>U</b>	28,34	8,23E+03
<b>A</b>	28,15	9,43E+03	<b>V</b>	28,34	8,19E+03
<b>B</b>	27,99	1,16E+04	<b>W</b>	28,34	8,19E+03
<b>C</b>	28,32	8,26E+03	<b>X</b>	28,35	8,12E+03
<b>D</b>	24,20	1,37E+05	<b>Y</b>	28,47	7,47E+03
<b>E</b>	28,47	7,50E+03	<b>Z</b>	28,47	7,48E+03
<b>F</b>	28,01	1,06E+04	<b>A1</b>	28,25	8,68E+03
<b>G</b>	28,21	8,98E+03	<b>B1</b>	28,43	7,70E+03
<b>H</b>	28,49	7,41E+03	<b>C1</b>	28,56	4,22E+03
<b>I</b>	28,32	8,28E+03	<b>D1</b>	28,70	3,92E+03
<b>J</b>	28,23	8,80E+03	<b>E1</b>	28,60	4,15E+03
<b>K</b>	28,11	9,93E+03	<b>F1</b>	29,05	3,12E+03
<b>L</b>	28,20	9,02E+03	<b>G1</b>	28,85	3,59E+03
<b>M</b>	28,08	9,78E+03	<b>H1</b>	28,40	4,69E+03
<b>N</b>	0,00	0,00E+00	<b>I1</b>	28,25	5,17E+03
<b>O</b>	27,86	1,14E+04	<b>J1</b>	29,00	3,21E+03

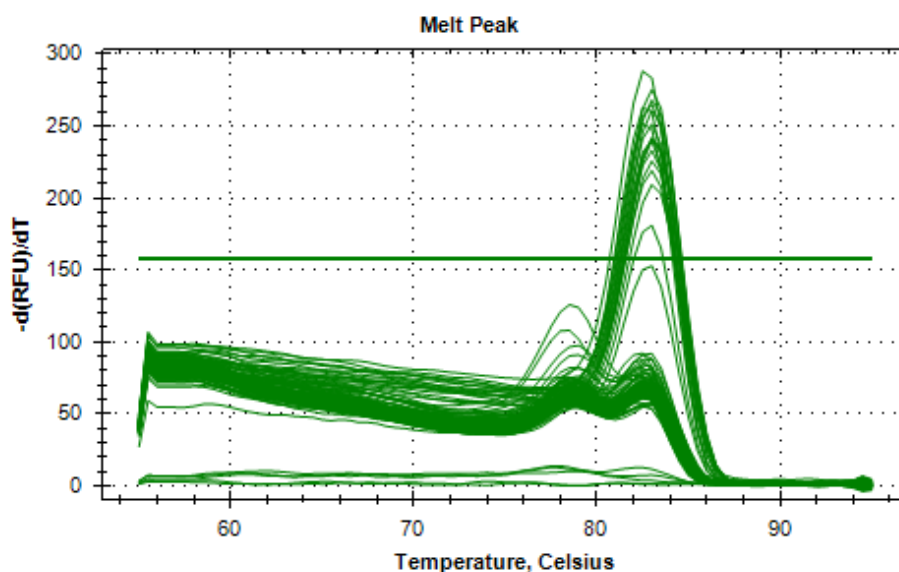


Figura 25. Melting curve correspondente à amplificação das amostras dos vinho A-Z incluindo os padrões e controlo negativo, em triplicado.

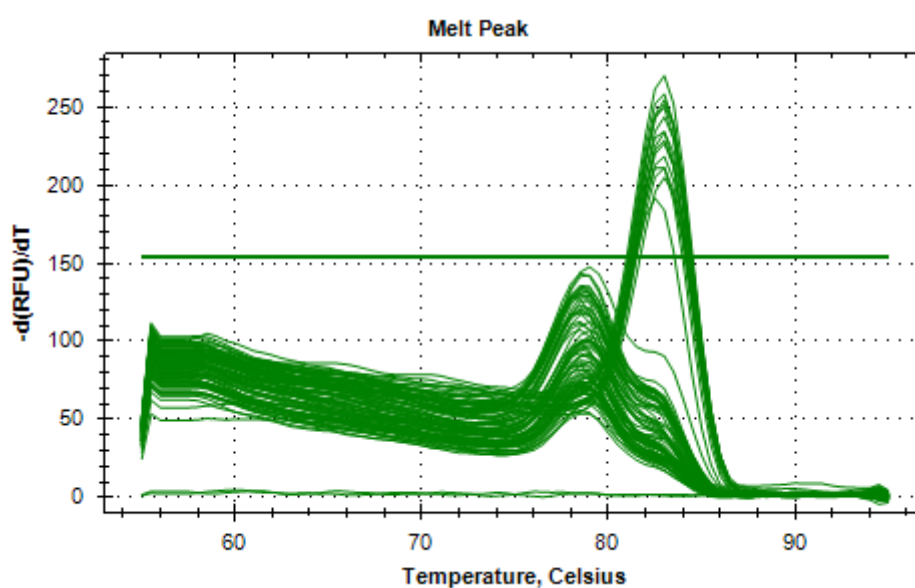


Figura 26. Melting curve correspondente à amplificação das amostras dos vinho A-..., incluindo os padrões e controlo negativo, em triplicado.

Segundo Chatonnet *et al.* (1992) o carácter “Brett” é detetado olfativamente e associado como defeito por parte do consumidor, quando a concentração de *B. bruxellensis* é aproximadamente  $10^5$  UFC/mL. O vinho D encontra-se dentro deste limite, com uma concentração de  $1,37 \times 10^5$  UFC/mL, realçado na Tabela 3, sendo possivelmente considerado como defeito, e sendo necessário atuar de forma a diminuir a concentração da levedura. Deve-se ter especial atenção, nomeadamente ao controlar os níveis de  $\text{SO}_2$ , aos vinhos B, F, O e Q, destacados na Tabela 3 por apresentarem uma concentração de *B.*

*bruxellensis*, na ordem dos  $10^4$  UFC/mL, sendo que estes estão próximos da concentração a partir da qual o vinho pode ser considerado como defeituoso.

Tabela 3. Resultado das amostras de vinho, por qPCR, com concentração de *B. bruxellensis* próxima da concentração considerada como defeito.

Amostra	Ct	Concentração (UFC/mL)
B	27,99	1,16E+04
D	24,20	1,37E+05
F	28,01	1,06E+04
O	27,86	1,14E+04
Q	27,99	1,04E+04

Em suma os vinhos cujos valores se encontram próximos do valor definido como defeito deverão ter um cuidado especial e mais pormenorizado para que a levedura não passe a tornar o vinho como defeituoso.

### 3.3.3. Águas de enxaguamento após higienização

Após ter sido observado os resultados positivos pela análise PCR das águas de higienização, procedeu-se à quantificação das amostras por qPCR. Notou-se que os valores de Ct eram de aproximadamente 27, exceto no caso da água H.1 como é possível visualizar na Tabela 4, o que corresponde a concentrações na ordem de milhares de colónias formadas.

Após deteção e quantificação de *B. bruxellensis*, conclui-se que a levedura se encontrava no depósito em altas concentrações. Como este método não só quantifica as células viáveis, mas também as inviáveis, não permite concluir se a higienização foi bem sucedida.

Tabela 4. Resultados das amostras de águas após higienização de depósitos obtidos por qPCR, de concentrações de *B. bruxellensis*.

Amostra	Ct	Concentração (UFC/mL)
Água H. 1	28,22	5,98E+03
Água H. 2	27,15	1,03E+04
Água H. 3	27,20	9,98E+03
Água H. 4	27,29	9,42E+03
Água H. 5	27,05	1,09E+04
Água H. 6	27,17	1,01E+04
Água H. 7	27,23	9,80E+03
Água H. 8	27,79	6,88E+03
Água H. 9	27,88	6,49E+03

## **4. Conclusão**



A levedura *B. bruxellensis* é de facto o microrganismo de alteração mais relevante na indústria vitivinícola, sendo necessário diminuir ou até mesmo impedir o seu crescimento no vinho. Para isto é necessário detetar e quantificar eficazmente a *B. bruxellensis* desde a vinha até ao vinho engarrafado garantindo assim um melhor controlo da levedura e a máxima higienização possível da adega, aplicando os conservantes necessários.

A avaliação microbiológica mais utilizada, de momento, na indústria vitivinícola em Portugal é através de uma técnica clássica de inoculação por filtração de vinho em meio de cultivo sólido seletivo. Esta metodologia é capaz de detetar a presença da levedura em alguns casos, como foi demonstrado neste trabalho, mas possui diversas desvantagens, sendo um processo moroso e não específico, pois apesar do meio ser seletivo para *B. bruxellensis* ainda é possível o crescimento de microrganismos indesejados devido ao mau manuseamento do meio, ou ao erro humano associado. Além disso, este processo pode originar falsos negativos, devido à capacidade da levedura em diferentes condições de stress ambiental entrar no estado viável não cultivável dando origem ao meio de cultura livre de crescimento microbiano. Desta forma é necessário conjugar o método de cultivo em meio sólido seletivo com métodos moleculares mais específicos.

Métodos moleculares com maior especificidade e rapidez tais como a PCR e qPCR foram ótimas alternativas ao clássico por garantir uma análise rápida, mais específica e ainda permitir a quantificação da *B. bruxellensis*, no caso da PCR quantitativa. A PCR convencional permitiu a deteção da levedura na maior parte das amostras analisadas de forma eficaz, ultrapassando a desvantagem do método clássico em detetar a presença de *B. bruxellensis* no estado viável não cultivável. Relativamente à quantificação da levedura presente nas amostras, a qPCR é sem dúvida um ótimo recurso, apesar dos reagentes ainda terem um custo elevado.

Apesar dos resultados obtidos por qPCR terem sido reprodutíveis, estes apresentam uma amplificação no próprio controlo negativo, tendo sido estabelecido um limite de quantificação, neste trabalho de  $10^4$  UFC/mL de *B. bruxellensis*. Na maior parte das amostras analisadas é observado na melting curve dois picos de amplificação, mas tendo sido observado um destes picos na zona do pico alvo é possível então concluir que *B. bruxellensis* se encontra presente na amostra, portanto, é possível a sua quantificação.

O processo foi otimizado, e foram realizados diversos testes para tentar obter apenas um pico na melting curve, significando que a amostra é pura e que contém apenas a

sequência alvo, mas todos sem sucesso. Não obstante, as concentrações de todas as amostras foram calculadas apesar deste percalço, para que sejam conhecidas as concentrações de *B. bruxellensis*. Com as concentrações determinadas e com o conhecimento que concentrações na ordem de  $10^5$  UFC/mL, representa possíveis defeitos olfativos no vinho, pode-se atuar de forma a controlar o crescimento de *B. bruxellensis*.

Por fim uma análise contínua do vinho desde a chegada das uvas ao depósito até à garrafa, permite um melhor controlo deste fator de contaminação, de modo a prevenir que a concentração da *B. bruxellensis* se aproxime da ordem de grandeza de  $10^5$ . Deste modo conclui-se que a técnica de qPCR poderá ser um ótimo método de avaliação microbiológica na indústria do vinho.

## 5. Proposta de trabalho futuro

Como trabalho futuro deverá ser otimizado o processo de quantificação por qPCR, de modo a eliminar a amplificação do controlo negativo, a obter apenas um pico de amplificação na melting curve e de modo a diminuir o também o limite de quantificação para o mais baixo possível.

A quantificação proporcionada pela qPCR dá origem à concentração total de leveduras vivas e mortas, logo uma diferenciação entre ambas iria permitir uma quantificação muito mais específica, garantindo com certeza qual a concentração de células viáveis. Isto iria proporcionar uma atuação sobre o vinho de forma mais precisa, utilizando menores quantidades de compostos que inibam ou diminuam o crescimento da *B. bruxellensis* resultando em menores perdas económicas para a empresa.

O estudo da quantificação de apenas células viáveis por qPCR é um ponto de grande interesse para a indústria vitivinícola, mas não só, indústrias como por exemplo, a indústria cervejeira poderia também beneficiar do mesmo método, que iria permitir a quantificação de qualquer microrganismo viável presente numa amostra.

## **Bibliografia**

- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., Nuti, M., 2010. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 143 (1-2), 76-80.
- Arvik, T., Conterno, L., Henick-Kling, T., 2002. *Brettanomyces bruxellensis* in New York State wines: A global issue. In *Proceedings from the 31st Annual New York Wine Industry Workshop*. Geneva, New York.
- Bisson, L.F., Joseph, C.M., 2009. Yeasts. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 47–60.
- Bisson, L.F., Waterhouse, A.L., Ebeler, S.E., Walker, M.A., Lapsley, J.T., 2002. The present and future of the international wine industry. *Nature*, 9: 418-696.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Muelle, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. and Pons, M. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of Science and Food Agriculture*, 60: 165-178.
- Chen, B.-Y., Janes, H.W., 2002. *PCR cloning protocols*. Second Edition. Humana Press 192, 439.
- Christaki, T., Tzia, C., 2002. Quality and safety assurance in winemaking. *Food Control*, 13: 503–517.
- Cocolin, L., Iacumin, L., Rantsiou, K., Zironi, R., 2004. ‘Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in Spoiled Wines’, *Society*, 70(3), 1347–1355.
- Cocolin, L., Ercolini, D., 2008. Wine Fermentation. In: *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer, New York, 162–192.

- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25: 422–427.
- Curvelo-Garcia, A. S., 1988. *Controlo de qualidade dos vinhos: Química Enológica-Métodos analíticos*. 1ª ed. Lisboa: Instituto da Vinha e do Vinho.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., & Fleet, L. H., 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 290-301.
- Deak, T., Beuchat, L.R., 1995. Modified indirect conductimetric technique for detecting low populations of yeasts in beverage concentrates and carbonated beverages, *Food Microbiology*, 165–172.
- Delfini, C., Formica, J.V., 2001. *Wine Microbiology: Science and Technology*, Marcel Dekker, 67-191 e 425-431.
- Delidow, B.C., Lynch, J.P., Peluso, J.J., White, B.A., 1993. *PCR protocols: current methods and applications*. Edition A White. Totowa, NJ, 2.
- De Rosa, T., G. Margheri, I. Moret, G. Scarponi, and G. Versini., 1983. Sorbic acid as a preservative in sparkling wine. Its efficacy and adverse flavor effect associated with ethyl sorbate formation. *American Journal of Enology and Viticulture* 34: 98–102.
- Divol, B., Lonvaud-Funel, A., 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (1), 85-93.
- Du Toit, M., Pretorius, I. S., 2000. Microbial Spoilage and Preservation of Wine: Using Weapons from Nature's Own Arsenal - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 74-96.
- Du Toit, W., Pretorius, I., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (4), 862-871.
- Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 11–22.

- Fleet, G.H., 2006. The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production, em: Yeasts in Food and Beverages. Springer, Germany, 1–12.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007. Identification of Wine Microorganisms. In: Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures. Springer, New York, 241–272.
- Genisheva. Z., Mussatto. S.I., Oliveira. J.M., Teixeira. J.A., 2013. Malolactic fermentation of wines with immobilized lactic acid bacteria – Influence of concentration, type of support material and storage conditions. Food Chemistry. 138: 1510-1514.
- Gerland, C., 2006. Interest of a simple new test for large detection of *Brettanomyces* in winery, South African Journal for Enology and Viticulture, 3.
- Gerland, C., Sarl, I., 2010. Novos conhecimentos científicos e prático para prevenção dos aromas fenólicos provocados por *Brettanomyces*, Revista internet de Viticultura e Enologia. Disponível em: [www.infowine.com](http://www.infowine.com) (Acedido: 15 novembro 2021).
- Hasler, C.M., 1998. Functional Foods: Their role in disease prevention and health promotion. Food Technology. 52: 61–72.
- Heid. C.A., S., J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research 6, 986-994.
- Hudelson, J., 2011. It Grows in Wine! In: Wine Faults- Causes, Effects and Cures. The wine appreciation guild, San Francisco, 38-55.
- Inês, T. Tenreiro, R. Tenreiro, A. Mendes- Faia, 2008. A review: Wine lactic acid bactéria – Part I, Ciência Técnica Vitivinícola 23: 81-96.
- Instituto da Vinha e do Vinho, 2014. Wines and Spirits of Portugal. Disponível em: <http://www.infovini.com/classic/pagina.php?codPagina=72&flash=1>.
- Instituto da Vinha e do Vinho, 2015. Mercado Nacional Vinhos Tranquilos- Janeiro a Junho/2015.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The realtime polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine 27, 95-125.
- Kunkee, F., Bisson. L., 1993. Wine-making Yeasts, em: The Yeasts. Academic Press Limited, London, 69–118.

- Leifert, W., Abeywardena, M., 2008. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*. 28: 729-737.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., Toit, M., 2010. Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 31: 186–212.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 317–331.
- Lonvaud-Funel, A., Renouf, V., Strehaiano, P., 2010. Les traitements pour la maîtrise des micro-organismes et la stabilité microbiologique des vins, em: *Microbiologie du vin - Bases fondamentales et applications*. Lavoisier, Paris, 267–301.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 23–50.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2006. Spoilage activities of *Dekkera/Brettanomyces* spp. In: C. Blackburn, ed. *Food Spoilage Microorganisms*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 354-398.
- Lucas, D., Influência da adição de Dimetil dicarbonato (DMDC) em vinhos tintos, 2009. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292–1305.
- Mackay, I. M., Mackay, J.F., Nissen, M.D., Sloots, T.P., 2007. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.), *Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization*. Caister Academic Press Norfolk, UK.
- Malfeito-Ferreira, M., 2010. Yeasts in wine off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology*, 61: 95-102.
- Malfeito-Ferreira, M., 2014. Wine Spoilage Yeasts and Bacteria, in: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, Academic Press, 805–810.
- Malfeito-Ferreira, M.; & Loureiro, V., 1995 - Os problemas microbiológicos do engarrafamento de vinhos: uma questão ainda em aberto. *Actas do 3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Évora*.



- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30 (2), 136-141.
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H., Geiger, H., H., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20, 6115-6116
- Morgan, H. H., Du Toit, M., Setati, M. E., 2017. The grapevine and wine microbiome: Insights from highthroughput amplicon sequencing, *Frontiers in Microbiology*, 8(820), 1–15.
- Mukamal, K.J., Rimm, E.B., 2008. Alcohol consumption: Risks and benefits. *Current Atherosclerosis Report* **10**, 536–543.
- Nisiotou, A. A., Dourou, D., Filippousi, M-E., Diamantea, E., Fragkoulis, P., Tassou, C., Banilas, G., 2015. Genetic and technological characterisation of vineyard and winery-associated lactic acid bacteria. *BioMed research International*. Research article.
- Oliveira, A.R.R., 2009. Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real. Tese de mestrado, Universidade de Lisboa – Faculdade de Ciências. Lisboa, 131.
- Ough, C. S., 1993. Sulfur dioxide and sulfites. In: *Antimicrobials in Foods*. P. M. Davidson & A. L. Branen (Eds.), 2nd ed, 5: 137–190. Marcel Dekker, Inc., New York, NY
- Pasquarella, C., Pitzurra, O., Sarno, A., 2000. The index of microbial air contamination. *The Journal of Hospital Infection*, London, 46, 241-256.
- Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., Hays, J.P., 2008. Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer, 332.
- Pérez-López, F.R., Chedraui, P., Haya, J., Cuadros, J.L., 2009. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas*. 64: 67–79.
- Phister, T. G., and Mills, D. A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7430–7434.

- Rayess, I., Albasi, C., Bacchin, P., Taillandier, P., Raynal, J., Mietton-Peuchot, P., Devatine, A., 2011. Crossflow microfiltration applied to oenology: A review. *Journal of Membrane Science*. 382: 1-19.
- Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A., 2007. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*, 41(1), 51–61.
- Riedel, H., Min, N., Thaw, M., Akumo, D.N., 2012. Wine as Food and Medicine, in: Riedel, H., Saw, N., Akumo, D., Küçük, O., Smetanska, I. (Eds.), *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*. InTech, 399–418.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86: 169–180.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Singer, V.L., Jin, X., Ryan, D., Yue, S., 1994. SYBR™ Green dyes: ultrasensitive stains for detection of DNA and RNA in electrophoretic gels *Biomedical Products*, 19, 68-72
- Stratford, M., 2006. Food and Beverage Spoilage Yeasts. in: Querol, A Graham. H. Fleet (Eds.), in: *Yeasts in Food and Beverages. The Yeast Handbook*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 338-363.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, 102, 10-21.
- Suárez-Lepe, J., Iñigo-Leal, B., 2004. *Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación*. Madrid: Mundi Prensa.
- Tessonière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., Remize, F., 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 237-243.

Versari, A., Parpinello, G.P., Cattaneo, M., 1999. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*. 23: 447–455.

Zuehlke, J.M., Petrova, B., Edwards, C.G., 2013. Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annual Review of Food Science and Technology* 4: 57–78.

## Apêndices

### Apêndice A. Descrição de vinhos analisados

Tabela A1. Descrição completa das análises realizadas aos vinhos tintos avaliados neste trabalho, através da técnica de análise a parâmetros físico-químicos, FTIR.

Designação	SO2 L ppm	SO2 T ppm	SO2 M ppm	TA %	AV g/L	AT g/L	pH	MV g/mL	Ma g/L	La g/L
A	58	136	0,75464	13,3	0,73	5,70	3,68	0,9916	-	1,21
B	99	241	1,57997	12,9	0,94	6,00	3,59	0,9920	-	1,03
C	45	113	0,59895	13,0	0,64	5,60	3,67	0,9916	-	1,51
D	72	157	0,44123	13,7	0,63	4,90	4,01	0,9928	-	1,12
E	41	161	0,71636	13,4	0,49	5,60	3,55	0,9907	-	0,58
F	134	280	1,86644	13,2	0,88	5,90	3,65	0,9918	-	1,16
G	59	129	0,78529	13,4	0,75	5,62	3,67	0,9942	0,17	1,39
H	66	237	1,17954	12,8	3,09	7,00	3,54	0,9917	-	1,06
I	19	43	0,18812	13,3	0,53	5,60	3,80	0,9960	-	1,20
J	28	49	0,25890	13,2	0,52	6,00	3,83	0,9970	-	1,33
K	26	45	0,34606	13,6	0,26	5,90	3,67	0,9960	-	1,17
L	23	43	0,20787	13,3	0,54	5,70	3,84	0,9970	-	1,35
M	62	135	0,65730	14,3	0,92	5,70	3,77	0,9941	-	1,07
N	41	120	0,43467	14,8	1,61	6,40	3,77	0,9903	-	2,46
O	40	225	0,69888	13,3	0,72	5,60	3,55	0,9901	-	0,90
P	60	120	0,91512	13,2	0,60	5,80	3,61	0,9949	-	6,90
Q	39	146	0,48488	13,2	0,82	5,60	3,70	0,9923	-	1,30

Tabela A2. Descrição completa das análises realizadas aos vinhos tintos avaliados neste trabalho, através da técnica de análise a parâmetros físico-químicos, FTIR.

Designação	SO2 L ppm	SO2 T ppm	SO2 M ppm	TA %	AV g/L	AT g/L	pH	MV g/mL	Ma g/L	La g/L
<b>R</b>	23	61	0,34293	15,8	1,49	6,10	3,62	0,9901	-	1,72
<b>S</b>	54	100	0,49930	13,0	0,53	5,60	3,83	0,9970	-	1,27
<b>T</b>	21	65	0,39266	15,3	1,18	6,00	3,52	0,9900	-	0,78
<b>U</b>	94	267	1,53454	12,9	2,54	6,70	3,58	0,9919	-	0,96
<b>V</b>	82	170	1,11650	13,2	0,72	5,20	3,66	0,9950	-	0,95
<b>W</b>	15	38	0,14189	13,3	0,51	5,90	3,82	0,9970	-	1,27
<b>X</b>	61	114	0,61789	14,3	0,79	5,70	3,79	0,9935	-	1,25
<b>Y</b>	86	138	0,77724	13,7	0,79	5,50	3,84	0,9948	-	1,29
<b>Z</b>	65	144	0,80813	13,0	0,72	6,10	3,70	0,9943	0,06	5,70
<b>A1</b>	76	148	1,21290	13,9	0,65	5,70	3,59	0,9935	-	0,98
<b>B1</b>	64	132	0,67850	13,2	0,77	5,70	3,77	0,9951	-	1,04
<b>C1</b>	54	132	0,41594	14,5	0,56	5,20	3,91	0,9920	-	1,16
<b>D1</b>	55	134	0,78366	13,3	0,72	5,50	3,64	0,9941	0,10	1,46
<b>E1</b>	33	115	0,32673	14,3	1,14	5,70	3,80	0,9902	-	1,83
<b>F1</b>	33	127	0,34197	15,2	0,77	5,60	3,78	0,9912	-	1,18
<b>G1</b>	62	144	0,68793	13,4	0,88	5,80	3,75	0,9953	-	1,21
<b>H1</b>	72	138	0,69680	13,6	0,84	6,00	3,81	0,9949	-	1,15
<b>I1</b>	114	309	1,77859	13,4	1,25	5,80	3,60	0,9909	-	0,96
<b>J1</b>	50	144	0,59399	13,7	0,78	5,40	3,72	0,9940	-	1,15

## Apêndice B. Curvas de calibração da análise PCR

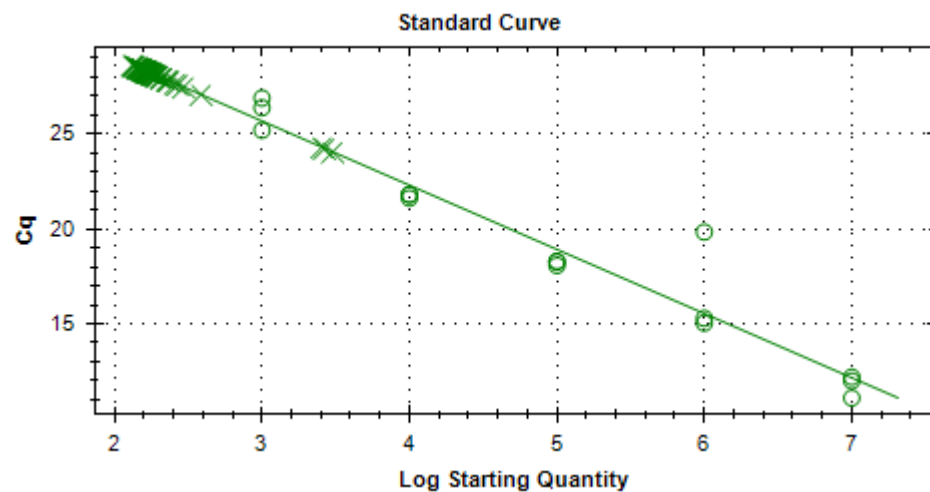


Figura B1. Curva de calibração traçada durante a análise qPCR das amostras dos vinhos A-Z. A equação da reta é  $y = -3,379x + 35,818$  e apresenta um  $R^2 = 0,933$  e uma  $E = 97,7\%$ .

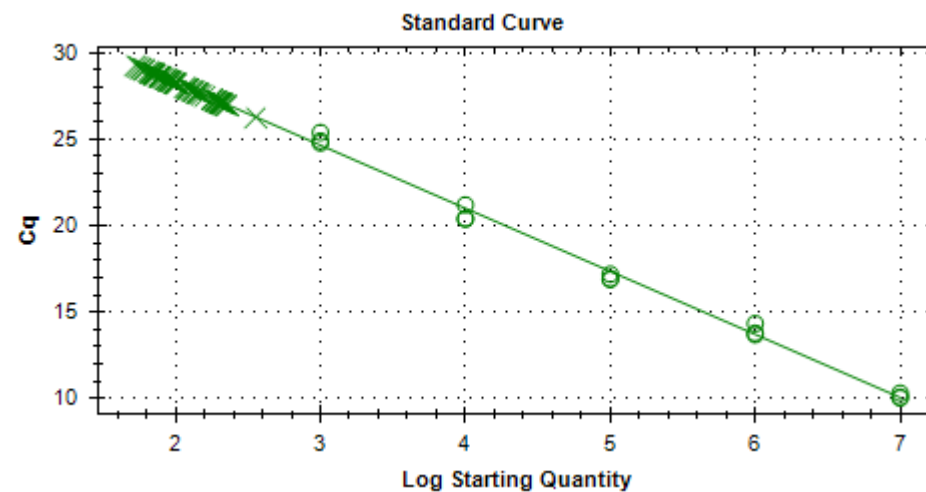


Figura B2. Curva de calibração traçada durante a análise qPCR das amostras dos vinhos A1-J1. A equação da reta é  $y = -3,644x + 35,577$  e apresenta um  $R^2 = 0,994$  e uma  $E = 88,1\%$ .