



Validação de metodologias para o controlo de *Brettanomyces/Dekkera* em vinhos tintos

Ana Rita Leal Silva

Dissertação realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Bioengenharia
Especialização em Engenharia Biológica

realizado em

Laboratório Central da Sogrape Vinhos S.A.

Orientador na FEUP: Prof. Olga Nunes

Orientador na Sogrape Vinhos S.A.: Eng. Cristina Fernandes

Setembro 2019

Resumo

Brettanomyces/Dekkera bruxellensis (*D. bruxellensis*) é considerada uma das principais leveduras de deterioração dos vinhos. Como tal, o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação de novas metodologias de deteção e quantificação de *D. bruxellensis* em vinhos tintos, promovendo a comparação entre o teste olfativo *SniffBrett*, PCR quantitativo (qPCR) e citometria de fluxo. Neste estudo foram avaliados três *kits* comerciais para a deteção de *D. bruxellensis*. Os *kits* 1 e 2 correspondem a *kits* de qPCR, enquanto o *kit* 3 a um *kit* de citometria de fluxo. A validação dos *kits* comerciais foi efetuada através da análise de suspensões de *D. bruxellensis* 21 em vinho tinto ou solução salina em concentrações conhecidas. Adicionalmente, procedeu-se à análise de amostras de vinho naturalmente contaminadas.

Através do estudo realizado verificou-se uma relação de linearidade entre a contagem através da câmara de *Neubauer* e a quantificação obtida pelos *kits* comerciais em estudo, apesar da subestimação face à concentração inoculada (100 vezes inferior para os *kits* de qPCR e uma 10 vezes para o de citometria de fluxo). Verificou-se que o efeito da matriz não é responsável pela subestimação, tendo a inoculação em solução salina devolvido concentrações inferiores comparativamente a vinhos tintos.

Para o *kit* 1 não foram obtidos os limites de deteção (LOD) propostos pelo fabricante. Quanto aos limites de quantificação, a inoculação das concentrações de 8 e 50 UFC/mL, descritas para os protocolos de extração de DNA a partir de 45 e 1,8 mL de amostra, respetivamente, devolveram valores de $2,6 \pm 1,6$ e $40,9 \pm 16,6$ UFC/mL.

Para o *kit* 2, a partir da extração de 1 mL de amostra, obtiveram-se valores de 13 e 80 UFC/mL para LOD e LOQ, respetivamente. Já o *kit* 3 evidenciou um limite de deteção de 10 células/mL para o vinho B, sendo 50 células/mL a inoculação que devolveu a menor quantificação analisada (4 células/mL). Já para o vinho A, a menor quantificação registada correspondeu a 8 células viáveis/mL, por inoculação de 10 células/mL.

Para ambos os *kits* de qPCR os resultados foram reprodutíveis, ainda que quantifiquem células mortas. Ainda assim, os *kits* de extração de DNA comercializados parecem adequados a vinhos, quando comparados com um *kit* geral de extração de DNA de fungos. A especificidade foi verificada apenas para o *kit* 1, dada a ausência de amplificação para uma amostra de leveduras totais.

Por utilização do *kit* 3 verificou-se ainda que o tratamento térmico contribui para a redução da viabilidade da estirpe (70,8 %) de forma mais acentuada, quando comparado com a adição de bissulfito de potássio (49,6 %).

Quanto à produção de fenóis voláteis, esta apenas se verificou a partir da inoculação de 1500 células/mL de *D. bruxellensis* 21 na matriz de vinho C. Após 10 dias de incubação, as inoculações efetuadas devolveram valores de aproximadamente 2,3 mg/L de 4-etil fenol (4-EP) e 0,29 mg/L de 4-etil guaiacol (4-EG), correspondente a uma concentração celular na ordem de 6 log células/mL.

De um modo geral, todos os *kits* apresentam as suas limitações. Ainda assim o *kit* 3 reproduziu concentrações mais próximas das inoculadas. Desta forma, a aquisição dos equipamentos deve ser ponderada, avaliando o custo e os falsos negativos passíveis de ser gerados, face à rápida obtenção de resultados.

Palavras-chave: *D. bruxellensis*, qPCR, citometria de fluxo

Abstract

Brettanomyces/Dekkera bruxellensis (*D. bruxellensis*) is considered one of the main spoilage yeasts in wines. Thus, the objective of this work was to evaluate new methodologies for the detection and quantification of *D. bruxellensis* in red wines, promoting the comparison between the *SniffBrett* olfactory test, quantitative PCR (qPCR) and flow cytometry. In this study, three commercial kits for the detection of *D. bruxellensis* were evaluated. Kits 1 and 2 correspond to qPCR kits, and kit 3 to a flow cytometry kit. Validation of commercial kits was performed by analysing suspensions of *D. bruxellensis* 21 in red wine or saline with known concentrations. In addition, naturally contaminated wine samples were analysed.

A linear relationship between the Neubauer count chamber and the quantification obtained from the commercial kits under study was noted, despite the underestimation of the inoculated concentration (100 times lower for the qPCR kits and 10 times for flow cytometry). It was found that the matrix effect is not responsible for the underestimation, since the inoculation in sterile saline led to lower concentrations compared to red wines.

For kit 1 the detection limits proposed by the manufacturer were not obtained. Regarding LOQ, the inoculation of the concentrations of 8 and 50 CFU/mL, described for the DNA extraction protocols from 45 and 1.8 mL of sample, respectively, returned the average concentrations of 2.6 ± 1.6 and 40.9 ± 16.6 CFU/mL.

For kit 2, regarding the extraction of 1 mL, values of 13 and 80 CFU/mL were obtained for LOD and LOQ, respectively. Kit 3 showed a detection limit of 10 cells/mL for wine B, with 50 cells/mL being the inoculation that returned the lowest quantification analysed (4 cells/mL). For wine A, the lowest quantification was 8 viable cells/mL by the inoculation of 10 cells/mL.

For both qPCR kits, the results were reproducible, even though dead cells were quantified. Despite this, these commercially available DNA extraction kits appear to be well-suited to wine when compared to a general yeast DNA extraction kit. Only kit 1 was specific for the quantification of the target organism, given the absence of amplification in a sample inoculated with a combination of yeasts.

Using kit 3 it was also found that the heat treatment contributes to a viability reduction of the strain (70.8 %), more substantially than with the addition of potassium bisulfite (49.6 %).

As for the production of volatile phenols, it was only verified from the inoculation of 1500 cells/mL of *D. bruxellensis* 21 in the wine matrix C. After 10 days of incubation,

inoculations returned values of approximately 2.3 mg /L of 4-ethyl phenol (4-EP) and 0.29 mg/L of 4-ethyl guaiacol (4-EG), corresponding to a cell concentration in the order of 6 log cells/mL.

In summary, this study showed that all kits have limitations. However, kit 3 reproduced concentrations closer to those inoculated. Hence, the price, the detection of false negatives and the time of the analysis should be all balanced before the acquisition of one of the equipments.

Keywords: *D. bruxellensis*, qPCR, flow cytometry

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Engenheira Cristina Fernandes não só por possibilitar o estágio na Sogrape Vinhos, como também pelo tema proposto e pelas formações fornecidas para a realização do mesmo.

Um agradecimento especial à professora Olga Nunes, orientadora desta dissertação, pelo inestimável apoio ao longo do desenvolvimento do projeto e pelo auxílio prestado nos vários obstáculos que foram surgindo. A professora é membro integrado do LEPABE - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado por: Unidade de Investigação UID/EQU/00511/2019 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE - financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC); Projeto “LEPABE-2-ECO-INNOVATION”, com a referência NORTE-01-0145-FEDER-000005, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Agradeço também às várias empresas que tornaram este projeto possível, nomeadamente à *BIO-RAD*, por intermédio da Amélia Miguel e Cristina Gómez e *Ambifood*, através do Artur Melo e Miguel Fernandes, pela disponibilidade, formação prestada e pela prontificação em emprestar material e equipamentos de qPCR necessários para a análise dos kits comerciais testados. O agradecimento recai ainda na *sysmex*, que, por intermédio do Carlos Fonseca, não só possibilitou uma ação de formação no IBET (instituto de Biologia Experimental e Tecnológica), como também disponibilizou o *kit*, juntamente com o equipamento de citometria de fluxo.

Aproveito também para agradecer ao professor José António Couto da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa (ESB-UCP), por fornecer a estirpe de *D. bruxellensis* que serviu de base para a realização deste projeto.

Por fim, agradeço a todos os que me ajudaram a superar os dias mais difíceis e me deram força e os mais preciosos conselhos para prosseguir.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Descrição do projeto	1
1.2. Contributos para o trabalho	1
1.3. Organização da tese	2
2. Estado de arte.....	3
2.1. Processo de vinificação	3
2.2. Potenciais etapas de contaminação	7
2.3. Microrganismos de deterioração	8
2.3.1. <i>Brettanomyces / Dekkera bruxellensis</i>	9
2.4. Práticas de controlo microbiológico.....	11
2.5. Metodologias de análise	12
2.5.1. PCR quantitativo	12
2.5.2. Citometria de fluxo	15
3. Materiais e métodos	18
3.1. Microrganismos e condições de cultura.....	18
3.2. Curva de crescimento de <i>D. bruxellensis</i> 21	19
3.3. Quantificação de microrganismos	19
3.4. Análise por PCR quantitativo	22
3.5. Análise por citometria de fluxo	24
3.6. Análise por teste olfativo - determinação da concentração de <i>D. bruxellensis</i> 21 para a produção de fenóis voláteis	25
4. Resultados e discussão	26
4.1. Curva de crescimento de <i>D. bruxellensis</i> 21	26
4.2. Quantificação de microrganismos	28
4.3. Análise por PCR quantitativo	30
4.4. Análise por citometria de fluxo	36
4.5. Validação da aplicabilidade dos <i>kits</i> comerciais para amostras de vinho naturalmente contaminadas.....	41
4.6. Análise por teste olfativo	43
4.6.1. Limiar de concentração para a deteção de fenóis voláteis	43
4.7. Comparação das metodologias utilizadas para a deteção de <i>Brettanomyces</i> ..	46
5. Conclusão	48
6. Proposta de trabalho futuro	50
7. Referências bibliográficas	51

Apêndices	a
Apêndice A. Descrição dos vinhos analisados	a
Apêndice B. Descrição de meios de cultura.....	b
Apêndice C. Equações auxiliares	c
C.1. Cálculo da taxa de crescimento específica para microrganismos.....	c
C.2. Contagem do número total de células por microscopia de fluorescência	c
C.3. Contagem do número total de células através da câmara de <i>Neubauer</i>	d
C.4. Cálculo da concentração de SO ₂ livre molecular	d
Apêndice D. Quantificação obtida por PCR quantitativo e citometria de fluxo ...	e
Apêndice E. Análise financeira.....	g

Lista de figuras

Figura 2.1.1: Etapas gerais de produção de vinho.....	3
Figura 2.5.1: Curva típica devolvida aquando da realização de um ensaio de PCR quantitativo (retirado de (Smith e Osborn, 2009)).	13
Figura 2.5.2: Composição e funcionamento esquematizado de um citómetro de fluxo (retirado de (Longin <i>et al.</i> , 2017))......	16
Figura 4.1.1: Curva de crescimento de <i>D. bruxellensis</i> 21 em meio seletivo obtida por medição da DO (600 nm) ao longo do tempo em escala semi-logarítmica (azul claro - crescimento celular; azul escuro - morte celular).	26
Figura 4.1.2: Linearização da curva de crescimento obtida para <i>D. bruxellensis</i> 21: (a) fase de latência; (b) fase exponencial; (c) fase estacionária ou de morte celular. ...	27
Figura 4.2.2: Relação entre DO (600 nm) e a concentração de células cultiváveis em UFC/mL obtida por cultura em placa para o conjunto de leveduras extraídas de mosto dessulfitado.	29
Figura 4.3.1: Quantificação de <i>D. bruxellensis</i> 21 por qPCR de acordo com a concentração inoculada nos diferentes vinhos. (A) Kit 1 a partir da extração de DNA (a) de 1,8 mL e (b) de 45 mL de vinho A inoculado com concentrações conhecidas de <i>D. bruxellensis</i> 21; (B) Kit 1 a partir de 1 mL de vinho A (a) e de vinho B (b) com concentrações conhecidas de <i>D. bruxellensis</i> 21.	30
Figura 4.3.2: Determinação da interferência de diferentes matrizes nos protocolos de extração de DNA: (A) <i>Kit A</i> a partir de 1,8 mL de amostra (B) <i>Kit B</i> . As suspensões continham 200 e 10 ⁴ células/mL, em (A) e (B) respetivamente.	31
Figura 4.3.3: Determinação da interferência do meio de proveniência de <i>D. bruxellensis</i> 21 na quantificação obtida pelo <i>kit 2</i> , usando como matrizes salinal e o vinho B inoculadas com 10 ⁴ células/mL.	32
Figura 4.3.4: Avaliação da influência de diferentes <i>kits</i> de extração de DNA na amplificação de <i>D. bruxellensis</i> 21 (10 ⁴ células/mL) por utilização do <i>kit 2</i> de qPCR : (a) <i>Kit B</i> ; (b) novo protocolo em fase de teste (<i>Kit C</i>); (c) <i>Kit A</i> ; (d) <i>Kit D</i>	33
Figura 4.3.5: Avaliação da reprodutibilidade da extração de DNA obtida por: (A) <i>Kit 1</i> a partir de 45 mL de suspensões de <i>D. bruxellensis</i> 21 inoculadas na matriz A; (B) <i>Kit 2</i> a partir de 1 mL de amostra inoculada na matriz B.	34
Figura 4.4.1: Quantificação de <i>D. bruxellensis</i> 21 por citometria de fluxo de acordo com a concentração inoculada nas diferentes matrizes de vinho (a) vinho A (b) vinho B.	36

Figura 4.4.2: Avaliação da influência da matriz na quantificação de *D. bruxellensis* 21 obtida através do *kit* comercial 3 (10^4 células/mL).....37

Figura 4.4.3: Determinação da interferência do meio de proveniência de *D. bruxellensis* 21 na quantificação obtida por citometria de fluxo usando como matrizes os vinhos A e B inoculados com 10^4 células/mL.....38

Lista de tabelas

Tabela 3.3.1: Correspondência entre a DO (600 nm) e as diluições plaqueadas de leveduras totais isoladas de mosto dessulfitado.....	20
Tabela 3.3.2: Correspondência entre a DO (600 nm) e o volume necessário para a contagem de <i>D. bruxellensis</i> 21 por microscopia de epifluorescência.	21
Tabela 3.4.1: Descrição da concentração de células totais testadas nos ensaios de deteção e quantificação de <i>D. bruxellensis</i> 21 em matrizes de vinho tinto estéril por qPCR aplicadas aos kits comerciais 1 e 2 (*os valores apresentados correspondem a LOQ e LOD, respetivamente, de acordo com a informação fornecida pelo fabricante).	22
Tabela 4.5.1: Comparação das concentrações de <i>Brettanomyces</i> obtidas por qPCR (<i>kit</i> 1) e citometria de fluxo (<i>Kit</i> 3).	41
Tabela 4.6.1: Correspondência entre a concentração de <i>D. bruxellensis</i> 21 inoculada no vinho C e a concentração de fenóis voláteis (por GC-MS) e da estirpe ao fim de 10 dias de incubação (por citometria de fluxo).	44
Tabela 4.7.1: Quadro-síntese de comparação das metodologias em estudo para a deteção de <i>D. bruxellensis</i> 21 (^a : para o protocolo de extração de DNA a partir de 45 mL de amostra; ^b : extração de DNA a partir de 1,8 mL de amostra - <i>kit</i> 1; ^c para a matriz A; ^d para a matriz B).	47
Tabela B.1: Constituição do meio seletivo YEPD para a enumeração de leveduras totais	b
Tabela D.1: Quantificação obtida pelos diferentes kits de qPCR testados de acordo com a concentração exata de <i>D. bruxellensis</i> 21 inoculada nas matrizes de vinho A e B. ... e	
Tabela D.2: Quantificação obtida através da aplicação do <i>kit</i> 3 de citometria de fluxo por inoculação de <i>D. bruxellensis</i> 21 nos vinhos A e B.	f
Tabela E.1: Discriminação dos custos dos kits requeridos para a análise por cada uma das metodologias em análise (* <i>Standard Kit</i> serve para a elaboração da reta de calibração, requerendo uma única realização por utilizador; para a obtenção do custo por amostra considera-se que o referido <i>kit</i> permite a quantificação de um total de 300 amostras).	g

Abreviaturas e símbolos

Lista de estirpes

<i>Brett</i>	<i>Brettanomyces</i>
<i>D. bruxellensis</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
<i>B. bruxellensis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
<i>O. oeni</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Lista de compostos químicos

CO ₂	Dióxido de carbono
K ₂ O ₅ S ₂	Metabissulfito de potássio
N ₂	Azoto
O ₂	Oxigénio
SO ₂	Dióxido de enxofre

Lista de Siglas

AWRI	<i>The Australian Wine Research Institute</i>
BAL	Bactérias do ácido láctico
C _T	<i>Cycle Threshold</i> Número mínimo de ciclos para amplificação
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindole
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
4-EC	4-etil catecol
4-EG	4-etil guaiacol
4-EP	4-etil fenol
ESB-UCP	Escola Superior de Tecnologia - Universidade Católica Portuguesa
FA	Fermentação alcoólica
FCM	Citometria de fluxo
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
FISH-FCM	<i>Fluorescence in situ Hybridization - flux cytometry</i>
FML	Fermentação malolática
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos
ISA	Instituto Superior de Agronomia
GC-MS	Cromatografia gasosa - Espetrometria de massa
LOD	Limite de deteção
log ₁₀	Logaritmo decimal
LOQ	Limite de quantificação
MiQE	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time PCR Experiments</i>
OIV	<i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i> Organização Internacional da Vinha e do Vinho

pb	Pares de bases
ppm	Partes por milhão
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	PCR quantitativo
SSC	<i>Side Scatter</i>
T _m	Temperatura de fusão
UFC	Unidades formadoras de colónias
UV	Ultravioleta
VNC	Células viáveis não cultiváveis
v/v	Volume/volume
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
λ	Comprimento de onda

1. Introdução

1.1. Descrição do projeto

O presente trabalho insere-se no projeto de dissertação do Mestrado Integrado em Bioengenharia, ramo de Engenharia Biológica. O referente projeto foi elaborado em ambiente empresarial no laboratório da Sogrape Vinhos na Freguesia de Avintes, Vila Nova de Gaia.

O principal objetivo do trabalho prende-se com a validação de novas metodologias - PCR quantitativo (qPCR) e citometria de fluxo - que permitam o controlo de *Brettanomyces* em vinhos tintos.

O projeto desenvolvido procurou determinar os limites de deteção e quantificação dos equipamentos de qPCR e citometria de fluxo por inoculação de *D. bruxellensis* 21 em duas matrizes de vinhos tintos estéreis - A e B. Adicionalmente, os *kits* comerciais avaliados foram testados quanto à sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, e ainda à linearidade dos resultados obtidos. Foi ainda alvo do projeto a recolha de amostras de vinho naturalmente contaminadas, após a realização do teste olfativo *SniffBrett*, para a validação dos *kits* para análise de amostras reais.

Em paralelo foi realizado o teste olfativo para a deteção de *Brettanomyces*, em execução pela Sogrape Vinhos, com o objetivo de determinação da concentração a partir da qual se verifica a produção de fenóis voláteis. Para tal, foi efetuada a quantificação de fenóis voláteis (4-etil fenol e 4-etil guaiacol) numa matriz de vinho C, por GC-MS e da densidade celular correspondente por citometria de fluxo.

1.2. Contributos para o trabalho

As metodologias em estudo não estão implementadas na empresa, pelo que foi desenvolvido um novo procedimento com base nos *kits* fornecidos pelas empresas *BIO-RAD*, *r-biopharm* e *sysmex*.

Os isolados de *Brettanomyces* foram fornecidos pela ESB-UCP (Escola Superior de Tecnologia - Universidade Católica Portuguesa).

1.3. Organização da tese

O documento inicia-se com o enquadramento do projeto, na introdução, ao qual se segue uma descrição compreensiva do estado de arte. O estado de arte engloba as principais etapas do processo de vinificação e potenciais pontos de contaminação, bem como uma breve descrição da levedura de deterioração em estudo - *D. bruxellensis* - e principais práticas de controlo microbiológico aplicados na indústria vitivinícola. Esta secção termina com a descrição da metodologia utilizada e em avaliação, nomeadamente PCR quantitativo e citometria de fluxo, para a deteção de microrganismos de deterioração nos vinhos.

No capítulo 3 são descritas as metodologias utilizadas para a análise de *D. bruxellensis*. O procedimento experimental inclui a elaboração de uma curva de crescimento, bem como de retas de calibração para estabelecer a relação entre a densidade ótica (600 nm), DO, e a concentração celular em células viáveis (UFC/mL), a partir de contagem em placa, bem como da DO e da concentração de células totais, por microscopia de epifluorescência. Adicionalmente está também descrito o procedimento para a verificação das concentrações inoculadas por contagem através da câmara de *Neubauer*. A secção de materiais e métodos contempla ainda uma descrição pormenorizada da metodologia empregue para a realização do teste olfativo, qPCR e citometria de fluxo.

Na secção 4 estão contemplados os resultados e discussão.

Finalmente é apresentada a conclusão do trabalho, bem como propostas de trabalho futuro, seguida das referências bibliográficas.

2. Estado de arte

2.1. Processo de vinificação

O processo de produção de vinho segue uma série de etapas, ainda que sujeito a ligeiras alterações consoante seja efetuado de acordo com a metodologia tradicional ou industrial. A figura 2.1.1 ilustra, de uma forma geral, o referido processo, sendo as principais etapas descritas mais pormenorizadamente nas secções posteriores.

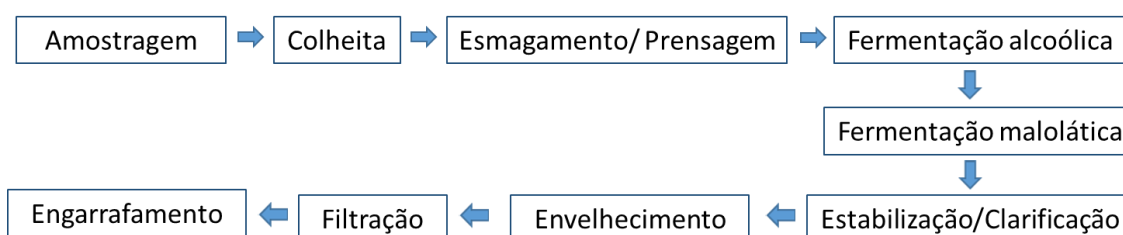


Figura 2.1.1: Etapas gerais de produção de vinho.

2.1.1. Fermentação alcoólica

Na etapa de fermentação alcoólica, as leveduras são responsáveis pela conversão de açúcares em etanol (Lambrechts e Pretorius, 2000).

No caso de uma fermentação alcoólica tradicional, a fase inicial é dominada por uma vasta gama de leveduras com baixa capacidade fermentativa como *Kloeckera*, *Hanseniospora* e *Candida*. O seu crescimento é limitado pela concentração de etanol (5 a 6 %), usualmente coincidente com os 2 primeiros dias de fermentação (Fleet, 2003; Romano *et al.*, 2003). Dada a baixa tolerância ao etanol, o crescimento destas estirpes decresce acentuadamente, sendo substituídas por *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), com tolerância a elevadas concentrações de etanol e elevada capacidade fermentativa, acabando por se tornar dominante e completar o processo de fermentação (Romano *et al.*, 2003; Bartowsky, 2017; Petruzzi *et al.*, 2017).

Já a nível industrial, o processo fermentativo requer a eliminação da microbiota nativa presente nas uvas, sendo, para tal, promovido o seu esmagamento e adicionado anidrido sulfuroso (dióxido de enxofre), normalmente sob a forma de metabissulfito de potássio ($K_2O_5S_2$). Em seguida, o procedimento passa pela hidratação e inoculação da levedura liofilizada selecionada (Zuehlke *et al.*, 2015).

S. cerevisiae é a principal levedura utilizada para a inoculação do mosto a nível industrial, sendo inoculada imediatamente após a etapa de esmagamento dos bagos. Com a utilização de estirpes selecionadas é garantido o controlo do processo de vinificação, conduzindo a parâmetros mais previsíveis. Adicionalmente, a utilização de estirpes selecionadas reduz o risco de deterioração do produto, por outros microrganismos nativos das uvas. Existem várias estirpes de *S. cerevisiae* disponíveis, cabendo ao enólogo a sua seleção. A seleção da estirpe de interesse pode basear-se numa série de critérios como o aumento da expressão aromática, fermentação de mostos com elevado teor de açúcar (leveduras osmofílicas), resistência a altas ou baixas temperaturas de fermentação ou tolerância a elevadas concentrações de etanol (Mas, A.; Guillamón, J.M.; Beltran, 2016; Petruzzi *et al.*, 2017).

Ainda assim, a utilização de leveduras comerciais selecionadas conduz à eliminação de microrganismos nativos do vinho, contribuindo para a perda da complexidade organolética, comparativamente a fermentações espontâneas tradicionais. A fim de contrariar a simplicidade dos vinhos, pode ser promovida a inoculação conjunta com outro tipo de leveduras, genericamente denominadas por *Non-Saccharomyces* (Sannino *et al.*, 2013; Petruzzi *et al.*, 2017).

Non-Saccharomyces correspondem a um conjunto de leveduras que conduzem ao aumento da concentração de compostos voláteis, dada a produção acentuada de metabolitos secundários, como álcoois e ésteres aromáticos (Mas, A.; Guillamón, J.M.; Beltran, 2016; Petruzzi *et al.*, 2017).

Dentro das leveduras *Non-Saccharomyces*, utilizadas destaca-se *Torulaspora delbrueckii*, promovendo o aumento complexidade e estrutura do vinho; *Lachancea thermotolerans*, produtora de ácido láctico, além de contribuir para a intensificação aromática; *Metschnikowia fructicola*, responsável pela proteção natural contra microrganismos de deterioração, permitindo a redução da adição de SO₂ na etapa de esmagamento (Petruzzi *et al.*, 2017; Berbegal *et al.*, 2018).

À semelhança do que se evidencia para *Saccharomyces*, algumas estirpes de *Non-Saccharomyces* apresentam fator *killer*, resultante da excreção de toxinas proteicas que podem ser letais para outras leveduras sensíveis. A presença de fator *killer* nas leveduras serve de alternativa para o controlo de leveduras de deterioração (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Berbegal *et al.*, 2018). No entanto, a grande maioria dos enólogos não recorre a este tipo de leveduras, dada a sua capacidade de deterioração dos vinhos, apesar dos vários benefícios apontados (Mas *et al.*, 2016).

2.1.2. Fermentação malolática

Quando completa a fermentação alcoólica, ocorre a fermentação malolática (FML), levada a cabo por bactérias do ácido láctico (BAL). Estas convertem o ácido málico presente no vinho em ácido láctico, através de uma descarboxilação promovida pela enzima malolática. Dentro das espécies de BAL intervenientes na FML, *Oenococcus oeni* (*O. oeni*) corresponde à estirpe dominante, contribuindo para a redução da acidez, e alterações sensoriais do vinho. Além disso, promove a produção de diacetilo, responsável pelo carácter amanteigado dos vinhos, além do desenvolvimento de aromas frutados em detrimento de herbáceos (Fleet, 2007; Renouf *et al.*, 2007; Bartowsky, 2017).

A fermentação malolática, apesar de garantir a estabilização microbiológica, bem com a desacidificação, está dependente do tipo e estilo de vinho que se pretende produzir. Para vinhos tintos a fermentação malolática é quase sempre desejável (De Revel *et al.*, 1999; Fleet, 2003; Bauer, R.; Dicks, 2004).

A realização de FML de forma espontânea implica alguns riscos, como o aumento da acidez volátil, consumo de açúcares residuais e formação de metabolitos indesejáveis, como é o caso das aminas biogénicas. Assim, ao nível industrial, são utilizadas culturas de BAL selecionadas, garantindo uma fermentação rápida e eficiente. A seleção de BAL pode ser feita consoante o pretendido pelo enólogo - tolerância a baixo pH, a elevadas concentrações de etanol e SO₂, compatibilidade com as leveduras selecionadas ou incapacidade de produção de aminas biogénicas (Petruzzi *et al.*, 2017).

O. oeni é a principal bactéria do ácido láctico selecionada para a iniciação da FML a nível industrial, podendo ser co-inoculada com as leveduras ou adicionada sequencialmente, após a fermentação alcoólica. A co-inoculação é atualmente a estratégia adotada na Sogrape, contribuindo para a redução do tempo do processo de vinificação, sendo assim mais vantajosa do ponto de vista económico (Mas *et al.*, 2016; Petruzzi *et al.*, 2017). *O. oeni* é usualmente utilizada face à capacidade de desempenhar a FML em condições adversas - baixo pH (<3), elevadas concentrações de etanol e baixa temperatura (inferior a 12 °C). Adicionalmente, esta estirpe permite a produção de diacetilo, interveniente na complexidade do aroma.

2.1.3. Maturação / envelhecimento

Vinhos tintos e alguns brancos passam ainda por um processo de maturação e envelhecimento, para a aquisição de maior estrutura e complexidade (De Revel *et al.*, 1999). Usualmente, esta etapa ocorre em barris de madeira, podendo durar vários meses. Dada a dificuldade de esterilização dos barris, esta é uma fonte de elevado risco de contaminação. Assim, no final do processo pode verificar-se um aumento da microbiota do vinho, podendo conter espécies de leveduras como *Saccharomyces* e *Brettanomyces* e de bactérias como *Acetobacter*, *Oenococcus* e *Pediococcus*, que, caso não sejam removidas, podem induzir a deterioração do vinho (De Revel *et al.*, 1999; Renouf *et al.*, 2007; Malfeito-Ferreira, 2011).

2.2. Potenciais etapas de contaminação

A etapa de maturação e armazenamento de vinhos em tanques ou barricas de madeira é um dos pontos críticos para a contaminação. Face à oxigenação, é promovido o desenvolvimento de leveduras fracamente fermentativas - *Candida* e *Pichia* - capazes de oxidar o etanol, glicerol e ácidos orgânicos e inorgânicos presentes no vinho (Fleet, 2003; Malfeito-Ferreira, 2011). Apesar destas estirpes serem resistentes a conservantes, como sorbato de potássio e dióxido de enxofre, podem facilmente ser controladas reduzindo o oxigénio disponível. Apesar disso, a micro oxigenação contribui para o desenvolvimento de *Dekkera bruxellensis*, responsável pelo sabor fenólico não característico e indesejável nos vinhos (Malfeito-Ferreira, 2011).

Para a desinfeção dos barris, os tratamentos mais comuns passam pela utilização de água quente, soluções de SO₂ e vapor de água. Apesar disso, a eficiência da higienização é limitada face à natureza porosa da madeira. Os sulcos e as aduelas podem armazenar microrganismos mesmo após a desinfeção e assim contribuir para uma re-contaminação (Malfeito-Ferreira, 2011).

O engarrafamento é outro ponto crítico na indústria vitivinícola, sendo que, quando inadequado, pode introduzir oxigénio no vinho. Face às condições aeróbias disponibilizadas, este passa a ser um meio propício para o crescimento exponencial de leveduras (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2011). Nesta etapa, também as rolhas devem ser avaliadas, visto que, quando de fraca qualidade podem apresentar canais de ar, contribuindo, assim, para a redução de SO₂ livre molecular, o que estimula o crescimento microbiano (Malfeito-Ferreira, 2011).

Atualmente, na etapa de engarrafamento são já aplicadas práticas de controlo microbiológico, que permitem a deteção das fontes de contaminação. Esse controlo é efetuado ao nível das garrafas, água de enxaguamento, enchedoras e máquinas de enrolamento, bem como na atmosfera (Malfeito-Ferreira, 2011).

Mais recentemente, como forma de garantir uma maior qualidade microbiológica do vinho têm sido implementados novos procedimentos de higienização das linhas, além do sistema HACCP. Ainda assim, estas metodologias não são suficientes para a redução da adição de dióxido de enxofre e sorbato de potássio utilizados em vinhos doces e branco secos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

2.3. Microrganismos de deterioração

A definição de deterioração microbiana é bastante complexa sobretudo em alimentos ou bebidas fermentáveis, em que alguns dos metabolitos produzidos são importantes para o sabor e aroma do produto final (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Na indústria dos vinhos, a fermentação alcoólica ocorre na presença de um vasto conjunto de leveduras e bactérias, o que dificulta a distinção de microrganismos benéficos ou prejudiciais. Estes acabam por ser mais facilmente classificados nas etapas de armazenamento, engarrafamento e envelhecimento de vinhos. No entanto, a deterioração do vinho pode ocorrer ainda antes da fermentação como acontece aquando da produção de etil-acetato por *Pichia anomala*. Como tal, a monitorização de microrganismos de deterioração deve ser efetuada em todas as etapas do processo de vinificação (Fleet, 2003; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Entre as consequências da deterioração bacteriana estão o sabor amargo, acidez volátil, textura oleosa e traços amanteigados nos vinhos (Bartowsky, 2009). No entanto, face aos recentes avanços tecnológicos implementados no processo de vinificação, a deterioração bacteriana já não é determinante desde que as boas práticas não sejam descuradas (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Quanto às leveduras, estas são geralmente consideradas como principais microrganismos de deterioração em vinhos engarrafados, sobretudo devido à sua capacidade de sobrevivência em ambientes adversos, com elevada acidez (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Os efeitos mais comuns face à deterioração por leveduras são a formação de películas, turvação, formação de depósitos e produção de gás em vinhos engarrafados, assim como o desenvolvimento de sabores não característicos ao longo dos processos de vinificação e armazenamento. *Dekkera bruxellensis* destaca-se como levedura de deterioração em vinhos tintos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2011).

2.3.1. *Brettanomyces / Dekkera bruxellensis*

Brettanomyces sp. é considerada uma das leveduras mais perigosas na deterioração dos vinhos. Juntamente com o seu estado sexual ascosporigénico, *Dekkera sp.*, é responsável pela produção de fenóis voláteis, ácido acético (resultante da oxidação do etanol) e tetrahidropiridinas (Rodrigues *et al.*, 2001; Fleet, 2003).

Relativamente aos fenóis voláteis destacam-se 4-etil fenol (4-EP), seguido de 4-etil guaiacol (4-EG) e 4-etil catecol (4-EC). A sua produção está associada à atividade sequencial de 2 enzimas (descarboxilase e redutase), capazes de converter os ácidos p-coumárico, ferúlico e cafeico em 4-EP, 4-EG e 4-EC, respetivamente. Estes compostos, quando em quantidades elevadas (superiores a 620 µg/L no caso de 4-EP ou a 426 µg/L para uma mistura 10:1 de 4-EP:4-EG), contribuem para a deteção de aromas fenólicos nos vinhos, designados de “Caráter Brett” (Rodrigues *et al.*, 2001; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2018).

Ainda assim, a deteção de aromas característicos de *Brettanomyces* está dependente do tipo de vinho, da casta utilizada e da região. Caso seja permitido à levedura proliferar, todos os vinhos manifestarão o mesmo aroma desagradável, independentemente da variedade ou região (Chandra *et al.*, 2016; White, 2018).

Brettanomyces sp. desperta sobretudo preocupação em vinhos tintos envelhecidos em barricas de madeira (onde pode persistir dada a permeabilidade a O₂) ou originários de uvas de fraca qualidade, podendo provocar perdas económicas na ordem das centenas de milhares de dólares (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Apesar de *Brettanomyces* poder também ser detetada em vinhos brancos, os tintos constituem uma melhor matriz para o seu desenvolvimento dada a riqueza em precursores de fenóis voláteis. Efetivamente, o elevado pH, ao reduzir a percentagem de SO₂ livre molecular no controlo microbiano, permite a proliferação de *Brettanomyces*, contribuindo, assim para o odor característico a suor de cavalo associado (Goode, 2003).

Esta levedura, pertencente à família *Cyptococcaceae*, apresenta um crescimento lento, sendo capaz de persistir no vinho por longos períodos de tempo. *D. bruxellensis* tem uma longa fase de latência, sendo o crescimento exponencial verificado após 6 a 10 meses da fermentação alcoólica, devendo, portanto, coincidir com a fase de envelhecimento (Cocolin *et al.*, 2004; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Bartowsky, 2017). É uma levedura anaeróbia facultativa, capaz de resistir a condições mínimas de nutrientes, podendo utilizar diferentes fontes de carbono desde glucose a etanol, e inclusivamente açúcares extraídos da madeira (celobiose). Adicionalmente, o seu

desenvolvimento está dependente de uma fonte de azoto, temperaturas entre os 13 e os 30 °C, presença de O₂, bem como baixas concentrações de SO₂ molecular (Zuehlke *et al.*, 2015).

O controlo de *Brettanomyces* nos vinhos deve ser efetuado durante a fase de envelhecimento e quando o vinho é engarrafado. Na primeira fase referida, a análise microbiológica não requer a completa eliminação da levedura, procurando apenas assegurar que o nível de contaminação é reduzido, de forma a evitar que a concentração de 4-EP atinja valores detetados organoleticamente. Já no engarrafamento, o principal objetivo prende-se com a eliminação total de *Brettanomyces*, sendo que apenas uma célula viável por garrafa pode contribuir para a posterior deterioração do vinho engarrafado (Malfeito-Ferreira, 2018, 2019).

Entre os processos de tratamento que podem ser aplicados, a filtração esterilizante continua a ser a técnica mais eficiente para a sua remoção, ainda que possam também ser efetuadas técnicas de sulfitação ou inativação térmica a partir de 35 °C (Tessonnière *et al.*, 2009; Malfeito-Ferreira, 2018).

A filtração esterilizante é um processo efetuado antes da etapa de engarrafamento, de forma a evitar a deterioração de vinhos pelo desenvolvimento de microrganismos remanescentes. Este processo consiste numa filtração por membrana, em que a porosidade deve ser escolhida considerando a menor dimensão do microrganismo que se pretende reter. A eficiência de filtração está associada a aspetos como o número e tortuosidade de poros, que varia com o filtro selecionado, bem como com o número de microrganismos presentes, o qual deve ser tão reduzido quanto possível. Para a indústria vitivinícola, é suficiente utilizar filtros com poros até 0,6 µm para a remoção de leveduras (tamanho médio entre 3 e 4 µm). Por sua vez, um filtro de 0,45 µm reduz a probabilidade de crescimento microbiano, sendo suficiente para a remoção de leveduras e bactérias do vinho, garantindo a estabilidade microbiológica, sem efeito negativo nas propriedades sensoriais (Malfeito-Ferreira, 2011; Fraise *et al.*, 2012).

2.4. Práticas de controlo microbiológico

Face à diversidade e quantidade de microrganismos presentes no mosto e no vinho são necessárias metodologias de controlo do processo de vinificação para assegurar a sua qualidade.

A adição de anidrido sulfuroso é uma das práticas mais comuns na vinificação, ainda que sujeito a limites legais muito rigorosos. Segundo OIV (Organização Internacional da Vinha e do Vinho), a quantidade de SO₂ total presente em vinhos tintos pode ir até 150 ou 300 mg/L, conforme contenham até ou mais de 4 g/L de substâncias redutoras, respetivamente (International organization of vine and wine, 2011). Nos vinhos, este composto encontra-se nas formas livre e combinada, consoante o pH. Acontece que, aquando da adição de SO₂ ao meio, cerca de 50 % combina-se com as antocianinas, perdendo a sua atividade antimicrobiana (Malfeito-Ferreira, 2011).

A adição de SO₂ é normalmente efetuada antes do início da fermentação alcoólica para a seleção das leveduras fortemente fermentativas, além de evitar que FA e FML ocorram em simultâneo. A forma ativa, responsável pelo carácter antisséptico corresponde à forma molecular livre (H₂SO₃), a qual depende do pH do vinho. Adicionalmente a forma de bissulfito (HSO₃⁻) contribui para a inibição da tirosinase além de retardar as oxidações do vinho. Apesar dos benefícios apresentados, o dióxido de enxofre é nefasto, pelo que a sua aplicação deve ser efetuada na dose mais reduzida que permita o efeito desejado nos vinhos. Quando aplicado inadequadamente pode originar maus aromas ou até inibir a fermentação malolática. Ainda assim, a aplicação de SO₂ nos vinhos não é suficiente para assegurar a qualidade, existindo um vasto conjunto de microrganismos resistentes (Malfeito-Ferreira, 2011).

Também os tratamentos térmicos podem ser aplicados no processamento do vinho, ainda que raramente sejam utilizados ao nível da indústria vitivinícola. Dada a sensibilidade dos microrganismos colonizadores de vinhos ao calor, temperaturas médias são suficientes para promover a morte celular, assegurando a esterilização do produto. A relutância perante a prática de pasteurização associa-se à interferência na qualidade organolética e longevidade dos vinhos (Malfeito-Ferreira, 2018, 2019).

2.5. Metodologias de análise

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

O método de filtração por membrana é o normalmente utilizado para enumerar microrganismos de deterioração. Esta metodologia permite isolar um reduzido número de microrganismos de um grande volume de amostra. Apesar disso, pode gerar falsos negativos, dado não garantir a deteção de células viáveis não cultiváveis (VNC). Estas correspondem a células metabolicamente ativas e capazes de persistir por longos períodos de tempo, apesar de não serem detetadas através do crescimento em placa. Assim, as células VNC podem causar deterioração de vinhos. De facto, existem já evidências da indução do estado VNC para *Brettanomyces* e *Zygosaccharomyces* em condições adversas de crescimento, com adição de SO₂ (Montville e Matthews, 2013; Anonymous, 2019; Zuehlke *et al.*, 2015; Longin *et al.*, 2017).

O teste olfativo é uma outra abordagem utilizada para a deteção de microrganismos, nomeadamente a presença de *Brettanomyces*. Este teste baseia-se na adição de meio de cultura seletivo ao vinho em análise, 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 deteção, quantificação e caracterização, procurando aumentar a rapidez e fiabilidade dos resultados. Para tal são utilizadas técnicas moleculares, como qPCR e citometria de fluxo, entre outras (Cocolin *et al.*, 2004; Renouf *et al.*, 2007; Gerland e Sarl, 2010; Morgan *et al.*, du Toit, 2017).

2.5.1. PCR quantitativo

A tecnologia de qPCR destaca-se do método convencional visto que, além de detetar, permite a quantificação de DNA, amplificado em tempo real. Este avanço foi possível dada a inclusão de corantes fluorescentes como o *SYBR-Green* ou sondas *TaqMan* (Fairchild *et al.*, 2006).

SYBR-Green corresponde ao corante mais utilizado, intercalando o DNA à medida que este vai sendo sintetizado. Trata-se de um corante mais económico além de permitir a análise de vários tipos de genes. Já as sondas *TaqMan*, com 18 a 22 pb, são constituídas por um fluoróforo covalentemente ligado à extremidade 5' e um *quencher*

à extremidade 3'. Numa fase inicial, face às reduzidas dimensões das sondas, o *quencher* inibe a fluorescência associada à extremidade 5'. Por sua vez, durante o PCR, a sonda emparelha com o DNA, e, por ação da atividade de exonuclease associada à polimerase, a extremidade 5' (fluoróforo) é clivada, resultando na emissão de fluorescência proporcional ao número de cópias gerado, o que se traduz numa elevada especificidade (IDT, 2010; Anonymous, 2015).

A amplificação de DNA por qPCR apresenta uma curva característica, capaz de ser subdividida em 4 etapas - ruído, amplificação exponencial, amplificação linear e *plateau* (Figura 2.5.1).

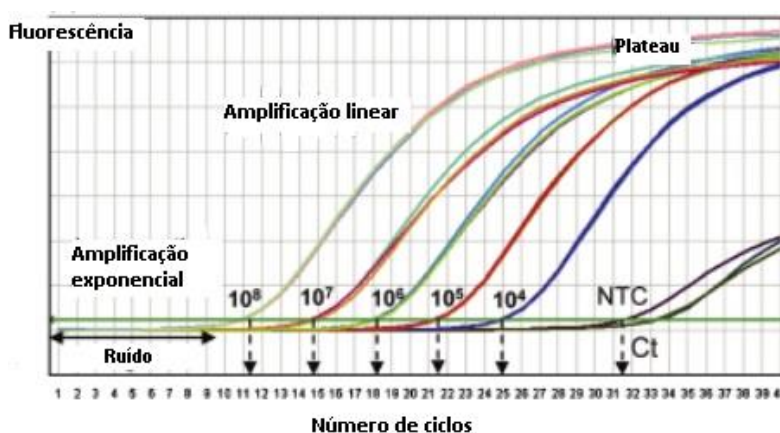


Figura 2.5.1: Curva típica devolvida aquando da realização de um ensaio de PCR quantitativo (retirado de (Smith e Osborn, 2009)).

O ruído verifica-se nos ciclos iniciais, em que a amplificação ainda não é detetável, provocando uma pequena variação no sinal de fluorescência. A partir do momento em que a fluorescência passa a ser detetável - após um número mínimo de ciclos, C_T (*cycle threshold*) - inicia-se a fase de amplificação exponencial. Durante a fase exponencial, a amplificação do gene-alvo ocorre proporcionalmente, sendo o número de cópias duplicado em cada ciclo, bem como a fluorescência associada. Face à precisão e especificidade da reação é possível quantificar o número de genes. Na fase linear, inicia-se o esgotamento dos componentes da reação, provocando a redução da eficiência. Já na fase de *plateau*, a reação pára, deixando de se verificar o incremento da fluorescência, o que normalmente se associa à perda de atividade da enzima *Taq* polimerase utilizada (Delaherche *et al.*, 2004).

Para a quantificação é elaborada uma reta de calibração, através da realização de diluições seriadas de um padrão de DNA total da estirpe, do gene ou de um vetor

recombinante que o contenha. Normalmente, a reta de calibração procura cobrir uma gama entre 5 e 6 \log_{10} . Assim, o logaritmo da quantidade inicial (em cada diluição) é feito corresponder ao número de ciclos mínimo para assegurar a amplificação (C_T). O gene-alvo é quantificado por comparação com a reta de calibração construída, ainda que não corresponda exatamente ao número de genes presentes na amostra. Desta forma, torna-se necessário calcular alguns parâmetros para a reta de calibração obtida - eficiência de amplificação (90-110 %), coeficiente de regressão linear ($R^2 > 0,98$), ordenada na origem e temperatura de fusão - de forma a avaliar a sensibilidade e especificidade da reação (Delaherche *et al.*, 2004; Smith e Osborn, 2009; Taylor *et al.*, 2010).

A eficiência, E , é calculada por $E = 10^{\frac{1}{m}} - 1$, com m correspondente ao declive da reta de calibração, sendo, normalmente, obtida diretamente do equipamento. A temperatura de fusão (T_m), correspondendo à temperatura de desnaturação do fragmento de DNA, permite assegurar que os *primers* utilizados estão a amplificar um único produto, inerente ao amplicão de interesse. As previsões da temperatura de fusão costumam permitir um erro máximo em torno de 1,5 °C face ao valor esperado. Esta curva de fusão é obtida, após o ensaio de qPCR, diretamente no equipamento, através do incremento da temperatura de desnaturação (Delaherche *et al.*, 2004; IDT, 2010).

Os limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) são importantes para a avaliação da sensibilidade do método. LOD corresponde à concentração mínima à qual 95 % das amostras são detetadas, sendo, teoricamente, o valor mais sensível passível de ser obtido de 3 cópias por PCR. Este parâmetro permite determinar o ponto em que as medições deixam de ser válidas. Já LOQ associa-se à concentração mínima mensurável que pode ser quantificada com precisão aceitável sob as condições experimentais estabelecidas (Bustin *et al.*, 2009; Forootan *et al.*, 2017).

Aplicando o limite de deteção a qPCR, este pode ser obtido pela análise da reta de calibração de forma a determinar a amostra mais diluída ainda detetável. Acontece que fatores inerentes à amostragem e extração podem contribuir para o aumento do ruído e assim promover o aumento substancial de LOD comparativamente a uma situação ideal. Da mesma forma, também LOQ pode ser obtido a partir das curvas padrão replicadas, por intermédio do cálculo do desvio padrão nas diferentes concentrações em análise (Forootan *et al.*, 2017).

De acordo com Tessonnière *et al.* (2009), a técnica de qPCR é válida para a deteção de *Brettanomyces* entre 25 e 2×10^5 UFC/mL, quer para vinhos brancos, rosés e tintos, tendo, para tal, utilizado o gene RAD4 (*Invitrogen*, 108 bp). Delaherche *et al.* (2004),

usando *SYBR Green PCR Supermix (BIO-RAD)* e o gene *RAD4* para a deteção de *Brettanomyces*, obteve um limite de deteção de 10^4 UFC/mL, face à presença de substâncias inibitórias. Já Phister e Mills (2003), criando os *primers* DBRUX (79 bp) - através do alinhamento do domínio D1/D2 da subunidade 26S rRNA para *Dekkera anomala*, *D. bruxellensis*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces naardensis*, *Brettanomyces nanus* e *S. cerevisiae* -, e fazendo uso de *SYBR-Green Master Mix (Applied Biosystems)*, chegaram a um limite de deteção de 1 UFC/mL.

Em suma, a técnica de qPCR, permitindo a quantificação do número de cópias de DNA, pode ser utilizada para a deteção e quantificação de leveduras de deterioração em amostras de vinho. Ainda assim, pode gerar falsos negativos, dada a presença de substâncias inibitórias nos vinhos, como taninos, polissacarídeos e pigmentos, o que reduz a eficiência da amplificação de DNA (Tessonnière *et al.*, 2009; Longin *et al.*, 2016).

A técnica de qPCR permite quantificar um baixo número de genes-alvo, dado o baixo limite de deteção, ainda que a informação acerca dos limites inferiores de deteção deva ser qualificada, de forma a evitar uma quantificação errónea de DNA presente na amostra (Smith e Osborn, 2009). À semelhança do que ocorre para genes de resistência a antibióticos, descrito por Fortunato *et al.* (2018), para leveduras de deterioração, os limites inferiores de deteção e quantificação podem ser considerados elevados para uma avaliação precisa. Efetivamente, este é um parâmetro crítico para a validação da metodologia no controlo de qualidade de vinhos, visto que, mesmo em baixas concentrações (não detetadas por qPCR) alguns microrganismos de deterioração podem crescer e danificar o vinho. Assim, as subestimações, ou falsos negativos, podem acarretar sérias consequências (Longin *et al.*, 2016).

2.5.2. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (FCM) é uma metodologia individual, qualitativa e quantitativa, baseada na utilização de um laser para a deteção e enumeração de microrganismos numa suspensão líquida (Longin *et al.*, 2017). Estando as células marcadas com sondas fluorescentes específicas, esta técnica permite conhecer o seu estado fisiológico, além de permitir a enumeração de um determinado microrganismo dentro de uma população heterogénea, podendo ser aplicada a patogénicos bem como a microrganismos de deterioração (Longin *et al.*, 2017).

O citómetro de fluxo é composto por 3 componentes principais: fluídico, ótico e eletrónico, como evidenciado pela figura 2.5.2. O componente fluídico é constituído

por uma câmara de fluxo capaz de separar e alinhar as células, dado o regime laminar e estreitamento do tubo verificado. As células atravessam um laser, gerando-se informação relacionada com dispersão da luz e com a emissão de luz por fluorocromos. Efetivamente, estando as células marcadas com um fluoróforo específico, emitem fluorescência e provocam a refração e o espalhamento da luz, a qual é detetada por um complexo sistema de espelhos e filtros, que constituem a componente ótica. A dispersão da luz pode ocorrer para a frente (*Forward Scatter FSC*), sendo proporcional ao tamanho das células, enquanto que a dispersão para os lados, a 90° (*Side Scatter SSC*) está associada à composição estrutural e granularidade, bem como à complexidade celular. Adicionalmente, o citómetro apresenta 2 sinais fluorescentes nas zonas do verde e do vermelho. Face à deteção da fluorescência gerada, esta é convertida em sinais eletrónicos - componente eletrónica - passíveis de serem analisados (Jahan-Tigh *et al.*, 2012; Longin *et al.*, 2017a).

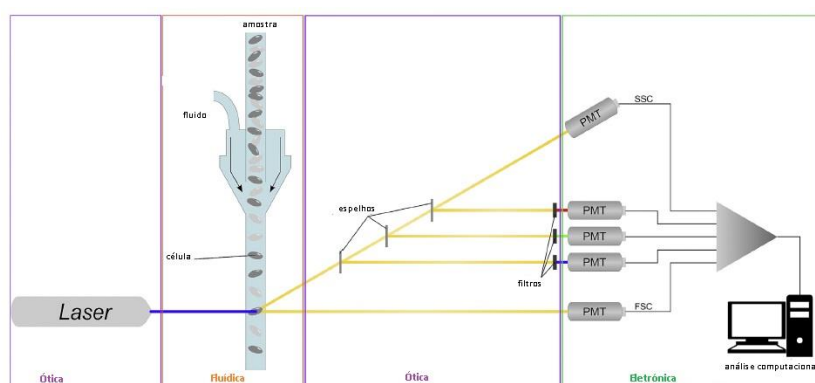


Figura 2.5.2: Composição e funcionamento esquematizado de um citómetro de fluxo (retirado de (Longin *et al.*, 2017)).

A citometria de fluxo é a tecnologia mais utilizada para geração de informações correlativas sobre células individuais dentro de amostras de populações heterogéneas. O gráfico de difusão é a forma mais simples de visualizar a informação gerada. Os eixos do gráfico são designados pelo nome do fluoróforo utilizado e do marcador. Assim, células positivas para os 2 marcadores situar-se-ão no 1º quadrante, enquanto as negativas para ambos encontrar-se-ão no 3º quadrante (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

FCM, além de sensível e reprodutível, permite separar células de interesse com elevada pureza (> 99 %), sendo rápida e altamente específica (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

No entanto, a citometria de fluxo apresenta algumas limitações, sobretudo associadas ao elevado custo, bem como à elevada quantidade de dados gerados, o que

pressupõe uma análise demorada e complexa. Para subpopulações de células com marcadores de expressão semelhantes, a sua diferenciação torna-se complicada, além de que também a normalização da técnica, bem como da análise de dados não estão ainda bem documentados (Jahan-Tigh *et al.*, 2012). Outra limitação comum a muitas outras técnicas corresponde aos falsos negativos passíveis de serem gerados consoante o fluorocromo utilizado (Longin *et al.*, 2017).

A citometria de fluxo já começa a ser aplicada em enologia, para a enumeração dos microrganismos presentes no vinho, nomeadamente leveduras e bactérias. A sua utilização permite determinar a viabilidade celular, bem como a capacidade de performance das fermentações alcoólica e malolática. Adicionalmente, a citometria de fluxo garante a deteção de células VNC, que podem provocar a deterioração futura de vinhos (Longin *et al.*, 2017).

FCM pode também ser utilizada para detetar leveduras de deterioração como *B. bruxellensis*, tendo já sido desenvolvidos testes de imunocitometria com esse propósito (Longin *et al.*, 2017). Já Serpaggi *et al.* (2010) recorreu à junção de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) com FCM para a deteção e quantificação de *B. bruxellensis* diretamente de vinho tinto.

A metodologia FISH-FCM é já considerada uma alternativa real a qPCR. Trata-se de uma técnica bastante rigorosa e sensível. Face à inclusão da metodologia FISH com a citometria de fluxo torna-se possível marcar regiões-alvo de DNA ou RNA, garantindo a identificação e quantificação de microrganismos. A sua aplicabilidade para leveduras, passa pela construção de sondas com afinidade para uma sequência específica da região D1-D2 de 26S rRNA. Para assegurar a hibridação da sonda com a sequência de rRNA, é promovida a permeabilização das células, sendo, posteriormente, adicionadas as sondas marcadas com fluorescência (Serpaggi *et al.*, 2010; Longin *et al.*, 2017).

3. Materiais e métodos

3.1. Microrganismos e condições de cultura

Neste estudo foram utilizadas as leveduras *D. bruxellensis* 21 e 33, isoladas de vinhos pela ESB-UCP. Já para a verificação da deteção de leveduras totais recorreu-se a mosto amuado dessulfitado da Sogrape Vinhos.

Para a deteção e quantificação de *Brettanomyces* os isolados foram inoculados em 3 vinhos tintos produzidos pela Sogrape Vinhos: A, B e C. Os referidos vinhos foram esterilizados por filtração (0,22 µm; Filter-Lab), encontrando-se pormenorizadamente descritos no apêndice A. O meio de cultura utilizado para o crescimento das referidas estirpes foi desenvolvido pela Sogrape em parceria com a ESB-UCP.

O crescimento de leveduras totais foi promovido em *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD), cuja composição se encontra descrita no apêndice B.

As amostras foram incubadas numa estufa (*Memmert*) a 28 °C. A incubação associada ao teste de *Brettanomyces* foi realizada durante 10 dias, enquanto, para leveduras totais, apenas foram necessárias 48 horas.

Para a preservação das estirpes foi preparado meio de cultura YEPD duplamente concentrado, ao qual foi adicionado glicerol a 30 % (v/v) na proporção de 1:1. A solução foi distribuída em micro tubos (1 mL) estéreis, sendo a estirpe posteriormente ressuspendida. As amostras foram conservadas a - 80 °C em triplicado (López *et al.*, 2013) .

Todos os ensaios foram realizados numa câmara de fluxo laminar (*Faster BH-EN* 2003).

Além das matrizes de vinho utilizadas para os ensaios, foram também avaliadas amostras de vinhos da Sogrape, sem inoculação prévia de microrganismos de forma a validar a eficiência das metodologias testadas em casos de contaminação real. Assim, para a análise de *Brettanomyces*, foram recolhidas amostras positivas após enriquecimento com meio de cultura, estando as mesmas descritas no apêndice A.

3.2. Curva de crescimento de *D. bruxellensis* 21

A curva de crescimento de *D. bruxellensis* 21 foi efetuada em condições de aerobiose. Inicialmente promoveu-se o crescimento da estirpe em meio seletivo sólido, sendo incubada a 28 °C, durante 10 dias.

Do inóculo inicial foi preparada uma suspensão, em 10 mL de solução salina, com densidade ótica de 0,5 (a 600 nm). O volume foi transferido integralmente para um matraz com 0,5 L de meio de cultura seletivo líquido.

As amostras foram recolhidas em duplicado para a quantificação. Foi realizada a leitura da densidade ótica (DO) a 600 nm num espectrofotómetro (V-630, *Jasco*) ao longo do tempo, tendo sido utilizado como branco o meio seletivo que serviu de matriz para o ensaio.

A taxa de crescimento específica foi obtida de acordo com a metodologia matemática descrita no apêndice C.1 (Werner-Washburne *et al.*, 1993; Couto *et al.*, 2005).

3.3. Quantificação de microrganismos

A quantificação das estirpes em análise seguiu diferentes procedimentos. Para a enumeração de leveduras totais foi utilizada a metodologia de contagem em placa do número de unidades formadoras de colónias (UFC/mL). Já para *D. bruxellensis*, a contagem foi conseguida através de microscopia de fluorescência com utilização do corante fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), sendo a mesma confirmada através da utilização da câmara de *Neubauer*.

3.3.1. Enumeração de microrganismos cultiváveis

Para a quantificação de leveduras totais foi realizada uma reta de calibração, de forma a fazer corresponder a densidade ótica (DO) ao número de colónias formadas no meio de cultura adequado ao seu crescimento (UFC/mL).

Inicialmente as leveduras totais foram isoladas de mosto amuado dessulfitado, por filtração de membrana. Seguidamente foram preparadas suspensões da mistura de leveduras obtida em salina (0,85 % NaCl), de forma a obter vários pontos com

densidades óticas compreendidas entre 0,1 e 0,9 (600 nm)(Tofalo *et al.*, 2012; Wahid *et al.*, 2015).

Para cada DO obtida foram realizadas diluições decimais seriadas, sendo posteriormente plaqueadas, em duplicado, em meio YEPD agar, conforme apresentado na tabela 3.3.1.

Tabela 3.3.1: Correspondência entre a DO (600 nm) e as diluições plaqueadas de leveduras totais isoladas de mosto dessulfitado.

DO (600 nm)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	0,9
Diluições	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²
plaqueadas	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴

As placas foram incubadas a 28 °C durante 48 horas e, posteriormente, foi realizada a enumeração das colónias de forma a obter UFC/mL.

A reta de calibração serviu de base para a determinação preliminar da concentração pretendida para os ensaios abaixo referenciados.

3.3.2. Concentração de microrganismos totais por microscopia de epifluorescência

A reta de calibração de *D. bruxellensis* 21 teve por base a enumeração de microrganismos através de microscopia de fluorescência. A quantificação foi efetuada através da utilização do corante fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI).

À semelhança do anteriormente descrito, a estirpe foi cultivada em meio seletivo sólido e, após 10 dias, a biomassa foi utilizada para preparar suspensões em solução salina, com densidades óticas (600 nm) compreendidas entre 0,1 e 0,9. As suspensões foram homogeneizadas por *vortex*. Após a montagem da coluna de filtração por vácuo, utilizando membranas filtrantes de polycarbonato ($\Phi = 0,22 \mu\text{m}$, $d = 25 \text{ mm}$; Merck), filtraram-se os volumes descritos na tabela 3.3.2.

Tabela 3.3.2: Correspondência entre a DO (600 nm) e o volume necessário para a contagem de *D. bruxellensis* 21 por microscopia de epifluorescência.

DO (600 nm)	Fator diluição	Volume (µL)
0,1	1	500
0,2	1	500
0,3	1	250
0,5	10	500
0,6	10	500
0,7	10	250
0,8	100	500
0,9	100	500

Após a filtração da amostra, as células foram cobertas com DAPI (0,1 mg/mL; Merck) à qual se seguiu uma incubação durante 10 minutos no escuro. Por fim, filtrou-se o excesso de corante e as amostras foram preparadas para a visualização ao microscópio com sistema de epifluorescência (*Nikon DS-Qi2*) com filtro UV. A contagem foi realizada com a objetiva 100x, tendo sido retiradas imagens de 10 campos representativos. A enumeração de microrganismos totais foi obtida por intermédio da equação C.2.1, descrita no apêndice C.2.

3.3.3. Contagem de leveduras através da câmara de *Neubauer*

A câmara de *Neubauer* (*Sigma-Aldrich*) foi utilizada com o intuito de determinar com maior exatidão a concentração das células em análise.

Inicialmente foi preparada uma suspensão homogénea de *D. bruxellensis* 21 em solução salina. Em seguida, procedeu-se à determinação da densidade ótica (600 nm). A partir da reta de calibração previamente elaborada tornou-se possível prever a concentração em células/mL. Tipicamente, a gama de concentração para a contagem celular exata utilizando uma câmara de *Neubauer* situa-se entre $2,5 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^6$ células/mL. Deste modo, para concentrações elevadas as suspensões foram diluídas, de forma a impedir a sobreposição celular (Bastidas, 2008).

Por último pipetou-se 20 µL da suspensão na câmara de *Neubauer*, procedendo-se, então, à contagem no microscópio ótico (*Nikon Elipse*), utilizando a objetiva de 40x.

Os cálculos para a contagem de microrganismos totais estão descritos no apêndice C.3.

3.4. Análise por PCR quantitativo

Inicialmente foi preparada uma suspensão-mãe de *D. bruxellensis* 21 em solução salina. Em seguida, com base na DO (600 nm), foi realizada a correspondência em células/mL, por intermédio da reta de calibração. Após a verificação da correspondência da concentração celular na suspensão-mãe através da câmara de *Neubauer*, foram preparadas várias alíquotas com diferente concentração de células totais inoculadas em 2 das matrizes de vinho referidas (A e B), conforme descrito na tabela 3.4.1.

Tabela 3.4.1: Descrição da concentração de células totais testadas nos ensaios de deteção e quantificação de *D. bruxellensis* 21 em matrizes de vinho tinto estéril por qPCR aplicadas aos kits comerciais 1 e 2 (*os valores apresentados correspondem a LOQ e LOD, respetivamente, de acordo com a informação fornecida pelo fabricante).

	Volume de extração DNA	Concentração inoculada (células/mL)				
		27/50*	200	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
<i>Kit 1</i>	1,8 mL	27/50*	200	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
	45 mL	1/8*				
<i>Kit 2</i>	1 mL	100		10 ³	10 ⁴	10 ⁵

Além das amostras descritas foi também testada a interferência da matriz na extração de DNA por inoculação de 200 e 10⁴ células/mL em solução salina, para os kits 1 e 2, respetivamente. Foi ainda avaliada a sua especificidade por inoculação de 200 e 10⁴ UFC/mL de leveduras isoladas de mosto dessulfitado na matriz B. Paralelamente, foi avaliada a quantificação de células mortas submetendo uma suspensão de 10⁴ células/mL de *Brettanomyces* a um tratamento térmico (65 °C, 10 minutos).

O ensaio de qPCR foi realizado em duplicado ambas as matrizes referenciadas nas concentrações descritas.

A extração de DNA das amostras em análise foi efetuada em duplicado por intermédio dos kits A e B, de acordo com as instruções do fabricante.

A extração de DNA por intermédio do *kit* A contempla uma etapa inicial de lavagem e concentração dos microrganismos presentes no vinho. Segue-se a fase de lise celular e, posteriormente, a purificação de DNA por intermédio de uma coluna cromatográfica. Já o *kit* B contempla também uma etapa de lavagem, sendo a lise celular efetuada posteriormente, no equipamento de qPCR disponibilizado pela marca, através da enzima liticase, imediatamente antes da amplificação de DNA.

O *kit* A permite a extração a partir de 1,8 ou 45 mL de amostra. O DNA assim extraído foi analisado por qPCR, recorrendo ao *kit* 1. A análise foi realizada no equipamento de PCR quantitativo da mesma marca (empresa I), com utilização da reta de calibração associada (declive= -3,284; eficiência= 101,6 %; $R^2= 1,000$). Os resultados foram devolvidos em UFC/mL.

Já o *kit* B recorreu a 1 mL de amostra para a extração de DNA. Para este *kit* foi também avaliada a interferência da inoculação de *D. bruxellensis* 21 proveniente de cultura em placa ou de meio líquido, por inoculação de 10^4 células/mL em solução salina e no vinho B. Procedeu-se ainda à comparação da eficiência de extração de DNA, sendo avaliados os 2 *kits* já referidos, bem como um novo protocolo sugerido pela empresa II (ainda em fase de teste) (*kit* C) e um *kit* geral de extração de DNA de leveduras (*kit* D). A comparação foi efetuada através da inoculação de 10^4 células/mL na matriz B. Por último, foi também realizado um tratamento térmico (65 °C, 10 min) numa suspensão de 10^4 células/mL na matriz B. O DNA foi analisado através do *kit* 2. A quantificação foi efetuada com base na elaboração de uma reta de calibração recorrendo ao *Standard Kit* disponibilizado pela mesma marca. Para a determinação de LOD e LOQ foram realizadas 5 diluições decimais seriadas a partir dos *standards* fornecidos, desde 8×10^6 até 80 UFC/mL. As amostras foram analisadas através do *software* e equipamento de qPCR do mesmo fornecedor.

Para todos os *kits* utilizados foi preparado um controlo negativo, correspondente ao vinho em análise após filtração (0,22 μ m; *Filter-Lab*).

3.5. Análise por citometria de fluxo

Para a deteção e quantificação de *Brettanomyces* por citometria de fluxo foi utilizado o *kit* 3. O *kit* referido faz uso de várias sondas-alvo para diferentes regiões conservativas de 18S rRNA de *Brettanomyces*, permitindo, desta forma, a diferenciação entre células metabolicamente ativas e inativas (assumidas como vivas e mortas, respetivamente).

A análise foi efetuada no equipamento de citometria de fluxo disponibilizado pela mesma marca, estando equipado com um laser azul de 488 nm e 2 sinais fluorescentes - FL1, atuando ao nível da fluorescência verde (~ 530 nm), e FL3 associado à fluorescência na zona do vermelho (\geq 630 nm). A obtenção e tratamento de dados foram conseguidos por intermédio dos *softwares* aconselhados pelo fornecedor.

A referida metodologia foi utilizada para a análise de amostras de *D. bruxellensis* 21 com concentrações iguais às testadas com o *kit* 1, conforme descrito na tabela 3.4.1 (a partir de 50 células/mL), nas matrizes A e B. Adicionalmente foi também testada a concentração de 10 células/mL.

Além das amostras descritas foi avaliada a inoculação de 10^4 células/mL de *D. bruxellensis* 21 em solução salina. Para avaliar a especificidade do método inoculou-se 10^4 UFC/mL da mistura de leveduras isoladas de mosto dessulfitado no vinho B. Paralelamente, foi também avaliada a interferência de algumas medidas de correção de vinhos empregues ao nível da indústria vitivinícola. Assim, foi efetuado um tratamento térmico (65 °C, 10 minutos) no vinho B inoculado com 10^4 células/mL, bem como adição de bissulfito de potássio (15 % v/v) (*Gaisin*), por forma a obter 51 mg/L de SO₂ livre. Foi ainda testada a influência da inoculação de 10^4 células/mL provenientes de meio líquido ou de cultura em placa nos resultados obtidos.

Como controlo negativo foram utilizadas as matrizes de vinho A e B, submetidas a um processo de filtração (0,22 μ m; *Filter-Lab*). A extração foi realizada em duplicado.

3.6. Análise por teste olfativo - determinação da concentração de *D. bruxellensis* 21 para a produção de fenóis voláteis

O teste olfativo foi realizado de acordo com a metodologia atualmente utilizada pela Sogrape Vinhos para a deteção de *Brettanomyces* em vinhos tintos.

Inoculou-se *D. bruxellensis* 21 na matriz C, de forma a obter concentrações de 1, 8, 15, 27, 50, 100, 200 1000, 1500, 10^4 e 10^5 células/mL. Cada suspensão (40 mL) foi misturada com igual volume de meio de cultura seletivo de *Brettanomyces* em frascos de 100 mL de volume. Os frascos foram incubados na estufa a 28 °C durante 10 dias. No fim do período de incubação, foi realizado o teste olfativo por 2 pessoas treinadas do laboratório da Sogrape Vinhos, tendo como finalidade a deteção de fenóis voláteis.

Paralelamente, foi realizada a quantificação de fenóis voláteis por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) (*Scion TQ 436-GC, Bruker*), a fim de determinar a concentração de fenóis voláteis presentes no vinho aquando da deteção por teste olfativo. Para tal, adicionou-se a 10 mL de amostra, 100 µL de padrão interno (4-decanol, 2 ppm). A quantificação de fenóis voláteis foi realizada em duplicado, tendo sido utilizado vinho branco (Bipea) como padrão para a quantificação.

4. Resultados e discussão

4.1. Curva de crescimento de *D. bruxellensis* 21

A monitorização da DO (600 nm) ao longo de 150 horas, permitiu a elaboração parcial da curva de crescimento característica de *D. bruxellensis* 21, em escala semi-logarítmica, conforme apresentado na figura 4.1.1.

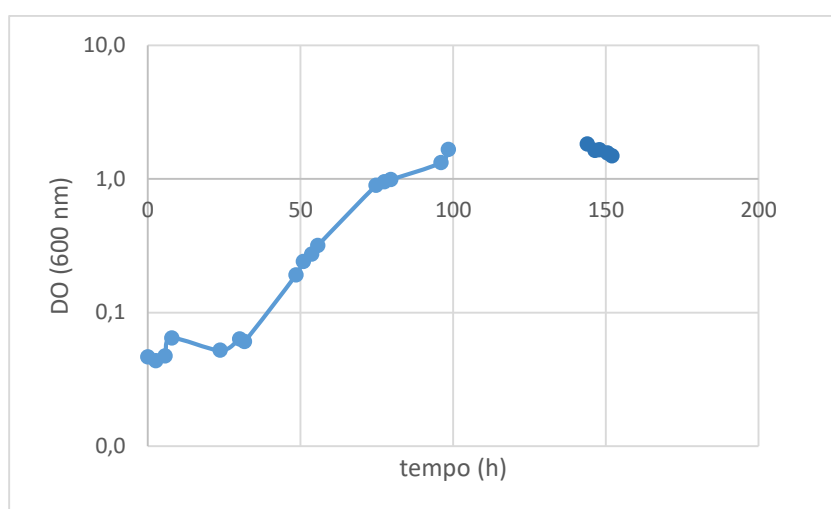


Figura 4.1.1: Curva de crescimento de *D. bruxellensis* 21 em meio seletivo obtida por medição da DO (600 nm) ao longo do tempo em escala semi-logarítmica (azul claro - crescimento celular; azul escuro - morte celular).

Apesar de não ter sido possível determinar os valores de DO entre as 99 e as 142 horas, foi possível estimar que a entrada em fase estacionária tenha ocorrido entre 4 e 5 dias. De facto, são diversas as evidências de crescimento exponencial de *Brettanomyces* até 3 a 10 dias, variando conforme a estirpe em análise (Louw *et al.*, 2016; Malfeito-Ferreira, 2018).

Adicionalmente, verificou-se uma ligeira redução da DO após 140 horas, podendo estar associado à entrada em fase de morte celular. Outra possível justificação prende-se ao fenómeno de agregação verificado aquando da entrada na fase estacionária. De facto, as elevadas absorvâncias lidas no final da fase exponencial de crescimento afetam a precisão da leitura, causando variabilidade (Jung *et al.*, 2015; Louw *et al.*, 2016).

Por intermédio da linearização da curva de crescimento obtida (figura 4.1.2), distinguem-se 3 fases: latência, exponencial e morte ou estacionária. Para o ensaio realizado a fase de latência teve uma duração de 22,8 horas, sendo, portanto, comparável com uma medição em vinho, sem adição de dióxido de enxofre (22,4 horas) (Avramova *et al.*, 2018). A taxa de crescimento específica obtida foi de $0,05 \text{ h}^{-1}$ para a estirpe em análise, estando na mesma ordem de grandeza dos valores evidenciados na literatura. Efetivamente, Avramova *et al.* (2018) chegou a taxas máximas de crescimento para estirpes de *Brettanomyces*, entre $0,07$ e $1,1 \text{ h}^{-1}$, em meio YEPD suplementado com cloranfenicol, bifenil e cicloheximida.

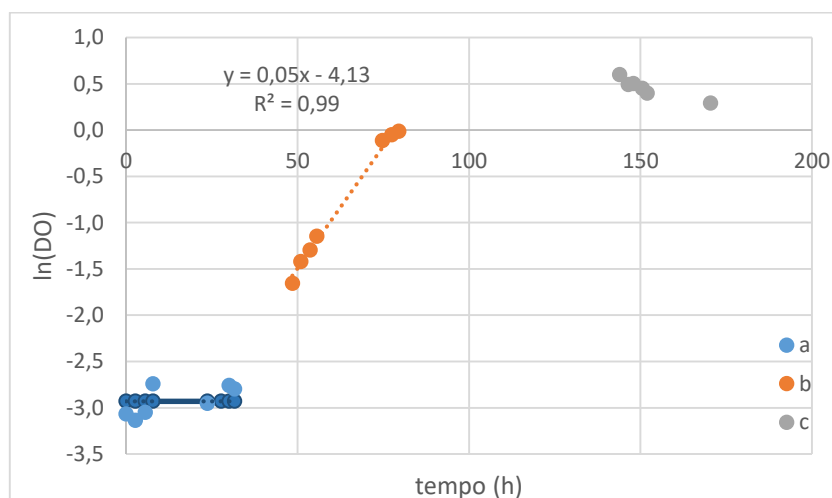


Figura 4.1.2: Linearização da curva de crescimento obtida para *D. bruxellensis* 21: (a) fase de latência; (b) fase exponencial; (c) fase estacionária ou de morte celular.

A determinação da curva de crescimento de *D. bruxellensis* 21 serviu para averiguar o período necessário para atingir a fase exponencial. Desta forma, a repicagem da cultura em meio líquido torna-se mais facilitada. Adicionalmente é assegurada a ausência de fatores de *stress*, aquando da inoculação da estirpe em vinho para os vários ensaios efetuados.

4.2. Quantificação de microrganismos

Para a quantificação de *Brettanomyces*, a correlação entre DO e UFC/mL foi inconclusiva, não tendo sido visualizada a presença de colónias em meio sólido seletivo no final do período de incubação para nenhuma das estirpes disponíveis (21 e 33). Este resultado pode ser justificado com base no lento crescimento das estirpes, associado a requerimentos nutricionais fastidiosos (Oelofse *et al.*, 2008).

Como alternativa, recorreu-se a técnicas de microscopia de fluorescência para a enumeração de microrganismos, conseguindo desta forma estabelecer a correspondência entre DO e células totais/mL. A quantificação do número total de células da amostra foi efetuada com recurso ao corante DAPI, capaz de corar DNA celular. O DAPI tem uma elevada foto estabilidade, permitindo contabilizar o número de núcleos, através das interações electrostáticas que estabelece com as regiões de DNA ricas em adenosina-timina. Ainda assim, esta metodologia tem como limitação o facto de não diferenciar células viáveis de não viáveis ou mortas (Tarnowski *et al.*, 1991; Chazotte, 2011).

A partir da visualização das estirpes de *Brettanomyces* por microscopia tornou-se evidente a heterogeneidade da população apontando para células em diferentes fases de desenvolvimento. Efetivamente, foi notória a presença de células elíticas, típica de leveduras. Ocasionalmente, observaram-se também células com separação incompleta, formando uma estrutura alongada designada de pseudomicélio, conforme descrito por Louw *et al.* (2016). Estas estruturas consistem na alongação celular, devido a um atraso no desenvolvimento durante a fase G2/M, que tanto pode ser provocado pela limitação de azoto (para células diploides), como de glucose (para haploides).

Com base na enumeração de *D. bruxellensis* 21 por microscopia de fluorescência foi obtida a reta de calibração evidenciada na figura 4.2.1.

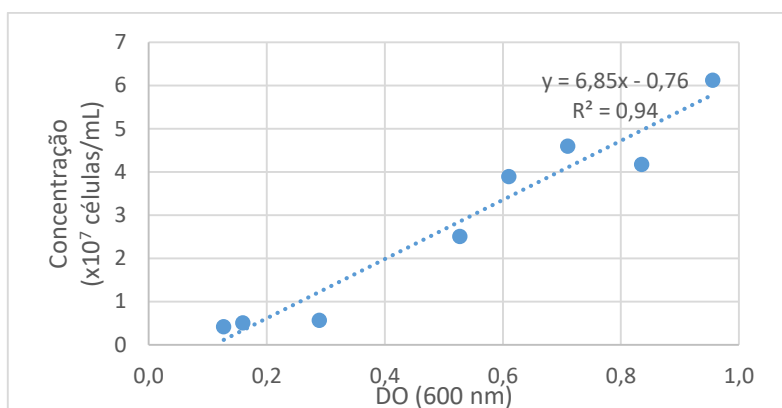


Figura 4.2.1: Relação entre DO (600 nm) e a concentração em células/mL obtida por microscopia de fluorescência para *D. bruxellensis* 21.

Para a deteção de leveduras totais, o crescimento em placa foi bem sucedido, pelo que serviu de base para a elaboração da respetiva reta de calibração (figura 4.2.2).

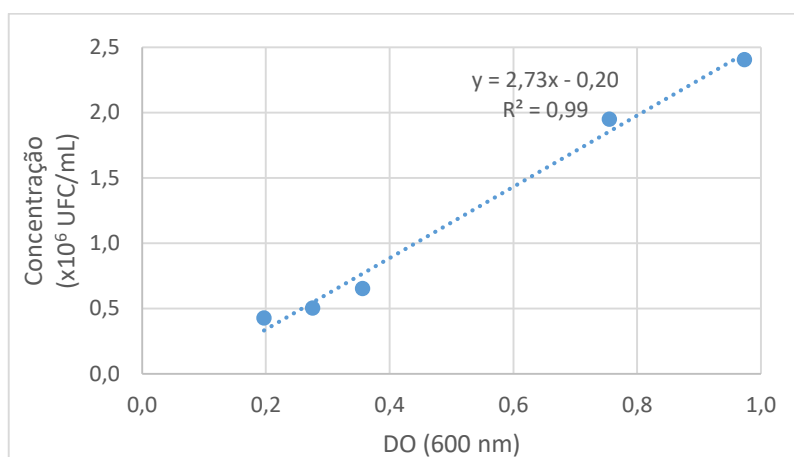


Figura 4.2.2: Relação entre DO (600 nm) e a concentração de células cultiváveis em UFC/mL obtida por cultura em placa para o conjunto de leveduras extraídas de mosto amuado dessulfitado.

Face ao coeficiente de correlação da reta de calibração obtida para *D. bruxellensis* 21, é possível inferir que a sua utilização para a determinação da concentração celular é inadequada, dado o erro grosseiro que se faz associar. Assim, esta reta serviu apenas para uma estimativa inicial da concentração celular, sendo a mesma determinada com maior rigor por utilização de câmara de *Neubauer*.

4.3. Análise por PCR quantitativo

Após a preparação das suspensões de *D. bruxellensis* 21 nos vinhos A e B estéreis às concentrações discriminadas na tabela 3.4.1 (secção 3.4 dos materiais e métodos) realizou-se a análise por qPCR, obtendo-se a quantificação conforme discriminado na tabela D.1 (apêndice D). Os resultados obtidos foram sumariados na figura 4.3.1.

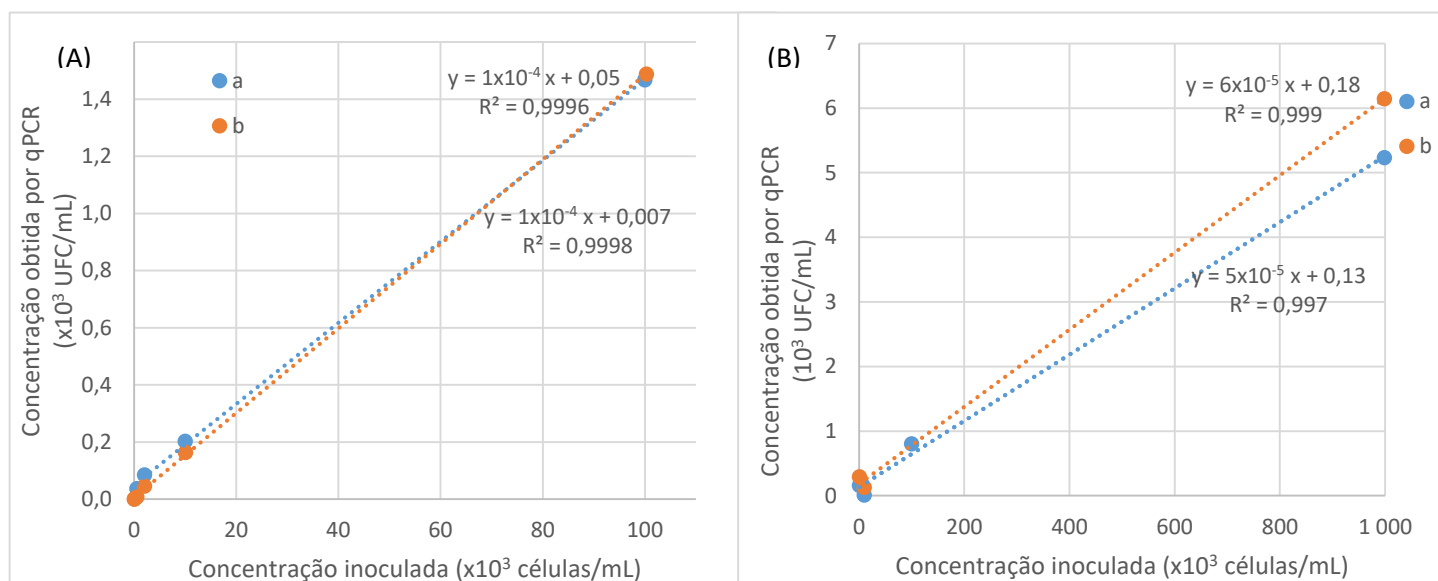


Figura 4.3.1: Quantificação de *D. bruxellensis* 21 por qPCR de acordo com a concentração inoculada nos diferentes vinhos. (A) Kit 1 a partir da extração de DNA (a) de 1,8 mL e (b) de 45 mL de vinho A inoculado com concentrações conhecidas de *D. bruxellensis* 21; (B) Kit 1 a partir de 1 mL de vinho A (a) e de vinho B (b) com concentrações conhecidas de *D. bruxellensis* 21.

Com base na figura é evidente a relação de linearidade entre as concentrações inoculadas e detetadas por qPCR. Todavia, nenhum dos kits comerciais de PCR quantitativo permitiu a determinação exata das concentrações inoculadas, sendo as concentrações detetadas cerca de 100 vezes mais reduzidas face às inicialmente inoculadas no vinho.

São vários os autores que apontam para a complexidade da matriz como uma problemática do método de qPCR na indústria vitivinícola, realçando os taninos, polissacarídeos e pigmentos como compostos capazes de inibir a DNA polimerase, produzindo falsos negativos (Delaherche *et al.*, 2004; Savazzini e Martinelli, 2006; Tessonnière *et al.*, 2009; Tofalo *et al.*, 2012). Por essa razão, foi também procurado

testar a interferência de diferentes matrizes na deteção e quantificação do método abordado (figura 4.3.2). Assim, foram utilizados os vinhos A e B, procurando com o último referido a avaliação de uma matriz de maior complexidade, dada a maior riqueza em fenóis totais. Como controlo utilizou-se uma suspensão preparada em solução salina. A análise dos vinhos utilizados como matriz encontra-se pormenorizadamente descrita no apêndice A.

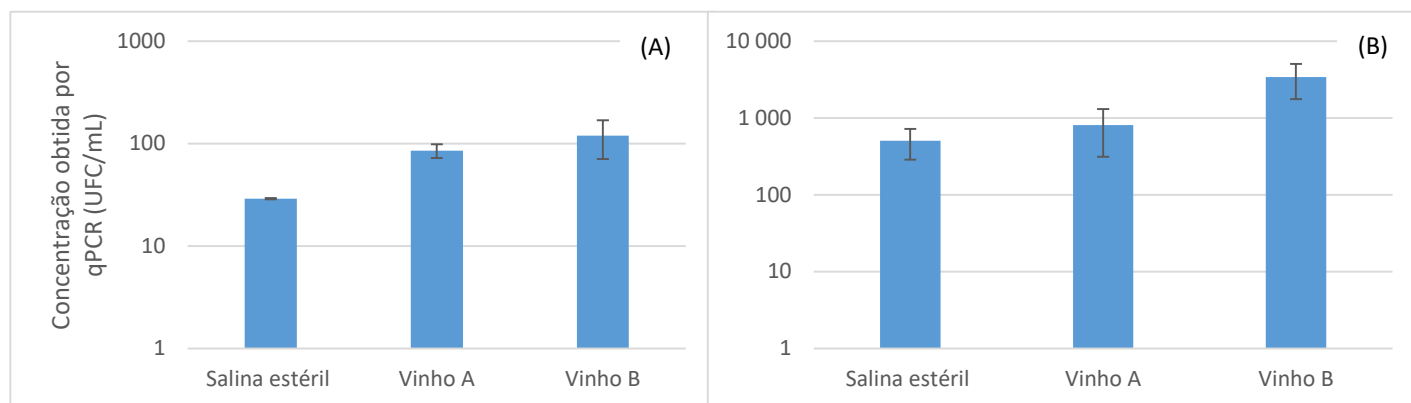


Figura 4.3.2: Determinação da interferência de diferentes matrizes nos protocolos de extração de DNA: (A) *Kit A* a partir de 1,8 mL de amostra (B) *Kit B*. As suspensões continham 200 e 10^4 células/mL, em (A) e (B), respetivamente.

Com base nos resultados da figura 4.3.2, verifica-se que a concentração média amplificada por qPCR tende a reduzir com a menor complexidade da matriz, ainda que os resultados estejam dentro da mesma ordem de grandeza. A variância de resultados para cada uma das matrizes não permitiu estabelecer nenhum tipo de relação entre a sua complexidade com a eficiência na extração de DNA. Tessonnière *et al.* (2009) chegou a uma conclusão semelhante, ao verificar que a eficiência e o coeficiente de correlação das retas de calibração efetuadas para qPCR usando como matrizes solução salina e vinho tinto não foram significativamente distintas.

A subestimação de *Brettanomyces* obtida por qPCR poderá estar relacionada com as etapas de lavagem no processo de extração de DNA. Adicionalmente, a própria colmatação da coluna cromatográfica, pode ser um passo limitante no *kit A* (Katevatis *et al.*, 2017).

A subestimação pode também associar-se ao meio de proveniência do inóculo utilizado para a preparação das suspensões com as concentrações desejadas. Assim, foi promovida a preparação de suspensões com 10^4 células/mL em 2 matrizes distintas

- B e salina - utilizando *D. bruxellensis* 21 proveniente de cultura em placa e de meio líquido, conforme evidenciado na figura 4.3.3.

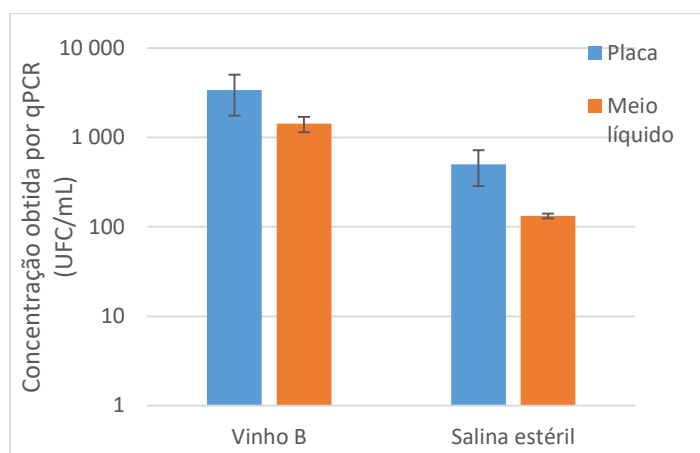


Figura 4.3.3: Determinação da interferência do meio de proveniência de *D. bruxellensis* 21 na quantificação obtida pelo *kit* 2, usando como matrizes solução salina e o vinho B inoculadas com 10^4 células/mL.

Por análise do gráfico verifica-se que a menor complexidade da matriz conduz a uma subestimação mais acentuada da concentração inoculada. Provavelmente, o resultado obtido deverá estar relacionado com a especificidade do *kit* para a extração de DNA a partir de vinho. Quanto à proveniência celular, é notória uma quantificação mais elevada para a estirpe proveniente de cultura em placa comparativamente ao meio líquido, ainda que os resultados estejam dentro da mesma ordem de grandeza. Seria expectável que as células provenientes de meio líquido, estando em crescimento exponencial, tivessem uma maior capacidade de adaptação, traduzindo-se numa quantificação mais exata por qPCR. Os resultados obtidos poderão relacionar-se com a heterogeneidade celular associada ao crescimento em placa.

Segundo Dimopoulou *et al.* (2019) a presença de sulfitos, necessários para a proteção dos vinhos de oxidações e contaminação microbiológica, aumenta a permeabilidade das células, contribuindo para a rutura celular, o que poderá também estar relacionado com a subestimação verificada.

Foi também avaliada a eficiência dos *kits* de extração de DNA disponibilizados e o seu potencial envolvimento na subestimação obtida por qPCR. Para tal foram utilizados 4 protocolos de extração distintos, conforme apresentado na figura 4.3.4, os quais foram utilizados para a extração de DNA de uma mesma amostra (10^4 células/mL).

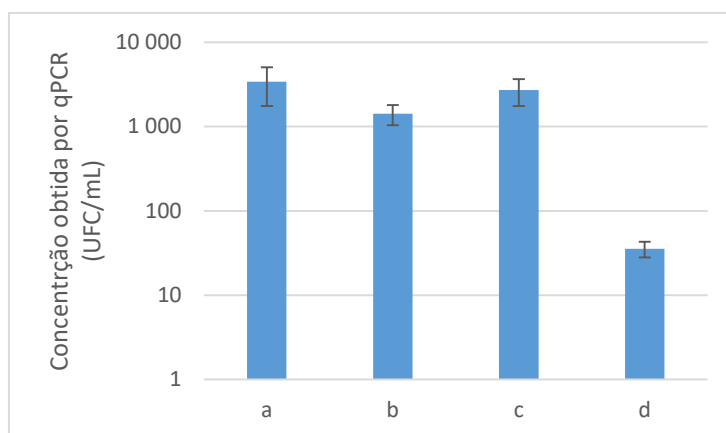


Figura 4.3.4: Avaliação da influência de diferentes kits de extração de DNA na amplificação de *D. bruxellensis* 21 (10^4 células/mL) por utilização do kit 2 de qPCR : (a) Kit B; (b) novo protocolo em fase de teste (Kit C); (c) Kit A; (d) Kit D.

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que, em todos os casos, a concentração contabilizada por qPCR continua inferior à concentração inoculada em uma ordem de grandeza, com exceção do protocolo D. Para o último referido a extração foi mais ineficiente, evidenciando 3 ordens de grandeza abaixo da concentração inoculada. A discrepância poderá estar relacionada com a especificidade do kit para a extração de DNA a partir de fungos desenvolvidos em placa. Apesar dos fungos serem também eucariotas, o protocolo utilizado pressupunha uma massa inicial de 100 mg, bastante superior comparativamente à concentração analisada (0,8 mg).

Adicionalmente, a presença de SO_2 nas matrizes de vinho utilizadas poderá também ser uma potencial causa para a subestimação detetada.

Por forma a avaliar a reprodutibilidade do processo de extração de DNA foram realizadas extrações em triplicado e duplicado, para os kits 1 e 2, respetivamente. Os resultados obtidos estão evidenciados na figura 4.3.5.

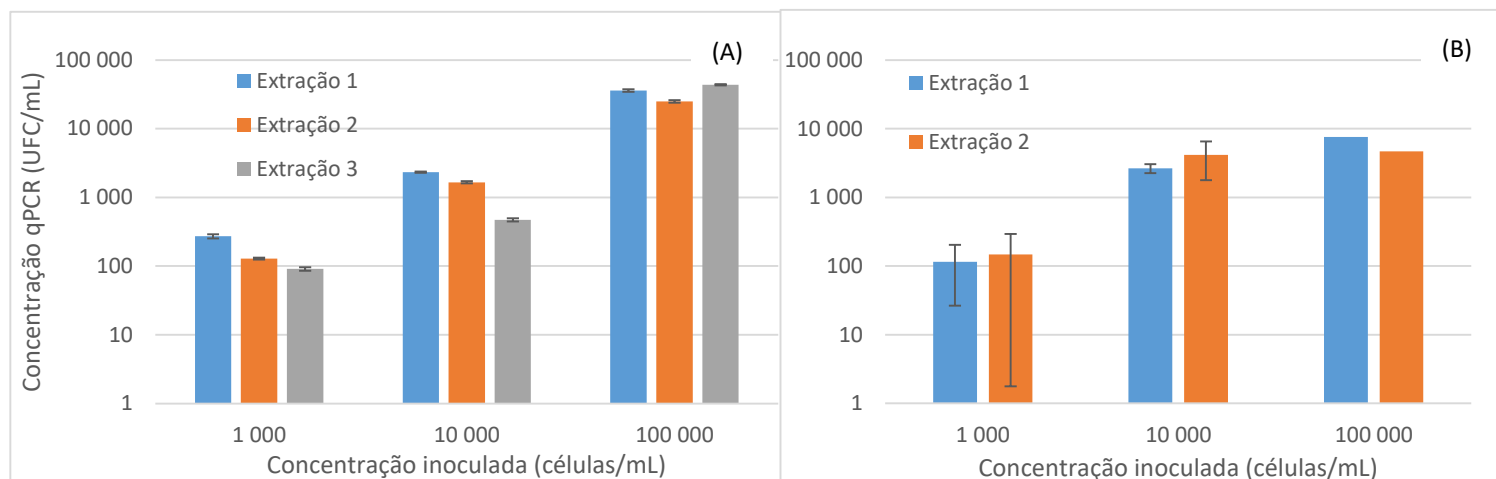


Figura 4.3.5: Avaliação da reprodutibilidade da extração de DNA obtida por: (A) *Kit 1* a partir de 45 mL de suspensões de *D. bruxellensis* 21 inoculadas na matriz A; (B) *Kit 2* a partir de 1 mL de amostra inoculada na matriz B.

Por análise do gráfico, verifica-se que diferentes extrações de uma mesma amostra conduzem a uma quantificação distinta, ainda que na mesma ordem de grandeza. A exceção apenas se verifica para uma das extrações realizada para 10^4 células/mL com o *kit* de extração A. De facto, Longin *et al.* (2016) além de realçar a imprecisão da quantificação da população em análise por intermédio de 3 *kits* comerciais, verificou também a variabilidade de rendimentos de extração de DNA. Também Tessonnière *et al.* (2009) verificou uma grande variância associada à extração de uma mesma amostra de DNA, o que reflete a problemática de repetibilidade da análise de populações de *Brettanomyces* em vinho. Efetivamente, a técnica de qPCR não pode ser utilizada para uma quantificação exata, mas apenas como aproximação para a determinação da magnitude (ordem de grandeza) da contaminação.

Por utilização dos diferentes equipamentos de qPCR, disponibilizados pelas empresas I e II, verificou-se que a mesma amostra (10^4 células/mL) devolveu uma mesma quantificação - 280 ± 54 e 242 ± 61 UFC/mL, respetivamente. Assim, apesar das diferentes retas de calibração que servem de base para a quantificação, dos *primers* utilizados, bem como dos programas de amplificação, a quantificação está padronizada para os 2 equipamentos em estudo.

Atendendo aos limites de deteção e quantificação, o *kit* comercial 1 considera LOD e LOQ de 1 e 8 UFC/mL, a partir do protocolo de extração de DNA de 45 mL e 27 e 50

UFC/mL para o protocolo efetuado a partir de 1,8 mL de amostra, respetivamente. Relativamente aos limites de quantificação descritos, a sua inoculação conduziu a concentrações mais reduzidas do que as referidas ($2,6 \pm 1,6$ e $40,9 \pm 16,6$ UFC/mL para os protocolos de 45 e 1,8 mL, respetivamente). Já para os limites de deteção houve predominância de falsos negativos (8 em 12). Estes resultados vêm de encontro ao descrito por Portugal e Ruiz-Larrea (2013), o qual verificou que populações de leveduras com concentrações inferiores a 100 UFC/mL podem conduzir a falsos negativos. Este problema acaba por afetar a fiabilidade do *kit* testado, na medida em que falsos negativos afetam a decisão do enólogo, e, conseqüentemente, poderão desencadear a deterioração do vinho em garrafa.

Para o *kit* 2, foi elaborada uma reta de calibração entre 8×10^6 e 80 UFC/mL através do *Standard kit* associado. Atendendo à reta de calibração obtida (declive=-3,53; eficiência= 92 %; $R^2=0,9977$; erro=0,304), o limite de quantificação obtido foi de 80 UFC/mL. Já o limite de deteção chegou a 13 UFC/mL.

O estudo procurou também testar a especificidade dos *kits* comerciais, por inoculação, de uma mistura de leveduras isoladas de mosto amuado dessulfitado. Tratando-se de mosto, é expectável que a mistura contenha a microbiota presente na película dos bagos, juntamente com a estirpe selecionada para a fermentação na Sogrape Vinhos - *S. cerevisiae* QA23. Do teste efetuado no equipamento da empresa I, por intermédio do protocolo de extração A, não foram devolvidos resultados positivos, o que aponta para a especificidade dos *primers* utilizados para a amplificação de DNA de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. Já com o equipamento do fornecedor do *kit* 2 verificou-se amplificação quer a partir do protocolo de extração A (30 UFC/mL) como do B (101 ± 63 UFC/mL). Desta forma, conclui-se que os *primers* utilizados no *kit* 2 não são específicos para a estirpe em análise, sendo que, provavelmente, amplificam uma região comum a outro tipo de microrganismo.

Por análise de uma suspensão de 10^4 células/mL de *D. bruxellensis* 21 após tratamento térmico (65 °C, 10 minutos), foram obtidas concentrações de $(2,5 \pm 0,2) \times 10^3$ e $(1,3 \pm 1,1) \times 10^3$ UFC/mL, a partir dos *kits* de extração A e B, respetivamente. Os resultados obtidos são expectáveis, já que uma quantificação a partir de DNA não permite diferenciar células vivas de mortas (Neeley *et al.*, 2005; Tofalo *et al.*, 2012).

4.4. Análise por citometria de fluxo

A metodologia de citometria de fluxo evidencia uma relação de linearidade entre a concentração de *D. bruxellensis* 21 inoculada e quantificada no equipamento (figura 4.4.1), também assegurada pelo fornecedor entre 150 e 10⁵ células/mL (Anonymous (Sysmex Partec), 2019). Os valores obtidos encontram-se discriminados no apêndice D (figura D.2).

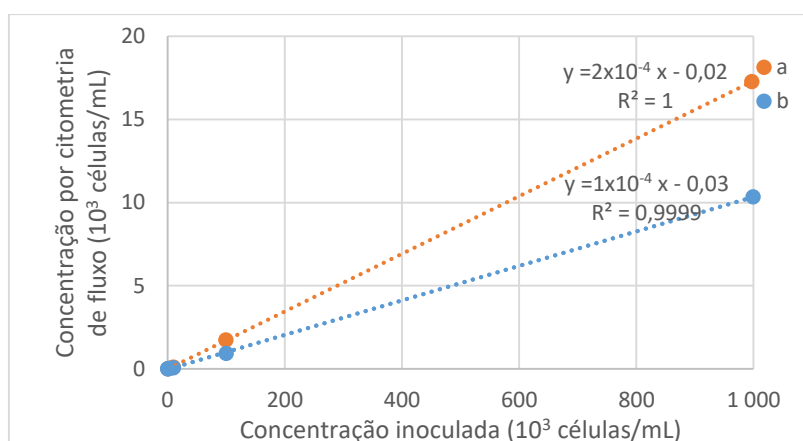


Figura 4.4.1: Quantificação de *D. bruxellensis* 21 por citometria de fluxo de acordo com a concentração inoculada nas diferentes matrizes de vinho (a) vinho A (b) vinho B.

Ainda que as concentrações devolvidas sejam inferiores às inoculadas, por comparação com os equipamentos de qPCR testados, verifica-se que, para a citometria de fluxo, a subestimação é ligeiramente inferior (de apenas 10 vezes). De acordo com Serpaggi *et al.* (2010), os compostos fenólicos impedem que as sondas FISH penetrem nas células, podendo esta ser uma possível razão para a subestimação evidente. Adicionalmente, Peluso *et al.* (2014) verificou que os flavonóides podem interferir com o sinal e a deteção das sondas fluorescentes por citometria de fluxo. Efetivamente, é notório que a menor complexidade do vinho A devolve concentrações ligeiramente superiores ao vinho B, ainda que na mesma ordem de grandeza.

Deste modo, foi procurado avaliar a influência da matriz na quantificação por FISH-FCM, por inoculação de 10⁴ células/mL. Os resultados obtidos encontram-se discriminados na figura 4.4.2.

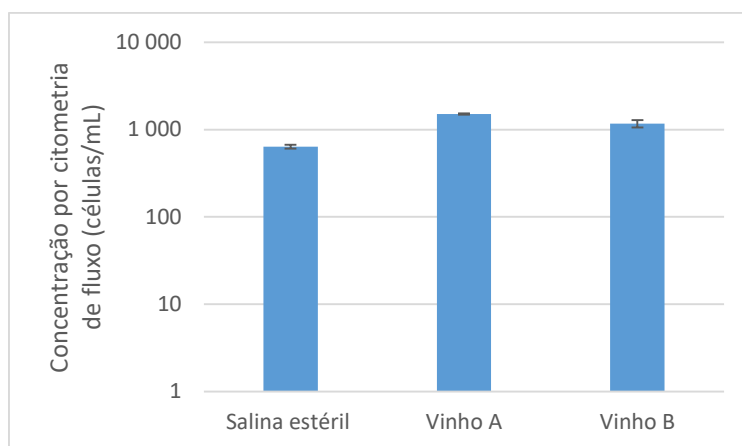


Figura 4.4.2: Avaliação da influência da matriz na quantificação de *D. bruxellensis* 21 obtida através do *kit* comercial 3 (10^4 células/mL).

De acordo com a quantificação obtida, verifica-se que o *kit* em teste está otimizado para a deteção de *D. bruxellensis* em matrizes de vinho, devolvendo uma quantificação mais próxima do valor inoculado. Enquanto que as 2 matrizes de vinho em análise não demonstram diferenças significativas em termos de quantificação, a avaliação de uma mesma concentração inoculada em solução salina reduz a precisão do método. Desta forma, a subestimação não resulta da interferência da matriz. Segundo as especificações, (Anonymous (Sysmex Partec), 2019), o *kit* comercial destina-se a ser utilizado para a análise de vinhos brancos ou tintos, pelo que a corroboração experimental efetuada para o lançamento no mercado não está otimizada para a deteção da estirpe noutra tipo de matrizes, como é o caso da solução salina testada.

Outra possível justificação para a subestimação detetada poderá estar relacionada com a proveniência do inóculo para a preparação das concentrações analisadas. Assim, foram preparadas amostras com concentração de 10^4 células/mL a partir de cultura em placa e de meio líquido, estando os resultados obtidos esquematizados na figura 4.4.3.

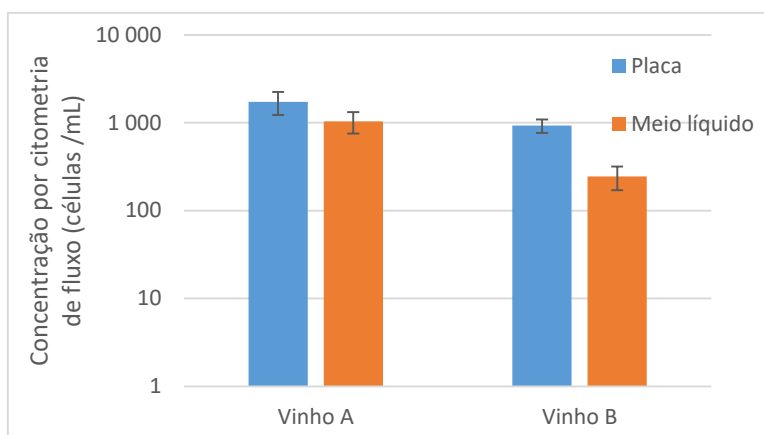


Figura 4.4.3: Determinação da interferência do meio de proveniência de *D. bruxellensis* 21 na quantificação obtida por citometria de fluxo usando como matrizes os vinhos A e B inoculados com 10^4 células/mL.

À semelhança do verificado por qPCR, a inoculação da estirpe a partir de meio seletivo sólido devolve resultados médios ligeiramente superiores, quando comparado com a inoculação a partir de meio líquido. Para a matriz A, as diferenças não são significativas e em todos os casos a quantificação devolvida encontra-se na mesma ordem de grandeza. A justificação para os resultados obtidos poderá estar relacionada com a heterogeneidade celular verificada para cultura em placa.

A fim de avaliar a interferência da adição de sulfitos ao vinho no desenvolvimento de *Brettanomyces*, foi efetuada uma adição de 100 mg/L de bissulfito de potássio (15 % v/v) à matriz B (118 mg/L de SO_2 total e 21 mg/L de SO_2 livre), passando a concentração de SO_2 livre para 51 mg/L. Efetivamente, segundo Portugal *et al.* (2014) uma concentração total de 100 mg/L de metabissulfito de potássio é suficiente para prevenir o crescimento de *Brettanomyces* em vinhos tintos na fase de envelhecimento. Por inoculação de 10^4 células/mL de *D. bruxellensis* 21 no vinho B, antes e após a adição de SO_2 , verificou-se a redução da quantidade detetada. Enquanto no vinho sem adição de SO_2 foram detetadas 952 células/mL, a adição contribuiu para um valor de 480 ± 226 células/mL. São vários os estudos que referem os sulfitos como potenciais indutores do estado VNC de *Brettanomyces* (Du Toit *et al.*, 2005; Serpaggi *et al.*, 2010, 2012). Du Toit *et al.* (2005), verificou que, para concentrações superiores a 0,8 mg/L de SO_2 total, nenhuma célula cresce em meio sólido. Ainda assim, a capacidade de os sulfitos contribuírem para a indução do estado VNC apenas seria comprovada caso fosse promovido o crescimento em placa paralelamente à análise por FCM. Este estudo foi

realizado por Serpaggi *et al.* (2012), tendo de facto verificado que o *stress* oxidativo contribui para o desenvolvimento do estado VNC.

Face aos resultados obtidos, a adição de dióxido de enxofre ao vinho parece contribuir para a morte celular, visto que a concentração de células viáveis devolvida por FISH-FCM reduz em 49,6 %. Barata *et al.* (2008) chegou a uma conclusão semelhante, tendo verificado morte celular de *D. bruxellensis* por adição de dióxido de enxofre. Assim, *D. bruxellensis* 21 apresenta sensibilidade a SO₂.

Todavia, algumas estirpes de *Brettanomyces* são resistentes aos sulfitos (Avramova *et al.*, 2018). Face à resistência, a pasteurização torna-se, por vezes, uma alternativa na indústria vitivinícola. Efetivamente, *Brettanomyces* não é resistente a temperaturas superiores a 35 °C, pelo que os tratamentos térmicos em garrafas contaminadas podem controlar a deterioração do vinho (Fabrizio *et al.*, 2015; Malfeito-Ferreira, 2018). Desta forma, foi avaliada a influência do tratamento térmico a 65 °C, durante 10 minutos para suspensões inoculadas com 10⁴ células/mL de *D. bruxellensis* 21. Os resultados obtidos após 48 horas do processo de tratamento térmico demonstraram um total de 278 ± 127 células/mL. Comparando com os resultados obtidos através do tratamento com SO₂ verificou-se uma redução de células viáveis em 70,8 %. Ainda que o processo não pareça suficiente para a eliminação total de *D. bruxellensis* 21. Fabrizio *et al.* (2015) avaliou a inativação 4 estirpes de *D. bruxellensis* por tratamento térmico. Neste estudo foi possível confirmar que a sensibilidade térmica está dependente da estirpe em análise, verificando-se por microscopia ótica, que a aglomeração de células contribui para uma maior resistência.

Relativamente à especificidade das sondas utilizadas no *kit* 3 para a deteção de *D. bruxellensis*, foi efetuada a inoculação de 10⁴ UFC/mL de uma mistura de leveduras isoladas de mosto dessulfitado da Sogrape Vinhos isenta de contaminação por *Brettanomyces*, na matriz A. Por análise através do *software* associado foram detetadas 12 ± 6 células/mL. Os falsos positivos detetados para a análise efetuada a leveduras totais, poderão ser justificados pela ligação não específica das sondas utilizadas (Serpaggi *et al.*, 2012). Para subpopulações de células com marcadores de expressão semelhantes, a sua diferenciação torna-se complicada (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

Por último procurou-se também avaliar LOD e LOQ do citómetro de fluxo disponibilizado. Como limite de deteção obteve-se o valor de 10 células/mL para o vinho B. Por sua vez, a mesma inoculação efetuada na matriz A devolveu 8 células/mL,

sendo esta a menor concentração quantificada (LOQ). Para a matriz B, a menor quantificação registada correspondeu à inoculação de 50 células/mL, tendo devolvido 4 células viáveis/mL. Ainda assim, de acordo com o fornecedor, apenas é assegurada uma sensibilidade de 150 células/mL (Anonymous (Sysmex Partec), 2019). Já Serpaggi *et al.* (2010) utilizando FISH-FCM para a deteção e enumeração de *Brettanomyces* em vinho tinto, verificou um limite de quantificação de 10^2 células/mL, sendo os resultados obtidos lineares de 10^2 até 10^7 . Segundo Portugal *et al.* (2014) o limite de quantificação determinado é suficiente, na medida em que a produção de fenóis voláteis apenas se torna significativa acima de 1000 células/mL de *Brettanomyces*. No entanto, segundo Biermann (2018), uma concentração entre 50 e 200 células é potencialmente indesejável. De qualquer forma, a capacidade de crescimento da estirpe em vinho, faz com que a avaliação do risco não seja pontual, requerendo uma monitorização ao longo do tempo.

4.5. Validação da aplicabilidade dos *kits* comerciais para amostras de vinho naturalmente contaminadas

Por forma a validar os *kits* 1 e 3, de qPCR e de citometria de fluxo, respetivamente, para a quantificação de *Brettanomyces* em amostras de vinho, foram utilizadas as amostras apresentadas na tabela 4.5.1. É de realçar que, para qualquer dos métodos em análise a quantificação obtida poderá não corresponder à presente nos vinhos, face à subestimação verificada. Assim, não é possível assegurar uma quantificação exata de *D. bruxellensis*.

Das amostras apresentadas, 6574 corresponde a uma amostra proveniente da aplicação de teste olfativo, sendo que “6574 barrica”, corresponde ao mesmo vinho antes de enriquecido com meio de cultura seletivo para a realização do teste olfativo. Já a amostra 33 corresponde à inoculação de *D. bruxellensis* 33 em vinho tinto reserva.

Tabela 4.5.1: Comparação das concentrações de *Brettanomyces* obtidas por qPCR (*kit* 1) e citometria de fluxo (*Kit* 3).

	Amostras		
	33	6574	6574 barrica
<i>Kit</i> 1 (UFC/mL)	$6,4 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^3$
<i>Kit</i> 3 (células/mL)	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$5,8 \times 10^2$

Analisando os resultados obtidos verifica-se que as concentrações obtidas por qPCR são bastante mais elevadas, comparativamente à metodologia de citometria de fluxo. Este resultado poderá estar relacionado com o facto de a análise por citometria de fluxo apenas ter sido realizada 48 dias após o teste por qPCR. Apesar de as amostras terem sido armazenadas a 4 °C, o elevado tempo entre análises contribui para o desenvolvimento do estado VNC, bem como para a indução de morte celular. Adicionalmente, o *kit* 3 recorre à tecnologia FISH, contendo uma mistura de sondas-alvo fluorescentes para diferentes regiões conservativas de 18S rRNA de *Brettanomyces*, pelo que permite a discriminação entre células vivas e células mortas, não conseguida por intermédio da metodologia de PCR quantitativo (Anonymous (Sysmex Partec), 2019).

Adicionalmente, foi também verificada a fiabilidade dos kits 1 e 3, visto ter sido detetada a presença de *Brettanomyces* na mesma amostra de vinho antes e após enriquecimento. Conforme previsto, a concentração de *Brettanomyces* na amostra retirada diretamente da barrica é inferior à detetada após a realização do teste olfativo, o que se justifica através das condições mais favoráveis ao crescimento proporcionadas pela adição de meio de cultura.

A fim de validar o kit 2, foram recolhidas 2 amostras de barrica, após confirmação da presença de *Brettanomyces* por teste olfativo. A descrição das referidas amostras encontra-se descrita no apêndice A. Para ambas foi verificada a deteção de *Brettanomyces*, ainda que em concentrações bastante reduzidas. Para a amostra 17770 (Douro tinto), não houve quantificação visto não ter sido atingido o *threshold* (C_T). Com base nos resultados obtidos na secção anterior (4.3.2) é possível concluir que a concentração deverá ser inferior a 13 UFC/mL, valor este correspondente à menor quantificação determinada através do kit comercial em estudo. Assim, estando a amostra diluída num fator de 2, é possível concluir que a concentração em barrica deverá ser inferior a 26 UFC/mL. Já para a amostra 17768 (Douro tinto) foi obtida uma concentração de 73 UFC/mL. Dada a baixa concentração detetada em barrica, esta metodologia revela-se eficaz para uma atuação preventiva, evitando, deste modo, a produção de fenóis voláteis acima dos limites de deteção.

4.6. Análise por teste olfativo

Em paralelo à metodologia de qPCR foi realizado o teste olfativo efetuado na Sogrape Vinhos para a deteção de *Brettanomyces*. Dentro das concentrações analisadas por qPCR apenas 10^3 , 10^4 e 10^5 células/mL, inoculadas nas matrizes A e B, foram detetadas como positivas. Efetivamente, segundo Portugal e Ruiz-Larrea (2013), *D. bruxellensis* apenas começa a ser detetável para concentrações de células metabolicamente ativas superiores a 10^3 células/mL. Já Couto *et al.* (2005), defende que o tempo necessário para a deteção de fenóis voláteis por intermédio do teste olfativo está dependente da concentração de *Brettanomyces*. Para as concentrações em análise, o tempo necessário para obter um resultado positivo é de 4, 3 e 2 dias para 10^3 , 10^4 e 10^5 células/mL, respetivamente. De facto, as mesmas concentrações preparadas no vinho A evidenciaram um resultado positivo ao final de 4 dias de incubação. No entanto, para a deteção de *Brettanomyces* no vinho B foram necessários os 10 dias de incubação, o que de facto comprova a afirmação de que a complexidade da matriz influencia o desenvolvimento do microrganismo em estudo (Delaherche *et al.*, 2004; Savazzini e Martinelli, 2006; Tessonnière *et al.*, 2009; Tofalo *et al.*, 2012).

4.6.1. Limiar de concentração para a deteção de fenóis voláteis

Utilizando as matrizes B e C, foram efetuadas inoculações de *D. bruxellensis* 21 de forma a obter concentrações de 1, 8, 15, 27, 50, 100, 200 e 1000 células/mL. Ao fim de 10 dias de incubação nenhuma das preparações evidenciou um resultado positivo quer através do teste olfativo (realizado por 2 peritos), como através da deteção de fenóis voláteis por GC-MS.

O resultado obtido poderá estar relacionado com a concentração de SO_2 molecular livre presente nas matrizes em estudo, dificultando o desenvolvimento da estirpe. De acordo com Chandra *et al.* (2016), para garantir o crescimento de *Brettanomyces* deve procurar-se a remoção de SO_2 do vinho.

Adicionalmente, foram também avaliadas as concentrações de 1500, 10^4 e 10^5 células/mL de *D. bruxellensis* 21 no vinho C. Para as referidas inoculações foi devolvido um resultado positivo quanto à deteção de fenóis voláteis por teste olfativo. Paralelamente, foi efetuada a correspondência em termos de fenóis voláteis

produzidos por GC-MS, bem como da concentração de *Brettanomyces* ao fim dos 10 dias de incubação por citometria de fluxo.

Os resultados encontram-se descritos na tabela 4.6.1.

Tabela 4.6.1: Correspondência entre a concentração de *D. bruxellensis* 21 inoculada no vinho C e a concentração de fenóis voláteis (por GC-MS) e da estirpe ao fim de 10 dias de incubação (por citometria de fluxo).

Concentração inoculada (células/mL)	Concentração após 10 dias de incubação ($\times 10^6$ células/mL)	Concentração de 4-EP ($\times 10^3$ $\mu\text{g/L}$)	Concentração de 4-EG ($\times 10^2$ $\mu\text{g/L}$)
1500	$2,8 \pm 2,3$	$2,3 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,5$
10^4	$5,8 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,9$
10^5	$6,0 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,9$	$2,9 \pm 0,6$

Analisando os resultados obtidos, verifica-se uma uniformidade relativa à concentração de *D. bruxellensis* viável ao fim de 10 dias de incubação, bem como do teor de fenóis voláteis produzidos. As concentrações obtidas são bastante superiores ao limiar de deteção olfativo (entre 400 e 430 $\mu\text{g/L}$) (Portugal *et al.*, 2014; Guzzon *et al.*, 2017). Segundo Chatonnet *et al.* (1995), o limiar de perceção de fenóis voláteis em vinho tinto ronda os 426 $\mu\text{g/L}$ para uma mistura 1:10 de 4-EP:4-EG, o que se verifica para uma população de *Brettanomyces* ativa superior a 10^3 células/mL (Portugal *et al.*, 2014).

A concentração de 4-EP obtida está em concordância com os resultados obtidos por Serpaggi *et al.* (2012), tendo verificado concentrações de $2,5 \pm 0,1$ mg/L para *Brettanomyces* cultiváveis. Já o estado VNC conduz a concentrações de 4-EP mais reduzidas (em torno de 1,9 mg/L). Face à presença de SO_2 , no vinho utilizado como matriz para a realização do teste olfativo, é expectável que a concentração de 4-EP produzida seja intermédia dos valores descritos.

Efetivamente, a produção de fenóis voláteis está dependente da estirpe de *Brettanomyces*, bem como do tipo de vinho. De acordo com Coulon *et al.* (2010), há uma relação entre o estado fisiológico de *D. bruxellensis* e a sua capacidade de produzir fenóis voláteis.

Quanto à concentração de células devolvida por citometria de fluxo ao fim dos 10 dias de incubação, verifica-se que, apesar das diferentes concentrações inoculadas, todas tendem para uma mesma ordem de grandeza (10^6). Também Chandra *et al.* (2016) verificou o crescimento de *D. bruxellensis* inoculada em vinho comercial a atingir níveis entre 6 a 8 log UFC/mL.

A semelhança de concentrações obtidas no término da incubação, quer ao nível de fenóis voláteis como de células viáveis, deverá estar relacionada com uma limitação de substrato, visto o ácido p-coumárico ser um dos principais precursores da produção de etil-fenóis (Coulon *et al.*, 2010; Chandra *et al.*, 2016). Este composto encontra-se presente no meio de cultura seletivo utilizado para o crescimento de *Brettanomyces*. Tendo sido adicionado, para as diferentes concentrações, um mesmo volume de meio de cultura (40 mL), então, é expectável que haja uma tendência de crescimento e produção de fenóis voláteis para um mesmo valor.

4.7. Comparação das metodologias utilizadas para a deteção de *Brettanomyces*

Atendendo às técnicas de biologia molecular avaliadas para a deteção de *D. bruxellensis* verifica-se que ambas se apresentam como mais rápidas por comparação ao teste olfativo *SniffBrett*. Ainda assim, as novas metodologias apresentam um elevado custo associado (Serpaggi *et al.*, 2010; Jahan-Tigh *et al.*, 2012; Loftie-Eaton *et al.*, 2014).

Conforme apresentado na tabela 4.7.1, há uma grande discrepância dos custos de análise associados à metodologia tradicional em comparação com as tecnologias moleculares. Como tal, a análise sistemática de vinhos tintos deverá, preferencialmente, ser efetuada por aplicação do teste olfativo. A mais valia associada à aquisição dos equipamentos em estudo prende-se com a rápida capacidade de resposta, aquando da deteção de uma amostra positiva (por intermédio do teste olfativo). Assim, a amostra proveniente de um conjunto de 10 barricas poderá ser reavaliada, de forma a verificar em qual das barricas ocorre, efetivamente, a contaminação. Em todo o caso, a aplicação desta alternativa de controlo implicaria um aumento de custos entre 3 470 € e 5 210 € por ano, conforme discriminado no apêndice E.

Uma outra possível limitação, bastante abordada para a técnica de PCR quantitativo corresponde aos elevados limites de deteção e quantificação reportados. Consequentemente, podem gerar-se falsos negativos, conforme foi reportado para os kits 1 e 2. Segundo Longin *et al.* (2016), os kits comerciais de qPCR subestimam frequentemente a concentração de *D. bruxellensis*, conduzindo a uma imprecisão da contaminação mensurável, que, de certa forma, acaba por contribuir para gerar falsos negativos. Esta é, também, uma problemática comum à metodologia de citometria de fluxo (Longin *et al.*, 2017), bem como ao teste olfativo, sendo que baixas concentrações celulares (inferiores a 10^3 células/mL), podem não contribuir para a formação de fenóis voláteis acima do limite de deteção (Portugal e Ruiz-Larrea, 2013).

Adicionalmente, a técnica de PCR quantitativo, assentando na amplificação de DNA, apresenta como inconveniente a quantificação de células mortas. Assim, a monitorização da contaminação do vinho apenas poderá ser conclusiva por realização de várias análises, espaçadas no tempo. Já o kit de citometria de fluxo testado, incidindo na deteção de rRNA, apenas quantifica células vivas, permitindo uma conclusão imediata acerca da contaminação do vinho, aquando da análise.

Quanto aos falsos positivos, estes podem estar relacionados com a amplificação não específica, detetada para os *kits* 2 e 3. Estes resultados colocam em causa a especificidade dos *kits* para algumas estirpes de *D. bruxellensis*, conduzindo ao incremento da concentração de sulfitos adicionados.

A comparação das metodologias encontra-se sintetizada na tabela 4.7.1.

Tabela 4.7.1: Quadro-síntese de comparação das metodologias em estudo para a deteção de *D. bruxellensis* 21 (^a: para o protocolo de extração de DNA a partir de 45 mL de amostra; ^b: extração de DNA a partir de 1,8 mL de amostra - *kit* 1; ^c para a matriz A; ^d para a matriz B).

Metodologias	Tempo	Alvo	LOD (UFC/mL)	LOQ (UFC/mL)	Linearidade	Especificidade	Custo/ amostra (€)
Teste olfativo	10 dias	Fenóis voláteis	-)	-	-	Sim	0,52
<i>Kit</i> 1	4h00	DNA	> 1 ^a > 27 ^b	8 ^a 50 ^b	10 ² -10 ⁵	Sim	17,72
<i>Kit</i> 2	1h30	DNA	13	80	10 ³ -10 ⁵	Não	14,59
<i>Kit</i> 3	3h00	rRNA	- ^c 10 ^d	10 ^c 50 ^d	10-10 ⁵	Não	20,81

5. Conclusão

Com base no trabalho desenvolvido concluiu-se que todos os *kits* comerciais analisados apresentam as suas limitações. Os *kits* A e B são adequados para a extração de DNA a partir de vinhos tintos, comparativamente a protocolos gerais (*kit* D). Todavia, a subestimação da concentração inoculada é evidente. Os *kits* 1 e 2 de qPCR demonstraram uma relação de linearidade entre a concentração inoculada e a quantificada no equipamento. Para o primeiro referido foram obtidos LOD superiores a 1/8, a partir dos protocolos de extração através de 45 e 1,8 mL de amostra, respetivamente. Quanto a LOQ, foram registados os valores de $2,6 \pm 1,6$ e $40,9 \pm 16,6$ UFC/mL, respetivamente associados à inoculação de 8 e 50 UFC/mL. Já para o *kit* comercial 2, LOD e LOQ devolveram os valores de 13 e 80 UFC/mL respetivamente. Adicionalmente, verificou-se a reprodutibilidade da quantificação efetuada nos diferentes equipamentos de qPCR. Apesar disso, entre réplicas, esta apenas pode ser considerada com base na ordem de grandeza de contaminação. A análise é rápida, mas os custos associados são mais elevados (17,72 e 14,59 €/amostra, para os *kits* 1 e 2, respetivamente), comparativamente ao método tradicional (0,52 €/amostra).

Para o *kit* comercial de citometria de fluxo, a subestimação da concentração inoculada foi inferior à detetada por qPCR, tendo também evidenciado uma relação de linearidade (neste caso entre 10 e 10^5 células/mL). O limite de deteção foi de 10 células/mL para o vinho B, enquanto a quantificação mais reduzida efetuada (4 células/mL) resultou da inoculação de 50 células/mL. Já para o vinho A apenas foi quantificada uma concentração mínima de 8 células/mL, corresponde a uma inoculação de 10 células/mL. O *kit* está também bem-adaptado para matrizes de vinho, apresentado reprodutibilidade entre diferentes extrações, com base no logaritmo de contaminação devolvido. Adicionalmente permite a diferenciação entre células vivas e mortas, contrariamente ao obtido para os *kits* de qPCR. Ainda assim, trata-se do método com maior custo associado (20,81 €/amostra).

Quanto à especificidade, apenas o *kit* 1 demonstrou capacidade de diferenciação de *D. bruxellensis* entre a diversidade de microrganismos presentes nos vinhos.

Face à avaliação das medidas de controlo de *Brettanomyces*, verificou-se que o tratamento térmico a 65 °C não é suficiente para promover a completa morte celular, ainda que devolva concentrações inferiores (278 ± 127 células/mL), comparativamente ao tratamento por adição de SO₂ (480 ± 226 células/mL).

Quanto ao método convencional, a deteção olfativa de *D. bruxellensis* 21 apenas foi conseguida a partir da inoculação de uma concentração de 1500 células/mL na matriz

C. Concentrações inferiores apresentam maior dificuldade de resistir perante o *stress* imposto num vinho com tratamento de SO₂. De qualquer forma, aquando da deteção, 4-EP e 4-EG rondam os valores de 2,3 e 0,29 mg/L, respetivamente, com a levedura presente numa concentração de 6 log de células/mL.

Em suma, com base nas técnicas de biologia molecular seria possível atuar de imediato aquando da deteção de *Brettanomyces*, evitando a produção de fenóis voláteis em vinhos tintos. Adicionalmente, tratando-se de um método quantitativo, ao determinar a concentração presente, os conservantes apenas seriam adicionados numa concentração suficiente para o combate da deterioração. Ainda assim, as limitações verificadas, bem como o elevado custo associado requer a ponderação perante a aquisição dos referidos equipamentos.

6. Proposta de trabalho futuro

Como trabalho futuro deverá procurar-se assegurar a validade estatística dos resultados obtidos, sobretudo nos principais aspetos em estudo - LOD e LOQ, especificidade de amplificação para *Brettanomyces*, bem como quantificação de células mortas. Em todos os casos, deverá ser utilizado um vinho sintético, sem adição de SO₂ e baixa concentração de etanol. Os referidos compostos, ao induzir *stress* celular, poderão estar na base da subestimação obtida nos vários ensaios. Adicionalmente, deve também procurar-se a confirmação da concentração inoculada, promovendo a contagem por microscopia e crescimento em placa das várias suspensões em vinho preparadas.

Em termos da especificidade, poderá ser promovido o ensaio com várias culturas puras de estirpes presentes nos vinhos, como é o caso de *S. cerevisiae* e *O. oeni*. Apesar de ter sido verificada a ausência de *Brettanomyces* na mistura de leveduras utilizada através de métodos convencionais (crescimento em meio seletivo líquido e sólido), é importante assegurar a validade do resultado obtido, recorrendo a uma sequenciação de alta *performance*.

Por último, outro aspeto de interesse passaria pela transposição do estudo efetuado a uma estirpe de *D. bruxellensis* isolada de vinhos contaminados da Sogrape Vinhos.

7. Referências bibliográficas

Anonymous (Sysmex Partec) (2019) *Quantitative determination of Brettanomyces bruxellensis using the CuFlow™ BrettCount Kit on a CyFlow™ Cube 6 (V2M)*.

Disponível em : www.sysmex-partec.com (Acedido: 22 Abril 2019).

Anonymous (2015) *PrimerDesigns beginners guide to real-time PCR, PrimerDesign*.

Disponível em: www.primerdesign.co.uk (Acedido: 20 Novembro 2018).

Anonymous (2019) *Total & Non-Viable counts of yeasts cells in a culture, The Australian Wine Research Institute*. Disponível em:

https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/laboratory_methods/microbiological/identification-of-yeast/non-viable_counts/ (Acedido: 26 Fevereiro 2019).

Avramova, M. *et al.* (2018) 'Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*' sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method', *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1-9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01260.

Barata, A. *et al.* (2008) 'Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide', *International Journal of Food Microbiology*, 121, pp. 201-207. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.020.

Bartowsky, E. J. (2009) 'Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it', *Letters in Applied Microbiology*, 48(2), pp. 149-156. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x.

Bartowsky, E. J. (2017) 'Microbiology of winemaking', *Microbiology Australia*, 33, pp. 76-79. doi: 10.1146/annurev.mi.22.100168.001543.

Bastidas, O. (2008) *Cell counting with Neubauer chamber - basic hemocytometer usage, Celeromics*. Disponível em: www.celeromics.com (Acedido: 12 Maio 2019).

Bauer, R.; Dicks, L. M. T. (2004) 'Control of malolactic fermentation in wine. A review', *South African Journal for Enology and Viticulture*, 5(2), pp. 74-88. doi: 10.21548/25-2-2141.

Berbegal, C. *et al.* (2018) 'Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), pp. 569-576. doi: 10.1007/s00253-017-8666-x.

Biermann, C. (2018) *Brettanomyces unfold, vinlab*. Disponível em:

<https://vinlab.com/brettanomyces-unfold/> (Acedido: 17 Julho 2019).

- Bustin, S. A. *et al.* (2009) 'The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments', *Clinical Chemistry*, 55(4), pp. 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Chandra, M. *et al.* (2016) 'Growth and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis* in different grapevine varieties during fermentation and in finished wine', *European Food Research and Technology*. Springer Berlin Heidelberg, 242(4), pp. 487-494. doi: 10.1007/s00217-015-2559-y.
- Chatonnet, P. *et al.* (1995) 'The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines', *American Journal of Enology and Viticulture*, 46 (4), pp. 463-468.
- Chazotte, B. (2011) 'Labeling nuclear DNA using DAPI', *Cold Spring Harbor Protocols*, 6(1). doi: 10.1101/pdb.prot5556.
- Cocolin, L. *et al.* (2004) 'Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in Spoiled Wines', *Society*, 70(3), pp. 1347-1355. doi: 10.1128/AEM.70.3.1347.
- Coulon, J. *et al.* (2010) '*Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles', *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), pp. 1450-1458. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04561.x.
- Couto, J. A. *et al.* (2005) 'A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines', *Letters in Applied Microbiology*, 41(6), pp. 505-510. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01782.x.
- Delaherche, A. *et al.* (2004) 'Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and "ropy" *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction', *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), pp. 910-915. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02334.x.
- Dimopoulou, M. *et al.* (2019) 'Microbiological, biochemical, physicochemical surface properties and biofilm forming ability of *Brettanomyces bruxellensis*'. *bioRxiv*. doi: 10.1101/579144.
- Fabrizio, V. *et al.* (2015) 'Heat inactivation of wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by hot water treatment', *Letters in Applied Microbiology*, 61(2), pp. 186-191. doi: 10.1111/lam.12444.
- Fairchild, A. *et al.* (2006) 'PCR basis', in Doyle, M. P. *et al.* (eds) *Pcr Methods in Foods*. Springer, pp. 1-27.

- Fleet, G. H. (2003) 'Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on successful malolactic conversion in wine', *International Journal of Food Microbiology*, 86, pp. 11-22. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00245-9.
- Fleet, G. H. (2007) 'Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers', in Beuchat, M. P. D. and L. R. (ed.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers Food Microbiology*. 3rd edn. ASM Press, pp. 863-890. Disponível em: <http://www.thanutswu.com/images/FSN321/FMB1.pdf> (Acedido: 20 Novembro 2018).
- Forootan, A. *et al.* (2017) 'Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)', *Biomolecular Detection and Quantification*. Elsevier, pp. 1-6. doi: 10.1016/j.bdq.2017.04.001.
- Fortunato, G. *et al.* (2018) 'A rationale for the high limits of quantification of antibiotic resistance genes in soil', *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2018.09.128.
- Fraise, A. P. *et al.* (2012) *Russell, Hugo & Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, Russell, Hugo & Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. doi: 10.1002/9781118425831.
- 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 (Acedido: 5 Outubro 2018).
- Goode, J. (2003) *Brettanomyces*, *harpers wine and spirit weekly*. Disponível em: <http://www.wineanorak.com/brettanomyces.htm> (Acedido: 26 Fevereiro 2019).
- Gumińska, N. *et al.* (2018) 'Culture purification and DNA extraction procedures suitable for next-generation sequencing of euglenids', *Journal of Applied Phycology*, 30(6), pp. 3541-3549. doi: 10.1007/s10811-018-1496-0.
- Guzzon, R. *et al.* (2017) 'The impact of different barrel sanitation approaches on the spoilage microflora and phenols composition of wine', *Journal of Food Science and Technology*. Springer India, 54(3), pp. 810-821. doi: 10.1007/s13197-017-2527-6.
- Homma, T. *et al.* (2003) 'Yeast gene expression during growth at low temperature', *Cryobiology*, 46(3), pp. 230-237. doi: 10.1016/S0011-2240(03)00028-2.

- International organization of vine and wine (2011) 'OIV-MA-C1-01 Maximum acceptable limits of various substances contained in wine', *Compendium of international methods of wine and must analysis*, pp. 1-3. Disponível em: <http://www.oiv.int/> (Acedido: 3 Maio 2019).
- Jackson, R. (2009) 'Visual perceptions - clarity', in Jackson, R. (ed.) *Wine Tasting: a professional handbook*. 2nd edn, pp. 41-45. Disponível em: <http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/3933>. (Acedido 15 Março 2019).
- Jahan-Tigh, R. R. *et al.* (2012) 'Flow cytometry', *Journal of Investigative Dermatology*. Nature Publishing Group, 132, pp. 1-6. doi: 10.1038/jid.2012.282.
- Jung, P. P. *et al.* (2015) 'Protocols and programs for high-throughput growth and aging phenotyping in yeast', *PLoS ONE*, 10(3), pp. 1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0119807.
- Katevatis, C. *et al* (2017) 'Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase', *PLoS ONE*, 12(5), pp. 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0176848.
- Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000) 'Yeast and its importance to wine aroma - a review', *South African Journal of Enology and Viticulture*, pp. 97-129. doi: 10.1080/00207230701791448.
- Loftie-Eaton, W. *et al.* (2014) 'Flow cytometry and real-time quantitative PCR as tools for assessing plasmid persistence', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), pp. 5439-5446. doi: 10.1128/AEM.00793-14.
- Longin, C. *et al.* (2016) 'Evaluation of three *Brettanomyces* qPCR commercial kits: results from an interlaboratory study', *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 50(4), pp. 223-230. doi: 10.20870/oenone.2016.50.4.1274.
- Longin, C. *et al.* (2017) 'Application of flow cytometry to wine microorganisms', *Food Microbiology*, 62, pp. 221-231. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.023.
- López, M. D. G. *et al.* (2013) 'Preservation of microbial strains in the wine industry', in Santiago, A. C., Munoz, R., and Garcia, R. G. (eds) *Molecular Wine Microbiology*, pp. 304-318. Disponível em: https://books.google.pt/books?id=VszO_kZl4bUC&printsec=frontcover&hl=pt-PT. (Acedido: 20 Maio 2019).
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. (2003) 'Spoilage yeasts in the wine industry', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), pp. 23-50. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00246-0.

- Louw, M. *et al.* (2016) 'Comparative morphological characteristics of three *Brettanomyces bruxellensis* wine strains in the presence/absence of sulfur dioxide', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 238, pp. 79-88. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.040.
- Malfeito-Ferreira, M. (2011) 'Yeasts and wine off-flavours: A technological perspective', *Annals of Microbiology*, 61(1), pp. 95-102. doi: 10.1007/s13213-010-0098-0.
- Malfeito-Ferreira, M. (2018) 'Two decades of "horse sweat" taint and *Brettanomyces* yeasts in wine: where do we stand now?', *Beverages*, 4(2), p. 32. doi: 10.3390/beverages4020032.
- Malfeito-Ferreira, M. (2019) 'Spoilage yeasts in red wines', in *Red Wine Technology*, pp. 219-235. doi: 10.1016/B978-0-12-814399-5.00015-3.
- Mas, A. *et al.* (2016) 'Editorial: non-conventional yeast in the wine industry', *Frontiers in Microbiology*, 7(1494), pp. 1-2. doi: 10.3389/fmicb.2016.01494.
- Montville, T., Matthews, K. (2013) 'Physiology, growth, and inhibition of microbes in foods', in Doyle, M. and Buchanan, R. (eds) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4th edn. Disponível em: https://books.google.pt/books?id=VszO_kZl4bUC&printsec=frontcover&hl=pt-PT (Acedido: 20 Fevereiro 2019).
- Morgan, H. H. *et al.* (2017) 'The grapevine and wine microbiome: Insights from high-throughput amplicon sequencing', *Frontiers in Microbiology*, 8(820), pp. 1-15. doi: 10.3389/fmicb.2017.00820.
- Neeley, E. T. *et al.* (2005) 'Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp. 8954-8957. doi: 10.1128/AEM.71.12.8954-8957.2005.
- Oelofse, A. *et al.* (2008) 'Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review', *South African Journal for Enology and Viticulture*, 29(2), pp. 128-144. doi: 10.21548/29-2-1445
- Peluso, I. *et al.* (2014) 'Interference of flavonoids with fluorescent intracellular probes: methodological implications in the evaluation of the oxidative burst by flow cytometry', *Cytometry Part A*, 85(8), pp. 663-677. doi: 10.1002/cyto.a.22490.
- Petruzzi, L. *et al.* (2017) 'Microbial resources and enological significance: opportunities and benefits', *Frontiers in Microbiology*, 8(995), pp. 1-13. doi: 10.3389/fmicb.2017.00995.

- Phister, T. G., Mills, D. A. (2003) 'Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine.', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp. 7430-7434. doi: 10.1007/s10347-012-0303-7.
- Portugal, C. *et al.* (2014) '*Brettanomyces* susceptibility to antimicrobial agents used in winemaking: In vitro and practical approaches', *European Food Research and Technology*, 238(4), pp. 641-652. doi: 10.1007/s00217-013-2143-2.
- Portugal, C., Ruiz-Larrea, F. (2013) 'Comparison of specific real-time PCR and conventional culture for detection and enumeration of *Brettanomyces* in red wines', *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(1), pp. 139-145. doi: 10.5344/ajev.2012.12047.
- Renouf, V. *et al.* (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), pp. 51-61. doi: 10.20870/oeno-one.2007.41.1.858.
- De Revel, G. *et al.* (1999) 'Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), pp. 4003-4008. doi: 10.1021/jf981383b.
- Ribéreau-Gayon, P. *et al.* (2006) *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2nd edn, *Handbook of Enology*. 2nd edn. John Wiley & Sons. doi: 10.1002/0470010398.
- Rodrigues, N. *et al.* (2001) 'Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*', *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), pp. 588-599. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01275.x.
- Romano, P. *et al.* (2003) 'Function of yeast species and strains in wine flavour', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), pp. 169-180. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00290-3.
- Sannino, C. *et al.* (2013) 'Effect of the natural winemaking process applied at industrial level on the microbiological and chemical characteristics of wine', *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier Ltd, 116(3), pp. 347-356. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.03.005.
- Savazzini, F., Martinelli, L. (2006) 'DNA analysis in wines: development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification', *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2 SPEC. ISS.), pp. 274-282. doi: 10.1016/j.aca.2005.10.078.

- Serpaggi, V. *et al.* (2010) 'Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers', *Cytometry Part A*, 77A(6), pp. 497-499. doi: 10.1002/cyto.a.20861.
- Serpaggi, V. *et al.* (2012) 'Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*', *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 30(2), pp. 438-447. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.020.
- Smith, C. J., Osborn, A. M. (2009) 'Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology', *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), pp. 6-20. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
- Tarnowski, B. I. *et al.* (1991) 'DAPI as a useful stain for nuclear quantitation', *Biotechnic and Histochemistry*, 66(6), pp. 296-302. doi: 10.3109/10520299109109990.
- Taylor, S. *et al.* (2010) 'Recognition and petroleum geological meaning of deepwater sub-lacustrine fan: Qing1 and Qing2 Group, Yingtai-Talaha area, northern Songliao basin, China', *Methods*. Elsevier Inc., 50, pp. 51-55. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005.
- Tessonnière, H. *et al.* (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*. Elsevier B.V., 129(3), pp. 237-243. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.027.
- Tofalo, R. *et al.* (2012) 'Detection of *Brettanomyces* spp. in Red Wines Using Real-Time PCR', *Journal of Food Science*, 77(9), pp. 1-5. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02871.x.
- Du Toit, W. J. *et al.* (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), pp. 862-871. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02549.x.
- Wahid, M. H. *et al.* (2015) 'Microencapsulation of bacterial strains in graphene oxide nano-sheets using vortex fluidics', *RSC Advances*, 5(47), pp. 37424-37430. doi: 10.1039/c5ra04415d.
- Werner-Washburne, M. *et al.* (1993) 'Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiological Reviews*, 57(2), pp. 383-401. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06693.x.
- White, K. (2018) *Brettanomyces: Science & Context*, *Guildsomm*. Disponível em: https://www.guildsomm.com/public_content/features/articles/b/kelli-white/posts/brettanomyces (Acedido: 26 Fevereiro 2019).

Zuehlke, J. *et al.* (2015) 'Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* to metabolize residual sugar present in partially-fermented red wines', *Fermentation*, 1(1), pp. 3-12. doi: 10.3390/fermentation1010003.

Apêndices

Apêndice A. Descrição dos vinhos analisados

Tabela A.1: Descrição completa das análises efetuadas aos vinhos utilizados para a realização do projeto (os valores a negrito evidenciam resultados fora do expectável para a validação dos vinhos, tendo sido posteriormente efetuada a respetiva correção).

Amostras	Vinho	Acidez total titulável (ácido sulfúrico) (g/L)	Acidez total FTIR (ácido tartárico) (g/L)	Acidez volátil FTIR (ácido acético) (g/L)	pH	SO ₂ livre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	SO ₂ molecular (mg/L)	Teor alcoométrico adquirido (% vol.)	Índice de fenóis totais
Matrizes										
11193	(A) Douro Tinto 2018	3,31	5,07	0,59	3,75	42	102	0,72	13,58	64
13282	(B) Douro Reserva 2016	3,43	5,25	0,76	3,63	50	153	1,15	14,17	98
1111	(C) Alentejo 2018	3,37	5,16	0,86	3,79	29	100	0,45	13,54	-
Vinhos contaminados										
6574	Vinho Tinto Lisboa	3,33	5,09	0,47	3,72	34,3	81	-	-	-
17768	Douro Tinto 2018	3,36	5,16	0,57	3,81	38	77	-	-	-
17770	Douro Tinto 2018	3,39	5,19	0,57	3,81	35,1	71	-	-	-

Apêndice B. Descrição de meios de cultura

A composição do meio de cultura *Yeast Extract Peptone Dextrose agar* (YEPD agar), utilizado para o crescimento de leveduras, encontra-se descrito na tabela B.1. As quantidades descritas na tabela correspondem à preparação de 1 litro de meio. Os componentes devem ser misturados em parte do litro de água necessário, sendo promovida a agitação para a sua dissolução. Por fim, é adicionada a água em falta.

O meio de cultura é então autoclavado, a 121 °C.

Tabela B.1: Constituição do meio seletivo YEPD para a enumeração de leveduras totais

Componentes	Quantidade
Glucose	20 g
Peptona de caseína	20 g
Agar	20 g
Extrato de levedura	10 g
Cloranfenicol	1 g
Água destilada	1 L

Apêndice C. Equações auxiliares

C. 1. Cálculo da taxa de crescimento específica para microrganismos

A fase exponencial de crescimento pode ser descrita de acordo com a equação C.1.1, em que X corresponde ao número de células, neste caso descrito em termos de densidade ótica (600 nm), t ao tempo, em horas, e μ à taxa específica de crescimento, em h^{-1} .

Rearranjando a equação diferencial (eq.C.1.2), por integração, é possível obter a equação C.1.3, que pode ser descrita como uma regressão linear, onde $y=\ln X$, e $x=t$, o que permite obter a taxa de crescimento específica, a partir do declive da reta.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Eq. (C.1.1)}$$

$$\frac{dX}{X} = \mu dt \quad \text{Eq. (C.1.2)}$$

$$\ln X = \mu t + \ln X_0 \quad \text{Eq. (C.1.3)}$$

C. 2. Contagem do número total de células por microscopia de fluorescência

A contagem do número total de células por intermédio de microscopia de fluorescência, utilizando DAPI recorreu à equação C.2.1, em que N corresponde à média do número de microrganismos contados nos 10 campos representativos do filtro, S_m à superfície da membrana filtrante ($2,27 \text{ cm}^2$), d ao fator de diluição, S à área de membrana visualizada no microscópio com ampliação 100x ($1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$), e V ao volume de amostra filtrado.

$$\text{Células/mL} = \frac{N \cdot S_m \cdot d}{S \cdot V} \quad \text{Eq. (C.2.1)}$$

C. 3. Contagem do número total de células através da câmara de *Neubauer*

A contagem de leveduras foi realizada ao microscópio ótico com uma objetiva 40x. Como regra de contagem considerou-se que células com sobreposição das linhas esquerda e de base de um quadrado da grelha não seriam contabilizadas. Foi ainda considerado que, no caso de células agregadas, apenas seriam contadas como separadas no caso da de menor tamanho apresentar pelo menos metade da dimensão da célula-mãe (Bastidas, 2008). Para assegurar a exatidão do método procurou-se atingir entre 250 a 300 células por contagem.

O número total de leveduras foi calculado através da equação C.3.1, em que N corresponde ao número de células, n ao número de quadrados, V ao volume do quadrado ($6,25 \cdot 10^{-6}$ mL) e d ao fator de diluição utilizado.

$$Células/mL = \frac{N \cdot d}{n \cdot V} \quad \text{Eq. (C.3.1)}$$

C. 4. Cálculo da concentração de SO₂ livre molecular

A concentração de SO₂ ativo nos vinhos é obtida em mg/L, a partir da equação C.4.1, em que SO₂ (livre) é a concentração de SO₂ livre em mg/L, TAV corresponde ao teor alcoométrico adquirido, em % vol. e T à temperatura, em °C.

$$SO_2 \text{ (molecular)} = \frac{SO_2 \text{ (livre)}}{10^{pH-1,92-0,02(TAV-10)-0,031(T-20)+1}} \quad \text{Eq. (C.4.1)}$$

Apêndice D. Quantificação obtida por PCR quantitativo e citometria de fluxo

Tabela D.1: Quantificação obtida pelos diferentes kits de qPCR testados de acordo com a concentração exata de *D. bruxellensis* 21 inoculada nas matrizes de vinho A e B.

	Concentração real (células/mL)	Quantificação (UFC/mL)	
		Vinho A	Vinho B
<i>Kit 1</i> *extração a partir de 1,8 mL amostra	27,0	-	-
	49,9	$(3,7 \pm 2,4) \times 10^1$	$(4,2 \pm 1,6) \times 10^1$
	199,8	$(8,5 \pm 1,3) \times 10^1$	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^2$
	999,6	$(2,0 \pm 0,6) \times 10^2$	$(1,1 \pm 0,9) \times 10^2$
	9996,5	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^3$	$(1,7 \pm 0,4) \times 10^3$
	99964,8	$(7,9 \pm 3,1) \times 10^3$	$(1,7 \pm 0,4) \times 10^3$
<i>Kit 1</i> *extração a partir de 45 mL amostra	1,0	$(4,1 \pm 5,8) \times 10^{-1}$	-
	8,0	$(3,1 \pm 2,6) \times 10^0$	-
	50,0	$(8,3 \pm 0,2) \times 10^0$	-
	200,7	$(4,7 \pm 0,0) \times 10^1$	-
	1002,7	$(1,6 \pm 0,8) \times 10^2$	-
	10026,7	$(1,5 \pm 0,8) \times 10^3$	-
	99980,2	$(3,5 \pm 0,8) \times 10^4$	-
<i>Kit 2</i>	100,0	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^2$	$(3,0 \pm 1,4) \times 10^2$
	9985,1	$(8,1 \pm 5,0) \times 10^2$	$(1,3 \pm 1,0) \times 10^2$
	99850,7	$(5,2 \pm 2,2) \times 10^3$	$(6,2 \pm 2,1) \times 10^3$

Tabela D.2: Quantificação obtida através da aplicação do *kit* 3 de citometria de fluxo por inoculação de *D. bruxellensis* 21 nos vinhos A e B.

Concentração real (células/mL)	Quantificação (células/mL)
Vinho A	
10,0	8
50,0	$(4,0 \pm 5,7) \times 10^0$
200,3	$(2,2 \pm 1,4) \times 10^1$
996,8	$(1,1 \pm 1,0) \times 10^2$
9967,6	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^3$
99676,4	$(1,7 \pm 1,0) \times 10^4$
Vinho B	
10,0	0
50,0	$(4 \pm 0) \times 10^0$
200,6	$(2,6 \pm 0,8) \times 10^1$
999,0	$(6,4 \pm 1,7) \times 10^1$
9990,3	$(9,3 \pm 1,6) \times 10^2$
99903,1	$(1,0 \pm 1,7) \times 10^4$

Apêndice E. Análise financeira

Para a aquisição de alguma das tecnologias moleculares em análise pela Sogrape Vinhos é necessário avaliar os gastos adicionais que a implementação nos procedimentos de rotina implica. Desta forma, a tabela E.1 sintetiza os custos associados.

Tabela E.1: Discriminação dos custos dos *kits* requeridos para a análise por cada uma das metodologias (* *Standard Kit* serve para a elaboração da reta de calibração, requerendo uma única realização por utilizador; para a obtenção do custo por amostra considera-se que o referido *kit* permite a quantificação de um total de 300 amostras).

Empresas	<i>Kits</i>	Custo unitário (€)	Número de amostras	Custo/ amostra (€)	Custo total/ amostra (€)
I	A	700	96	7,29	16,67
	1	900	96	9,38	
II	B	260	100	2,60	13,54
	2	490	48	10,21	
	<i>Standard Kit</i>	220	-	0,73*	
III	3	1000	50	20,00	

Além dos custos apresentados, é também necessário considerar o material consumível requerido para a realização dos ensaios.

Os custos associados a qPCR foram estimados de acordo com a empresa I, não tendo sido pedido nenhum orçamento a qualquer outro fornecedor. Tendo sido considerado que cada amostra requer a utilização unitária de cada um dos consumíveis (tubos de 1 mL, pontas de 1000, 200 e 20 µL, tubo e tampa para análise por qPCR), estima-se um total de 1,05 € adicionais por cada amostra.

Também a análise por citometria de fluxo, requer a compra de consumíveis. Para tal, é recomendada a aquisição de tubos de 2 mL, pontas de 1000, 200 e 20 µL, tubos de 3,5 mL, solução de lavagem, solução de descontaminação, solução de hipoclorito, *Sheath fluid* e *Count Check Beads green*, para a calibração do equipamento. O custo unitário dos consumíveis apresentados perfaz um total de 0,81 €.

Desta forma, o custo total para a análise de 1 amostra por qPCR da empresa I ronda os 17,75 € e 14,60 € para a empresa II. Quanto à citometria de fluxo, a análise ficará por 20,81 €.

Considerando que, desde janeiro até julho de 2019 foram detetadas 163 amostras positivas através de *SniffBrett*, então, por ano, em média, são contabilizadas cerca de 280 amostras positivas na Sogrape Vinhos. Com a implementação de qualquer das metodologias moleculares, vinhos complexos, bem como repetições de amostras retiradas de um conjunto de 10 barricas deixariam de ser analisadas pela metodologia convencional. Assim, o aumento de custos verificado rondaria os 4 345 €, 3 470 € e 5 210 € para os *kits* 1, 2 e 3, respetivamente. A estimativa apresentada considera a análise de todas as amostras positivas detetadas em 1 ano por intermédio das tecnologias em estudo.