

Validação do Método Pesquisa de *Brettanomyces bruxellensis* em Vinhos

Beatriz Marques Nunes da Cunha

Mestrado em Aplicações em Biotecnologia e Biologia Sintética

Departamento de Biologia e Departamento de Química e Bioquímica

Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Ano Letivo 2021/2022

Orientador

Fátima Castro

Diretora Geral

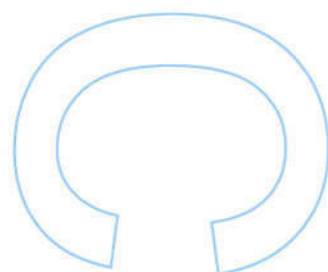
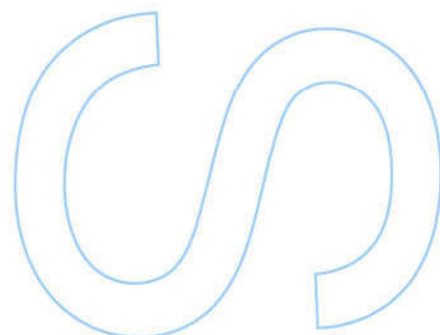
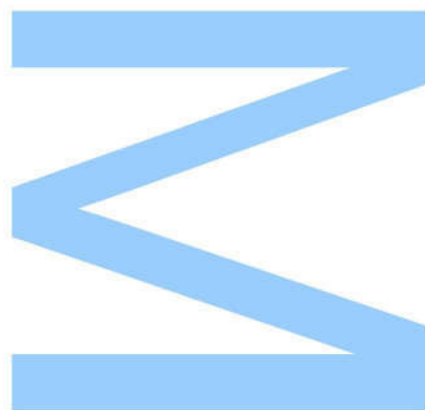
Silliker Portugal, S.A.

Coorientador

Nuno Mateus

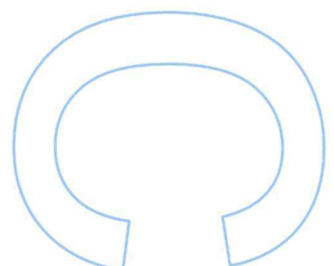
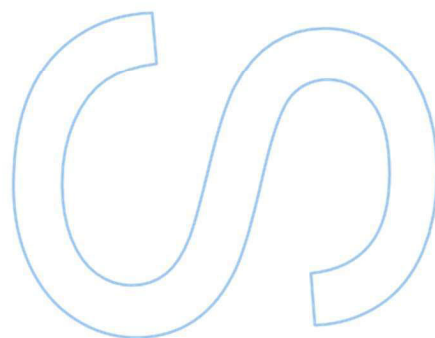
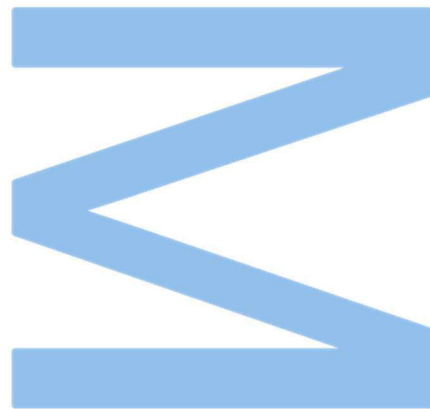
Professor Associado

Faculdade de Ciências, Universidade do Porto





Better Food. Better Health. Better World.



“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

Declaração de Honra

Eu, Beatriz Marques Nunes da Cunha, inscrita no Mestrado em Aplicações em Biotecnologia e Biologia Sintética da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U.Porto, que o conteúdo do presente relatório de estágio reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar este relatório de estágio declaro, ainda, que o mesmo é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados no presente relatório de estágio quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Beatriz Cunha

Porto, 30 de setembro de 2022

Agradecimentos

Gostaria de dirigir os meus agradecimentos à empresa Silliker Portugal, S.A., em particular à Dra. Fátima Castro, Diretora Geral, e a Andreia Poças, responsável, à data, do laboratório de microbiologia pela oportunidade de estágio.

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto por possibilitar programas de Estágio em Contexto Empresarial.

À professora Paula Tamagnini, diretora do Mestrado em Aplicações em Biotecnologia e Biologia Sintética, pelo apoio e disponibilidade ao longo deste ano final de Mestrado e de escrita da Tese.

Ao professor Nuno Mateus, professor associado da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela orientação científica prestada ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores e investigadores com quem me cruzei ao longo deste percurso académico que me transmitiram um sem fim de conhecimentos, os quais aplicarei sempre a favor do progresso e desenvolvimento.

Um agradecimento final e especial à minha família e amigos, em particular aos meus pais, irmã e namorado, que sempre me apoiaram e motivaram em todas as etapas que culminam na realização desta tese de Mestrado.

Resumo

Brettanomyces bruxellensis é uma das principais leveduras de deterioração dos vinhos, que é um produto de elevado interesse económico a nível mundial e em especial em Portugal. Este trabalho teve como principal objetivo a validação e implementação em laboratório acreditado de microbiologia de um método de pesquisa de *B.bruxellensis* em Vinhos, recorrendo a um kit de deteção comercial - VinoBrett®.

A implementação de um método em laboratório acreditado exige que seja previamente realizado um ensaio que reúne as evidências necessárias por forma a garantir que o laboratório é capaz de gerar dados de desempenho semelhantes àqueles estabelecidos aquando da validação primária do método. As características de desempenho em análise foram: a sensibilidade, especificidade, seletividade, eficiência e taxas de falsos positivos e negativos.

A validação secundária foi realizada segundo procedimento interno tendo sido analisadas 55 amostras e obtidos 100 resultados. Obtiveram-se os valores de 100% para sensibilidade, especificidade e eficiência; 46% para seletividade e 0% para as taxas de falsos positivos e negativos. Deste modo, foi demonstrado que este método cumpre com o propósito para o qual foi desenvolvido e que as características de desempenho do mesmo cumprem com as especificações exigidas sendo, assim, implementado o método para rotina no laboratório.

Palavras-chave: *Brettanomyces bruxellensis*, deterioração, vinho, VinoBrett®, validação secundária de métodos.

Abstract

Brettanomyces bruxellensis is one of the main spoilage yeasts in wines, which is a product of high economic interest worldwide and especially in Portugal. The main objective of this work was the validation and implementation in an accredited microbiology laboratory of a research method for *B.bruxellensis* in Wines, using a commercial detection kit - VinoBrett®.

The implementation of a method in an accredited laboratory requires that a test is previously carried out that gathers the necessary evidence in order to guarantee that the laboratory is able to generate performance data similar to those established during the primary validation of the method. The performance characteristics under analysis were: sensitivity, specificity, selectivity, efficiency and false positive and negative rates.

Secondary validation was performed according to an internal procedure, 55 samples were analyzed and 100 results were obtained. Values of 100% were obtained for sensitivity, specificity and efficiency; 46% for selectivity and 0% for false positive and negative rates. In this way, it was demonstrated that this method fulfills the purpose for which it was developed and that the performance characteristics of the same comply with the required specifications and, thus, the method is implemented for routine in the laboratory.

Key words: *Brettanomyces bruxellensis*, spoilage, wine, VinoBrett®, secondary validation of methods.

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice de Tabelas	ix
Índice de Figuras	x
Lista de Abreviaturas	xi
1. Introdução.....	12
1.1. A empresa – Silliker Portugal, S.A.	12
1.2. O vinho	13
1.3. <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	15
1.4. <i>B. bruxellensis</i> em vinhos – Origem e impactes na qualidade do vinho	16
1.5. Métodos comuns de deteção de <i>Brettanomyces</i> em vinhos	18
1.6. O método VinoBrett®	19
1.7. Validação de métodos para rotina laboratorial.....	21
1.8. Objetivos do Trabalho.....	24
2. Procedimento Experimental	25
2.1. Preparação da amostra	25
2.1.1. Preparação da amostra a partir de vinho	25
2.1.2. Preparação da amostra a partir de suspensões.....	26
2.1.3. Preparação da amostra a partir de colónia isolada	27
2.2. Análise na cassette de teste	27
3. Resultados.....	28
4. Discussão	31
5. Conclusão.....	34
Considerações finais e perspetivas futuras.....	35
Referências	36
Anexos	39
Anexo 1 - Experiência no método Pesquisa de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> em vinhos...	39

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Cálculo das características de desempenho para validação secundária de métodos	22
Tabela 2 - Programas utilizados no termociclador	26
Tabela 3 - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios	29
Tabela 4 - Resumo dos valores obtidos para as características de desempenho	30

Índice de Figuras

Figura 1 - Logotipo atual da empresa Silliker Portugal, S.A.	13
Figura 2 - Evolução do consumo mundial de vinho	13
Figura 3 - Evolução da produção mundial de vinho (excluídos sumos e mostos)	14
Figura 4 – Morfologia celular de <i>B. bruxellensis</i>	16
Figura 5 - Pseudomicélio de <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	16
Figura 6 - Resultados semi-quantitativos do teste VinoBrett ®	27

Lista de Abreviaturas

°C	Grau Celsius
µl	Microlitro
4-EG	4-etilguaicol
4-EP	4-etilfenol
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
<i>B. bruxelensis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
BAA	Bactérias do Ácido Acético
BAL	Bactérias do Ácido Láctico
Bretta	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EGI	Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ISO	Organização Internacional de Normalização
mhl	Milhão de hectolitro
min	Minuto
ml	Mililitro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Prev	Preliminar
Prov	Provisório
RCF	Força Centrífuga Relativa
s	Segundo
UFC	Unidade Formadora de Colónia
VNC	Viável mas Não Cultivável
YGC	<i>Yeast Glucose Cloramphenicol</i>

1. Introdução

1.1. A empresa – Silliker Portugal, S.A.

A Silliker Portugal, S.A. é uma empresa independente de prestação de serviços intimamente ligada aos vários ramos do setor agroalimentar.

A empresa foi fundada em 1992, em Vila Nova de Gaia, como EGI - Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda.. Nesta altura, o interesse crescente na qualidade e segurança alimentar aliado à escassa oferta de serviços de análises e acessoria contribuíram para que a EGI se tornasse rapidamente líder nacional no setor. Em 1993 integrou o Sistema Português da Qualidade através da acreditação do seu laboratório pelo IPAC (Instituto Português de Acreditação, I.P.), com o número de acreditação L0087. A empresa continuou o seu forte crescimento e em março de 2008 foi adquirida pela multinacional norte-americana Silliker, surgindo então a Silliker Portugal, S.A. que passou a integrar um dos maiores grupos mundiais de prestação de serviços na área da qualidade e segurança alimentar.

A empresa norte-americana Silliker foi fundada em 1967 nos Estados Unidos da América pelo Dr. John H. Silliker, um microbiólogo reconhecido pelos seus trabalhos em *Salmonella*. Em 1990 foi adquirida pelo Instituto Mérieux, uma sociedade familiar estabelecida em 1897 que seguia a visão de Louis Pasteur e que se tornou líder mundial na área das vacinas, tanto humanas como veterinárias. Com a aquisição da Silliker, empresa americana de prestação de serviços de controlo analítico a alimentos, o Instituto Mérieux ampliou-se e passou também a trabalhar na área da segurança alimentar. A partir do ano de 2014, a Silliker apresenta-se no mercado como Mérieux NutriSciences.

Atualmente, tem uma rede de mais de 100 laboratórios acreditados em 26 países por todo o mundo, como Austrália, Bélgica, Brasil, Canadá, França, Alemanha, Índia, Israel, Estados Unidos, Portugal, entre outros.

A Mérieux NutriSciences conta com mais de 50 anos de experiência científica e empresarial para responder às necessidades da indústria alimentar. Tem como visão a saúde e bem-estar dos consumidores de todo o mundo, disponibilizando uma vasta oferta de serviços analíticos (microbiológicos, químicos e físicos) e de consultoria para empresas

do setor alimentar e nutrição. Adicionalmente, presta serviços a empresas de outros setores como água e ambiente, agroquímicos, bens de consumo, farmacêutica e cosméticos.

A empresa trabalha diariamente com rigor e elevada qualidade sob o seu lema: **“BETTER FOOD. BETTER HEALTH. BETTER WORLD”** (que se traduz em português para: “Comida melhor. Saúde melhor. Mundo melhor”). (Silliker Portugal, S.A., 2022)



Figura 1 - Logotipo atual da empresa Silliker Portugal, S.A.

1.2. O vinho

O vinho é uma bebida alcoólica produzida pela fermentação do sumo de uva, em especial de uvas da espécie *Vitis vinifera*. Na União Europeia, legalmente, o vinho define-se como o produto obtido exclusivamente por fermentação total ou parcial de uvas frescas, inteiras ou esmagadas, ou de mostos. (ASAE, 2016; Regulamento (CE) n.º 1493/1999, 1999).

O vinho é um produto de elevado interesse económico em todo o mundo. Em 2021, o consumo mundial de vinho estimado foi de 235 milhões de hectolitros (mhl), sendo os Estados Unidos o maior consumidor, seguido da França e da Itália. Portugal surge, em 2021, em décimo primeiro lugar na tabela de maiores consumidores mundiais de vinho,

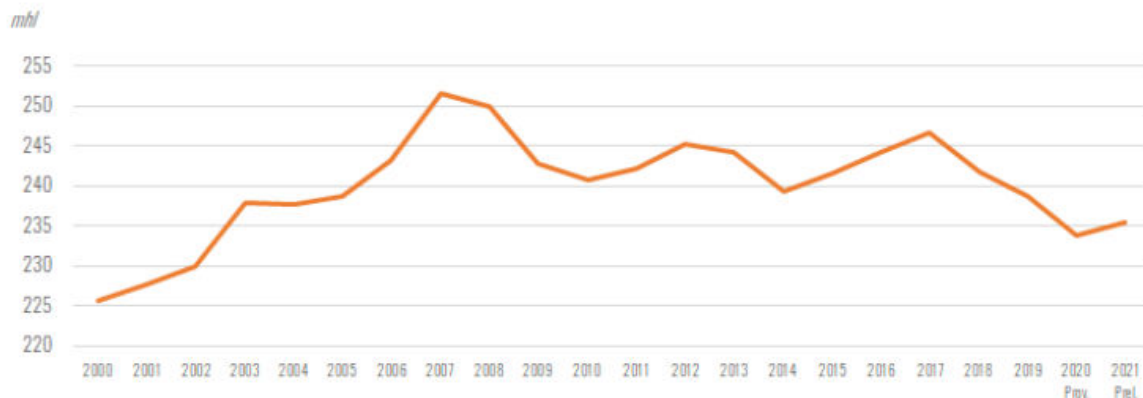


Figura 2 - Evolução do consumo mundial de vinho. (International Organisation of Vine and Wine, 2022)

com um consumo total estimado em 4,6 mhl em 2021 e que corresponde a 2% do consumo mundial de vinho no mesmo ano. (International Organisation of Vine and Wine, 2022)

Relativamente à produção de vinho, Portugal é o décimo país com maior produção de vinho a nível mundial e o quinto a nível europeu, com uma produção de 7,3 mhl em 2021 que representou 2,8% da produção mundial nesse ano, que foi estimada em 260 mhl. (International Organisation of Vine and Wine, 2021; International Organisation of Vine and Wine, 2022)

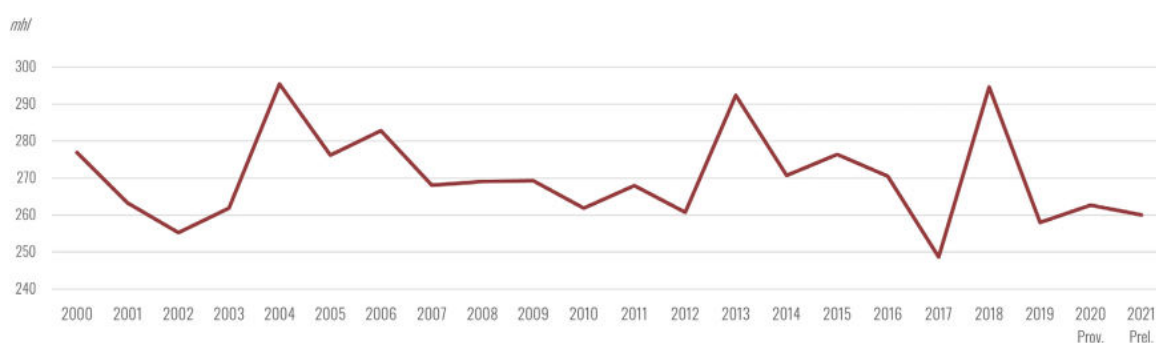


Figura 3 - Evolução da produção mundial de vinho (excluídos sumos e mostos). (International Organisation of Vine and Wine, 2022)

O processo de produção do vinho, com origem milenar, consiste sumariamente na maceração das uvas e na fermentação alcoólica realizada por leveduras. Se desejado, pode também ocorrer fermentação malolática, por bactérias lácticas, principalmente dos géneros *Leuconostoc* e *Oenococcus*. Após a fermentação, dá-se a maturação, clarificação e engarrafamento. O complexo processo de vinificação envolve interação entre vários microrganismos que geralmente são benéficos para a qualidade do vinho, no entanto, por vezes a atividade de algumas bactérias e leveduras é responsável pela deterioração do produto e surgimento de compostos voláteis e aromas indesejados. (Boulton *et al.*, 1996; Van Wyk *et al.*, 2019)

A constituição química das uvas permite que a fermentação se dê sem que seja necessário adicionar açúcares, ácidos, enzimas ou outros nutrientes. A fermentação é feita por vários tipos de leveduras (naturalmente presentes ou adicionadas) que consomem os açúcares presentes nas uvas e produzem etanol. Dependendo do tipo de vinho, pode ser utilizada uma grande variedade de uvas e de leveduras. (ASAE, 2016)

Os principais microrganismos que intervêm na produção de vinho são as leveduras, sendo a principal a *Saccharomyces cerevisiae*, bactérias do ácido láctico (BAL), bactérias do ácido acético (BAA) e alguns bolores. (Van Wyk *et al.*, 2019)

1.3. *Brettanomyces bruxellensis*

Brettanomyces bruxelensis é uma levedura unicelular pertencente ao filo Ascomycota (Jimenez *et al.*, 1999)

O termo *Brettanomyces* foi introduzido pela primeira vez em 1904 por Claussen para descrever uma levedura utilizada na produção de cerveja inglesa, tendo sido reconhecido como um género em 1920, na Bélgica, quando foi detetada e isolada uma levedura semelhante em cervejas Lambic (um tipo de cerveja com forte carácter ácido típica da zona do vale do rio Senne, próximo de Bruxelas. Trata-se de uma cerveja de fermentação espontânea, sem inoculação de culturas *starter*, sendo fermentada por inúmeras leveduras, bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético naturalmente presentes no mosto). (Wedral *et al.*, 2010; Spitaels *et al.*, 2014)).

Atualmente, a taxonomia das leveduras *Brettanomyces* inclui dois géneros: o género *Brettanomyces* que inclui as formas anamórficas (ou seja, assexuais e não esporulantes) destes ascomicetos enquanto que as formas telomórficas (com reprodução sexuada) têm a designação de género de *Dekkera*. Os géneros incluem 5 espécies: *B. custersianus*, *B. naardenensis*, *B. nanus*, *B. anomalus* (e a forma telomórfica *D. anomala*) e *B. bruxellensis* (com a forma telomórfica *D. bruxellensis*). (Jimenez *et al.*, 1999; Ciani *et al.*, 2014; Wedral *et al.*, 2010 e Agnolucci *et al.*, 2017)

A morfologia celular destas espécies é muito variada, podendo ser esféricas a subglobosas e elipsoides, mas mais frequentemente apresentam uma forma ogival ou de cilindro alongado (figura 4). Por vezes podem formar um pseudomicélio (figura 5). (Jimenez *et al.*, 1999 e Ciani *et al.*, 2014)

Estas leveduras têm um crescimento lento e geralmente a longevidade celular é reduzida. São auxoheterotróficas uma vez que necessitam de uma fonte externa de vitaminas, nomeadamente tiamina e biotina. São fermentadoras de glucose e a sua fermentação segue o efeito de Custer, no qual se dá a inibição da fermentação alcoólica em condições aeróbias, sendo o oxigénio um estimulador deste tipo de fermentação e o ácido acético o principal produto final. São também capazes de produzir e tolerar elevadas

concentrações de etanol. Outra característica fisiológica particular destas leveduras é a sua resistência ao fungicida cicloheximida entre 0,01% a 0,1%. (Jimenez *et al.*, 1999; Hellborg *et al.*, 2009 e Ciani *et al.*, 2014)

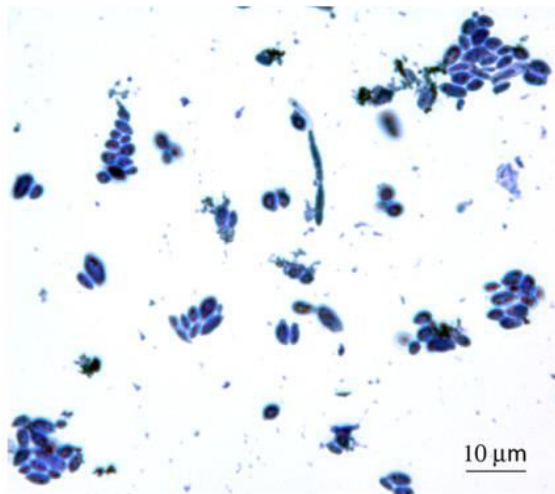


Figura 4 – Morfologia celular de *B. bruxellensis*. (Wedral *et al.*, 2010)



Figura 5 - Pseudomicélio de *Brettanomyces/Dekkera*. (Ciani *et al.*, 2014)

Devido à sua taxa de crescimento lenta, as leveduras do género *Brettanomyces* têm capacidade de sobreviver durante longos períodos de tempo e crescer em produtos armazenados ou que são maturados, tendo sido já isoladas de vários produtos alimentares, como vinhos e equipamentos de adega, cervejas (especialmente do tipo Lambic), cidras, tequila, laticínios, sumos de fruta, pickles e chá de kombucha. (Jimenez *et al.*, 1999 e Wedral *et al.*, 2010)

Brettanomyces bruxellensis tem especial interesse uma vez que é frequentemente encontrada em vinhos, aos quais confere propriedades sensoriais indesejadas, sendo responsável por consideráveis perdas económicas. (Wedral *et al.*, 2010)

1.4. *B. bruxellensis* em vinhos – Origem e impactes na qualidade do vinho

As leveduras são consideradas os principais microrganismos de deterioração de vinho, principalmente devido à sua capacidade de sobreviver em condições tipicamente adversas, como elevada acidez e depleção de nutrientes, bem como na presença de quantidades elevadas de etanol. (Loureiro e Malfeito-ferreira, 2003).

Os efeitos mais comuns de deterioração por leveduras incluem a formação de películas, turvação, formação de depósitos e produção de gás em vinhos engarrafados, bem como o desenvolvimento de aromas não característicos ao longo dos processos de vinificação e armazenamento. *B. bruxellensis*, também designada por Brett, destaca-se como levedura de deterioração, sendo atualmente considerada a principal responsável pela perda de qualidade dos vinhos provocada por leveduras e em especial em vinhos tintos, a granel ou engarrafados. (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2011).

B. bruxelensis existe na superfície das uvas e foi detetada pela primeira vez em vinhos no ano de 1930. Sendo que existe na superfície das uvas é possível que durante o processo de vinificação seja transferida para o vinho, bem como para as barricas de madeira utilizadas para o seu envelhecimento, e que constituem o habitat preferencial de *B. bruxelensis*. (Wedral *et al.*, 2010; Agnolucci *et al.*, 2017). Esta levedura está caracteristicamente envolvida na produção de dois compostos químicos aromáticos: 4-etilguaiacol (4-EG) e 4-etilfenol (4-EP), sendo o único microrganismo conhecido capaz de os sintetizar. Estes compostos fenólicos voláteis quando presentes em pequena quantidade são praticamente indetetáveis, mas quando as suas concentrações são superiores conferem aos vinhos aromas indesejáveis identificáveis olfativamente como aroma a sangue, estrebaria e suor de cavalo, designado de “Caráter *Brett*” (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006; Wedral *et al.*, 2010; Van Wyk *et al.*, 2019). Dependendo da espécie, as leveduras do género *Brettanomyces* também produzem ácido acético e ácidos gordos voláteis, que quando produzidos provocam rancidez e aromas semelhantes a queijo. (Oelofse *et al.*, 2008; Steensels *et al.*, 2015).

O controlo de *Brettanomyces* nos vinhos deve ser efetuado durante a fase de envelhecimento e quando o vinho é engarrafado. Na fase de envelhecimento, 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-EG e 4-EP atinja valores detetados organoleticamente. Na fase de engarrafamento, já é necessário assegurar a eliminação total de *Brettanomyces*, uma vez que apenas uma célula viável por garrafa pode contribuir para a posterior deterioração do vinho engarrafado (Malfeito-Ferreira, 2018; Malfeito-Ferreira, 2019).

Existem vários processos de tratamento que podem ser aplicados sendo que entre eles se destacam a filtração esterilizante, técnicas de sulfitagem e inativação térmica a partir de 35 °C. (Malfeito-Ferreira, 2018).

A filtração esterilizante é a técnica mais eficiente e deve ser realizada antes da etapa de engarrafamento, de modo 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 remover (retendo-o na membrana). A eficiência de filtração está associada com o número e tortuosidade de poros, que varia com o filtro selecionado, bem como com o número de microrganismos presentes, que deve ser tão reduzido quanto possível. Para a indústria vinícola, é suficiente utilizar filtros com poros até 0,6 µm para a remoção de leveduras (que têm em média cerca de 3 a 4 µm). Seguidamente, uma segunda filtração com um filtro de 0,45 µm permite a remoção de leveduras e bactérias do vinho, reduzindo a probabilidade de crescimento microbiano e garantindo a estabilidade microbiológica, sem ter efeitos negativos nas propriedades sensoriais do produto final (Malfeito-Ferreira, 2011; Fraise *et al.*, 2012)

1.5. Métodos comuns de deteção de *Brettanomyces* em vinhos

São várias as metodologias existentes para deteção e quantificação de leveduras, em especial *Brettanomyces*, nas matrizes alimentares. O método mais recorrente na indústria alimentar é, sem dúvida, a técnica de cultura em placa. O método de filtração por membrana é geralmente o mais utilizado para quantificar os microrganismos de deterioração em matrizes líquidas. Com esta metodologia é possível isolar um número reduzido de microrganismos a partir de um grande volume de amostra, é um método comum e de baixo custo. No entanto, estes métodos tradicionais podem gerar resultados falsos negativos, uma vez que não garantem a deteção de células viáveis não cultiváveis (VNC), ou seja, são células metabolicamente ativas e capazes de persistir por longos períodos de tempo, apesar de não serem detetadas através dos métodos tradicionais de crescimento em placa pois não crescem em meios de cultura. As células VNC podem causar deterioração dos vinhos e, de facto, existem já evidências da indução deste estado VNC para *Brettanomyces* quando em condições adversas de crescimento, por exemplo, com a adição de dióxido de enxofre (SO₂) (conservante comum na indústria vinícola). (Loureiro e

Malfeito-Ferreira, 2003; Montville e Matthews, 2013; Zuehlke *et al.*, 2015; Longin *et al.*, 2017).

Outra abordagem utilizada para deteção de *Brettanomyces* é o teste olfativo *Sniff Brett*, que consiste na adição de um meio de cultura seletivo ao vinho em análise, gerando um ambiente propício e adequado ao crescimento de *Brettanomyces* e consequentemente à produção de fenóis voláteis (4-EG e 4-EP) que são posteriormente detetados olfativamente. (Gerland e Sarl, 2010).

Nos últimos anos, a investigação tem vindo a desenvolver metodologias de deteção, quantificação e caracterização de modo a aumentar a rapidez e fiabilidade dos resultados.

Assim, têm vindo a surgir e a ganhar popularidade métodos que incluem técnicas moleculares, tais como o PCR; o PCR quantitativo (qPCR), que além de detetar permite quantificar o DNA amplificado em tempo real, é rápido (menos de 5 horas) e sensível (10 UFC/ml) e a citometria de fluxo, que é uma metodologia individual, qualitativa e quantitativa baseada na utilização de um laser para deteção e enumeração de células de microrganismos presentes numa suspensão líquida. (Cocolin *et al.*, 2004; Renouf *et al.*, 2007; Gerland e Sarl, 2010; Tofalo *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2017; Fairchild *et al.*, 2006 ; Longin *et al.*, 2017).

Fazendo uso destas tecnologias têm vindo a ser desenvolvidos inúmeros kits comerciais para deteção de quantificação de microrganismos que trazem diversas vantagens para o uso industrial.

1.6. O método VinoBrett®

VinoBrett® é um kit comercial de um método rápido e económico de deteção de *Brettanomyces bruxellensis* desenvolvido pela Invisible Sentinel, uma empresa de Biotecnologia sediada em Filadélfia, nos Estados Unidos, e pertencente ao grupo Biomerieux.

A tecnologia VinoBrett® pode ser utilizada por laboratórios especializados como também pelos próprios produtores nas suas adegas ou locais de produção uma vez que se baseia numa tecnologia simples de PCR (reação em cadeia da polimerase) e todos os reagentes e equipamento necessário são comercializados pela marca. Trata-se de um teste semi-quantitativo, fácil de realizar e de interpretar e é ainda um método rápido, pois os

resultados são obtidos em cerca de 4 horas e com pouco tempo de preparação e manuseamento das amostras.

As vantagens deste método, além das acima mencionadas, incluem:

✓ **Deteção precoce e a baixos níveis:**

Esta tecnologia possibilita aos produtores detetar a presença de *Brettanomyces* muito antes de os efeitos dos 4-EP/EG atingirem os limites sensoriais de deteção. A gestão desta levedura deve começar tão cedo quanto o início da etapa de fermentação dos vinhos, permitindo uma gestão proativa com métodos menos intrusivos e antes que seja necessário introduzir processos de remediação. A deteção por este método é robusta e eficaz mesmo em vinhos jovens (ou seja, com pouco tempo de estágio em barris), e permite também identificar barris contaminados para que possam ser isolados e devidamente tratados de modo a evitar contaminações cruzadas.

✓ **Precisão e sensibilidade:**

A tecnologia Veriflow, na qual este método se baseia, é certificada pela AOAC International (organização sem fins lucrativos que une governo, indústria e academia com o objetivo de estabelecer métodos normalizados de análises que garantem a segurança e integridade de bens alimentares e outros produtos relacionados com a saúde pública. (AOAC International, 2022)) para deteção de patogénicos alimentares. O VinoBrett foi desenvolvido para os produtores de vinho e foi validado por laboratórios internos e externos, nos testes de validação identificou 100% dos 49 isolados de *Brettanomyces bruxellensis* e excluiu corretamente 100% das múltiplas espécies de outros microrganismos tipicamente encontradas em vinhos.

✓ **Implementação simples e económica:**

A implementação do método requer apenas um modesto investimento e tem um custo por teste acessível.

✓ **Permite gestão proativa para preservar a qualidade e valor dos produtos:**

A deteção dos microrganismos deterioradores tardiamente e em elevadas quantidades requer **remediação**, o que implica métodos mais intrusivos, como filtração, mistura ou aplicação de aditivos; processos mais trabalhosos, como esterilização e limpeza dos barris; aumento dos custos e constrangimentos em caso de contaminação cruzada; tem impacto

negativo na qualidade e valor do vinho, logo, aumenta o potencial para a necessidade de descartar o vinho. A remediação tem, portanto, um impacto económico bastante significativo.

Pelo contrário, quando os microrganismos deterioradores são detetados precocemente e, logo, em contrações reduzidas, permite que seja feita uma **gestão**. A gestão requer métodos menos intrusivos do que a remediação, tais como modulação da temperatura, aumento da concentração de dióxido de enxofre (SO₂) e diminuição do pH; tem requisitos mínimos de mão de obra; permite isolar os lotes contaminados antecipadamente de modo a minimizar a contaminação cruzada e tem impacto mínimo ou nulo na qualidade e valor do vinho, tendo, assim, um impacto económico negligenciável. (Invisible Sentinel, 2022)

1.7. Validação de métodos para rotina laboratorial

A realização deste trabalho teve origem no desejo constante da empresa Silliker Portugal, S.A. em melhorar o serviço que presta aos seus clientes, concretamente, na introdução de um novo método microbiológico que visa a deteção da levedura *Brettanomyces bruxellensis* em vinhos no seu leque de análises.

Tratando-se de um laboratório acreditado é necessário que antes de ser utilizado para amostras de clientes o método seja devidamente implementado e verificado, cumprindo os requisitos de qualidade predefinidos por procedimento interno.

O procedimento interno relativo ao controlo da qualidade para validação de métodos em análises microbiológicas define as metodologias e ferramentas que devem ser utilizadas na validação destes métodos no que respeita à identificação das principais fontes de incerteza; descrição da metodologia aplicada na estimativa de incertezas e descrição da metodologia a aplicar na validação ou implementação de novos métodos em microbiologia. Este procedimento interno aplica-se tanto aos métodos quantitativos como os qualitativos realizados no laboratório de microbiologia da empresa.

Em suma, e no que respeita ao protocolo deste trabalho, para determinar, segundo este procedimento, que o método é adequado à utilização prevista é necessário elaborar o relatório de validação de método no qual consta a informação relativa à identificação das matrizes analisadas em rotina, a experiência do método, o princípio do método sensibilidade, especificidade, eficiência, seletividade, taxa de falsos positivos e taxa de falsos negativos, os quais devem ser calculados com base nos resultados da análise de

pelo menos 10 amostras, sendo realizados, no mínimo, 30 ensaios, dos quais pelo menos 10 com resultados positivos e 2 brancos, abrangendo as diferentes matrizes às quais o método se aplica.

A validação ou verificação secundária deve ser realizada quando o laboratório pretende implementar um método desenvolvido externamente e baseia-se em reunir as evidências necessárias de que o laboratório é capaz de gerar dados de desempenho semelhantes àqueles estabelecidos aquando da validação primária do método.

As características de desempenho a serem executadas pelo laboratório a fim de verificar secundariamente um método já validado são as seguintes:

- ✓ **Eficiência** – fração de colónias ou ensaios corretamente atribuídos na contagem presumtiva;
- ✓ **Especificidade** – fração total de negativos corretamente atribuídos na contagem presumtiva. Normalmente a especificidade deve ser superior a 80%.
- ✓ **Seletividade** - Rácio do número de colónias/ensaio-alvo com o número total de colónias. Por norma, os resultados não são válidos se seletividade for inferior a 10%.
- ✓ **Sensibilidade** - Capacidade do método em detetar o organismo-alvo. Fração do total de positivos, corretamente atribuídos na contagem presumtiva. Normalmente a sensibilidade deve ser superior a 90%.
- ✓ **Taxa de falsos negativos** - Fração de negativos (por exemplo: colónias atípicas) que demonstram ser colónias alvo.
- ✓ **Taxa de falsos positivos** - Fração de positivos (por exemplo: colónias típicas) que demonstram ser devido a organismos não-alvo.

Estas características de desempenho são calculadas segundo as fórmulas referidas abaixo, sendo **a**, o número de verdadeiros positivos; **b**, o número de falsos negativos; **c**, o número de falsos positivos e **d**, o número de verdadeiros negativos (valores esquematizados na tabela 1).

Tabela 1 - Cálculo das características de desempenho para validação secundária de métodos

		Presuntivos		
		+	-	
Confirmados/ Verdadeiramente	+	<i>a</i> (verdadeiros positivos)	<i>b</i> (falsos negativos)	<i>a+b</i>
	-	<i>c</i> (falsos positivos)	<i>d</i> (verdadeiros negativos)	<i>c+d</i>
		<i>a+c</i>	<i>b+d</i>	<i>n</i> (total de testes)

Eficiência: $(a+d)/n$ que corresponde ao número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros somado ao número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros, dividido pelo número total colónias ou ensaios.

Especificidade: $d/(c+d)$ que corresponde ao número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros dividido pelo número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros somado ao número de colónias ou ensaios presuntivos mas que são falsos. Este valor deve ser superior a 80%.

Falsos negativos: $b/(b+d)$ que corresponde ao número de colónias ou ensaios não considerados presuntivos mas que são verdadeiros dividido pelo número de colónias ou ensaios não considerados presuntivos mas que são verdadeiros somado ao número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros.

Falsos positivos: $c/(a+c)$ que corresponde ao número de colónias ou ensaios presuntivos mas que são falsos dividido pelo número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros somado ao número de colónias ou ensaios presuntivos mas que são falsos.

Seletividade: a/n que corresponde ao número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros dividido pelo número total colónias ou ensaios. Valor válido quando é igual ou superior a 10%.

Sensibilidade: $a/(a+b)$ que corresponde ao número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros dividido pelo número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros somado ao número de colónias ou ensaios não considerados presuntivos mas que são verdadeiros. Normalmente é superior a 90%.

1.8. Objetivos do Trabalho

O presente trabalho insere-se no âmbito da obtenção do grau de mestre em Aplicações em Biotecnologia e Biologia Sintética. O estágio que deu origem a este trabalho foi realizado no laboratório de microbiologia da empresa Silliker e teve como principais objetivos:

- Validação e implementação do método “Pesquisa de *Brettanomyces bruxellensis* em Vinhos”, recorrendo a um kit de deteção comercial – VinoBrett®;
- Execução de amostras para a validação do método;
- Elaboração do relatório de validação do método;

Outros objetivos prendem-se com a obtenção de experiência na prática de análises microbiológicas de rotina em laboratório acreditado e aquisição de experiência de trabalho de equipa em contexto real de ambiente empresarial.

2. Procedimento Experimental

O procedimento adotado consiste na utilização de um kit comercial para a deteção de *B.bruxellensis* em amostras de vinho, designado por VinoBrett®. O kit (que inclui todos os reagentes específicos para os ensaios) bem como os protocolos que devem ser seguidos foram desenvolvidos e comercializados pela Biomérieux. Trata-se de um ensaio de base molecular que permite a deteção qualitativa e semi-quantitativa do organismo alvo - *B.bruxellensis* – tanto no seu estado ativo como em estado viável mas não cultivável (VNC), através do método de amplificação por PCR acoplado por deteção visual e colorimétrica por cassete.

O método, sumariamente, consiste em quatro etapas: recolha e preparação da amostra; digestão; amplificação e, por fim, análise na cassete. O kit é constituído por duas soluções tampão (Buffers A e B); tubos de PCR e tubos de digestão, ambos contendo os reagentes necessários às respetivas reações; um controlo positivo de *B.bruxellensis* e as cassetes de teste.

Neste trabalho, foram analisadas um total de 55 amostras das quais 36 amostras de vinho, 3 provenientes de suspensões, 3 provenientes de colónias isoladas e 13 amostras de controlo positivo comercial.

As amostras de vinhos foram obtidas de amostras enviadas de clientes. A partir de amostras de vinho positivas para *B.bruxellensis* procedeu-se à inoculação da amostra positiva em meio de cultura específico para bolores e leveduras - *Yeast Glucose Chloramphenicol* (YGC), de modo a obter colónias isoladas de *B.bruxellensis*. As colónias obtidas foram posteriormente analisadas segundo o protocolo abaixo descrito para colónias isoladas. Foram ainda preparadas suspensões que foram analisadas segundo o protocolo para suspensões seguidamente descrito.

2.1. Preparação da amostra

2.1.1. Preparação da amostra a partir de vinho

Para proceder à análise a partir de uma amostra de vinho começou-se por transferir 25 ml do vinho para um tubo cónico de 50 ml e centrifugou-se a 1800 RCF durante 10 minutos. Após centrifugação, descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 1000 µl de Buffer A. Homogeneizou-se por agitação em vortex e transferiu-se 100 µl do sedimento ressuspendido para um tubo de digestão. Os

tubos de digestão contendo a amostra foram colocados no termociclador Invisible Sentinel® e submetidos ao programa de digestão, com a duração de aproximadamente uma hora (Tabela 2). De seguida, os tubos foram removidos com cuidado para não agitar o conteúdo, uma vez que o DNA alvo se encontra na solução do topo do tubo e desta solução do topo foram transferidos 5 µl para o tubo de PCR. Os tubos de PCR foram colocados no termociclador Invisible Sentinel® e executado o programa de PCR (Tabela 2) com a duração aproximada de duas horas.

Tabela 2 - Programas utilizados no termociclador

Programa	Duração (min)	Descrição	
Digestão	50	37°C, 30 min	
		95°C, 10 min	
		21°C, 10 min	
		Manutenção a 4°C	
Amplificação (PCR)	120	Desnaturação	94°C, 2 min
		Extensão (36 ciclos)	94°C, 40 s
			61,2°C, 40 s
			68°C, 1 min
		Emparelhamento	68°C, 1 min
		Manutenção a 4°C	

2.1.2. Preparação da amostra a partir de suspensões

A análise a partir de suspensões prosseguiu do seguinte modo: transferiu-se 500 µl de Buffer A para um microtubo de centrífuga de 1,5 ml ao qual se adicionou 500 µl da suspensão a analisar. O conteúdo do tubo foi misturado por pipetagem ou, em alternativa, vortex.

De seguida, transferiu-se 5 µl da suspensão anteriormente preparada para o tubo de PCR (já contendo os restantes reagentes). O tubo de PCR foi aberto apenas para inserir a respetiva amostra e imediatamente fechado, de modo a evitar contaminação cruzada entre amostras. Após preparados os tubos de PCR estes foram colocados no termociclador Invisible Sentinel® e executado o programa de PCR evidenciado anteriormente na tabela 2.

2.1.3. Preparação da amostra a partir de colónia isolada

O procedimento para deteção de *B. bruxellensis* a partir de colónias isoladas consistiu em transferir uma colónia para um microtubo de centrífuga de 1,5 ml contendo 500 µl de água desionizada estéril, suspendeu-se a colónia por pipetagem ou votex de modo que a suspensão ficasse homogénea.

Seguidamente, transferiu-se 5 µl da suspensão para o tubo de PCR. O tubo de PCR foi aberto apenas para inserir a respetiva amostra e imediatamente fechado, de modo a evitar contaminação cruzada entre amostras. Procedeu-se para a reação de PCR com o programa evidenciado anteriormente na tabela 2, que decorreu no termociclador Invisible Sentinel®.

2.2. Análise na cassette de teste

A análise na cassette de teste é comum para os 3 tipos de matrizes (vinho, suspensão ou colónia isolada).

Terminada a amplificação os tubos foram removidos do termociclador e adicionaram-se 4 gotas de Buffer B ao conteúdo do tubo, transferiu-se toda a amostra (aproximadamente 200 µl) diretamente para a janela da cassette, onde foram adicionadas mais 4 gotas de Buffer B. Após aguardar cerca de 1 minuto puxou-se o manipulador da cassette para baixo e observaram-se os resultados. Um resultado negativo corresponde ao desenvolvimento de apenas uma linha vermelha, a linha controlo, se esta linha controlo não se desenvolver então o teste é considerado inválido e terá de ser repetido. Num resultado positivo, além da linha controlo desenvolve-se uma segunda linha, a linha de teste. A intensidade da cor vermelha da linha de teste indica o resultado semi-quantitativo, conforme representado na figura 3.



Figura 6 - Resultados semi-quantitativos do teste VinoBrett®. (Invisible Sentinel. (2022))

3. Resultados

Para efeitos de análise de resultados, estes foram agrupados em duas classes: resultados positivos com semi-quantificação ou negativos.

Das 55 amostras analisadas para a pesquisa e semi-quantificação de *B. bruxellensis*, o laboratório obteve 100 resultados (análises a partir de amostras naturalmente contaminadas, contaminadas artificialmente e amostras não contaminadas, realizadas em duplicado e/ou paralelo) para efeitos de verificação do método, incluindo as diferentes matrizes: 88 ensaios de vinho, 6 suspensões e 6 colónias isoladas.

Dos 100 resultados obtidos, 46 foram positivos. Entre estes, 16 eram expectáveis por se tratarem de ensaios com presença e semi-quantificação de *B. bruxellensis*, pois provinham de amostras contaminadas (controlo positivo). Nos restantes 30 ensaios era também esperado obter presença e semi-quantificação de *B. bruxellensis*, pois provinham de amostras que tinham contaminação natural. As amostras foram analisadas em duplicado e/ou em paralelo, ou seja, uma primeira análise obteve um resultado que foi posteriormente confirmado pelo segundo ensaio, seja este realizado pelo mesmo analista (em duplicado) ou por um analista diferente (em paralelo).

Os resultados negativos para a presença de *B. bruxellensis* foram um total de 54 e todos expectáveis de não obterem presença e semi-quantificação de *B. bruxellensis*, pois provinham de amostras que não tinham contaminação (as amostras foram analisadas em duplicado e/ou em paralelo).

Dos 46 ensaios que provinham de amostras contaminadas artificialmente e/ou naturalmente (analisadas em paralelo ou duplicado), o laboratório considerou os 46 ensaios presuntivos e todos os resultados confirmaram ser efetivamente positivos.

Dos 54 ensaios que provinham de amostras não contaminadas, o laboratório considerou os 54 ensaios não presuntivos, ou seja, todos os 54 ensaios que não confirmaram eram expectavelmente negativos pois na primeira análise tinha sido obtido um resultado negativo.

Abaixo, na tabela 3, estão sumariados os resultados obtidos com base nos quais foi possível calcular os parâmetros necessários para definir as características de desempenho.

Tabela 3 - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios

		Ensaio Presuntivo		
		+	-	
Confirmados/ Verdadeiramente	+	(a) Verdadeiros positivos	(b) Falsos Negativos	a + b
	-	(c) Falsos positivos	(d) Verdadeiros negativos	c + d
		a + c	b + d	n

		Ensaio Presuntivo		
		+	-	
Confirmados	+	46	0	a + b
	-	0	54	c + d
		a + c	b + d	100

Com base nos resultados obtidos, evidenciados na tabela 3 acima, foram calculados os parâmetros das características de desempenho, cujas fórmulas de cálculo foram anteriormente neste trabalho referidas e explicadas, e se encontram resumidas abaixo na tabela 4.

A sensibilidade obtida para o método foi de 100%, ou seja, o método tem 100% de capacidade para detetar *B. bruxellensis*, o microrganismo-alvo, quando está presente.

Obteve-se igualmente um resultado de 100% para a especificidade, o que significa que o resultado foi negativo em todos os ensaios em que o microrganismo-alvo não estava presente.

Para a eficiência obteve-se um valor de 100%, o que significa que todos os ensaios considerados presuntivos foram efetivamente positivos e todos os considerados não presuntivos obtiveram um resultado negativo.

As taxas de falsos positivos e de falsos negativos são ambas 0%, significando que o método não conduz a resultados falsos, isto é, o método não permite que um ensaio não presuntivo obtenha um resultado positivo, e vice-versa.

Relativamente à seletividade, foi obtido um valor de 46%, ou seja, a capacidade do método de detetar inequivocamente *B. bruxellensis* na presença de microrganismos interferentes é de 46%. Estes resultados bem como os respetivos cálculos encontram-se explicitados na tabela 4.

Tabela 4 - Resumo dos valores obtidos para as características de desempenho

Parâmetro	Fórmula	Cálculo	Resultado
<i>Sensibilidade</i>	$a / (a+b)$	$46/(46+0)$	100%
<i>Especificidade</i>	$d / (c+d)$	$54/(0+54)$	100%
<i>Taxa de falsos positivos</i>	$c / (a+c)$	$0/(46+0)$	0%
<i>Taxa de falsos negativos</i>	$b / (b+d)$	$0/(0+54)$	0%
<i>Seletividade</i>	a / n	$46/100$	46%
<i>Eficiência</i>	$(a+d) / n$	$(46+54)/100$	100%

4. Discussão

A segurança e qualidade dos produtos oferecidos aos clientes são uma preocupação crescente e com grande impacto na indústria dos vários setores, em especial no setor agroalimentar, que é também o âmbito do presente trabalho. No que respeita à microbiologia alimentar, os microrganismos patogénicos têm forte impacto na segurança e consequente qualidade dos alimentos, sendo uma questão de elevada importância na saúde pública. Por sua vez, os microrganismos deterioradores, como *B. bruxellensis*, embora a sua presença e atividade geralmente não constitua um problema de segurança, têm uma elevada importância na qualidade dos alimentos, visto que alteram os produtos conferindo-lhes propriedades indesejadas pelos consumidores, e sendo, assim, um fator relevante na indústria e a causa de elevadas perdas económicas quando não são detetados e mitigados os seus efeitos atempadamente.

O vinho é um produto de origem agrícola altamente consumido e apreciado no mundo inteiro, com origem remota e transversal a várias culturas, tornando-se, então, um produto de excelência e com grande interesse económico.

No setor vitivinícola, a levedura *B. bruxellensis* é uma grande preocupação na qualidade dos vinhos devido aos produtos da sua atividade que conferem aos vinhos o denominado “caráter Brett”, caracterizado pela presença de aromas desagradáveis a “suor de cavalo”. Sendo impossível até ao momento remover estes compostos dos vinhos, a deteção precoce da sua presença é essencial para a mitigação das perdas.

Tendo em conta esta necessidade, o laboratório de microbiologia da Silliker Portugal, S.A. implementou o método rápido de deteção e semi-quantificação de *B. bruxellensis* - VinoBrett®.

A acreditação de um laboratório obriga a que qualquer método antes de ser implementado por rotina seja validado internamente, ou seja, que seja feita uma validação secundária ou verificação. Esta validação secundária é a demonstração do cumprimento das especificações e da adequação ao uso de um método normalizado, isto é, consiste num conjunto de procedimentos e técnicas que permitem comprovar que o método cumpre a finalidade prevista e que o laboratório é capaz de o executar corretamente. Todos os resultados obtidos devem ser devidamente registados, tratados estatisticamente e

arquivados por forma a constituírem uma evidência documentada que demonstra a qualidade dos resultados obtidos pelo método.

A validação secundária foi realizada neste trabalho seguiu um procedimento interno que define que devem ser analisadas no mínimo 10 amostras e realizados, no mínimo, 30 ensaios, para obter os dados necessários para o cálculo de seis características de desempenho. Neste trabalho, foram analisadas 55 amostras e obtidos 100 resultados, dos quais 46 positivos e 54 negativos.

Os resultados foram classificados em positivos com semi-quantificação ou negativos uma vez que o método se trata de uma pesquisa, logo o relevante é a presença ou ausência do microrganismo. A quantificação adicional que o método permite é parcial, permitindo apenas enquadrar a quantidade de células presentes em intervalos. Adicionalmente, tratando-se de uma semi-quantificação com interpretação visual esta pode por vezes tornar-se subjetiva. Por estes motivos optou-se por validar este método como um método qualitativo, e não quantitativo.

Para a característica de desempenho **sensibilidade**, que deve ser superior a 90%, foi obtido um valor de 100%. A **especificidade**, normalmente superior a 80%, foi de 100%. A **eficiência** relaciona, de certo modo, a sensibilidade e a especificidade, e uma vez que para ambos o resultado obtido foi de 100%, é também esperado que a eficiência seja de 100% e efetivamente foi este o valor obtido.

Num método o ideal é que tanto a sensibilidade como a especificidade sejam de 100% pois isso indica que o método não produz resultados falsos, os resultados obtidos estão concordantes com este pressuposto, visto que para a **taxa de falsos positivos e taxa de falsos negativos** se obtiveram valores de 0% para ambas.

Calculou-se ainda a **seletividade**, que para um método ser válido deve ser igual ou superior a 10% e neste trabalho a seletividade obtida foi de 46% pelo que os resultados obtidos pelo método em estudo são considerados válidos.

Neste trabalho realizou-se todo o processo de implementação e validação secundária do método VinoBrett® para deteção e semi-quantificação de *B. bruxellensis* e estando as seis características de desempenho dentro dos valores desejados e sendo concordantes, considerou-se que o método produz resultados corretos e válidos, tendo sido então demonstrado pelos resultados referidos anteriormente que este método cumpre com

o propósito para o qual foi desenvolvido e que o laboratório é capaz de o executar dentro das especificações exigidas sendo, portanto, adequada a sua aplicação rotineira para auxiliar os clientes da indústria vitivinícola a evitar as perdas provocadas por *B. bruxellensis* em vinhos.

5. Conclusão

Em tempos a maior preocupação do setor agroalimentar recaía sobre a segurança dos alimentos, atualmente sendo a segurança um fator garantido e inquestionável no mercado, a qualidade ganha cada vez mais relevância. Os consumidores são cada vez mais informados e, portanto, mais exigentes no que respeita à qualidade e estabilidade dos produtos, desafiando a indústria a ser capaz de satisfazer as suas necessidades.

Brettanomyces bruxellensis é uma levedura unicelular tipicamente encontrada em vinhos, nos quais produz essencialmente dois compostos fenólicos, 4-EG e 4-EP, que conferem aromas indesejáveis aos vinhos, nomeadamente a sangue, estrebaria e suor de cavalo. Embora baixas concentrações não afetem o sabor, concentrações mais elevadas são um problema, sendo necessário misturar o vinho com outro vinho não contaminado ou mesmo descartar o produto, visto que uma vez produzidos não é possível remover estes compostos do vinho. Assim, a higiene em todo o processo é a medida preventiva mais importante no controlo deste microrganismo deteriorador, e de seguida a deteção o mais precoce possível da sua presença para ser possível mitigar os efeitos negativos da sua atividade atempadamente.

Os métodos comuns de deteção de *B. bruxellensis* incluem a cultura em placa, filtração por membrana, teste olfativo, técnicas moleculares: PCR convencional, PRC quantitativo e citometria de fluxo, que podem ser subjetivos, morosos ou acarretam custos mais ou menos significativos. O método que foi alvo de estudo neste trabalho, designado de VinoBrett®, é um método preciso e sensível que permite a deteção rápida e precoce de *B. bruxellensis*. É de implementação simples e económica, contribuindo para uma gestão proativa que preserva a qualidade e valor dos produtos.

Este trabalho permitiu a implementação e validação secundária do método VinoBrett® para Pesquisa de *B. bruxellensis* no laboratório de Microbiologia da Silliker Portugal, S.A., no qual, de momento, o método é aplicado apenas a vinhos, suspensões e colónias com possibilidade de, futuramente, ser aplicado a outras matrizes para as quais está validado, tais como como cervejas e sumos de fruta.

Considerações finais e perspetivas futuras

Agora terminado este estágio curricular em contexto empresarial considero importante refletir sobre a experiência que vivi ao longo deste período.

O balanço que faço de todo o estágio é muito positivo, pois tratou-se de uma fase de grande progresso e crescimento na minha formação quer a nível pessoal como profissional. Foi um momento de interação com a realidade do mercado de trabalho e com a prática laboratorial em contexto empresarial/industrial, foi um momento de grande ampliação de conhecimentos teóricos e práticos e considero ter atingido os objetivos delineados numa fase inicial.

Foi-me dada a oportunidade de consolidar e aplicar conhecimentos previamente adquiridos e reforçar *soft-skills* como são o trabalho em equipa, a comunicação, a organização e a delegação de tarefas.

Por fim, tive o prazer de ser convidada pela empresa para fazer parte da sua equipa de técnicos de laboratório de microbiologia, trabalho este que aceitei com todo o gosto e que desempenho com toda a dedicação e procura crescente e contínua de conhecimento de modo a ser capaz de a cada dia acrescentar valor ao meu trabalho.

Referências

- Agnolucci, M., Tirelli, A., Cocolin, L., e Toffanin, A. (2017). *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: Impact on wine and winemaking. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), 1-6. DOI: 10.1007/s11274-017-2345-z
- AOAC International. (2022). *About AOAC INTERNATIONAL*. Disponível em: <https://www.aoac.org/about-aoac-international/>. Consultado a 30/08/2022.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). (2016). *O Vinho*. Disponível em <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-104-dezembro-2016/o-vinho.aspx>. Consultado a 28/03/2022
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. e Kunkee, R. E.. (1996). *Principles and practices of winemaking*. New York: Chapman and Hall.
- Ciani, M. e Comitini, F. (2014). *Brettanomyces*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. ,316–323. DOI:10.1016/B978-0-12-384730-0.00046-X
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., e Comi, G. (2004). Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1347-1355.
- Fairchild, A., Lee, Margie D., Maurer, John J. (2006). PCR basis, in *Pcr Methods in Foods*. Springer, pp. 1–27.
- Gerland, C. e 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 a 01/07/2022
- Hellborg, L., e Piškur, J. (2009). Yeast diversity in the brewing industry. In *Beer in health and disease prevention* (pp. 77-88). Academic Press.
- International Organisation of Vine and Wine. (2021). *World Wine Production Outlook. OIV First Estimates*. Publicado em novembro de 2021.
- International Organisation of Vine and Wine. (2022). *State of the world vine and wine sector 2021*. Publicado em abril de 2022.

Invisible Sentinel. (2022). *Preserve the value of your wine*. Disponível em: <https://invisiblesentinel.com/products/wine-quality-tests/vinobrett-Brettanomyces-bruxellensis/> Consultado a 4/04/2022.

Jimenez, J., Fidalgo, M., e Alguacil, M. (1999). *Brettanomyces*. Academic Press.

Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., & Alexandre, H. (2017) Application of flow cytometry to wine microorganisms, *Food Microbiology*, 62, pp. 221–231. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.023

Loureiro, V., e Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 23-50.

Loureiro, V., e Malfeito-Ferreira, M. (2006). *Food spoilage microorganisms*. Boca Raton: Woodhead Publishing.

Loureiro, V. e 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.

Malfeito-Ferreira, M. (2011). Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology*, 61(1), 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.

Montville, T. e 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_kZI4bUC&printsec=frontcover&hl=pt-PT Acedido a 01/07/2022.

Morgan, H. H., Du Toit, M. e Setati, M.E.. (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.

Oelofse, A., Pretorius, I. S., e Du Toit, M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. DOI: 10.21548/29-2-1445

Regulamento (CE) nº 1493/99, do Conselho, de 17 de Maio. Disponível em: <https://www.ivv.gov.pt/np4/446.html#1>

Renouf, V., Strehaiano, P., e Lonvaud-Funel, A. (2007). Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE, *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*, 41(1), pp. 51–61. doi: 10.20870/oeno-one.2007.41.1.858.

Silliker Portugal, S. A. (2022). *Quem somos. Resumo histórico da Silliker Portugal*. Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal> Consultado a 3/01/2022.

Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H. M., Van Landschoot, A., & Vandamme, P. (2014). The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PloS one*, 9(4), e95384. DOI: 10.1371/journal.pone.0095384

Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. J. (2015). *Brettanomyces* yeasts—From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International journal of food microbiology*, 206, 24-38. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005

Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Corsetti, A. e Suzzi, G.. (2011). Método rápido para a determinação do carácter "brett" no vinho, *Revista internet de Viticultura e Enologia*. Disponível em: www.infowine.com Consultado a 01/07/2022

Van Wyk, S., e Silva, F. V. (2019). Nonthermal preservation of wine. *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*, 203-235. DOI: 10.1016/B978-0-12-816685-7.00007-0

Wedral, D., Shewfelt, R., e Frank, J. (2010). The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT-Food Science and Technology*, 43(10), 1474-1479. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.06.010

Zuehlke, J. M., Childs, B. C., e Edwards, C. G. (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

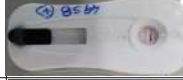
Anexos

Anexo 1 - Experiência no método Pesquisa de *Brettanomyces bruxellensis* em vinhos

Data	Nº amostra	Analista	Produto	Observações	Resultado (Células/ml)	Resultado semi-quantitativo (Células/ml)	Fotografia
05/11/2021	40835	AP	Vinho tinto	-	Detetado	50	
		AP	Vinho tinto	-	Detetado	50	
	40837	AP	Vinho tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
09/11/2021	41535	E	Vinho tinto	-	Não detetado	0	
		E	Vinho tinto	-	Não detetado	0	
	41536	E	Vinho tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
	41537	F	Vinho branco	-	Não detetado	0	
		F	Vinho branco	-	Não detetado	0	
	41538	F	Vinho branco	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
11/11/2021	41547	M	Vinho do Porto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		M	Vinho do Porto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	41548	M	Vinho do Porto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
	41861	J	Vinho rosé	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		J	Vinho rosé	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	41862	J	Vinho branco	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		J	Vinho branco	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	41866	J	Vinho tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		J	Vinho tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	41867	J	Vinho tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
	43418	P	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		P	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	

24/11/2021	42420	P	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		P	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	43422	P	Vinho Tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
09/12/2021	45030	E	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		E	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	45031	F	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		F	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	45032	M	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		M	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	45033	J	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		J	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	45034	J	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		J	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	45036	E	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Detetado	50	
		E	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Detetado	50	
	45037	JV	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		JV	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	45038	JV	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		JV	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	45039	JV	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
		JV	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	45040	F	Vinho Branco	Analísado em duplicado	Detetado	100	

45040	F	Vinho Branco	Analísado em duplicado	Detetado	100	
45041	M	Vinho Branco	Analísado em duplicado	Detetado	500	
	M	Vinho Branco	Analísado em duplicado	Detetado	500	
45042	J	Vinho Branco	Analísado em duplicado	Detetado	50	
	J	Vinho Branco	Analísado em duplicado	Detetado	50	
45043	JV	Vinho Tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
3835	S	Vinho branco	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	50	
	S	Vinho branco	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	50	
3836	S	Vinho branco	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	S	Vinho branco	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
3837	S	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	S	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
3838	JF	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	JF	Vinho Tinto	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
3839	JF	Vinho branco	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
	JF	Vinho branco	Analísado em duplicado	Não detetado	0	
3842	JF	Matéria Prima_Suspensão	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	50	
	JF	Matéria Prima_Suspensão	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	50	
3843	P	Matéria Prima_Suspensão	Analísado em duplicado	Detetado	500	
	P	Matéria Prima_Suspensão	Analísado em duplicado	Detetado	500	
3844	JV	Matéria Prima_Suspensão	Analísado em duplicado	Detetado	500	
	JV	Matéria Prima_Suspensão	Analísado em duplicado	Detetado	500	

	3845	S	Matéria Prima_Suspensão	Analisado em duplicado	Detetado	100	
		S	Matéria Prima_Suspensão	Analisado em duplicado	Detetado	100	
	3846	S	Matéria Prima_Colônia	Analisado em duplicado	Detetado	100	
		S	Matéria Prima_Colônia	Analisado em duplicado	Detetado	100	
	3847	F	Matéria Prima_Colônia	Analisado em duplicado	Detetado	50	
		F	Matéria Prima_Colônia	Analisado em duplicado	Detetado	50	
3848	F	Matéria Prima_Colônia	Analisado em duplicado	Detetado	500		
	F	Matéria Prima_Colônia	Analisado em duplicado	Detetado	500		
18/02/2022	4957	F	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Detetado	50	
		F	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Detetado	50	
	4958	E	Vinho Tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
22/03/2022	8199	M	Vinho Tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	50	
		M	Vinho Tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	50	
	8200	JV	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
		JV	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
	8201	BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
		BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
	8202	BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
		BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
	8203	BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
		BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
	8204	BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	

	8204	BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
	8205	BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
		BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
	8206	BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
		BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Não detetado	0	
08/04/2022	10567	F	Vinho Tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
	10435	F	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Detetado	500	
		M	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Detetado	500	
	10436	E	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Detetado	500	
		E	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Detetado	500	
12/04/2022	+	BC	Vinho tinto	Contaminado com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Biomerieux ISEV012	Detetado	500	
	10855	BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Detetado	500	
		BC	Vinho Tinto	Analisado em duplicado	Detetado	500	

Amostras	Ensaios	Ensaios de amostras contaminadas artificialmente	Ensaios de Amostras não contaminadas (analisadas em paralelo ou duplicado)	Ensaios de amostras contaminadas naturalmente (analisadas em paralelo ou duplicado)
55	100	16	54	30

Ensaios Presuntivos				
Confirmados/ Verdadeiramente		+	-	
	+	a) Verdadeiros positivos	(b) Falsos Negativos	a + b
	-	(c) Falsos positivos	(d) Verdadeiros negativos	c + d
		a + c	b + d	n

Ensaios Presuntivos				
Confirmados		+	-	
	+	46	0	a + b
	-	0	54	c + d
		a + c	b + d	100

PAM,055		
Sensibilidade:	a / (a + b)	100%
Especificidade:	d / (c + d)	100%
Taxa de falsos positivos:	c / (a + c)	0%
Taxa de falsos negativos:	b / (b + d)	0%
Seletividade:	a / n	46%
Eficiência:	(a + d) / n	100%