



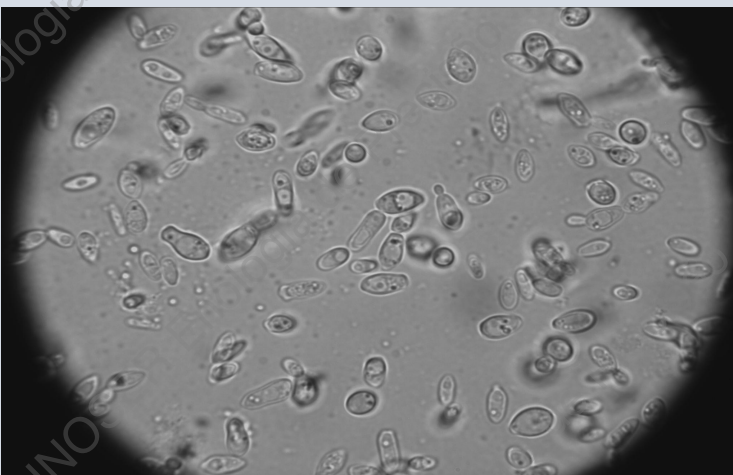
Um inimigo da qualidade  
***BRETTANOMYCES***



**inoser**  
enologia de precisão

# ***Brettanomyces***

## **Sobrevivente extremamente competitiva**



Elevada resistência a condições adversas , tais como:

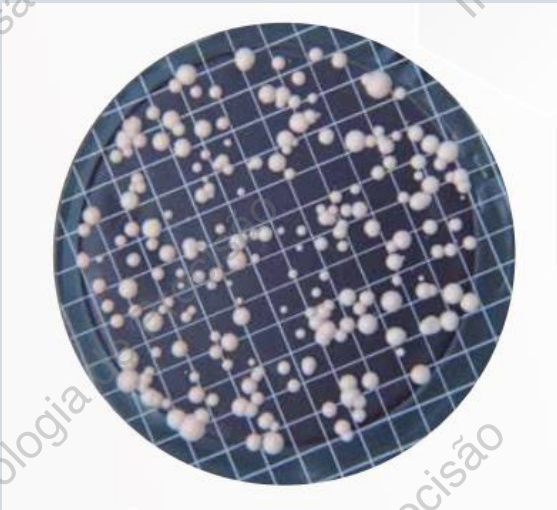
- pH do vinho;
- Temperaturas de fermentação;
- Álcoois elevados, graças às paredes celulares adaptáveis;
- Elevadas concentrações de SO<sub>2</sub>;
- Alta capacidade de reprodução
- Multiplica-se com baixos teores de açúcares residuais, tendo o O<sub>2</sub> como estimulante e não inibidor da sua atividade;
- Ao contrário de outros microrganismos, a *Brettanomyces* metaboliza fontes de carbono e outras fontes de azoto;
- Responsável pela formação de fenóis voláteis no vinho, sobretudo o 4-etilfenol, bem como o 4-etilguaiaacol, a partir dos ácidos fenólicos (cumárico e ferúlico) desde bem cedo presentes no vinho/uva.



# Pesquisa de *Brettanomyces bruxellensis* Meio de Cultura versus Teste PCR

## Meio de Cultura

- Resultados pouco objetivos dada a possibilidade de contaminações
- Não contemplam as células viáveis mas não cultiváveis (VBNC)
- Requer vários dias de incubação e elevado tempo de resposta



## Teste PCR (Polimerase Chain Reaction)

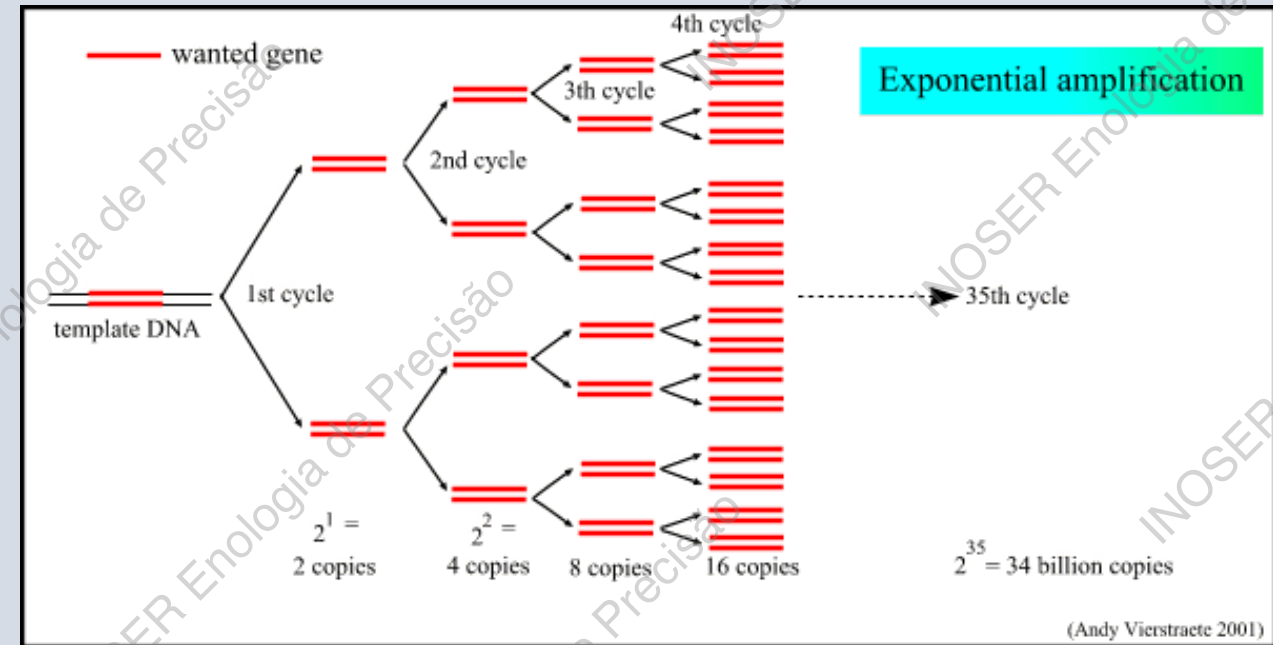
- Rápido – Resultados em menos de 4 horas
- Limite de detecção: 10 células/mL
- A extração de ADN é feita de forma simples
- Anula a ocorrência de falsos positivos



# O que é um teste PCR?

(*Polimerase Chain Reaction*)

- É um procedimento rápido para a amplificação *in vitro* de segmentos específicos de ADN localizados entre duas regiões cujas sequências são conhecidas
- Aumento exponencial no ADN inicial através de um processo cíclico



# Tecnologia

## Principais fundamentos

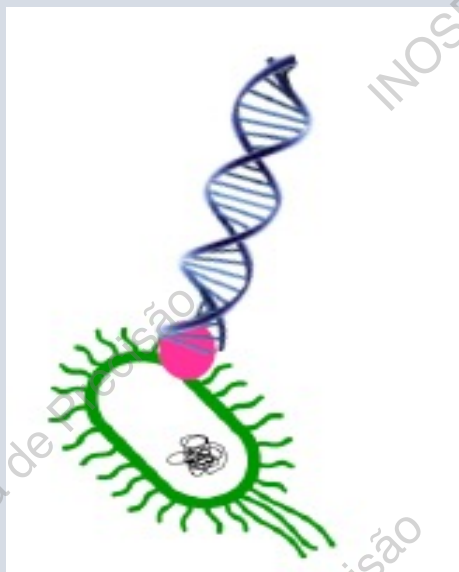
- Análise baseada na biologia molecular para a deteção qualitativa e quantitativa de microrganismos, em particular *Brettanomyces bruxellensis*
- Método PCR associado a tecnologia de fluxo lateral: método rápido, visual e de fácil utilização
- Compatível com diversas matrizes: vinho, mosto, borras e água de lavagem de barricas



# Solução: dois princípios reconhecidos

## Biologia Molecular: PCR

- Elevada especificidade e sensibilidade



## Imunoensaio: Teste rápido

- Simples e rápido



# Resultados

Após realização do protocolo standard, resultados semi-quantitativos em 3 minutos





# Quantificação “a revolução do PCR”

## Resultados quantitativos e rastreabilidade de lotes


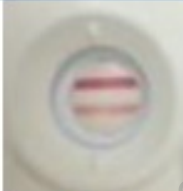


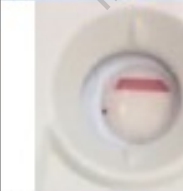







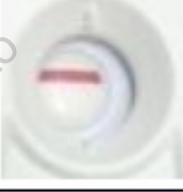
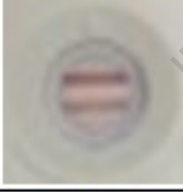




- Resultados quantitativos e instantâneos em **nº de células/mL**
- Elimina a subjetividade na interpretação dos resultados obtidos
- Rastreabilidade de lotes durante todo o processo



**INOSER é o único laboratório privado em Portugal a possuir esta tecnologia**



**Teste efetuado para detetar se o DNA residual de *Brettanomyces bruxellensis* não viáveis causa falsos positivos no resultado final**

WINE	1	2	3	4	5	6
	Before Spike	BRETT Spiked	DMDC Only Day 0	DMDC and filtered Day 0	DMDC Only Day 7	DMDC and filtered Day 7
<b>1: Cabernet Sauvignon</b>						
Veriflow equivalent- Wine 1 (cells/mL)	0	500	50	0	0	0
WL+C plating (total cfu/25 mL) Wine 1	0	TNTC	33	0	0	0
<b>2: Merlot</b>						
Veriflow equivalent- Wine 2 (cells/mL)	0	500	50	0	0	0
WL+C plating (total cfu/25 mL) Wine 2	0	TNTC	25	0	0	0
<b>3: Semillon</b>						
Veriflow equivalent- Wine 3 (cells/mL)	0	500	50	0	0	0
WL+C plating (total cfu/25 mL) Wine 3	0	TNTC	35	0	0	0

## Fundamentos do teste:

- Foram usadas 3 vinhos distintos com resultados negativos relativamente a *Brettanomyces bruxellensis*, de diferentes castas: Cabernet Sauvignon, Merlot e Semillon (coluna 1)
- Os vinhos foram enriquecidos com aproximadamente 500 ufc/mL da levedura contaminante (coluna 2)
- Posteriormente, foram tratados com DMDC (dimetildicarbonato); efetuado novo teste após adição do conservante e nos 7 dias seguintes de atuação do mesmo.
- Na coluna 3, observa-se que nos vinhos tratados com DMDC, há uma redução da população de *Brettanomyces*, no entanto, sugere-se que o DMDC pode não ter sido totalmente eficaz, após 24h de tratamento.
- Os vinhos após tratamento e filtração demonstraram-se negativos para *Brettanomyces* (coluna 4).
- Os resultados confirmaram-se 7 dias após aplicação do DMDC (coluna 5) e filtração (coluna 6).

**Conclusão:** Os resultados mostrados neste estudo, sugerem que o DNA residual de leveduras *Brettanomyces* não viáveis, não conduz a falsos resultados positivos no âmbito do teste.

É sempre necessário tempo suficiente após tratamento com DMDC, caso não seja efetuada uma filtração esterilizante.

## VANTAGENS



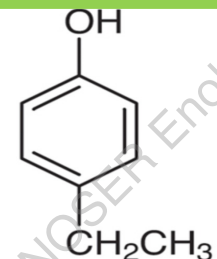
Quantidade de vinho necessária para efetuar o teste irrelevante (300 ml)



Resultados em 4 horas, anula a ocorrência de falsos positivos

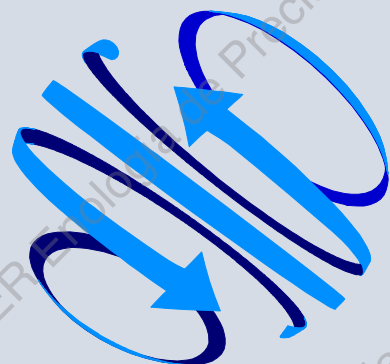


Poupança nos elevados custos de envio das amostras para os laboratórios no estrangeiro



Com um resultado positivo e sempre a pedido do cliente, permite a quantificação do 4EF e 4EG (HPLC)





**inoser**  
enologia de precisão

INOSER Enologia de Precisão  
Urbanização Colina do Sol Bloco 2  
5050-221 Peso da Régua – Portugal

[lab@inoser.pt](mailto:lab@inoser.pt)

+351 254 324 233

***É da responsabilidade do cliente enviar as amostras em perfeitas condições, bem como informar de qualquer risco inerente às amostras e de qualquer tratamento especial e condições de conservação.***

***Para maior segurança, as amostras devem ser enviadas sempre em recipientes de plástico e não de vidro.***

***Se não for recebida a quantidade de amostra necessária (informações indicadas para cada determinação na TP em vigor) para realização das análises solicitadas, não asseguramos a conclusão das mesmas.***

***Em caso de cancelamentos de análises já iniciadas, será faturado o custo total.***