

Influência da glucose, etanol e dióxido de enxofre no crescimento de bactérias do ácido láctico

Ana Patrícia Pedro Ramos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Viticultura e Enologia

Orientador: Professor Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira

Júri:

Presidente - Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais - Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista.

Lisboa, 2013

Ao meu avô Faustino José Pedro
pela força de viver que sempre demonstrou,
por todos os ensinamentos que me transmitiu
e por todo o amor e carinho com que sempre me tratou.

“Capa negra de saudade,
No momento da partida,
Segredos desta cidade,
Levo comigo pra vida.”

Balada da Despedida - Fado de Coimbra

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Prof. Doutor Manuel Malfeito Ferreira, orientador desta dissertação de mestrado, pela oportunidade que me concedeu em realizar este trabalho, pelo incentivo, motivação e por todos os ensinamentos transmitidos, obrigado.

Aos meus colegas, companheiros de aventura e de batalha no laboratório de Microbiologia, Ana Teles, Inês Oro, Viviana Monteiro e Sandro Martins, por todos os momentos de alegria, diversão e entreaajuda que passamos juntos.

À Rute Coutinho, que desde sempre se prontificou a ajudar-me, compreendendo as minhas dificuldades e dando-me força para não desistir.

À Prof. Doutora Luísa Brito, cuja energia, boa disposição e simpatia, que contagiava qualquer um, foi um prazer conhecê-la.

To Dr. Mahesh Chandra, for all the knowledge transmited, for all patience, for all the support, thank you. I really enjoy working with you was very rewarding.

À Eng^a Carla Silva e aos colegas de laboratório, Paula Cunha, Virna e António Lourenço, por todos os esclarecimentos recebidos, pela pronta disponibilidade em ajudar, pela força e pelo incentivo.

Às funcionárias do laboratório de Microbiologia D. Lena e D. Manuela, um grande obrigado pela boa disposição, disponibilidade constante, pela força e pelo carinho com que me trataram.

À D. Júlia, do Laboratório Ferreira Lapa, pela ajuda e paciência com as análises às amostras de vinho.

À minha amiga de infância Andreia Durão, por toda a força, compreensão e amizade.

Aos meus amigos Inês Paquete, João Soares Lopes, João Duarte Silva, Diogo Ferreira Borges e Francisco Henriques, que conheci no ISA, pela amizade que construímos e por todos os momentos que passamos juntos, estes anos do vosso lado foram espetaculares, que continuem assim por muitos e muitos anos.

À minha família, avó Ilaide, tios, tias, primos e primas, por estar sempre do meu lado.

Ao avô Espanhol e à avó Amélia que já partiram mas que nunca são esquecidos, por todo o carinho, amor, as memórias maravilhosas que deixaram e todos os ensinamentos passados.

À minha irmã Marta, minha amiga e minha companheira, pela força, amor e ajuda que me dá todos os dias. De ti recebi o melhor presente que poderia receber este ano, uma fonte de inspiração inesgotável, uma força de viver infinita... a minha sobrinha Maria Inês.

Aos meus pais Florinda e Fernando, que proporcionaram que chegasse até aqui. Neste percurso acadêmico, tal como na vida estiveram sempre do meu lado dando-me força para realizar os meus sonhos, incentivando-me para continuar e a nunca desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. Sem dúvida nenhuma que é a eles que tudo devo e que tudo posso agradecer, sobretudo todo o amor, carinho e confiança que sempre me deram. Sem vocês nada disto seria possível.

Finalmente, um agradecimento muito especial ao Pedro, pelo apoio incondicional, pela força, pela ajuda, pela paciência que teve comigo e que não foi pouca, pelos momentos que era suposto termos passados juntos e que passei a trabalhar, por me aturar, pela coragem que me dá e pelo amor incondicional, muito muito obrigado por tudo.

Obrigado.

RESUMO

O objectivo deste trabalho foi avaliar o efeito de vários factores na inibição de bactérias lácticas (BAL) relacionadas com o vinho. As bactérias escolhidas foram *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Oenococcus oeni*. A escolha recaiu sobre a sua importância no mundo do vinho tanto como agentes da fermentação maloláctica como pela produção de alterações microbiológicas no vinho. Numa primeira perspectiva foram realizados crescimentos de BAL em vinho. Contudo, a ausência de crescimento levou a realizar os ensaios em meio sintético MRS. Neste contexto, o trabalho realizado consistiu na construção de um delineamento composto central pelo método de superfície de resposta, usando três fatores: glucose (2-10 g/L), etanol (10-15% (v/v)) e dióxido de enxofre (0-40 mg/L), escolhidos devido à sua importância no vinho. Os resultados obtidos demonstraram que o etanol foi dominante como agente inibidor, acima de 14%, e com crescimento lento a 12,5%, ao contrário do dióxido de enxofre, que, nas concentrações testadas, não se manifestou como agente inibidor. A glucose não mostrou um efeito estimulante do crescimento que contrariasse a inibição pelo etanol.

Palavras-chave: Bactérias do ácido Láctico; Vinho; Glucose; Etanol; Dióxido de Enxofre; Método de Superfície de Resposta.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of various factors on the inhibition of lactic acid bacteria (LAB) related to wine. The bacteria chosen were *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Oenococcus oeni*. The choice fell on their importance in the wine world both as agents of malolactic fermentation as for production of microbiological changes in wine. In the first perspective growths of LAB were performed in wine. However, the absence of growth led to carry out tests on synthetic medium MRS. In this context, the work involved the construction of a central composite design by response surface method using three factors: glucose (2 - 10 g/L), ethanol (10 - 15% (v/v)) and carbon dioxide sulfur (0-40 mg/L), chosen because of its importance in wine. The results showed that ethanol was dominant as an inhibitor agent, above 14%, and with a slow growth of 12.5% as opposed to sulfur dioxide, which, in the tested concentrations did not manifest itself as an inhibitor agent. Glucose did not show a stimulating effect on growth which contradicted inhibition by ethanol.

Keywords: Lactic acid bacteria; Wine, Glucose, Ethanol, Sulfur Dioxide; Response Surface Method.

EXTENDED ABSTRACT

This study was aimed at the assessment of the effect of glucose, ethanol and sulfur dioxide on the growth of lactic acid bacteria (LAB) in wine, using an experimental central composite design, by the response surface method. The bacteria chosen for this design were the bacteria *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Oenococcus oeni*.

The lactic acid bacteria are found naturally on the surface of the grapes, leaves, soil and winery equipment. However, as wine is an extremely selective environment, only some types of LAB are able to grow in that environment.

An important factor for the quality of a wine is the ability of LAB to metabolize malic acid transforming it into lactic acid to reduce the acidity of wine by the malolactic fermentation. However, beyond this positive aspect, some compounds of wine (sugars, tartaric acid, and glycerol) can also be metabolized leading to the deterioration of wine. The nature and extent of deterioration depends on various factors, including the species of bacteria, the composition of wine and winemaking practices. The lactic acid bacteria can also cause undesirable changes in flavor of the wine, making it unpleasant to the level of aroma and flavor.

These bacteria responsible for spoilage of wine can metabolize complex compounds such as phenolic compounds, aromatic compounds and flavor precursors present in small amounts and the resulting products may have important impacts on the organoleptic quality of the wine. The excess of volatile acidity, ropiness, bitterness, mousiness, “mannitol taint”, the formation of acrolein, the degradation of tartaric acid, diacetyl production, rancidity as well as geranium aroma, are often consequence of the uncontrolled growth of some species of *Lactobacillus* (e.g., *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*), *Leuconostoc* (e.g., *L. mesenteroides*).

Generally the LAB have difficulty to grow in the presence of concentrations of sulfur dioxide (SO₂) total and free, greater than 100 mg/L and 10 mg/L. This is the recommended range to stabilize wine after malolactic fermentation or to prevent this fermentation. The sensitivity to SO₂ varies with species and strain. Cocci are less resistant than lactobacilli and, among cocci, species belonging to the genera *Leuconostoc* and *Oenococcus* are more sensitive.

Ethanol also affects the growth parameters of LAB and their malolactic activity. The capacity for survival and growth of LAB decreases as the concentration of ethanol increases. The sensitivity to ethanol varies between species of LAB. The cocci can

tolerate to about 12 to 14% of ethanol. It is noted that tolerance to ethanol is much lower when the strains are cultivated in laboratory compared to their growth in wine.

The response surface method (RSM) is a collection of mathematical and statistical techniques useful for modeling and analysis of problems in which the response of interest is influenced by several variables and the objective to optimize this response. The response surface methodology (RSM) is a set of mathematical and statistical techniques based on empirical models fit to the experimental data obtained in relation to the experimental design. For this polynomial functions are used to describe linear or square the system under study, and consequently to analyze modeling (and offset) the experimental conditions until its optimization.

The experimental design was a central composite design (Central Composite Design) presented by Box and Wilson. This design consists of a split or full factorial design, an additional delineation often star-shaped, wherein the data points are at a distance from the center and a central point. We conducted a randomized, with three factors, with one (two, monitoring only) repeat at the center point, making a total of seventeen experimental trials.

The factors chosen for this test were: glucose 2 – 10 g/L, ethanol 10-15% (v/v) and sulphur dioxide 0 - 40 mg/L.

This work showed that the factor that mostly inhibited growth of the bacteria was ethanol. The bacteria were inhibited by percentages of ethanol up to 12.5% for *Oenococcus oeni* and 14% for the other. Although being known for its inactivating activity, sulfur dioxide did not reveal itself in this work, quite possibly because its free form would have been combined with the carbonated compounds under the pH of 6.5 of MRS Broth. In turn, the glucose was consumed and converted to lactic acid by LAB, but did not prevent the inhibition induced by ethanol.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
EXTENDED ABSTRACT.....	V
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tabelas.....	X
1 Introdução.....	1
1.1 Bactérias do ácido láctico.....	1
1.1.1 Caracterização Geral.....	1
1.2 Bactérias do ácido láctico no vinho.....	4
1.2.1 Taxonomia.....	6
1.2.2 Ecologia.....	7
1.2.3 Importância enológica das BAL.....	10
1.3 Método de superfície de resposta (RSM).....	15
1.4 Enquadramento e Objectivos do Trabalho.....	17
2 Material e Métodos.....	18
2.1 Microrganismos.....	18
2.2 Meio de Cultura.....	18
2.3 Inóculo e Pré-Inóculo.....	19
2.3.1 Preparação do pré-inóculo.....	19
2.3.2 Preparação do inóculo.....	20
2.4 Ensaio de crescimento.....	20
2.4.1 Curvas de crescimento.....	20
2.4.2 Preparação do vinho.....	22
2.4.3 Crescimento em vinho.....	23
2.4.4 Resistência ao etanol em vinho.....	25
2.4.5 Resistência ao etanol em meio sintético.....	25
2.4.6 Adaptação ao etanol em meio sintético e inoculação em vinho.....	26
2.5 Ensaio experimental – Response Surface Methodology.....	27
2.5.1 Delineamento Experimental.....	27
2.5.2 Inóculo.....	29
2.5.3 Protocolo experimental.....	30
2.5.4 Análise de HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	33

2.6	Análise de dados e análise estatística	34
3	Resultados e Discussão de Resultados	35
3.1	Ensaio de Crescimentos	35
3.1.1	Curvas de crescimento	35
3.1.2	Crescimento em vinho	37
3.1.3	Resistência ao etanol em vinho	38
3.1.4	Resistência ao etanol em meio sintético	39
3.1.5	Adaptação ao etanol em meio sintético e inoculação em vinho	39
3.1.6	Método seleccionado	40
3.2	Ensaio Experimental – Response Surface Methodology	41
3.2.1	Análise estatística do RSM	41
3.2.2	Resultados obtidos por HPLC	59
4	Conclusão e perspectivas futuras	60
5	Bibliografia	62
6	Anexos	66
6.1	Anexo I – Análises do vinho – resumo dos boletins analíticos	66
6.2	Anexo II - Ajuste do etanol e neutralização do dióxido de enxofre	68
6.3	Anexo III – Solução stock de ácido tartárico	70
6.4	Anexo IV – Soluções stock de glucose e SO ₂	71
6.5	Anexo V – Taxas de crescimento e tempo de duplicação das Curvas de crescimento	73
6.6	Anexo VI – Densidades ópticas e valores médios de UFC das diferentes estirpes para obtenção das Curvas de Crescimento	81
6.7	Anexo VII – Resultados da experiência RSM	83
6.8	Anexo VIII – Curvas de calibração do HPLC	86
6.9	Anexo IX – Exemplo de cromatograma de HPLC	89
6.10	Anexo X – Evolução das concentrações dos compostos	91

Lista de Figuras

Figura 1 – Ilustração da produção de ácido láctico pela via homofermentativa.....	3
Figura 2 - Ilustração da produção de ácido láctico pela via heterofermentativa..	4
Figura 3 – Alterações bioquímicas na fermentação maloláctica.....	11
Figura 4 - As três principais consequências da FML.....	12
Figura 5 – Preparação do pré-inóculo.....	19
Figura 6 -Preparação do inóculo.....	20
Figura 7 –Amostragem retirada para as curvas de crescimento	21
Figura 8 – Inoculação do vinho.....	24
Figura 9 – Procedimentos efectuadas para a obtenção do inóculo do ensaio RSM.	30
Figura 10 – Ensaio experimental, com os diferentes níveis de fatores.....	31
Figura 11 – Inoculação efectuada para cada um dos tubos de ensaio.....	32
Figura 12 – Amostragem realizada durante os 10 dias de incubação.....	32
Figura 13 – Componentes que constituem uma análise de HPLC.....	34
Figura 14- Curvas de crescimento para <i>L. plantarum</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. hilgardii</i> e <i>Leu. mesenteroides</i>	35
Figura 15 - Curva de crescimento para <i>Oenococcus Oeni</i>	36
Figura 16 - Superfície de resposta para <i>L. plantarum</i> no Dia 3 para os factores glucose e etanol.....	45
Figura 17 - Superfície de resposta para <i>L. plantarum</i> no Dia 3 para os factores glucose e SO ₂	45
Figura 18 – Superfície de resposta para <i>L. plantarum</i> no Dia 3 para os factores etanol e SO ₂	46
Figura 19 – Superfície de resposta para <i>L. mali</i> no Dia 5 para os factores glucose e etanol.....	48
Figura 20 – Superfície de resposta para <i>L. mali</i> no Dia 5 para os factores glucose e SO ₂	48
Figura 21 –Superfície de resposta para <i>L. mali</i> no Dia 5 para os factores SO ₂ e etanol.....	49
Figura 22- Superfície de resposta para <i>L. hilgardii</i> no Dia 5 para os factores etanol e glucose.....	51
Figura 23 – Superfície de resposta para <i>L. hilgardii</i> no Dia 5 para os factores etanol e SO ₂	51
Figura 24 - Superfície de resposta para <i>L. hilgardii</i> no Dia 5 para os factores glucose e SO ₂	52
Figura 25 - Superfície de resposta para <i>Leu. mesenteroides</i> no Dia 5 para os factores etanol e glucose.....	54
Figura 26 - Superfície de resposta para <i>Leu. mesenteroide</i> no Dia 5 para os factores glucose e SO ₂	54
Figura 27 - Superfície de resposta para <i>Leu. mesenteroides</i> no Dia 5 para os factores etanol e SO ₂	55
Figura 28 - Superfície de resposta para <i>O. oeni</i> no Dia 10 para os factores etanol e glucose.....	57
Figura 29 - Superfície de resposta para <i>O. oeni</i> no Dia 10 para os factores glucose e SO ₂	58
Figura 30 - Superfície de resposta para <i>O. oeni</i> no Dia 10 para os factores etanol e SO ₂	58

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Algumas características das BAL associadas ao vinho.....	6
Quadro 2 – Diferentes estirpes de bactérias lácticas isoladas de mosto e vinho.....	6
Tabela 3 – As bactérias do ácido láctico em estudo	18
Tabela 4 - Compostos que constituem o meio MRS Broth	18
Tabela 5 - Valores mínimos e máximos para o delineamento experimental.....	28
Tabela 6 - Matriz experimental para o delineamento composto central.....	28
Tabela 7 - Matriz experimental para o ensaio com os valores adicionais	29
Tabela 8 - Concentrações das soluções stock de glucose e SO ₂	30
Tabela 9 - Quantidade de etanol, MRS Broth, glucose e SO ₂ , a adicionar para o ensaio experimental	31
Tabela 10 – Taxas de crescimento específicas e tempos de duplicação para as BAL em estudo.....	36
Tabela 11 – Resultados do primeiro ensaio de crescimento em vinho para a estirpe <i>Lactobacillus hilgardii</i> CBISA 3962.	37
Tabela 12 – Resultados obtidos do ensaio de resistência a diferentes percentagens do etanol, em vinho, para as estirpes <i>Lactobacillus</i>	38
Tabela 13- Resultados do ensaio de resistência ao etanol em meio sintético para as diferentes bactérias.	39
Tabela 14 – Resultados do ensaio de adaptação ao etanol em meio sintético com posterior inoculação em vinho.	40
Tabela 15 – Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) para <i>L. plantarum</i>	44
Tabela 16 – Tabela-resumo da ANOVA para <i>L. plantarum</i>	44
Tabela 17 - Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) para <i>L. mali</i>	47
Tabela 18 – Tabela-resumo da ANOVA para <i>L. mali</i>	47
Tabela 19 - Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) para <i>L. hilgardii</i>	50
Tabela 20 – Tabela-resumo da ANOVA para <i>L. hilgardii</i>	50
Tabela 21 - Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) para <i>Leu. mesenteroides</i>	53
Tabela 22 – Tabela-resumo da ANOVA para <i>Leu. mesenteroides</i>	53
Tabela 23 - Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) para <i>O. oeni</i>	56
Tabela 24 – Tabela-resumo da ANOVA para <i>O. oeni</i>	56

1 Introdução

1.1 Bactérias do ácido láctico

1.1.1 Caracterização Geral

As bactérias do ácido láctico (BAL) pertencem ao filo "Firmicutes", à classe dos "Bacilli", à ordem dos "Lactobacillales" e estão agrupadas em seis famílias ("Lactobacillaceae", "Aerococcaceae", "Carnobacteriaceae", "Enterococcaceae", "Leuconostocaceae" e "Streptococcaceae") (Axelsson, 2004; Makarova & Koonin, 2007). As BAL associadas aos alimentos e bebidas fermentadas estão agrupadas nos géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Stiles & Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004; Jay, *et al.*, 2005).

Esta família de bactérias (as BAL) é metabólica e fisiologicamente heterogénea. Apresentam-se como bacilos ou cocos gram-positivos estritamente fermentativos, não móveis (ou raramente móveis), estas bactérias não formam endósporos e acusam catalase negativa na ausência de porfirínicos. Apesar de serem aerotolerantes, são um grupo de bactérias característico dos habitats não aeróbios, são organotróficas e muito exigentes do ponto de vista nutritivo, suportam valores de pH muito baixos, sendo a tolerância à acidez uma característica variável entre estirpes (Davis, *et al.*, 1988; Lonvaud-Funel, 1999; Carr, *et al.*, 2002; Liu, 2002; Axelsson, 2004).

As BAL podem ser encontradas em alimentos (leite, queijo, iogurte e produtos de carne fermentados), bebidas (cerveja e vinho), solo, água, plantas (frutas, vegetais, grãos de cereais, esterco, esgoto, silagem) e nas membranas mucosas (intestinos, da boca e vagina) de seres humanos e animais (Aukrust & Blom., 1992; Gobbetti & Corsetti, 1997; Jay, *et al.*, 2005).

Para além disso estas bactérias produtoras de ácido láctico são amplamente utilizadas em culturas de arranque ("starter cultures") para obter mudanças favoráveis na textura e no sabor dos alimentos, também contribuem para as qualidades nutricionais e para a prevenção da deterioração dos alimentos, uma vez que estes microrganismos são responsáveis pela inicial acidificação da matéria-prima por meio da produção de ácido láctico. As BAL também possuem a capacidade de produzir moléculas bioactivas tais como o acetaldeído, peróxido de hidrogénio, dióxido de carbono, diacetilo, polissacáridos, e etanol (Caplice & Fitzgerald, 1999; Vuyst & Degeest, 1999; Liu, 2003).

Metabolismo dos Hidratos de Carbono

As BAL são quimiotróficas, portanto, a energia necessária para o seu metabolismo é fornecida pela oxidação de compostos químicos.

A oxidação dos açúcares (por exemplo, hexoses e pentoses) constitui a principal via de produção de energia essencial para o crescimento bacteriano. A fermentação é o processo que permite às BAL assimilarem os açúcares. Para uma estirpe de BAL específica, o tipo de açúcar fermentado e as condições ambientais que a rodeiam (presença de electrões aceitadores, pH, etc) podem modificar o rendimento energético e a natureza do produto final (Caplice & Fitzgerald, 1999; Kuipers, *et al.*, 2000; Jay, *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

As BAL subdividem-se em dois grupos segundo a natureza e a concentração dos produtos finais produzidos a partir da glucose: as homofermentativas que produzem quase exclusivamente ácido láctico, pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e as heterofermentativas que produzem, para além de CO₂, ácido láctico e etanol, pela via hexose-monofosfato ou via 6P-gluconato/fosfocetolase. (Demazeaud & de Roissart, 1994).

Para além da glucose, outros açúcares são metabolizados pelas BAL, nomeadamente a frutose, a galactose, a manose, a sacarose, a lactose, a maltose e pentoses (Gottschalk, 1986).

Via Homofermentativa

NA via homofermentativa (Figura 1), também conhecida como a (EMP), as bactérias convertem quase todas as hexoses, especialmente a glucose (mais de 90%), em ácido láctico. A primeira fase contém todas as reacções denominadas EMP que inicia com a hexose até ao piruvato. Durante esta fase, ocorre a reacção de oxidação que origina a redução da coenzima NADH + H⁺. A segunda fase caracteriza a fermentação láctica. A coenzima reduzida é oxidada em NAD⁺ durante a redução do piruvato a ácido láctico. Os géneros de BAL que representam a via homofermentativa incluem *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Pediococcus* (Caplice & Fitzgerald, 1999; Kuipers, *et al.*, 2000; Jay, *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

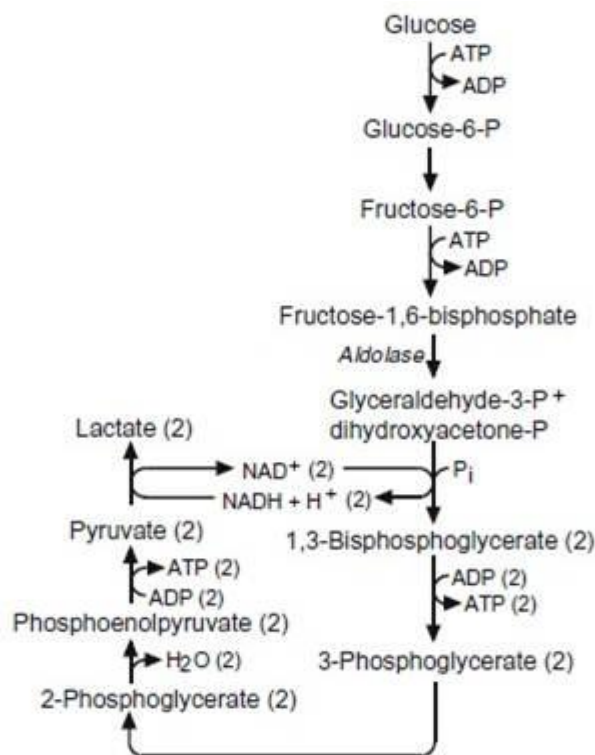


Figura 1 – Ilustração da produção de ácido láctico pela via homofermentativa. Fonte: (Fugelsang & Edwards, 2007).

Via heterofermentativa

As bactérias com um metabolismo heterofermentativo usam a via das pentoses-fosfato, alternativamente referida como a via fosfocetolase (Figura 2).

Inicialmente a glucose é fosforilada formando-se uma mole de glucose-6-fosfato que por sua vez é desidrogenada para 6-fosfogluconato e subsequentemente descarboxilado para se obter uma mole de CO_2 . A resultante pentose-5-fosfato é dividida em uma mole gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e uma mole de acetil-fosfato. GAP é posteriormente metabolizado em lactato (ácido láctico) como na via homofermentativa, sendo que a acetil-fosfato é reduzida a etanol por meio da acetil-CoA e os intermediários do acetaldeído.

Em teoria, os produtos finais (incluindo ATP) são produzidos em quantidades equimolares a partir do catabolismo de uma mole de glucose. As BAL que representam a via heterofermentativa incluem os géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella* (Caplice & Fitzgerald, 1999; Kuipers, *et al.*, 2000; Jay, *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

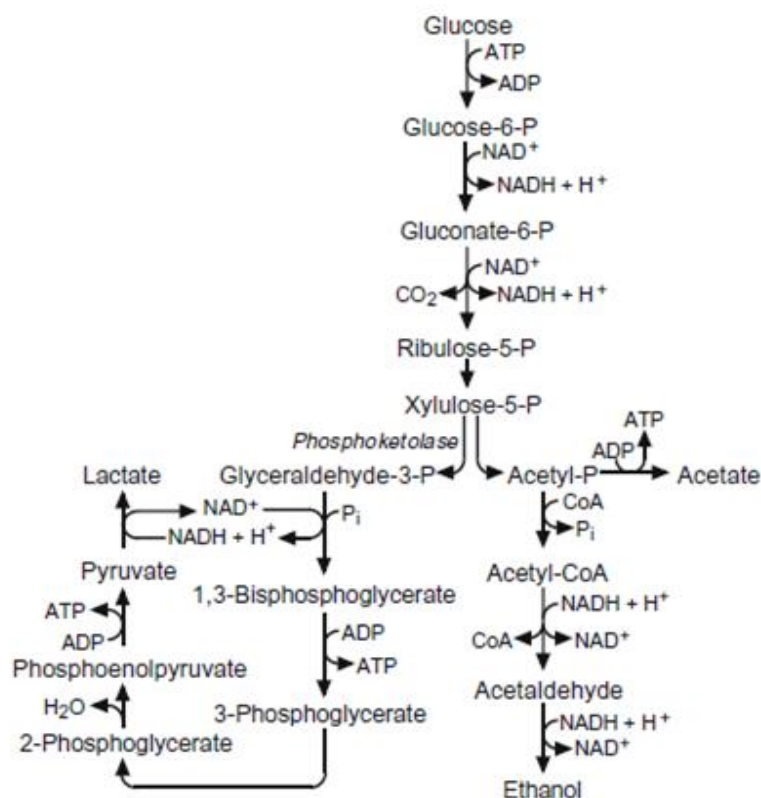


Figura 2 - Ilustração da produção de ácido láctico, CO_2 , etanol ou ácido acético pela via heterofermentativa. Fonte: (Fugelsang & Edwards, 2007).

A via homofermentativa tem um rendimento energético de 2 ATP por mole de glucose oxidada, enquanto na via heterofermentativa este rendimento é de apenas 1 ATP (Kandler, 1983).

1.2 Bactérias do ácido láctico no vinho

A produção de vinho pode ser vista como uma das tecnologias mais antigas da humanidade, inclusive anterior à produção de pão (Ribereau-Gayon, 1985).

O processo biológico da vinificação é o resultado de uma série de transformações bioquímicas, pela acção de várias enzimas de diferentes microrganismos, nomeadamente de leveduras, que são responsáveis pela fermentação alcoólica, principal parte do processo, e de BAL, que são responsáveis por um processo secundário, a fermentação maloláctica (Van Rensburg & Pretorius, 2000; Axelsson, 2004; Moreno-Arribas & Polo, 2005).

Na produção de vinho, as BAL são duplamente importantes, pois tanto podem aumentar como diminuir a qualidade do vinho. Estas bactérias (BAL) são responsáveis pela fermentação maloláctica que ocorre no vinho, contudo também podem causar alterações que vão afectar negativamente as propriedades organolépticas do produto final (Carrascosa, *et al.*, 2011).

Durante a fermentação maloláctica, a concentração de BAL atinge cerca de 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro, que dá uma indicação da sua importância na produção do vinho. Em 1886, Louis Pasteur demonstrou que o crescimento microbiano era uma característica comum a todos os processos de fermentação. Os diferentes tipos de fermentação foram definidos de acordo com os produtos orgânicos predominantes, presentes no final do processo, e a cada um deles foi associado com um tipo de microrganismo específico. Pasteur também foi o primeiro a demonstrar a presença de BAL em vinhos. Estas bactérias foram subsequentemente ligadas a um defeito o vinho conhecido como Volta que resulta da degradação do ácido tartárico. Mais tarde Muller-Thurgau (1891) e Koch (1900) atribuíram a presença de BAL à redução da acidez dos vinhos. Pouco depois, em 1901, Seifert referiu que essas bactérias eram capazes de degradar ácido málico (Carrascosa, *et al.*, 2011).

Os avanços na segunda metade do século XX mostraram claramente que a fermentação do mosto de uvas e a produção de vinhos de qualidade não é tão simples como Pasteur, sugeriu há mais de um século sendo que estudos datados dos anos setenta confirmaram a importância da fermentação maloláctica na redução da acidez dos vinhos (essencial em vinhos tintos) e na estabilidade microbiológica do produto final, evitando que a fermentação ocorra após o engarrafamento (Moreno-Arribas & Polo, 2005; Carrascosa, *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, os avanços tecnológicos proporcionaram uma melhoria significativa ao nível da compreensão da fisiologia, metabolismo e genética das BAL envolvidas na produção de vinho. A informação agora disponível permite aos enólogos estarem melhor posicionados para controlar a atividade destas bactérias e de analisar e explorar o seu impacto sobre a qualidade do vinho a partir de uma perspectiva mais ampla e multidisciplinar (Moreno-Arribas & Polo, 2005; Carrascosa, *et al.*, 2011).

1.2.1 Taxonomia

As BAL isoladas de uvas, vinho ou mosto pertencem a duas famílias. A família "Lactobacillaceae" que é representada pelo género *Lactobacillus* e a família "Streptococcaceae" que é representada pelo género *Oenococcus* e *Pediococcus* (Fugelsang & Edwards, 2007).

A Tabela 1 apresenta algumas características dos géneros das BAL no vinho. As principais espécies de BAL encontradas em mostos de uvas e vinhos estão descritas na Tabela 2. Estas bactérias são geralmente microaerófilicas, necessitam de hidratos de carbono e por isso ao meio de cultura de crescimento devem ser adicionados aminoácidos e vitaminas de modo a permitir a sua proliferação (Wibowo, *et al.*, 1985; Fugelsang & Edwards, 2007). Sendo o meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) o meio mais comum usado para o isolamento e crescimento de BAL, Wibowo *et al.* (1985) recomenda como exemplo que lhe seja adicionado sumo de uva ou de tomate, cisteína, ácido málico, e açúcares vários (Carrascosa, *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Algumas características das BAL associadas ao vinho. Os símbolos + e – representam respectivamente reacção positiva e negativa. Fonte: adaptado de (Fugelsang & Edwards, 2007).

Género	Morfologia da célula e Tipo de Arranjo	Características		
		Tipo de Metabolismo	CO ₂ a partir da Glucose	Isómero do Ácido Láctico
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos, Cocobacilos simples ou em cadeia	Homo- ou Heterofermentativo	+ e -	D, L, DL
<i>Leuconostoc</i>	Cocos em pares ou em cadeia	Heterofermentativo	+	D
<i>Oenococcus</i>	Cocos em pares ou em cadeia	Heterofermentativo	+	D
<i>Pediococcus</i>	Cocos em pares ou em cadeia	Homofermentativo	-	L, DL
<i>Weissella</i>	Cocos de forma irregular	Heterofermentativo	+	D, DL

Tabela 2 – Diferentes estirpes de BAL isoladas de mosto e vinho. Fonte: (Pozo-Bayón, *et al.*, 2009).

Género	Estirpe
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. kunkeei</i> , <i>L. lindneri</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. trichodes</i> , <i>L. vermiforme</i> , <i>L. vini</i> , <i>L. zeae</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>P. parvulus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	<i>O. oeni</i>

Este trabalho vai ser focado nalgumas estirpes do género *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus*.

1.2.2 Ecologia

As BAL são encontradas naturalmente na superfície dos bagos das uvas, folhas, solo e equipamentos da adega. No entanto, como o vinho é um meio extremamente selectivo, apenas algumas estirpes de BAL são aptas de crescer nesse ambiente. Um fator importante para a qualidade de um vinho é a capacidade das BAL metabolizarem o ácido málico transformando-o em ácido láctico, a fim de reduzir a acidez do vinho. No entanto, além deste aspecto positivo, vários compostos do vinho tais como açúcares, ácido tartárico, e glicerol podem também ser metabolizados pelas BAL induzindo a deterioração do vinho como por exemplo o amargor, a gordura ou o cheiro a rato (mousiness) (Lafon-Lafourcade, *et al.*, 1983; Fleet, 1993).

Apenas algumas espécies de bactérias são capazes de crescer em mostos e vinhos, devido às condições hostis com que se deparam: principalmente pH baixo, a falta de nutrientes, bem como a presença de etanol (Carrascosa, *et al.*, 2011).

Durante o processo de vinificação, as populações indígenas de BAL variam quantitativa e qualitativamente (Wibowo, *et al.*, 1985). Esta variação traduz-se numa sucessão de espécies e estirpes antes, durante e após a fermentação alcoólica (Fleet, *et al.*, 1984). Segundo obteve Lafourcade *et al.*, (1983) após a maturação das uvas as BAL isoladas são em número reduzido e pouco diversificadas (10^0 a 10^1 UFC/mL), aumentando ligeiramente após a prensagem encontrando-se no mosto cerca de 10^2 a 10^4 UFC/ml de BAL (Wibowo, *et al.*, 1985; Lonvaud-Funel, 1999; Krieger, 2005).

As principais espécies de BAL já referenciadas por diversos investigadores como tendo sido isoladas nesta fase do processo de vinificação são: *Lactobacillus (Lb.) plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. hilgardii*, *Lb. brevis*, *Lb. confusus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus damnosus* e *Oenococcus oeni* (Costello, *et al.*, 1983; Lafon-Lafourcade, *et al.*, 1983; Fleet, *et al.*, 1984; Fugelsang & Edwards, 2007). Normalmente estas populações sofrem um declínio rápido e permanecem em números reduzidos ($<10^2$ UFC/mL), podendo não se desenvolver até ao final da fermentação alcoólica (Fugelsang & Edwards, 2007). Excepcionalmente pode ocorrer uma proliferação ligeira de algumas espécies neste período (Wibowo, *et al.*, 1985). Após esta fase de latência, cuja duração é dependente das características do vinho, as células sobreviventes começam a multiplicar-se e entram na fase exponencial de crescimento, atingindo populações de 10^6 a 10^8 UFC/mL, quase exclusivamente constituídas por estirpes de *Oenococcus oeni*, espécie que domina nesta fase e que realiza a FML (Fugelsang & Edwards, 2007).

1.2.2.1 Fatores que influenciam o crescimento e a sobrevivência das BAL no vinho

A presença, crescimento e sobrevivência das BAL em vinho podem ser influenciadas pela composição química e física do vinho, fatores tecnológicos e interações microbianas entre as BAL e outros microorganismos do vinho. Todos estes fatores variam de acordo com o género, espécie e estirpe das BAL (Firme, *et al.*, 1994).

O vinho é um ambiente complexo e as suas características físicas e químicas divergem de acordo com a casta, as condições climáticas e de vinificação. Os principais fatores físicos e químicos são: o pH, a percentagem de etanol, a concentração de SO₂ e a temperatura (Versari, *et al.*, 1999).

O pH é um dos parâmetros mais importantes que afecta o desempenho das BAL no vinho. Geralmente, vinhos com pH abaixo de 3,5 não admitem o crescimento de *Pediococcus* e *Lactobacillus spp.*, sendo o domínio assegurado pela espécie *O. Oeni*. A incidência de *Pediococcus* e *Lactobacillus spp.* em vinhos aumenta à medida que o pH se aproxima de 4,0 (Wibowo, *et al.*, 1985; Davis, *et al.*, 1988; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

O dióxido de enxofre é amplamente utilizado na produção de vinho como um antioxidante (protege o vinho de uma oxidação excessivamente intensa de compostos fenólicos e de certos elementos do aroma), anti-sépticos (controla/inibe o crescimento de levedura selvagem e bactérias) e antioxidásico (inibe o funcionamento das enzimas de oxidação como tirosinase e lacase e pode assegurar a sua destruição ao longo do tempo) (Fugelsang, 1997; Carreté, *et al.*, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

Durante a solubilização do SO₂ estabelecem-se os equilíbrios:



Em função do pH do vinho, o SO₂ total encontra-se em equilíbrio sob as formas de SO₂ livre (forma molecular, iões sulfito e bisulfito) e SO₂ combinado (com compostos carbonados, nomeadamente aldeídos, cetonas, ácido pirúvico) (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

Regra geral as BAL têm dificuldade em desenvolver-se na presença de concentrações de SO₂ total e livre superiores a 100 mg/L e 10 mg/L, respectivamente (Reguant, *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

Esta será a dose recomendada para estabilizar os vinhos após a fermentação maloláctica ou para evitar naqueles em que não for desejada (Mendes-Faia, 1987).

A sensibilidade ao SO₂ varia com a espécie e com a estirpe. Os cocos são menos resistentes que os lactobacilos e entre os cocos as espécies pertencentes aos géneros *Leuconostoc* e *Oenococcus* apresentam maior sensibilidade do que as do género *Pediococcus*.

O efeito bactericida do SO₂ é atribuído à fracção de SO₂ livre que entra na célula por difusão e, no seu interior, é convertida em ião bisulfito (HSO₃⁻), que reage com proteínas, ácidos nucleicos e alguns cofatores, inibindo enzimas e consequentemente conduzindo à morte das células (Romano & Suzzi, 1993). Recentemente, Carreté *et al.* (2002) observaram um decréscimo na actividade maloláctica e na viabilidade de *O. oeni* associada à inibição da actividade da ATPase pela acção do dióxido de enxofre.

O etanol, principal resultante da fermentação alcoólica ou adicionado no caso dos vinhos fortificados, também afecta os parâmetros de crescimento das BAL e a sua actividade maloláctica. A capacidade de sobrevivência e crescimento das BAL decresce à medida que as concentrações de etanol aumentam (Wibowo, *et al.*, 1985).

A sensibilidade ao etanol varia entre as espécies de BAL. De um modo geral, os lactobacilos heterofermentativos apresentam maior tolerância ao etanol do que leuconostocs, oenococos e pediococos. Os cocos podem tolerar cerca de 12 a 14% de etanol (Inês, 2007).

Em relação aos lactobacilos, já foram isoladas estirpes de *Lactobacillus fructivorans*, *Lb. brevis* e *Lb. hilgardii* em vinhos fortificados com teores alcoólicos de 16 a 20% (Couto & Hogg, 1994; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006). Esta variabilidade é o resultado de modificações estruturais (composição em ácidos gordos, fosfolípidos e proteínas) e funcionais da membrana celular (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

É de salientar que a tolerância ao etanol é muito menor quando as estirpes são cultivadas em laboratório comparativamente ao seu crescimento em vinho. Fernandes *et al.* (1991) observaram um efeito estimulante do etanol a baixas concentrações (2 a 4%) nas taxas de crescimento de BAL, e sugerem a utilização do etanol nestas concentrações na formulação de meios de cultura para isolamento e para multiplicação de fermentos. A tolerância ao etanol é fortemente afectada pela temperatura e pH, decrescendo à medida que a temperatura aumenta e o pH decresce (Inês, 2007).

A temperatura, tal como o pH influencia os parâmetros de crescimento das BAL. Este é o fator mais facilmente monitorizado e controlado no processo de vinificação. As temperaturas óptimas de crescimento das BAL isoladas dos vinhos variam entre 20-30°C em meios de cultura e entre 20-23°C no vinho. A temperatura ideal para que durante o processo de vinificação ocorra o crescimento das BAL, nomeadamente de *O. oeni*, e a degradação do ácido málico é aproximadamente 20°C. Valores inferiores atrasam e prolongam a fermentação maloláctica, enquanto valores superiores a 25°C afectam a biomassa produzida e a qualidade do produto final pela maior produção de ácido acético levando à sua depreciação ou deterioração (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

Os fatores tecnológicos têm também grande relevância na sobrevivência e crescimento das BAL. A clarificação de mosto e de vinho por sedimentação, a filtração ou a centrifugação podem remover grande parte das BAL existentes no vinho, reduzindo a possibilidade de ocorrer fermentação maloláctica pela flora indígena e reduzindo a incidência de crescimento bacteriano e o seu efeito sobre a qualidade do vinho. Além disso, estas operações, se excessivas, podem também remover os nutrientes essenciais para o crescimento das BAL (Wibowo, *et al.*, 1985).

A fermentação maloláctica ocorre mais rápida e consistentemente num vinho que fermentou em contacto com as borras do que num vinho que fermentou na ausência destas. Adiar a trasfega do vinho ou deixá-lo em contacto com as borras depois da fermentação alcoólica também estimula o desenvolvimento da fermentação maloláctica. Este efeito está aparentemente relacionada com a lixiviação de substâncias estimulantes a partir das borras e de nutrientes fornecidos por autólise de leveduras que promovem crescimento de BAL (Wibowo, *et al.*, 1985). Outros fatores de vinificação que poderiam influenciar a sobrevivência e crescimento das BAL incluem estabilização pelo frio, troca iônica e pasteurização. Troca iônica e estabilização pelo frio podem remover as bactérias ou nutrientes importantes para o seu crescimento. A sensibilidade ao calor das BAL do vinho varia com as espécies e com as propriedades do vinho (Wibowo, *et al.*, 1985).

1.2.3 Importância enológica das BAL

Durante a produção de vinho, sobretudo tinto, após a fermentação alcoólica, ocorre a fermentação maloláctica pela acção das BAL. O principal objectivo desta fermentação é reduzir a acidez do vinho, pela transformação do ácido málico em ácido

lático. Além disso, durante este processo, ocorrem transformações, que possibilitam a formação de compostos voláteis, que vão enriquecer a qualidade do vinho aromaticamente (Henick-Kling, 1995; Revel, *et al.*, 1999). Por outro lado, durante a fermentação maloláctica há o risco de alguns BAL produzirem compostos indesejáveis (compostos off-flavour, aminas biogénicas, carbamato de etilo, etc.), que pode depreciar o vinho (Bartowsky, 2005). Os impactos gerais da BAL no processo de vinificação são resumidos na Figura 3.

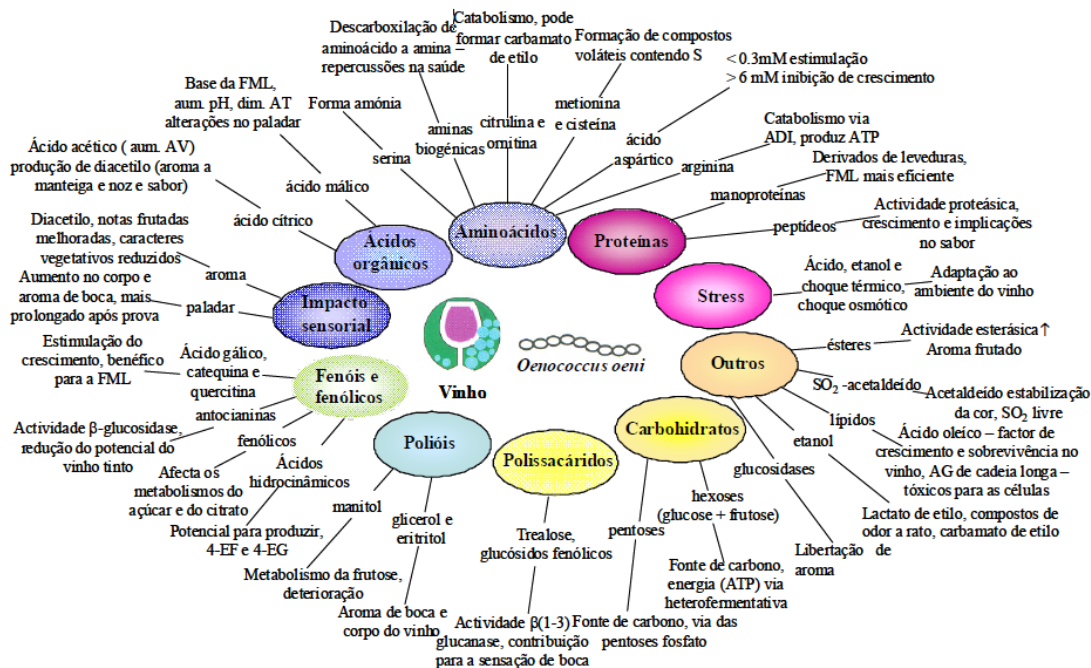


Figura 3 – Demonstração global das alterações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação maloláctica e metabolismo da espécie *Oenococcus oeni*. ADI: arginina desaminase; AG: ácidos gordos; AT: acidez total; AV: acidez volátil; 4-EF: 4-etilfenol; 4-EG: 4-etilguaicol. Fonte: adaptado de (Bartowsky, 2005; Inês, 2007).

1.2.3.1 A fermentação maloláctica

As BAL realizam a fermentação maloláctica, durante a vinificação de vinhos na sua maioria tintos mas por vezes também em brancos e espumantes (Davis *et al.*, 1988; Kunkee, 1991; Lonvaud-Funel, 2001; Bartowsky *et al.*, 2002).

A fermentação maloláctica é uma fermentação secundária, que geralmente ocorre no final da fermentação alcoólica, embora, por vezes, possa ocorrer mais cedo. Este processo biológico de desacidificação é realizado pelas BAL envolvendo a conversão do ácido dicarboxílico L-málico, um dos principais ácidos orgânicos presentes no vinho, a um ácido monocarboxílico L-lático e dióxido de carbono,

resultando num acréscimo de pH e decréscimo da acidez titulável, que se reflecte na estabilidade microbiológica e qualidade (Liu, 2002; Bartowsky, 2005). No vinho, esta desacidificação biológica é na sua maioria levada a cabo pela espécie *Oenococcus oeni*, contudo, outras espécies estão também envolvidas *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lactobacillus spp.* e *Pediococcus spp.* (Bartowsky, 2005).

A descarboxilação do ácido L-málico a ácido L-láctico é catalisada pela enzima maloláctica, dependente de NAD^+ e Mn^{2+} . O acréscimo de pH intracelular produz uma força protomotriz (ΔP). Por cada molécula de malato que entra na célula e sofre descarboxilação, uma molécula de lactato sai da célula acompanhada de um H^+ , que é equivalente à translocação de um H^+ para o exterior. A exportação do lactato a favor de um gradiente de concentração fornece à célula energia para transportar os H^+ . O aumento da força protomotriz pode ser usado pela ATPase membranar para produção de ATP. No vinho e devido ao seu pH tão reduzido, não ocorre a transformação da glucose pela via heterofermentativa, devido à escassez de glucose, sendo provavelmente a fermentação maloláctica a única via para *O. oeni* produzir ATP (Bartowsky, 2005).

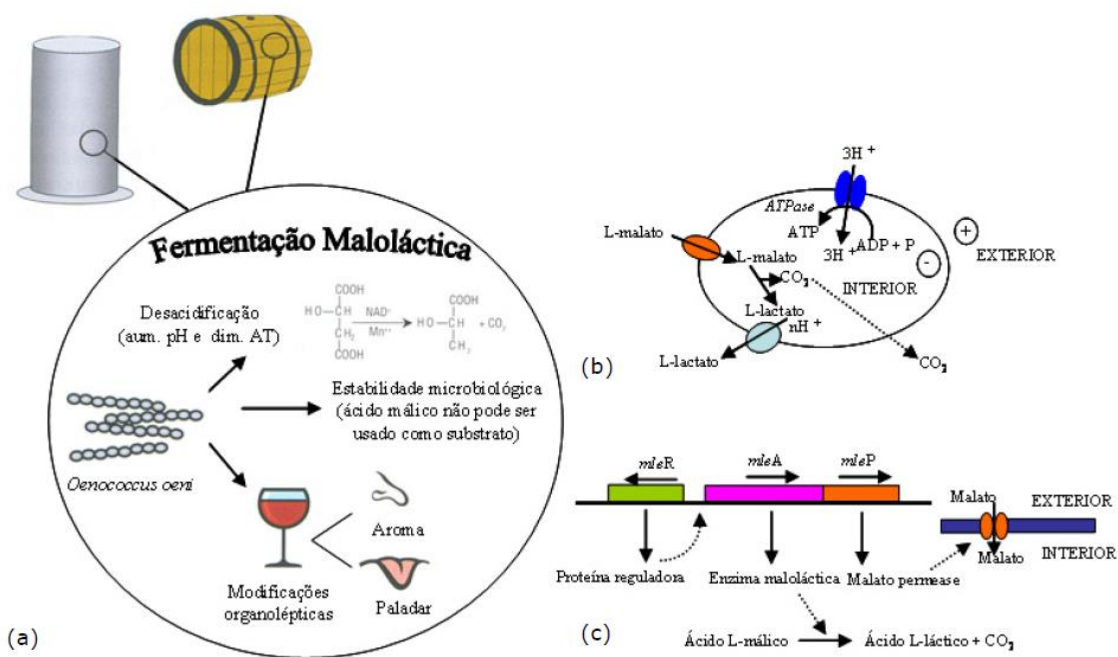


Figura 4 - (a) As três principais consequências da FML: estabilidade microbiológica; desacidificação do vinho; modificações sensoriais ao nível do aroma e paladar do vinho. (b) A descarboxilação do ácido L-málico a ácido L-láctico envolve o transporte activo do ácido málico para o interior da célula, descarboxilação, e o transporte de ácido láctico para o exterior da célula para o meio envolvente. (c) Dos três genes envolvidos na reacção maloláctica, *mleA* codifica para a enzima maloláctica, *mleP* codifica para a malato permease e *mleR* codifica para um regulador transcricional. Fonte: adaptado de (Inês, 2007).

1.2.3.2 8.3 Os efeitos nocivos das BAL no vinho

Além de realizarem a fermentação maloláctica, sob determinadas condições, as BAL também podem causar mudanças indesejáveis no sabor do vinho, que o tornam desagradável ao nível do aroma e do sabor. Muitas espécies das BAL não conduzem a fermentação maloláctica, podendo o seu crescimento em vinho causar alguma deterioração deste. A natureza e a extensão dessa deterioração dependem de vários fatores, tais a espécie de bactérias, a composição do vinho e as práticas de vinificação.

Estas bactérias, responsáveis pela deterioração do vinho, podem metabolizar compostos do vinho mais complexos, tais como: compostos fenólicos, compostos aromáticos e precursores do aroma presente em pequenas quantidades sendo que os produtos resultantes podem ter repercussões importantes organolépticas na qualidade do vinho. O excesso de acidez volátil, a gordura, o amargor, a manite, o cheiro a rato, a formação de acroleína, a degradação do ácido tartárico, a produção de diacetil, o ranço, bem como o aroma a gerânio, são muitas vezes o consequência do crescimento descontrolado de algumas espécies de *Lactobacillus* (por exemplo, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*), *Leuconostoc* (por exemplo, *L. mesenteroides*), *Streptococcus* (*S. mucilaginosus*) e *Pediococcus* (por exemplo, *P. cerevisiae*) (Pretorius, 2001).

Quando a fermentação alcoólica é muito lenta ou amua, ficam disponíveis no vinho, condições para o desenvolvimento bacteriano. As BAL conseguem degradar as fontes de carbono que não foram totalmente consumidas pelas leveduras, produzindo ácido acético e ácido D-láctico. Essa produção vai originar uma alteração no vinho denominada "pico láctico" (pique lactique) que é caracterizada por um aumento da acidez volátil que deprecia o vinho. Se esta acidez volátil exceder o limite de 1 g/L, o vinho torna-se não comercial. Esta deterioração pode ocorrer também em vinho fortificados onde as espécies *O. oeni*, *L. hilgardii*, *L. plantarum* e *L. fructivorans* são activas, apesar das quantidades de etanol serem bastante elevadas (Lonvaud-Funel, 1999).

A decomposição microbiológica do glicerol origina a formação da acroleína, responsável por causar a amargura no vinho quando se liga aos compostos fenólicos (Singleton, 1995).

Algumas estirpes de *L. brevis* provocam manite pela redução enzimática da frutose a manitol. O manitol é um poliol produzido na via heterofermentativa. A presença deste defeito é muitas vezes de difícil percepção uma vez que geralmente existe no vinho ao lado de outros defeitos, no entanto é descrito como viscoso e idêntico ao éster, combinado com um doce e “irritante” fim de boca (Du Toit & Pretorius, 2000). O manitol é geralmente produzida em vinhos que se submetem à fermentação maloláctica com um nível elevado de açúcares residuais ainda presentes.

O ácido tartárico é relativamente estável à actividade bacteriana só podendo ser metabolizado por algumas espécies de *Lactobacillus*, o resultado dessa metabolização é a produção de ácido acético, ácido láctico e ácido succínico (Kandler, 1983).

Quando o ácido tartárico é metabolizado, a acidez volátil aumenta e o vinho adquire um aroma a ácido acético e um sabor desagradável; essa degradação pode ser total ou parcial, dependendo da população de bactérias, no entanto diminui a qualidade do vinho. A capacidade de degradar o ácido tartárico é restrita a algumas espécies tais como a *L. plantarum* e a de *L. brevis* (Cavin, *et al.*, 1993).

Mais tarde, Couto *et al.* (2006) relatou que as espécies *L. mali*, *L. sake*, *L. viridescens*, e *P. acidilactici* encontradas em vinho são também capazes de produzir compostos voláteis contudo estão apenas capacitadas de executar o passo da descarboxilação.

A gordura no vinho identifica-se pelo aumento de viscosidade do vinho e por este se apresentar com uma aparência viscosa. Este aspecto deve-se à produção de dextranas produzida por espécies de *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus* (Fugelsang, 1997; Lonvaud-Funel, 1999).

O cheiro a rato é um defeito do vinho frequentemente atribuída à levedura *Brettanomyces*, no entanto também pode ser originado pelas BAL das espécies *L. brevis*, *L. fermentum* e *L. hilgardii* (Du Toit & Pretorius, 2000).

1.3 Método de superfície de resposta (RSM)

O método de superfície de resposta (RSM – Response Surface Methodology) é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas úteis para a modelagem e análise de problemas em que a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis sendo o objetivo otimizar essa resposta (Montgomery, 1997).

O RSM consiste num conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de modelos empíricos, para os dados experimentais obtidos, em relação ao desenho experimental. Para tal são usadas funções polinomiais lineares ou quadradas para descrever o sistema em estudo e, conseqüentemente, para analisar (modelagem e deslocamento) as condições experimentais até sua otimização (Bezerra, *et al.*, 2008).

O método permite explorar várias condições operatórias de um processo como a interacção entre factores, os efeitos dos factores e com a mesma precisão da abordagem clássica, necessita de um menor número de ensaios. As vantagens da sua utilização são:

- Determinar as condições óptimas para a reacção;
- Determinar a região do espaço onde as condições óptimas são satisfeitas;
- Verificar se o modelo é adequado aos dados experimentais;
- Fornecer uma distribuição dos pontos experimentais pela região de interesse;
- Calcular os parâmetros do modelo de uma forma simples;
- Não exigir um número elevado de níveis dos factores;
- Calcular um estimador de erro experimental;
- A partir de matrizes de delineamento experimental obter equações polinomiais, função dos fatores definidos, equações estas que correspondem graficamente a superfícies denominadas *Superfícies de Resposta* (Montgomery, 1997).

Algumas das fases na aplicação do RSM como técnica de otimização são: a seleção de variáveis independentes como efeitos principais sobre o sistema por meio de estudos de rastreio e da delimitação da região experimental, de acordo com o objetivo do estudo e da experiência do investigador, a escolha do desenho experimental e a realização das experiências de acordo com a matriz selecionada para a experiência, o tratamento matemático-estatístico dos dados experimentais obtidos através do ajuste de uma função polinomial, a avaliação da aptidão do modelo, a verificação da necessidade e da possibilidade de realização de um deslocamento em

direção à região ótima, e a obtenção dos valores ótimos para cada variável estudada (Bezerra, *et al.*, 2008).

Rastreo de variáveis

Numerosas variáveis podem afetar a resposta do sistema em estudo, e é praticamente impossível identificar e controlar as pequenas contribuições de cada uma delas. Portanto, é necessário selecionar as variáveis com efeitos principais. Modelos de triagem devem ser realizados para determinar qual das diversas variáveis experimentais e as suas interações apresentam efeitos mais significativos. Completos ou fracionados em dois níveis fatoriais podem ser utilizados para este objetivo, principalmente, porque são eficientes e económicos (Bezerra, *et al.*, 2008).

Escolha do modelo experimental

O modelo mais simples, que pode ser usado na RSM baseia-se numa função linear. Para a sua aplicação, é necessário que as respostas obtidas estejam bem ajustadas com a seguinte equação:

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon,$$

Onde k é o número de variáveis, β_0 é constante, β_i representa os coeficientes dos parâmetros lineares, x_i representa as variáveis, e ε é o residual associado à experiência (Bezerra, *et al.*, 2008).

O RSM utiliza vários tipos de matrizes de delineamento experimental: Matriz Factorial Completa, Matriz Factorial Fraccionada, Delineamento Central Compósito Rotativo – CCRD (*Central Composite Rotatable Design*) (Montgomery, 1997).

A matriz correspondente ao delineamento experimental é construída a partir dos factores que entram no processo e estes devem satisfazer as seguintes condições:

- Serem conhecidos e considerados críticos para o processo;
- Ser conhecida a região de interesse na qual o nível dos factores influencia o processo;
- Variarem continuamente durante os ensaios.

1.4 Enquadramento e Objectivos do Trabalho

É conhecida a importância das BAL no vinho, quer pelo seu contributo na fermentação maloláctica quer por estarem na origem de alguns defeitos. Quando inseridas nesse meio (vinho), as BAL são condicionadas por diversos fatores. Esses fatores podem ser inibidores ou impulsionadores do crescimento de vários microorganismos presentes no vinho, incluindo as BAL. A glucose, o etanol e o dióxido de enxofre, são exemplos de fatores, presentes no vinho, com efeitos inibidores e impulsionadores, para além disso, estão presentes no vinho em quantidades significativas.

O objectivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos fatores, glucose, etanol e dióxido de enxofre, no crescimento das BAL, através de um delineamento composto central rotativo, pelo método de superfície de resposta. Os valores máximos e mínimos escolhidos para o delineamento partiram dos limites legais para o uso de dióxido de enxofre livre, dos valores de glucose e etanol recomendados para vinhos de mesa. As BAL escolhidas para este delineamento estão também directamente relacionadas com o vinho e com a influência que podem exercer nele. *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus hilgardii* e *Leuconostoc mesenteroides*, são bactérias existentes na colecção do departamento de microbiologia do Instituto Superior de Agronomia, já apontadas por diversas bibliografias por serem responsáveis pela fermentação maloláctica e por defeitos do vinho.

Para avaliar os compostos metabolizados e produzidos pelas BAL as amostras foram sujeitas a uma análise por HPLC.

2 Material e Métodos

2.1 Microrganismos

Nos ensaios foram utilizadas cinco estirpes de BAL: *Lactobacillus plantarum* (CBISA 3960), *Lactobacillus mali* (CBISA 3961), *Lactobacillus hilgardii* (CBISA 3962), *Leuconostoc mesenteroides* (CBISA 3963) e *Oenococcus oeni* (CBISA 4279). Estas estirpes, pertencentes à coleção do Instituto Superior de Agronomia (ISA), foram cedidas ao Instituto pela Coleção Espanhola de Culturas Tipo (CECT). Informação sobre as estirpes, Tabela 3:

Tabela 3 – As BAL em estudo, respectivos códigos e origem do seu isolamento.

Estirpe	Código ISA	Código CECT	Isolada a partir de:
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CBISA 3960	CECT 748 ^T	Couves em conserva
<i>Lactobacillus mali</i>	CBISA 3961	CECT 4149 ^T	Mosto de vinho
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	CBISA 3962	CECT 4786	Vinho
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CBISA 3963	CECT 219 ^T	Azeitonas em fermentação
<i>Oenococcus oeni</i>	CBISA 4279	CECT 217 ^T	Vinho

A manutenção das culturas, para o presente trabalho, foi feita com o auxílio de placas de Petri, contendo um meio de repicagem sólido (MRS Broth), à temperatura de 30°C. A repicagem foi realizada semanalmente.

2.2 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi MRS Broth (da BIODIAGNOSTICS, embalagem de 500g), que é um meio adequado ao crescimento de BAL. Segundo informação recolhida do respetivo rótulo o meio MRS é constituído por:

Tabela 4 - Compostos que constituem o meio MRS Broth e respectiva quantidade em g/L. Informação retirada do rótulo de uma embalagem com 500g da BIODIAGNOSTICS.

Ingrediente	Quantidade em g/L
Polipeptona	10
Extrato de Carne	10
Extrato de Levedura	5
Glucose	20
Tween 80	1,08
Fosfato Dipotássico	2
Acetato de Sódio	5
Citrato de Amónio	2
Sulfato de Magnésio	0,2
Sulfato de Manganês	0,05

Informação adicional do produto:

O pH do meio quando preparado é de 6,4 +/- 0,2 a uma temperatura de 25°C.

Este meio foi utilizado na forma sólida e líquida. Para a preparação de 1 litro de meio MRS Broth, adicionou-se, a 1 litro de água desmineralizada, 52g de MRS Broth – obtendo-se o meio na forma líquida. Para preparar a forma sólida foi apenas necessário adicionar ao preparado anterior (forma líquida) 20g de Agar. O meio foi depois a esterilizar, em autoclave a 120°C durante 15 a 20 minutos.

2.3 Inóculo e Pré-Inóculo

2.3.1 Preparação do pré-inóculo

O facto de não ser indiferente utilizar células em várias zonas da fase exponencial de crescimento, obrigou a que se desse especial atenção à preparação do pré-inóculo. Pretendendo-se, assim, obter uma população “homogénea” de células provenientes da mesma zona da fase exponencial.

A preparação do pré-inóculo constou dos seguintes procedimentos:

- Transferiu-se uma ou mais ansadas da cultura fresca (com entre 48 e 72h) mantida em meio sólido MRS Broth, para um balão de Erlenmeyer contendo 100mL de MRS Broth na forma líquida;

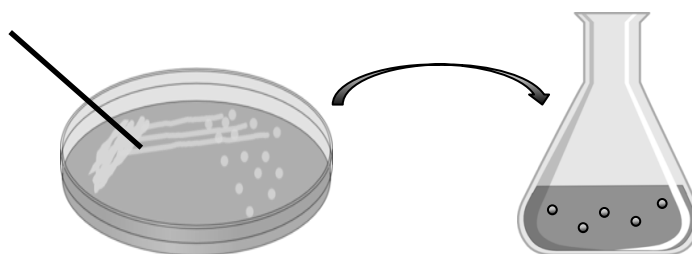


Figura 5 – Representação da preparação do pré-inóculo, transferência de cultura fresca em meio sólido para meio líquido. Fonte: www.clker.com.

- Com o auxílio de um espectrofotómetro calibrado, por 1 mL de MRS Broth líquido, a uma absorvância de 660nm, foi medida a densidade ótica (DO) do pré-inóculo. Pretendeu-se obter valores de densidade ótica entre 0,04 e 0,06;

- Após obtenção dos valores pretendidos incubou-se o balão, numa estufa a 30°C, até obter o crescimento pretendido (DO entre 0,3 e 0,5), normalmente entre 12 a 16h.

2.3.2 Preparação do inóculo

A preparação do inóculo partiu do pré-inóculo e constou do acerto da densidade ótica (DO) aos valores pretendidos (aproximadamente 0,050).

O protocolo experimental de preparação do inóculo foi o seguinte:

- Partindo do pré-inóculo já desenvolvido, transferiu-se depois de agitar, 1mL ou mais do pré-inóculo para um balão de Erlenmeyer com 100mL de MRS Broth líquido;

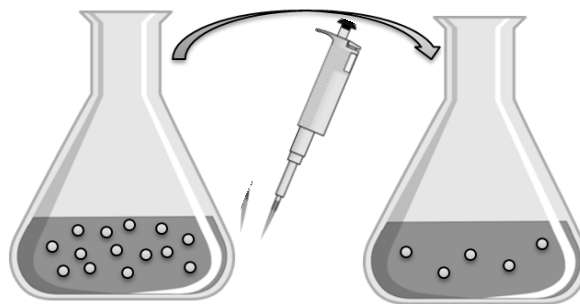


Figura 6 - Representação da preparação do inóculo, transferência de cultura fresca em meio líquido para um novo meio líquido. Fonte: www.clker.com.

- Agitou-se e procedeu-se à leitura da densidade ótica (DO), até obter uma DO de aproximadamente entre 0,04 e 0,06, após o qual o inóculo está pronto para o início da experiência.

2.4 Ensaios de crescimento

O principal objetivo destes ensaios foi verificar o comportamento das diferentes bactérias em vinho, avaliando a sua capacidade de resistência e crescimento. Em primeiro lugar, procedeu-se à determinação das curvas de crescimento das bactérias, com o objectivo de determinar a fase exponencial de cada estirpe. Depois, foram realizados quatro diferentes ensaios de crescimento, em vinho e em meio enriquecido (MRS).

2.4.1 Curvas de crescimento

Foram determinadas curvas de crescimento padrão para cada uma das estirpes de BAL. Estas curvas permitiram saber aproximadamente a população existente numa determinada densidade ótica e o intervalo da fase exponencial, para cada uma das bactérias.

O protocolo experimental para as curvas de crescimento foi o seguinte:

1. Do inóculo já pronto, transferiu-se 1,5mL de inóculo para um eppendorf. Este procedimento foi repetido até um máximo de 30 eppendorfs, agitando sempre o balão para que a amostra retirada fosse o mais homogênea possível;
2. Os eppendorfs foram devidamente numerados com o tempo (T0, T1, T2, T3,...) e identificados com o número da estirpe, de seguida foram colocados na estufa, à exceção do T0;
3. Do eppendorf T0 retirou-se 1mL para leitura da densidade ótica¹. A leitura foi feita num espectrofotómetro, devidamente calibrado;
4. Dos 0,5mL restantes são retirados 100µl de inóculo para um eppendorf com 900µl de Solução de Ringer, esta foi a primeira de 6² diluições;
5. Das diluições 5 e 6 (ou 6 e 7) foram retiradas amostras em duplicado na proporção de 100µl para placas de Petri, com MRS Broth sólido (Figura 7), espalhadas com a ajuda de um semeador;

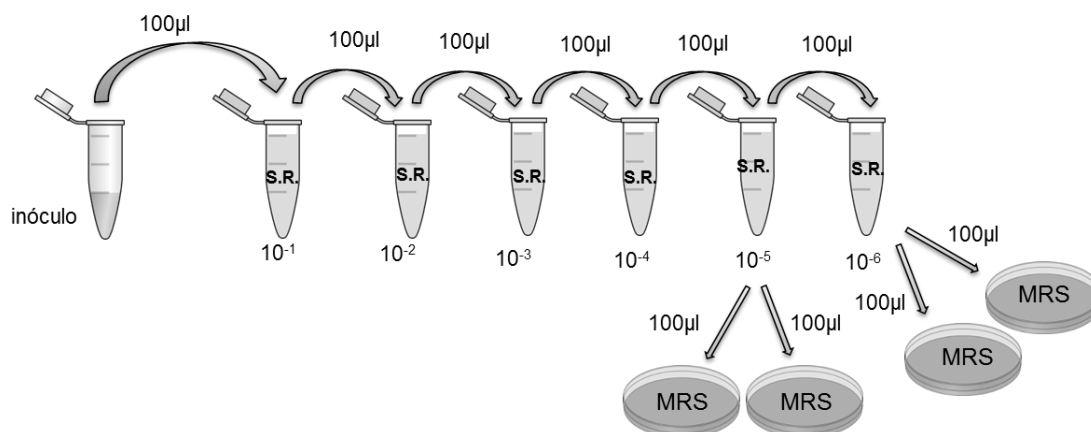


Figura 7 – Representação esquemática da amostragem retirada para as curvas de crescimento, com as respectivas diluições. Fonte: www.clker.com.

6. Depois de secas, as placas foram colocadas numa estufa a 30°C, ao fim de 2/3 dias e procedeu-se à contagem das placas.

Este procedimento foi repetido de 30 em 30 minutos, a partir do ponto 3, retirando-se sempre um dos eppendorfs da estufa. Quando se obteve valores muito próximos de densidade ótica real³, que pressupusessem a fase estacionária, dava-se por terminada a experiência. A estirpe ISA 4279 foi uma exceção, as suas amostras

¹ Para valores de densidade ótica superiores a 0,5 é necessário proceder a uma diluição, para que o espectrofotómetro faça uma leitura mais rigorosa.

² O número de diluições foi baseado nos valores de densidade ótica, para valores até 0,3 realizaram-se apenas 6 diluições, para valores entre 0,3 e 0,5 realizaram-se 7 diluições.

³ Quando se recorreu a diluições para leitura da densidade ótica, no espectrofotómetro, a densidade ótica real foi dada pela multiplicação do valor lido no espectrofotómetro e o fator de diluição.

foram retiradas em tempos diferentes uma vez que o seu crescimento em pré-inóculo se revelou sempre muito lento, optando-se então por retirar as amostras de 2 em 2h.

2.4.2 Preparação do vinho

O vinho usado nos ensaios foi um vinho de compra, em bag-in-box de dez litros, da marca Lidl, denominado Brilho d' uva.

Informação adicional do produto:

- Vinho da Comunidade Europeia
- Contêm Sulfitos
- Teor Alcoólico de 12,5% (v/v)

Posteriormente à compra do vinho recolheu-se uma amostra de vinho para análise dos principais parâmetros analíticos. As análises foram realizadas no Laboratório Ferreira Lapa do Instituto Superior de Agronomia. Obtidos os resultados das análises (Anexo I), procedeu-se à neutralização do dióxido de enxofre (SO_2) e ao ajuste do teor de etanol. O dióxido de enxofre foi neutralizado, por possuir um efeito inibidor muito grande no crescimento bacteriano, relativamente ao teor de etanol, este foi ajustado para um teor superior, uma vez que sem a protecção do dióxido de enxofre e com o teor de etanol razoável o vinho ficaria mais susceptível a ataques microbiológicos.

O vinho foi retirado da bag-in-box e colocado num balão volumétrico de 10L, para a execução dos ajustes descritos no Anexo II.

Após os procedimentos de neutralização do dióxido de enxofre (SO_2) e ajuste do teor alcoólico, o balão volumétrico foi colocado num agitador orbital durante alguns minutos para homogeneização do meio. O balão foi depois rolhado por forma a impedir ao máximo a entrada de oxigénio e colocado em repouso num lugar fresco, durante 4 dias, para que ocorresse a neutralização do SO_2 livre.

Ao fim dos 4 dias foi recolhida uma nova amostra de vinho, para nova análise (resultados no Anexo I). Foram realizadas correções até a obtenção dos valores de SO_2 e teor alcoólico pretendidos. O vinho foi depois colocado em garrafas, devidamente rolhadas e armazenado no frigorífico, até à sua utilização.

2.4.3 Crescimento em vinho

O primeiro ensaio de crescimento em vinho consistiu em inocular uma estirpe de bactéria, a *Lactobacillus hilgardii* (CBISA 3962), em vinho com diferentes percentagens de etanol (1.5, 3, 5, 7.5, 10, 11, 12, 12.5 e 13%).

As diferentes percentagens de vinho foram preparadas através da junção do vinho com uma solução stock de ácido tartárico, preparada para o efeito. O protocolo para a preparação da solução tartárica e vinho com as diferentes percentagens de etanol encontra-se descrito no Anexo III. A solução tartárica teve de ter uma concentração igual à acidez total do vinho, obtida através da análise dos parâmetros analíticos anteriormente referidos.

Depois de preparadas as soluções de vinho com diferentes percentagens de etanol, realizou-se uma leitura do pH do meio, através de um potenciómetro. O pH foi acertado a 3.5, recorrendo a soluções de HCL e NaOH de 1M.

Protocolo experimental:

- 1) Preparou-se as soluções de vinho com diferentes percentagens de etanol e corrigiu-se o pH, ajustando-o a 3,5;
- 2) As soluções com as diferentes percentagens de etanol foram depois esterilizadas por filtração e colocadas em balões de Erlenmeyer de 100mL devidamente identificados (rolhados, uma rolha de borracha com agulha, para simular a microoxigenação que ocorre no vinho);
- 3) Para a inoculação das soluções preparou-se previamente um inóculo como descrito no ponto 2.1.4, este foi colocado na estufa até atingir uma densidade ótica que correspondesse a 10^8 ufc/mL;
- 4) Quando atingidos os valores necessários transferiu-se 1mL de inóculo para um eppendorf, que seguiu para a centrifuga durante 6 minutos a 10000rpm;
- 5) Após a centrifugação o eppendorf continha uma fase sólida constituída pelo inóculo (Pellet) e uma fase líquida constituída por meio e secreções geradas pelas bactérias durante o crescimento (Sobrenadante), removendo-se a fase líquida com o auxílio de uma micropipeta;
- 6) Adicionou-se ao eppendorf (só com o Pellet) 1mL de Solução de Ringer, agitou-se, e colocou-se de novo o eppendorf na centrifuga por mais 6 minutos a 10000rpm;

- 7) Removeu-se novamente o sobrenadante e adicionou-se 1mL de solução de ringer;
- 8) Depois de agitar retiraram-se 100µl deste inóculo para cada um dos balões de Erlenmeyer (os passos correspondentes à inoculação estão demonstrados na figura 8);

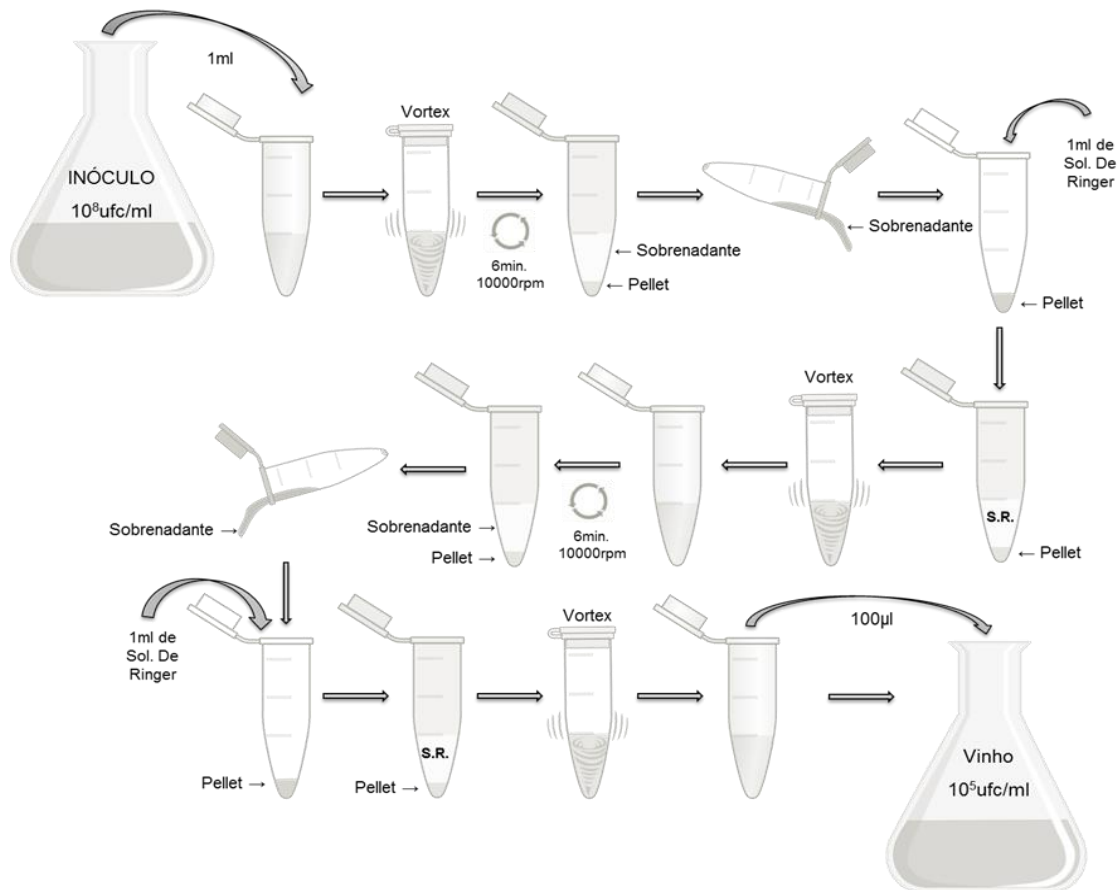


Figura 8 – Representação esquemática dos procedimentos tomados para a inoculação do vinho. Fonte: www.clker.com.

- 9) Após a inoculação, retirou-se uma amostra de cada balão para placas de MRS Broth. As amostras⁴ foram recolhidas em duplicado num volume de 100µl para cada placa;
- 10) Procedeu-se ao espalhamento das placas com o auxílio de um semeador;
- 11) Colocou-se os balões e as placas na estufa a 30°C;
- 12) Os pontos 4, 5 e 6 foram repetidos nos dois dias seguintes.

Procedeu-se à contagem das placas após dois dias de incubação na estufa.

⁴ As amostras foram retiradas diretamente dos balões para as placas sem que fosse necessário fazer diluições uma vez que com este ensaio se pretendia apenas demonstrar o crescimento das bactérias no vinho.

2.4.4 Resistência ao etanol em vinho

O ensaio de resistência ao etanol em vinho, é praticamente idêntico ao ensaio de crescimento em vinho descrito em 2.4.3 diferindo apenas em alguns aspetos. Para além da estirpe *Lactobacillus hilgardii* (CBISA 3962), foram também utilizadas as estirpes *Lactobacillus plantarum* (CBISA 3960) e *Lactobacillus mali* (CBISA 3961). As soluções de vinho com solução tartárica foram reduzidas a duas percentagens, 5% e 12%, e foi adicionado um balão controlo com 0% de etanol apenas constituído por MRS Broth líquido.

O protocolo experimental usado para este ensaio foi em tudo idêntico ao ensaio descrito em 2.4.3, com a exceção óbvia do número de balões em análise e da adição de um balão controlo.

2.4.5 Resistência ao etanol em meio sintético

Este ensaio foi realizado em simultâneo com o ensaio de resistência ao etanol em vinho, descrito no ponto anterior, partilhando inclusive, das mesmas estirpes de bactérias (*Lactobacillus hilgardii* (CBISA 3962), *Lactobacillus plantarum* (CBISA 3960) e *Lactobacillus mali* (CBISA 3961)), contudo apresentou uma abordagem diferente. O objetivo deste ensaio foi verificar o comportamento das bactérias num meio enriquecido (MRS Broth líquido) com etanol, para possível comparação com os ensaios em vinho.

Protocolo experimental:

- 1) Preparou-se o inóculo como acima descrito em 2.3.2;
- 2) O inóculo foi colocado na estufa até atingir uma densidade ótica que correspondesse a 10^8 ufc/mL;
- 3) Preparou-se de um balão de Erlenmeyer de 100mL com 1,5% de etanol e restante volume de MRS Broth líquido;
- 4) Quando atingidos os valores requeridos de ufc/mL procedeu-se à inoculação, transferindo 100µl de inóculo para o balão com 1,5% de etanol;
- 5) Foram depois retiradas amostras para duas placas com um volume de 100µl, espalhadas com o auxílio de um semeador;
- 6) O balão e as placas foram depois colocados numa estufa a 30°C.

Quando se verificou o crescimento visível no balão com 1,5% de etanol, pela presença de turvação, retirou-se uma porção do seu conteúdo, que serviu de inóculo⁵ para o balão seguinte com 3% de etanol. O mesmo aconteceu com o balão com 3% de etanol, que serviu de inóculo para balões com 5, 7.5 e 10%.

2.4.6 Adaptação ao etanol em meio sintético e inoculação em vinho

A adaptação ao etanol em meio sintético e inoculação em vinho foi baseada nos ensaios anteriores e foi composta por duas fases, a primeira consistiu no crescimento das bactérias em meio sintético (MRS Broth) a diferentes e graduais percentagens de etanol até valores de 10%. A segunda fase consistiu em usar os resultados da primeira fase como inóculos de vinho a percentagens idênticas e inferiores em teor alcoólico. As estirpes de BAL usadas para este ensaio foram as seguintes: *Lactobacillus plantarum* (CBISA 3960), *Lactobacillus mali* (CBISA 3961), *Lactobacillus hilgardii* (CBISA 3962) e *Oenococcus oeni* (CBISA 4279).

Protocolo experimental:

- 1) Efectuou-se todos os pontos do procedimento experimental do ensaio descrito em 2.4.5 até se obter crescimentos em meio sintético (MRS Broth líquido) com 7,5% e 10% de etanol;
- 2) Preparou-se soluções de vinho com solução tartárica, tal como descritas no Anexo III, duas com 7,5% de etanol e uma com 10%, em balões de Erlenmeyer de 100mL;
- 3) Os inóculos foram recolhidos dos balões com meio sintético, colocados em eppendorfs no volume de 1,5mL e foram colocados numa centrífuga, durante 6 minutos a 10000rpm, de seguida foi retirado o sobrenadante e adicionado 1mL de Solução de Ringer, este procedimento foi repetido mais uma vez (2.4.3 do ponto 4 ao 7);
- 4) A inoculação foi feita da seguinte forma: o inóculo correspondente ao meio sintético com 7,5% de etanol inoculou o balão com vinho com 7,5% de etanol. Por sua vez o inóculo correspondente ao meio sintético com 10% de etanol inoculou o balão com vinho com 10% de etanol e um outro com 7,5%;

⁵ Uma vez que o crescimento já será visível, deve recorrer-se a uma diluição do inóculo para se obter o crescimento pretendido para o inóculo (10^8 ufc/mL)

- 5) Foram depois recolhidas amostras em duplicado dos respetivos balões (100µl para placas MRS Broth sólido) durante os 6 dias seguintes.

2.5 Ensaio experimental – Response Surface Methodology

2.5.1 Delineamento Experimental

O efeito das concentrações de glucose, etanol e SO₂, no crescimento das bactérias foi testado usando um Delineamento Composto Central (Central Composite Design) apresentado por Box and Wilson (Box & Wilson, 1951). Este delineamento é composto por:

1. Delineamento fatorial completo ou fraccionado;
2. Delineamento adicional, muitas vezes em forma de estrela, em que os pontos experimentais estão a uma distância do centro;
3. Ponto central.

Um delineamento composto central, completo e rotativo apresenta as seguintes características:

1. Um número de experiências de acordo com a equação $N=k^2+2\alpha k+cp$, onde k é o número de fatores e (cp) é o número de repetições do ponto central;
2. Os valores de α (pontos adicionais) dependem do número de variáveis/fatores e podem ser calculados pela equação, $\alpha=2^{(k)/4}$. Para dois, três e ou quatro fatores, os valores de α são, respectivamente, 1.41, 1.68 e 2.00;
3. Todos os fatores são estudados em cinco níveis $(-\alpha, -1, 0, 1, +\alpha)$ (Bezerra, *et al.*, 2008).

Para determinação dos valores correspondentes aos níveis -1, 0 e 1 recorreu-se às seguintes equações:

$$(\pm \omega) = \frac{(MAX - MIN)}{2\alpha} \quad (0) = MIN + \frac{MAX - MIN}{2} \quad \begin{matrix} (+1) = (0) + \omega \\ (-1) = (0) - \omega \end{matrix}$$

A equação $\pm \omega$ é utilizada quando os valores dos fatores se apresentam entre valores superiores/inferiores a 1 e -1.

Os fatores escolhidos para este ensaio foram a Glucose, o SO₂ e o Etanol, pela importância que têm no vinho e pela influência que exercem nas BAL.

Assim, para um delineamento experimental, a três fatores (k), com uma repetição⁶ no ponto central (pc), tivemos dezasseis ensaios experimentais, como demonstrado abaixo pela equação:

$$N=k^2+2 \times k+pc \rightarrow N=3^2+2 \times 3+1 \Leftrightarrow N=16$$

Contudo, optou-se por ter mais uma repetição no ponto central, constituindo um total de 17 ensaios.

O valor de α foi de 1.68, como referido acima para um delineamento experimental a três fatores. Relativamente aos valores dos níveis e respectivos mínimos e máximos dos fatores em estudo, estes encontram-se na Tabela 5. A matriz experimental para o delineamento composto central com três variáveis apresenta-se na Tabela 6.

Tabela 5 - Valores mínimos e máximos escolhidos para o delineamento experimental e valores determinados para os níveis adicionais.

	Min	Máx	ω	+1	0	-1
Glucose (g/L)	2	10	2,378	8,4	6	3,6
Sulfuroso (mg/L)	0	40	11,892	32	20	8
Etanol (%v/v)	10	15	1,487	14,0	12,5	11,0

Tabela 6 - Matriz experimental para o delineamento composto central a três fatores com X1 – Etanol; X2 – Glucose; X3- SO₂.

Ensaio	Fatores		
	X1	X2	X3
	1	1	1
	2	-1	1
	3	1	-1
Delineamento Adicional	4	-1	-1
	5	1	1
	6	-1	1
	7	1	-1
8	-1	-1	-1
Delineamento Fatorial	9	Min	0
	10	Max	0
	11	0	Min
	12	0	Max
	13	0	0
	14	0	0
Pontos Centrais	15	0	0
	16	0	0
	17	0	0

⁶ Apesar de o ponto central escolhido ter apenas uma repetição, foram realizadas duas repetições, ficando o ponto central com três pontos.

A Tabela 7 representa o delineamento experimental, para o ensaio.

Tabela 7 - Matriz experimental para o ensaio com os valores adicionais e dos extremos inseridos.

Ensaio	Fatores			Etanol (%v/v)	Fatores	
	X1	X2	X3		Glucose (g/L)	Sulfuroso (mg/L)
1	1	1	1	11	3,6	8
2	-1	1	1	14	3,6	8
3	1	-1	1	11	8,4	8
4	-1	-1	1	14	8,4	8
5	1	1	-1	11	3,6	32
6	-1	1	-1	14	3,6	32
7	1	-1	-1	11	8,4	32
8	-1	-1	-1	14	8,4	32
9	Min	0	0	10	6	20
10	Max	0	0	15	6	20
11	0	Min	0	12,5	2	20
12	0	Max	0	12,5	10	20
13	0	0	Min	12,5	6	0
14	0	0	Max	12,5	6	40
15	0	0	0	12,5	6	20
16	0	0	0	12,5	6	20
17	0	0	0	12,5	6	20

2.5.2 Inóculo

Para o ensaio experimental foram utilizadas todas as BAL em estudo, ou seja, *Lactobacillus plantarum* (CBISA 3960), *Lactobacillus mali* (CBISA 3961), *Lactobacillus hilgardii* (CBISA 3962) *Leuconostoc mesenteroides* (CBISA 3963) e *Oenococcus oeni* (CBISA 4279).

Os inóculos das BAL foram preparados em tubos de ensaio com 10mL de meio líquido MRS Broth com 12,5% de etanol, após uma adaptação das mesmas a este meio, de acordo com 2.4.6.

Quando a densidade óptica dos inóculos correspondeu a 10^8 ufc/mL, nas curvas de crescimento das respectivas estirpes, estes estavam prontos para a inoculação. Contudo, antes da inoculação foi realizada uma ressuspensão do meio, recorrendo-se a duas centrifugações (6 minutos a 10000rpm), onde em ambas se retirava o sobrenadante e se adicionava solução de Ringer para que fossem eliminadas secreções produzidas pelas bactérias durante o crescimento. Após a ressuspensão foi efectuada uma diluição do inóculo (10^{-1}) para que mais tarde se obtivesse o valor de UFC pretendido (10^5), só então o inóculo estava pronto para a inoculação (Figura 9).

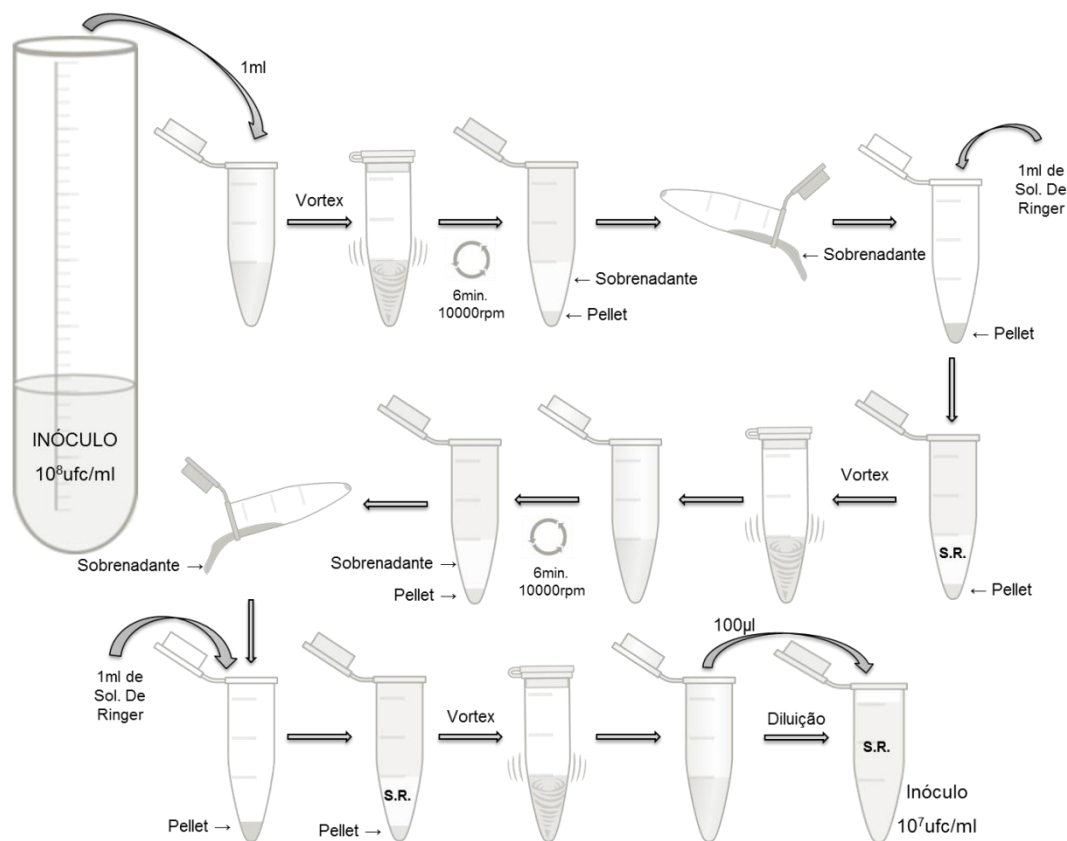


Figura 9 – Representação esquemática dos procedimentos efectuadas para a obtenção do inóculo do ensaio RSM. Fonte: www.clker.com.

2.5.3 Protocolo experimental

O protocolo experimental teve por base a utilização de 17 tubos de ensaio, com um volume fixo de 12,5mL. O principal constituinte dos tubos de ensaio foi o meio MRS Broth, em substituição do vinho, seguidamente foi adicionado etanol na proporção pretendida. Foi ainda adicionado um volume de glucose e SO_2 na proporção de 1mL retirado das respectivas soluções stock realizadas para o efeito. As concentrações das soluções stock de glucose e SO_2 estão descritas na Tabela 8 e a sua preparação está descrita no Anexo IV.

Tabela 8 - Concentrações das soluções stock de glucose e SO_2 , preparadas para o ensaio experimental.

	Concentração				
Sulfuroso mg/L	8	20	32	40	-
Glucose g/L	2	3,6	6	8,4	10

Procedimentos:

1. Preparou-se o inóculo com o descrito em 2.3.2;
2. Preparou-se as soluções stock de glucose e SO₂ para as diferentes concentrações;
3. Esterilizou-se as soluções stock de glucose e SO₂ por filtração;
4. Preparou-se os 17 tubos de ensaio colocando em cada um deles as quantidades de MRS Broth, Etanol⁷, 1mL da solução stock de glucose e outro da solução stock de SO₂, correspondente a cada tubo de ensaio (Figura 10 e Tabela 9);

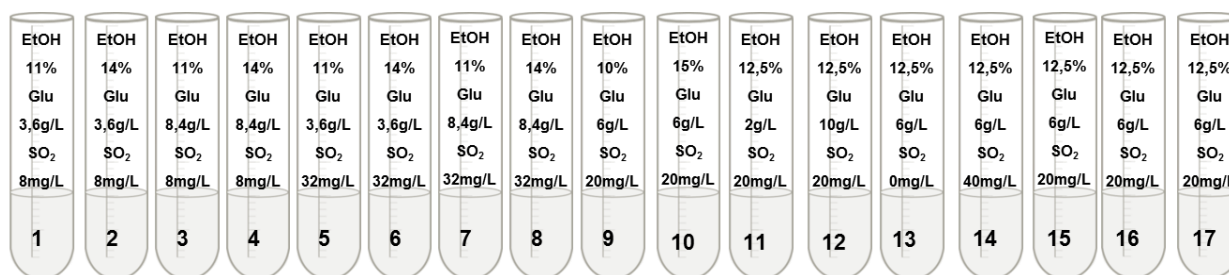


Figura 10 – Representação esquemática do ensaio experimental, com os diferentes níveis de fatores. Fonte: Adaptado de www.clker.com.

Tabela 9 - Quantidade de etanol, MRS Broth, glucose e SO₂, a adicionar em cada respectivo tubo de ensaio, para o ensaio experimental, os cálculos correspondentes aos valores de etanol e MRS Broth, tal como os da preparação das soluções stock de glucose e SO₂ encontram-se no Anexo IV.

Ensaio	MRS Broth mL	Etanol %(v/v)	Etanol mL	Solução de Glucose [g/L]	Solução de Glucose mL	Solução de Sulfuroso [mg/L]	Solução de Sulfuroso mL
1	9,12	11,0	1,38	3,6	1	8,1	1
2	8,75	14,0	1,75	3,6	1	8,1	1
3	9,12	11,0	1,38	8,4	1	8,1	1
4	8,75	14,0	1,75	8,4	1	8,1	1
5	9,12	11,0	1,38	3,6	1	31,9	1
6	8,75	14,0	1,75	3,6	1	31,9	1
7	9,12	11,0	1,38	8,4	1	31,9	1
8	8,75	14,0	1,75	8,4	1	31,9	1
9	9,25	10,0	1,25	6,0	1	20,0	1
10	8,63	15,0	1,88	6,0	1	20,0	1
11	8,94	12,5	1,56	2,0	1	20,0	1
12	8,94	12,5	1,56	10,0	1	20,0	1
13	9,94	12,5	1,56	6,0	1	0,0	1
14	8,94	12,5	1,56	6,0	1	40,0	1
15 (C)	8,94	12,5	1,56	6,0	1	20,0	1
16 (C)	8,94	12,5	1,56	6,0	1	20,0	1
17 (C)	8,94	12,5	1,56	6,0	1	20,0	1

⁷ O etanol usado foi de compra com um percentagem de 99,5%, para os cálculos de volume de etanol a adicionar foi considerado etanol a 100%, uma vez que a diferença era mínima.

5. A partir do inóculo transferiu-se 125 μ L para cada tubo de ensaio e agitou-se num vortex, inoculação (Figura 11);

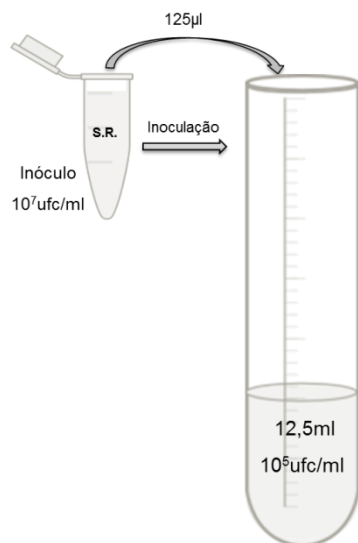


Figura 11 – Inoculação efectuada para cada um dos tubos de ensaio. Fonte: .Adaptado de www.clker.com.

6. De cada tubo de ensaio foi retirada uma amostra de 100 μ L, para duas diluições, 10^{-1} e 10^{-2} , e destas foram retiradas duas amostras, na mesma proporção, para placas de MRS Broth com 4% de etanol, como demonstra a figura 12;

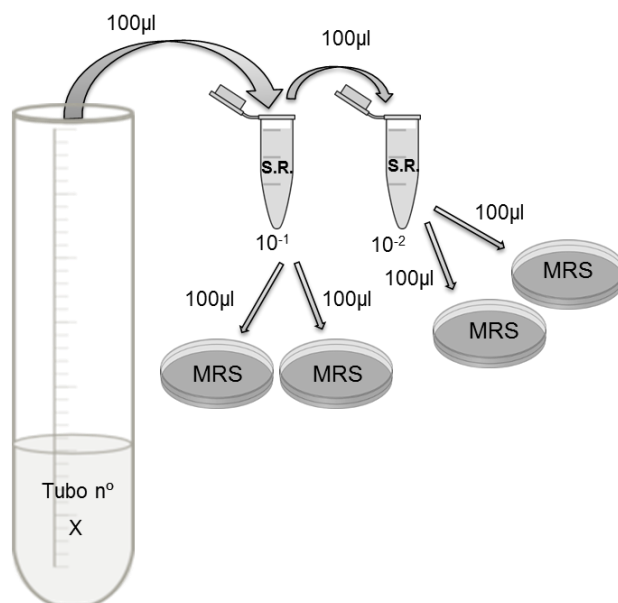


Figura 12 – Representação da amostragem realizada durante os 10 dias de incubação. Fonte: Adaptado de www.clker.com.

7. As amostras foram espalhadas nas placas com recurso a esferas de vidro previamente esterilizadas;
8. Após a recolha das amostras, placas e tubos de ensaio foram colocados numa estufa a 30°C.

Os tubos de ensaios permaneceram em estufa durante 10 dias. Foram recolhidas amostras de todos os tubos de ensaio durante os cinco primeiros dias e posteriormente ao décimo dia. O número de diluições foi aumentando gradualmente ao longo do tempo (dias) mas, apenas nos tubos que apresentavam turvação ou nos tubos cujas placas dos dias anteriores apresentavam um aumento significativo do número de colónias. A leitura das placas foi realizada entre 1 a 3 dias depois da incubação na estufa.

No início e no fim de cada experiência foram colhidas amostras de cada um dos tubos de ensaio, cerca de 1.5mL, estas amostras foram congeladas e mais tarde analisadas.

2.5.4 Análise de HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

A análise de HPLC foi realizada com o objectivo de analisar os compostos que constituem o meio MRS Broth e verificar as alterações que ocorreram nesses constituintes após o ensaio experimental. Para avaliar a concentração de cada composto foram utilizadas retas de calibração já preparadas para o efeito.

Realizaram-se análises por HPLC nas amostras recolhidas do início e do fim do ensaio para cada uma das estirpes em estudo. Para a execução desta análise as amostras foram sujeitas a uma centrifugação de 10000 rpm durante 10 minutos. No fim da centrifugação, o líquido translucido obtido foi filtrado com recurso a seringa e filtros Millipore de 0,2 μm de porosidade e transferidos para vials de HPLC devidamente identificados com a estirpe e o número do tubo de ensaio a que correspondia.

Por fim, o líquido filtrado foi injetado numa coluna (Schodex 1011) mantida a 60°C. A fase móvel (Eluente) usada é constituída por 2,5mM de ácido sulfúrico, com um fluxo de 0,6 mL/min. A separação dos constituintes foi conseguida por detecção num índice de refração (486 Waters Corporation, Milford, MA) e os resultados foram processados utilizando o *software* do HPLC (Empower Pro). A Figura 13 ilustra todo o procedimento por HPLC. As amostras foram injetadas em duplicado.

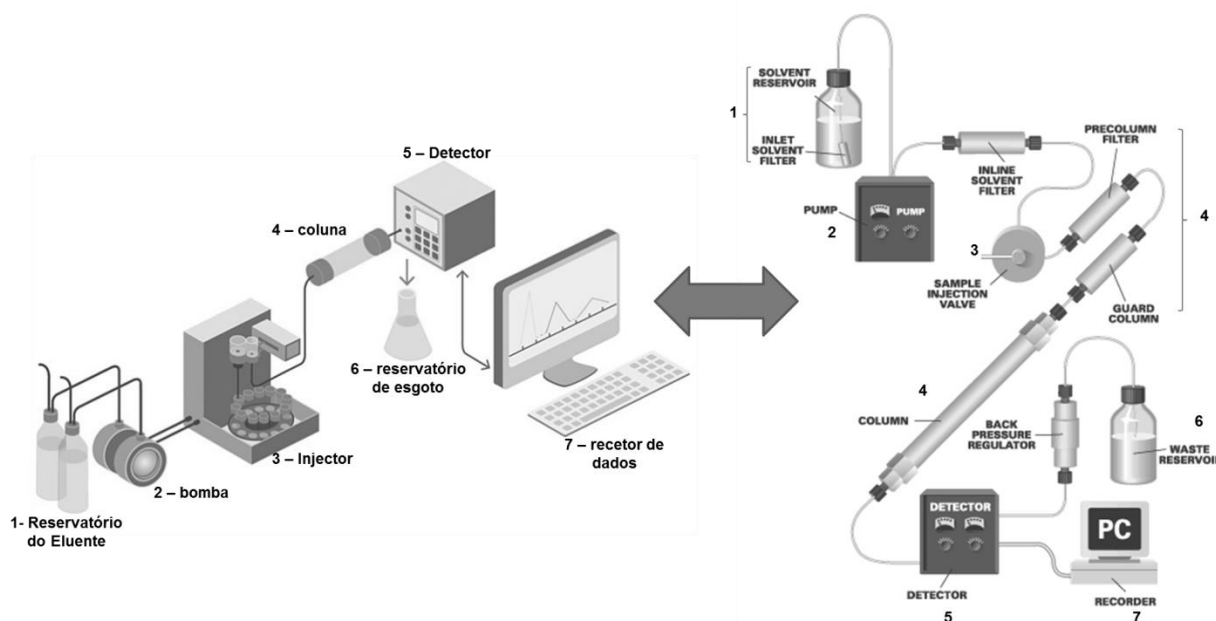


Figura 13 – Representação esquemática dos componentes que constituem uma análise de HPLC. Fonte: <http://hiq.linde-gas.com> e de <http://www.idex-hs.com>.

2.6 Análise de dados e análise estatística

As curvas de crescimento e os ensaios de crescimento foram tratados no programa Microsoft Office Excel 2010 sem recorrer a análise estatística dos resultados, sendo que estes foram apenas interpretados.

Relativamente ao delineamento experimental RSM, este foi estudado para verificar a relação entre as estirpes de bactérias e os constituintes glucose, SO_2 e etanol determinando fatores inibidores e/ou promotores de crescimento. Os dados foram tratados estatisticamente pelo programa Statistica versão 7 (StatSoft), um dos *softwares* indicado para o método. Neste programa foram introduzidos os dados relativos aos ensaios após terem sido calculadas as médias dos seus valores e dos seus logaritmos de base 10 (Anexo VII). Através do *software* apurou-se os efeitos estimados das variáveis através de uma análise de variâncias ANOVA. Foram depois gerados os modelos polinomiais de segunda ordem com base na regressão linear do modelo ajustado. A significância estatística e a validade do ajuste dos modelos foram estimadas com base nos coeficientes de determinação (R^2), do seu coeficiente ajustado (R^2_{ajustado}) e do significado dos valores de *p-value*. No fim do ajuste dos modelos procedeu-se à representação gráfica dos resultados no mesmo programa.

3 Resultados e Discussão de Resultados

3.1 Ensaio de Crescimentos

3.1.1 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento que se seguem foram realizadas para determinação das fases e do tempo de crescimento das estirpes de BAL em estudo. Estas curvas revelaram-se um utensílio fulcral durante todos os ensaios uma vez que permitiam saber aproximadamente o número de unidades formadoras de colónia que existia numa determinada densidade óptica. Estes valores de crescimento apenas dizem respeito ao meio onde foram realizadas.

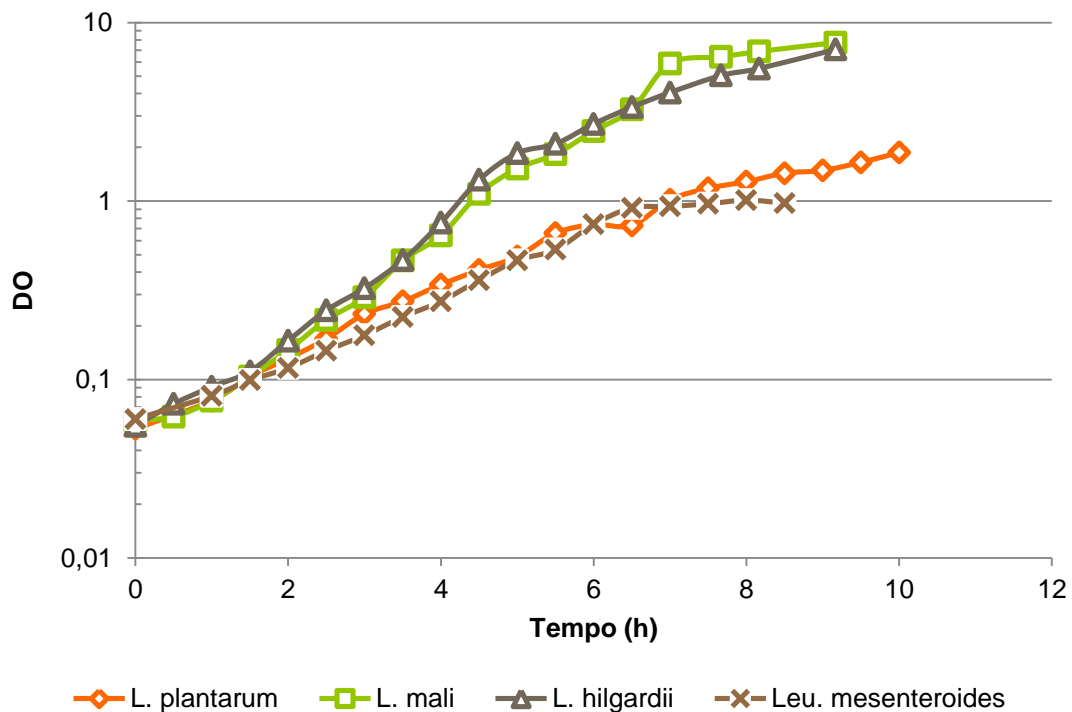


Figura 14- Representação gráfica das curvas de crescimento das estirpes *L. plantarum*, *L. mali*, *L. hilgardii* e *Leu. mesenteroides*.

Na Figura 14 estão apenas representadas as estirpes do género *Lactobacillus* e *Leuconostoc* uma vez que o seu crescimento em função do tempo foi muito mais rápido que o da estirpe de *Oenococcus oeni* (Figura 15). Comparando ambos os gráficos é visível a diferença entre as estirpes do género *Lactobacillus* e *Leuconostoc* comparativamente com a estirpe de *Oenococcus*, estas atingiram a fase estacionária num intervalo entre as 7 e as 10 horas enquanto a *Oenococcus Oeni* apenas a atingiu

ao fim de 25 horas. Numa outra perspectiva a fase exponencial da estirpe de *Oenococcus oeni* é muito mais ampla que a das restantes estirpes.

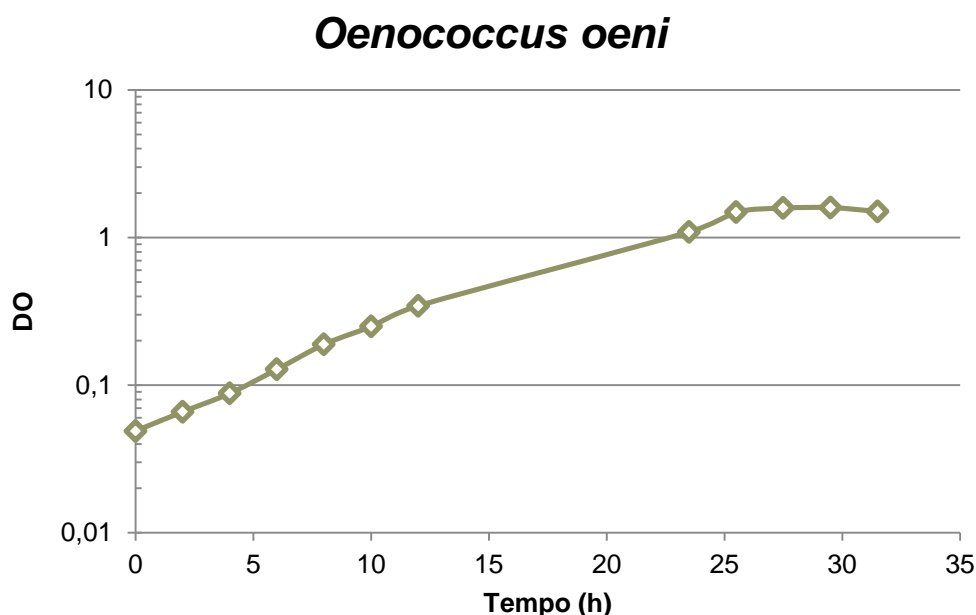


Figura 15 - Representação gráfica da curva de crescimento da estirpe *Oenococcus oeni*.

Sabendo que a taxa específica de crescimento, μ , e o tempo de duplicação, t_d , de uma população microbiana são parâmetros muito importantes em Microbiologia procedeu-se ao cálculo desses parâmetros. Os seus gráficos e cálculos encontram-se no Anexo V, contudo, na Tabela 10 encontra-se um resumo das taxas de crescimento e dos tempos de duplicação para as diferentes estirpes de bactérias. É de salientar que estes cálculos foram efectuados apenas para a fase exponencial de cada curva de crescimento e respectiva estirpe.

Tabela 10 – Taxas de crescimento específicas e tempos de duplicação para as BAL em estudo.

Estirpe	Taxa de crescimento específica, μ (h^{-1})	Tempo de duplicação, t_d (h)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,46	1,50
<i>Lactobacillus mali</i>	0,73	0,95
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	0,77	0,90
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,46	1,50
<i>Oenococcus oeni</i>	0,13	5,40

O conhecimento destes parâmetros permite prever a evolução da concentração de um microrganismo ao longo do tempo de crescimento exponencial. Neste caso específico a bactéria *Oenococcus oeni* revelou ser a estirpe que mais tempo demorou a duplicar o número de células, reflectindo-se na representação gráfica da sua curva de crescimento. Por sua vez as estirpes de *Lactobacillus mali* e de *Lactobacillus hilgardii* foram as estirpes que revelaram uma maior eficiência na duplicação das células. Apesar de se encontrarem num meio-termo as estirpes de *Leuconostoc mesenteroides* e de *Lactobacillus plantarum* têm um tempo de duplicação muito próximo das estirpes de *Lactobacillus mali* e *hilgardii*.

As curvas de crescimento, taxas de crescimento e tempo de duplicação acima apresentadas são específicas para estas bactérias, para este meio e para este ensaio, uma vez que estes parâmetros se alteram facilmente consoante o meio em que as bactérias são desenvolvidas.

3.1.2 Crescimento em vinho

O primeiro ensaio de crescimento em vinho consistiu em inocular a estirpe *Leuconostoc hilgardii*, desenvolvida em meio sintético MRS Broth, em vinho com diferentes percentagens de etanol. Os resultados desse ensaio estão indicados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados do primeiro ensaio de crescimento em vinho para a estirpe *Lactobacillus hilgardii* CBISA 3962.

% (v/v) de Etanol	UFC/mL média			
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1,5%	1,16E+03	5,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
3%, 5%, 7.5%, 10%, 11%	>3,00E+03	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
12%	5,45E+02	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
12,5%	1,10E+02	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
13%	4,00E+01	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00

Como se pode verificar pela Tabela 11 os resultados de crescimento em vinho, para a estirpe *Lactobacillus hilgardii* revelaram que ao fim de 24h quase todas as percentagens de etanol apresentavam menos de 1,00E+00 colónias nos resultados das amostras. Esses resultados mantiveram-se nos dias seguintes.

3.1.3 Resistência ao etanol em vinho

O ensaio de resistência ao etanol em vinho surgiu após a ausência de resultados positivos do ensaio de crescimento em vinho descrito no ponto anterior. Optando por se realizar um ensaio, em vinho, com mais estirpes e com apenas duas percentagens de etanol, um valor intermédio e outro mais elevado. Foi também inserido um balão controlo, sem etanol, para garantir que a ausência de resultados de crescimento não se devia a outros fatores que não a adversidade do meio (vinho).

Os resultados deste segundo ensaio estão apresentados na Tabela 12, contudo, devido aos resultados do balão controlo, pode afirmar-se que o meio, vinho, foi o fator determinante na ausência de resultados por parte das outras percentagens de etanol. Está também excluída a hipótese de se dever apenas à estirpe *Lactobacillus hilgardii* a ausência de resultados do ensaio anterior uma vez que os outros *Lactobacillus* reagiram da mesma forma.

Tabela 12 – Resultados obtidos do ensaio de resistência a diferentes percentagens do etanol, em vinho, para as estirpes *Lactobacillus*.

Estirpe	%(v/v) de Etanol	UFC/mL média		
		Dia 0	Dia 1	Dia 2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0%	>3,00E+03	>3,00E+03	>3,00E+03
	5%	>3,00E+03	1,30E+02	<1,00E+00
	12%	>3,00E+03	<1,00E+00	<1,00E+00
<i>Lactobacillus mali</i>	0%	>3,00E+03	>3,00E+03	>3,00E+03
	5%	>3,00E+03	<1,00E+00	<1,00E+00
	12%	5,50E+01	<1,00E+00	<1,00E+00
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	0%	>3,00E+03	>3,00E+03	>3,00E+03
	5%	>3,00E+03	<1,00E+00	<1,00E+00
	12%	1,10E+02	<1,00E+00	<1,00E+00

3.1.4 Resistência ao etanol em meio sintético

Este ensaio foi realizado em simultâneo com o ensaio anterior, recorrendo às mesmas estirpes de bactérias. O objectivo deste ensaio foi perceber até que ponto o etanol tinha um efeito inibidor nas BAL, utilizando meio sintético. Iniciou-se o ensaio com um balão de Erlenmeyer de 1,5%. Após o crescimento o balão de 1,5% foi o inóculo para um novo balão com 3% de etanol e posteriormente este de 3% foi inóculo para um balão de 5%, outro de 7,5% e outro de 10%. Os resultados encontram-se na Tabela 13 abaixo apresentada.

Tabela 13- Resultados do ensaio de resistência ao etanol em meio sintético para as diferentes bactérias.

Estirpe	%(v/v) de Etanol	UFC/mL média	
		Dia 0	Dia 1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,5%	>3,00E+03	>3,00E+03
	3%	>3,00E+03	>3,00E+03
<i>Lactobacillus mali</i>	5%	>3,00E+03	>3,00E+03
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	7,5%	>3,00E+03	>3,00E+03
	10%	>3,00E+03	>3,00E+03

Estes resultados revelaram que o etanol não inibiu o crescimento das diferentes estirpes de bactérias após a adaptação ao etanol, pelo menos para estas percentagens de etanol.

3.1.5 Adaptação ao etanol em meio sintético e inoculação em vinho

A adaptação ao etanol em meio sintético com posterior inoculação em vinho teve por base os dois últimos ensaios. O objectivo consistiu em a partir de um pré-inóculo em meio sintético com uma percentagem de etanol igual ou superior a 7,5%, inocular vinho com a mesma percentagem de etanol e/ou inferior. Os resultados obtidos para este ensaio estão representados na Tabela seguinte (Tabela 14).

Tabela 14 – Resultados do ensaio de adaptação ao etanol em meio sintético com posterior inoculação em vinho. A percentagem de etanol exibida por 7,5%*, representa a inoculação indirecta, ou seja, o seu inóculo adveio de meio sintético com 10% de etanol.

Estirpe	% (v/v) de Etanol	UFC/mL média					
		Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
<i>L. plantarum</i>	7,5%	>3,00E+03	4,80E+02	4,00E+01	5,00E+00	5,00E+00	<1,00E+00
	7,5%*	>3,00E+03	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
	10%	>3,00E+03	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
<i>L. mali</i>	7,5%	>3,00E+03	1,10E+02	>3,00E+03	>3,00E+03	2,65E+02	<1,00E+00
	7,5%*	3,85E+02	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
	10%	1,60E+02	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
<i>L. hilgardii</i>	7,5%	6,55E+02	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	1,50E+01	<1,00E+00
	7,5%*	6,05E+02	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
	10%	2,30E+02	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
<i>O. oeni</i>	7,5%	1,35E+03	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
	7,5%*	2,25E+02	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00
	10%	2,60E+02	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00

Os resultados obtidos demonstram novamente um decréscimo muito acentuado do número de colónias, ao fim de 24h. Em quase todas as estirpes e percentagens de etanol, foram obtidos crescimentos inferiores a 1,00E+00. Contudo, a maior resistência ocorreu nos ensaios de 7,5% de etanol que derivaram de inoculação directa.

3.1.6 Método seleccionado

Após os resultados obtidos de crescimento, optou-se por realizar o ensaio experimental em meio sintético. Contudo, antes do ensaio experimental, efectuou-se uma adaptação das bactérias, ao etanol, em meio sintético, até uma concentração de 12,5%.

3.2 Ensaio Experimental – Response Surface Methodology

3.2.1 Análise estatística do RSM

O efeito das concentrações de glucose, etanol e SO_2 , no crescimento das BAL foi testado usando um Delineamento Composto Central pelo RSM. Posteriormente os resultados dos ensaios foram analisados estatisticamente através do programa “Statistica” versão 7.

Para a análise dos dados foram utilizados os resultados dos ensaios de cada estirpe, ou seja, os valores representativos da contagem de colónias, apresentados em logaritmo dos valores médios de UFC/mL, em conjunto com a matriz do delineamento experimental determinada para este ensaio. No Anexo VII, encontram-se todos os dados para a análise estatística.

Através do programa foram calculados os efeitos lineares e quadráticos dos factores (glucose, etanol e SO_2), bem como as interacções entre factores.

Os efeitos lineares permitem fazer uma interpretação directa dos factores. Os efeitos quadráticos têm a ver com o facto de a resposta não ser linear e ser representada por uma superfície. Se o efeito for negativo teremos uma superfície convexa, se for positivo teremos uma superfície côncava. Recorrendo à análise de variância (ANOVA), calculou-se o *nível de significância p* o qual foi fixado em $<0,05$. Este valor para o parâmetro *p* indica-nos que temos uma probabilidade de erro na resposta inferior a 5%.

Os coeficientes de regressão que permitem estabelecer as equações polinomiais representativas das superfícies de resposta foram também calculados recorrendo à ANOVA. Serão apresentados juntamente com as equações polinomiais, os coeficientes de determinação (R^2) e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}). O R^2 correspondente ao coeficiente de correlação ao quadrado que permite determinar a percentagem de ajuste do modelo e varia entre 0 e 1. Quanto mais próximo estiver da unidade mais o modelo se ajusta aos dados experimentais. Por sua vez o R^2_{ajustado} permite confirmar se o modelo está bem ajustado aos resultados experimentais, varia igualmente entre 0 e 1, sendo no entanto sempre inferior a R^2 .

Os valores dos efeitos lineares, quadráticos, das interações e os respectivos níveis de significância p , bem como os coeficientes de regressão para cada ensaio encontram-se abaixo representados.

Observando as estimativas ou efeitos dos diferentes factores relativamente ao crescimento das BAL em estudo podemos concluir que estas são apenas significativamente inibidas pelo efeito etanol, como demonstram os níveis de significância para o efeito etanol, nas Tabelas 15, 17, 19, 21, 23.

Observando as Tabelas 15, 17, 19, 21 e 23 verificamos que o efeito linear significativo do etanol foi negativo durante os 10 dias o que indica que o crescimento das estirpes diminui em função do aumento do etanol, por outro lado, o facto de o efeito quadrático significativo do etanol ser positivo em quase todas as estirpes indica que o crescimento das bactérias pode ser descrito por superfícies de resposta convexas, Figuras 16, 18, 19, 21. As superfícies apresentam-se convexas, uma vez que foram nos ensaios com menor percentagem de etanol que ocorreram os crescimentos mais acentuados. A parte convexa correspondente à maior percentagem de etanol foi extrapolada pelo programa uma vez que não se efectuaram ensaios para valores superiores a 15% de etanol.

É de notar que ao dia 10, para todas as estirpes, o efeito do etanol quadrático se torna negativo (Tabelas 15, 17, 19, 21, 23, efeito Etanol Q, dia 10), este efeito pode ser explicado pelo facto de ao décimo dia, nos ensaios com menor percentagem de etanol, não ter sido observado crescimento contrariando o crescimento que esses ensaios apresentavam até ao quinto dia. Este declínio de crescimento pode acontecer devido à ausência de nutrientes ou à morte das BAL devido à alteração do pH, pela produção de ácido láctico. Estes resultados são visíveis nas Figuras 25 e 27 da estirpe *Leuconostoc mesenteroides* que representa os resultados ao dia 10. As Figuras 25 e 27 apresentar uma forma côncava, contrariando assim a forma convexa que apresentam os dias com efeito positivo. As Figuras 28, 29 e 30 da estirpe *Oenococcus oeni* também representam o dia 10, contudo não apresentam a forma côncava. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto de o crescimento desta estirpe ser mais lento relativamente às restantes estirpes, encontrando-se os seus ensaios com menor percentagem de etanol ainda com crescimento ao décimo dia.

A estirpe *L. hilgardii*, e *Leuconostoc mesenteroides*, apresentam ao dia 3 e dia 5, respectivamente, valores não significativos para o efeito do etanol quadrático.

Os fatores que apresentam valores de significância superiores a 0,05 são considerados não significativos e por isso ignorados, pois o efeito desses factores não explica os valores obtidos. Para exemplificar, as Figuras 22, 23 e 24 da estirpe *L. hilgardii*, representam os efeitos não significativos para os diferentes fatores ao dia 5. É de referir que o efeito do etanol é visível, apenas não se observam as formas convexas ou concavas, pois não existe interação entre o etanol e os restantes fatores.

A glucose (linear e quadrática), o SO_2 (linear e quadrática) e os fatores de interação, apresentam quase sempre valores de significância superiores a 0,05 pelo não serão considerados. Esses fatores apenas se encontram representados, porque a sua eliminação levaria a uma diminuição do nível de ajuste dos modelos polinomiais pelo que não devem ser eliminados.

A ausência de significância por parte dos fatores glucose e SO_2 é demonstrada nas Figuras 17, 20, 24, 26, 29 que representam a sua interação para as diferentes estirpes. A ausência de significância da glucose pode ser explicada, devido a um erro técnico, onde por lapso a glucose que compõe o meio sintético MRS Broth, não foi considerada para o delineamento experimental, assim sendo todos os valores de glucose, representados nas figuras abaixo, acrescem um valor de 20g/L. Assim, os valores mínimos e máximos de glucose são de 22 e 30g/L, em vez de 2 e 10g/L, valores excessivos que não permitem retirar elações sobre o efeito inibidor da glucose nas estirpes. Em relação ao SO_2 , a ausência de resultados pode ser explicada pelo pH do meio, uma vez que ao não ter sido alterado se encontrava entre valores próximos de 6,4, valores que condicionam a forma livre do SO_2 que perante esses valores de pH se combinou com constituintes do meio, perdendo o efeito inibidor.

Relativamente aos cálculos para os coeficientes de regressão, foram determinados os valores dos coeficientes de determinação, R^2 e R^2_{ajustado} , para as respectivas estirpes e respectivos dias, apresentando-se os resultados nas Tabelas 16, 18, 20, 22 e 24.

Os valores relativamente elevados de R^2 e R^2_{ajustado} indicam um bom ajuste do modelo aos resultados experimentais de crescimento para as diferentes bactérias.

Tabela 15 – Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) sobre os fatores do modelo, para a estirpe *Lactobacillus plantarum*.

CBISA 3960 *Lactobacillus plantarum*

Fatores	UFC - DIA 3		UFC - DIA 5		UFC - DIA 10	
	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)
Interceção	2,99	0,00001	1,63	0,001	7,23	0
Etanol (%) (L)	-1,47	0,000005	-3,80	0,000006	-3,19	0,005
Etanol (%) (Q)	1,63	0	3,21	0,000046	-4,81	0,0003
Glucose (g/L) (Q)	–	–	0,94	0,096	–	–
SO ₂ (mg/L) (L)	-0,29	0,153	–	–	-0,50	0,572
Etanol L x Glucose L	-	-	0,94	0,170		
Etanol L x SO ₂ L	0,43	0,116	–	–		

Tabela 16 – Tabela-resumo da ANOVA realizada sobre os coeficientes de regressão, para a estirpe *Lactobacillus plantarum*.

Fatores	Parâmetros	Equação do Modelo	R ²	R ² Ajustado
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 3	$69,96 - 9,94 \times Et + 0,37 \times Et^2 - 0,16 \times SO_2 + 0,01$	0,91344	0,88458
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 5	$124,203 - 18,276 \times Et + 0,68 \times Et^2 + 0,002 \times Glu^2$	0,84527	0,80956
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 10	$-148,847 + 26,112 \times Et - 1,087 \times Et^2 - 0,021 \times SO_2$	0,76669	0,73336

Superfície de Resposta da estirpe *L. plantarum* Variável: Log UFC Dia 3
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=,1318116
 Glucose VS Etanol

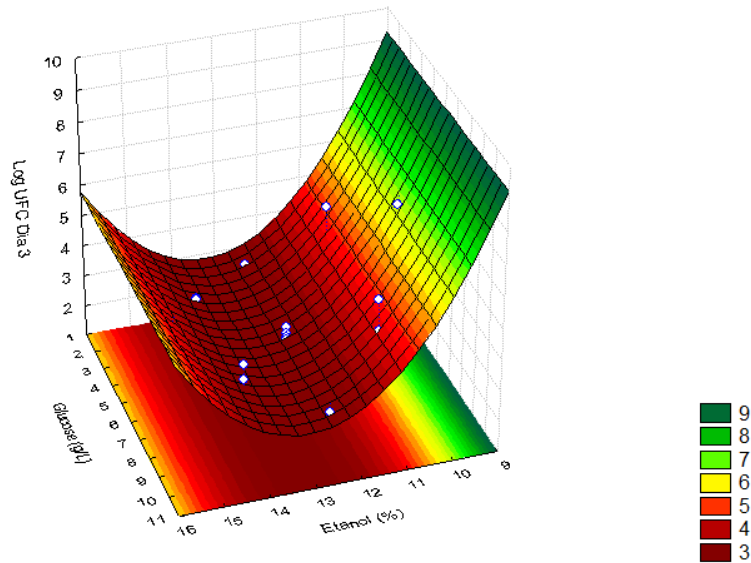


Figura 16 - Superfície de resposta para a estirpe *L. plantarum* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 3 em UFC/mL, considerando os factores de glucose (g/L) e de etanol (%).

Superfície de Resposta da estirpe *L. plantarum* Variável: Log UFC Dia 3
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=,1318116
 Glucose VS SO₂

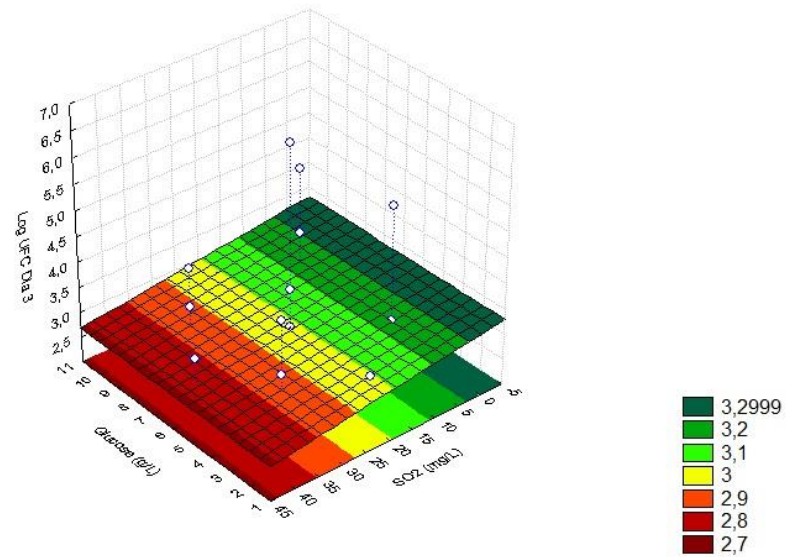


Figura 17 - Superfície de resposta para a estirpe *L. plantarum* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 3 em UFC/mL, considerando os factores de glucose (g/L) e de SO₂ (mg/L).

Superfície de Resposta da estirpe *L. plantarum* Variável: Log UFC Dia 3
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=,1318116
 Etanol VS SO₂

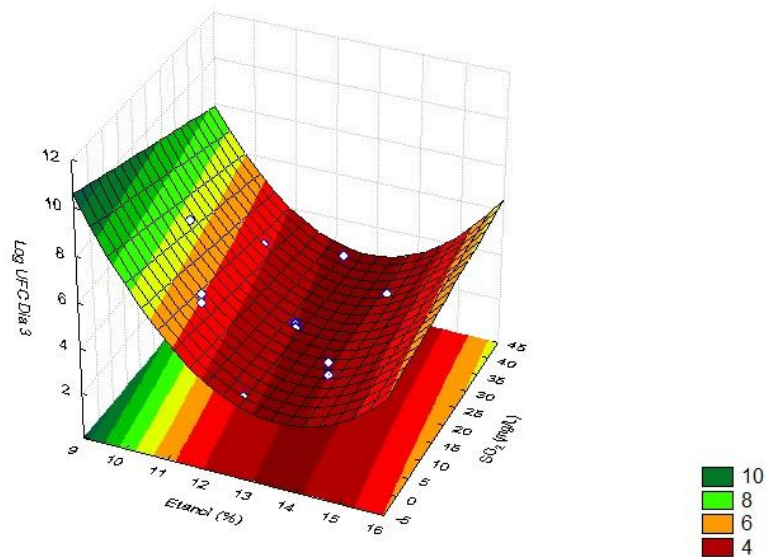


Figura 18 - Superfície de resposta para a estirpe *L. plantarum* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 3 em UFC/mL, considerando os factores de etanol (%) e SO₂ (mg/L).

Tabela 17 - Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) sobre os fatores do modelo, para a estirpe *Lactobacillus mali*.

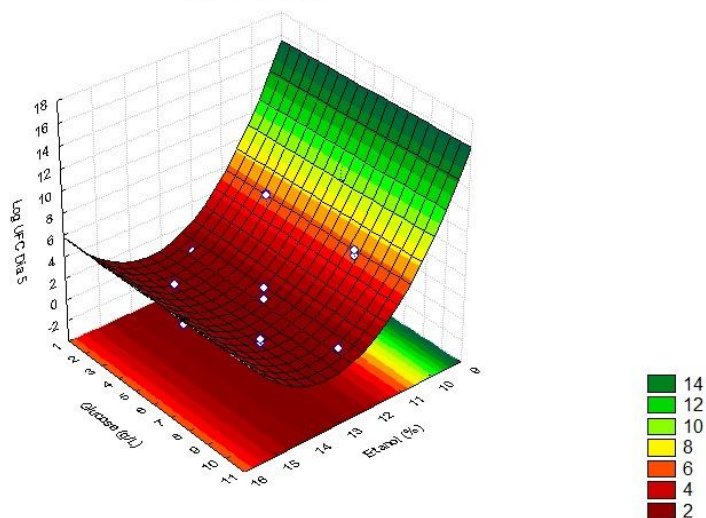
CBISA 3961 *Lactobacillus mali*

Fatores	UFC - DIA 3		UFC - DIA 5		UFC - DIA 10	
	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)
Interceção	2,78	0	0,92	0,047	7,43	0,000005
Etanol (%) (L)	-1,03	0,000005	-4,11	0	-3,43	0,002
Etanol (%) (Q)	1,46	0	3,55	0,000004	-4,98	0,0003
Glucose (g/L) (L)	-0,12	0,362	–	–	–	–
Glucose (g/L) (Q)	–	–	0,56	0,216	-0,53	0,600
SO ₂ (mg/L) (L)	–	–	0,34	0,399	–	–
SO ₂ (mg/L) (Q)	-0,12	0,399	0,91	0,055	-0,65	0,523
Glucose L por SO ₂ L	0,37	0,047	–	–	–	–

Tabela 18 – Tabela-resumo da ANOVA realizada sobre os coeficientes de regressão, para a estirpe *Lactobacillus mali*.

Fatores	Parâmetros	Equação do Modelo	R ²	R ² Ajustado
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 3	$58,64 - 8,517 \times Et + 0,3268 \times Et^2 - 0,125 \times Glu - 0,00067 \times SO_2^2 + 0,005$	0,94846	0,92504
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 5	$139,06 - 20,545 \times Et + 0,7665 \times Et^2 + 0,001 \times Glu^2 - 0,0917 \times SO_2 + 0,0026 \times SO_2^2$	0,93554	0,90624
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 10	$-145,818 + 25,619 \times Et - 1,071 \times Et^2 - 0,002 \times Glu^2$	0,76895	0,69193

Superfície de Resposta da estirpe *L. mali* Variável: Log UFC Dia 5
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=,5857982
 Glucose VS Etanol



Superfície de Resposta da estirpe *L. mali* Variável: Log UFC Dia 5
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=,5857982
 Glucose VS SO₂

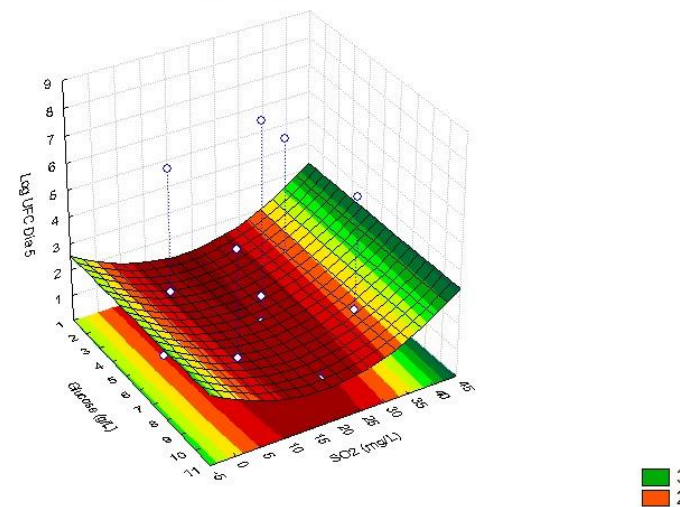


Figura 19 - Superfície de resposta para a estirpe *L. mali* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 5 em UFC/mL, considerando os factores de glucose (g/L) e de etanol (%).

Figura 20 - Superfície de resposta para a estirpe *L. mali* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 5 em UFC/mL, considerando os factores de glucose (g/L) e de SO₂ (mg/L).

Superfície de Resposta da estirpe *L. mali* Variável: Log UFC Dia 5
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=,5857982
 Etanol VS SO2

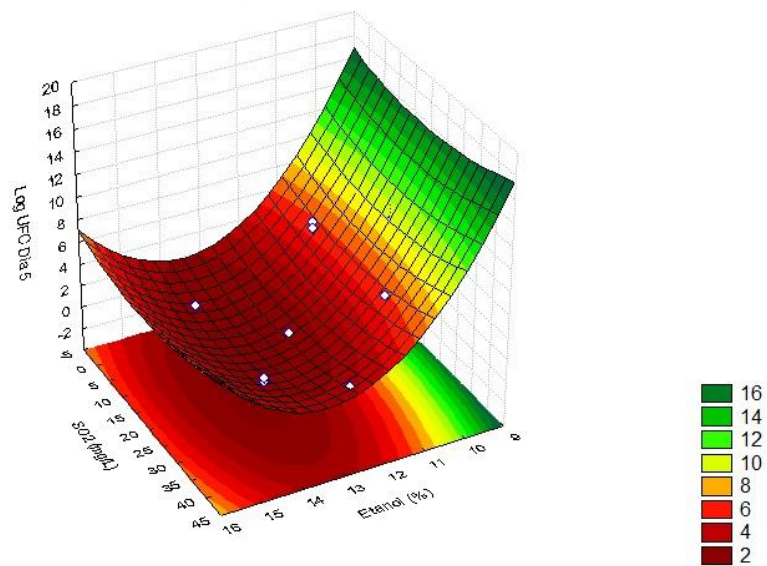


Figura 21 - Superfície de resposta para a estirpe *L. mali* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 5 em UFC/mL, considerando os factores de SO₂ (mg/L) e de etanol (%).

Tabela 19 - Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) sobre os fatores do modelo, para a estirpe *Lactobacillus hilgardii*.

CBISA 3962 *Lactobacillus hilgardii*

Fatores	UFC - DIA 3		UFC - DIA 5		UFC - DIA 10	
	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)
Interceção	5,168	0	6,22	0	7,49	0
Etanol (%) (L)	-2,370	0	-4,17	0	-2,64	0,034
Etanol (%) (Q)	0,492	0,0002	-0,34	0,271	-5,76	0,000
Glucose (g/L) (L)	-0,128	0,137	–	–	1,30	0,260
Glucose (g/L) (Q)	–	–	-0,23	0,452	–	–
SO ₂ (mg/L) (L)	-0,137	0,116	–	–	–	–
SO ₂ (mg/L) (Q)	-0,077	0,374	–	–	–	–
Etanol L por Glucose L	0,090	0,403	-0,30	0,425	–	–
Etanol L por SO ₂ L	–	–	–	–	-1,86	0,220
Glucose L por SO ₂ L	0,055	0,603	–	–	-1,86	0,220

Tabela 20 – Tabela-resumo da ANOVA realizada sobre os coeficientes de regressão, para a estirpe *Lactobacillus hilgardii*.

Factores	Parâmetros	Equação do Modelo	R ²	R ² Ajustado
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 3	$32,69 - 3,579 \times Et + 0,111 \times Et^2 - 0,027 \times Glu + 0,0052 \times SO_2 - 0,00027 \times SO_2^2$	0,98959	0,98486
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 5	$13,4 + 0,2366 \times Et - 0,0656 \times Et^2$	0,9428	0,93463
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 10	$-185,789 + 31,712 \times Et - 1,302 \times Et^2 - 0,002 + 0,007$	0,68597	0,58129

Superfície de Resposta da estirpe *Lactobacillus hilgardii* no Dia 5
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=,258993
 Factores: Glucose e Etanol

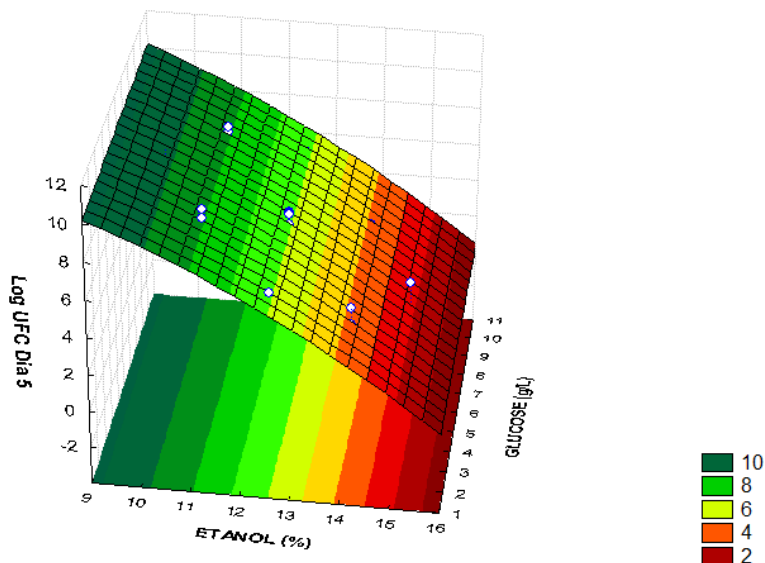


Figura 23- Superfície de resposta para a estirpe *L. hilgardii* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 5 em UFC/mL, considerando os factores de etanol (%) e de glucose (g/L).

Superfície de Resposta da estirpe *Lactobacillus hilgardii* no Dia 5
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=,4214994
 Etanol VS SO2

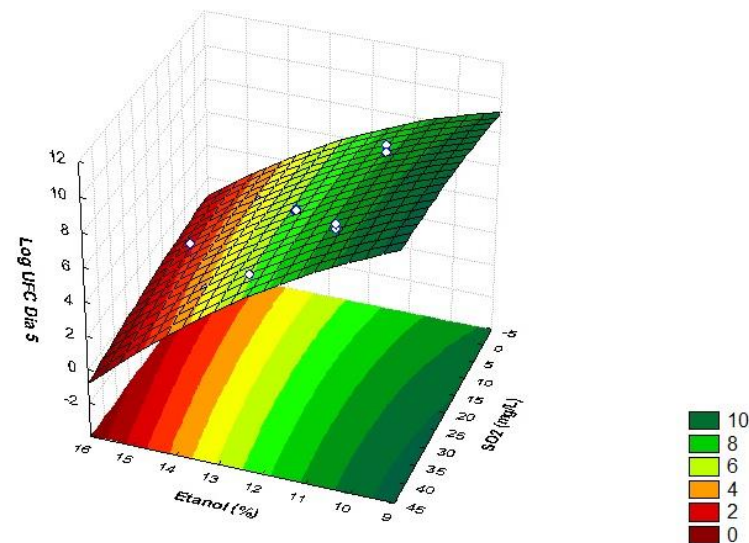


Figura 22 - Superfície de resposta para a estirpe *L. hilgardii* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 5 em UFC/mL, considerando os factores de etanol (%) e de SO₂ (mg/L).

Superfície de Resposta da estirpe *Lactobacillus hilgardii* no Dia 5
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=,4214994
 Glucose VS SO2

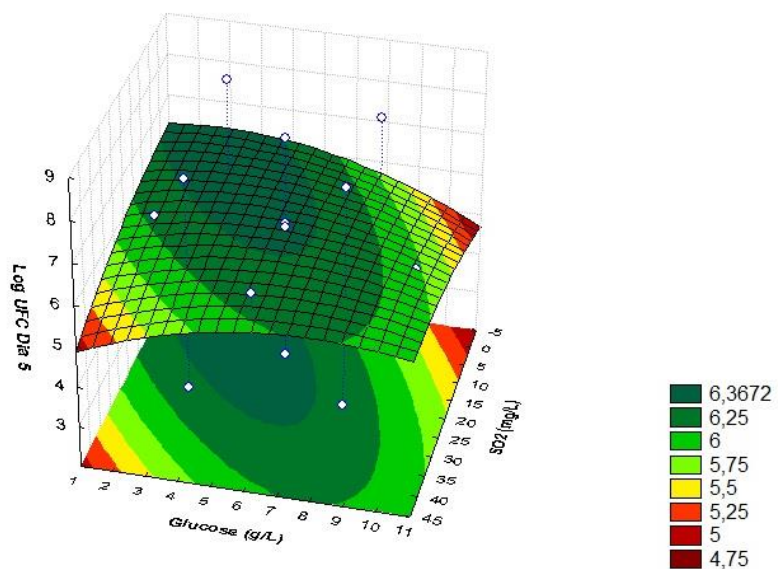


Figura 24 - Superfície de resposta para a estirpe *L. hilgardii* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 5 em UFC/mL, considerando os factores de glucose (g/L) e de SO₂ (mg/L).

Tabela 21 - Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) sobre os fatores do modelo, para a estirpe *Leuconostoc mesenteroides*.

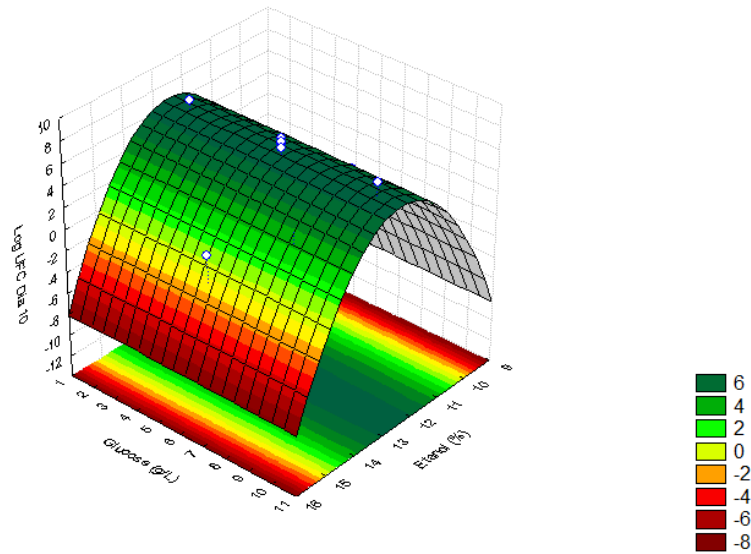
CBISA 3963 *Leuconostoc mesenteroides*

Fatores	UFC - DIA 3		UFC - DIA 5		UFC - DIA 10	
	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)
Interceção	4,44	0	3,96	0,000002	7,20	0,000059
Etanol (%) (L)	-2,51	0	-4,75	0	0,00	1
Etanol (%) (Q)	-	-	0,37	0,432	-5,61	0,000601
Glucose (g/L) (L)	-0,21	0,337	0,42	0,331	-	-
Glucose (g/L) (Q)	-	-	0,34	0,469	- 1,05	0,394
SO ₂ (mg/L) (L)	-0,23	0,299	-	-	1,63	0,158
SO ₂ (mg/L) (Q)	-0,30	0,195	-0,33	0,480	- 3,28	0,027
Etanol L por Glucose L	0,32	0,270	-	-	-	-
Etanol L por SO ₂ L	-0,35	0,228	-	-	-	-

Tabela 22 – Tabela-resumo da ANOVA realizada sobre os coeficientes de regressão, para a estirpe *Leuconostoc mesenteroides*.

Fatores	Parâmetros	Equação do Modelo	R ²	R ² Ajustado
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 3	$15,92742 - 0,91563 \times Et - 0,61107 \times Glu + 0,15698 \times SO_2 - 0,00106 \times SO_2^2 + 0,04533 - 0,00995$	0,93736	0,89978
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 5	$40,68105 - 4,16622 \times Et + 0,10278 \times Et^2 - 0,3621 \times Glu + 0,03752 \times Glu^2 - 0,00016$	0,92254	0,88734
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 10	$-186,568 + 30,039 \times Et - 1,2 \times Et^2 - 0,002 \times Glu^2 + 0,489 \times SO_2 - 0,01 \times SO_2^2$	0,69579	0,55751

Superfície de Resposta da estirpe *Leu. mesenteroides* Variável: Log UFC Dia 10
 3 factores, 1 Repetições, 17 Ensaios; MS Residual=4,212901
 Glucose VS Etanol



Superfície de Resposta da estirpe *Leu. mesenteroides* Variável: Log UFC Dia 10
 3 factor2s, 1 Repetição, 17 Ensaio; MS Residual=4,212901
 SO2 VS Glucose

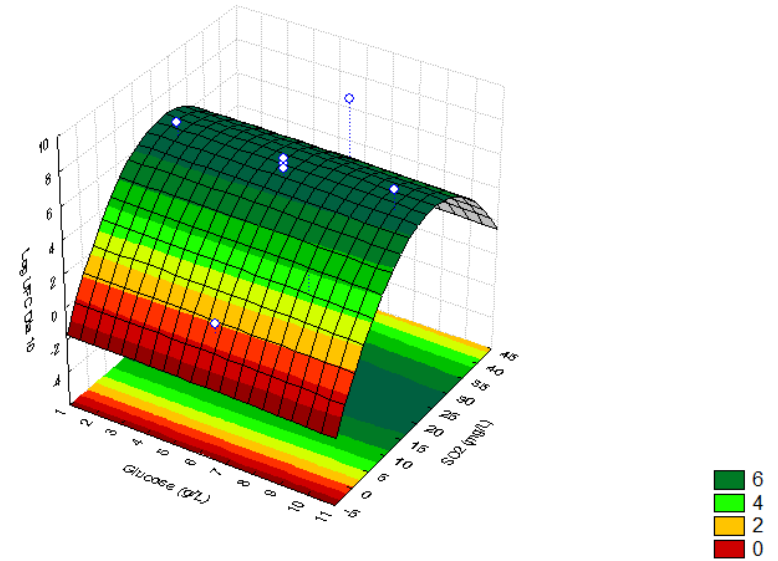


Figura 25 - Superfície de resposta para a estirpe *Leu. mesenteroides* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 5 em UFC/mL, considerando os factores de etanol (%) e de glucose (g/L).

Figura 26 - Superfície de resposta para a estirpe *Leu. mesenteroides* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 5 em UFC/mL, considerando os factores de glucose (g/L) e SO₂ (mg/L).

Superfície de Resposta da estirpe *Leu. mesenteroides* Variável: Log UFC Dia 10
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=4,212901
 DV: Log UFC Dia 10

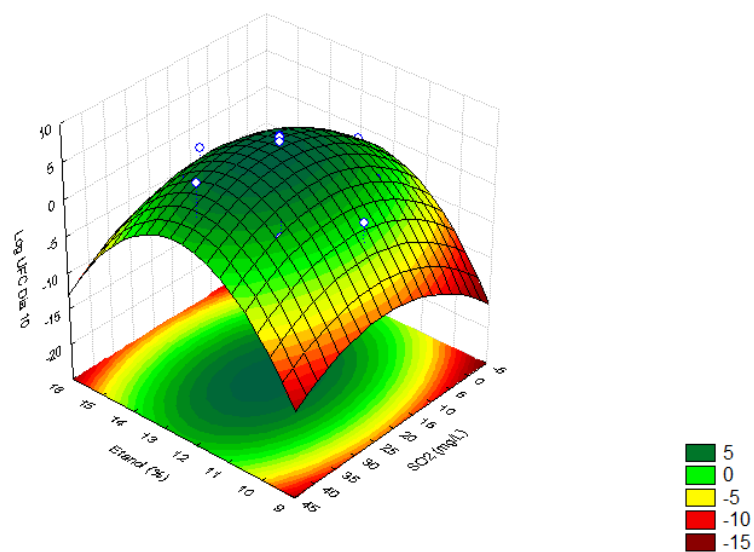


Figura 27 - Superfície de resposta para a estirpe *Leu. mesenteroides* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 5 em UFC/mL, considerando os factores de etanol (%) e de SO₂ (mg/L).

Tabela 23 - Tabela-resumo com os resultados dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q), e valores dos níveis de significância (p) sobre os fatores do modelo, para a estirpe *Oenococcus oeni*.

CBISA 4279 *Oenococcus oeni*

Fatores	UFC - DIA 3		UFC - DIA 5		UFC - DIA 10	
	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)	Estimativa	Nível de Significância (p)
Intercepção	2,06	0	2,06	0,000013	1,26	0,017
Etanol (%) (L)	-1,17	0,002	-4,01	0	-5,86	0
Etanol (%) (Q)	0,63	0,058	2,49	0,000026	2,04	0,005
Glucose (g/L) (L)	–	–	-0,11	0,751	-0,26	0,662
Glucose (g/L) (Q)	–	–	0,54	0,145	4,77	0,000004
SO ₂ (mg/L) (L)	–	–	–	–	-	-
Etanol L por Glucose L	0,32	0,419	0,55	0,222	–	–
Glucose L por SO ₂ L	0,38	0,337	0,44	0,323	–	–

Tabela 24 – Tabela-resumo da ANOVA realizada sobre os coeficientes de regressão, para a estirpe *Oenococcus oeni*.

Fatores	Parâmetros	Equação do Modelo	R ²	R ² Ajustado
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 3	$29,06494 - 3,92731 \times Et + 0,14191 \times Et^2 - 0,00257 + 0,00088$	0,60662	0,47549
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 5	$114,5488 - 15,8856 \times Et + 0,5628 \times Et^2 - 1,5751 \times Glu + 0,0477 \times Glu^2 + 0,0781 + 0,0002$	0,94934	0,91894
Glucose; Etanol, SO ₂	UFC - DIA 10	$113,5023 - 13,5062 \times Et + 0,4613 \times Et^2 - 5,1119 \times Glu + 0,4215 \times Glu^2$	0,93483	0,91311

Superfície de Resposta da estirpe *O. oeni* Variável: Log UFC Dia 10
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=1,207223
 Glucose VS Etanol

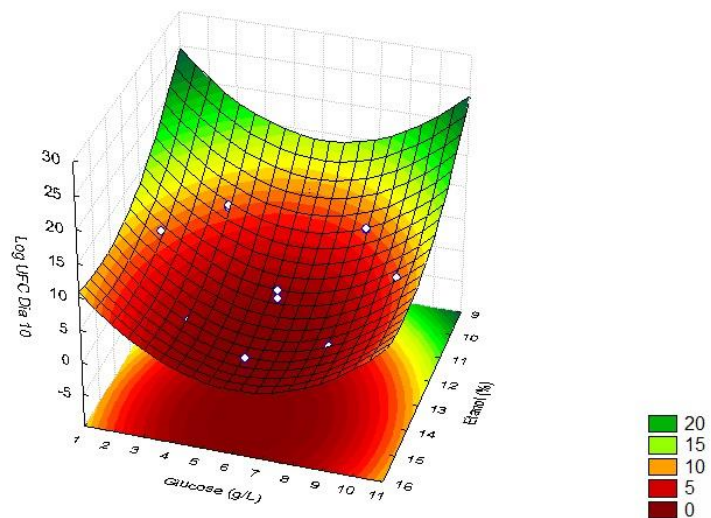


Figura 28 - Superfície de resposta para a estirpe *O. oeni* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 10 em UFC/mL, considerando os factores de etanol (%) e de glucose (g/L).

Superfície de Resposta da estirpe *O. oeni* Variável: Log UFC Dia 10
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=1,207223
 Etanol VS SO₂

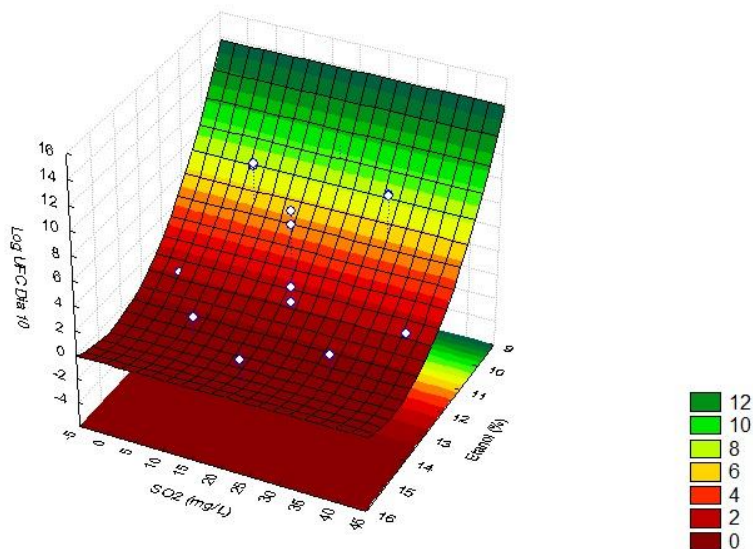


Figura 30 - Superfície de resposta para a estirpe *O. oeni* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 10 em UFC/mL, considerando os factores de etanol (%) e de SO₂ (mg/L).

Superfície de Resposta da estirpe *O. oeni* Variável: Log UFC Dia 10
 3 factores, 1 Repetição, 17 Ensaios; MS Residual=1,207223
 Glucose VS SO₂

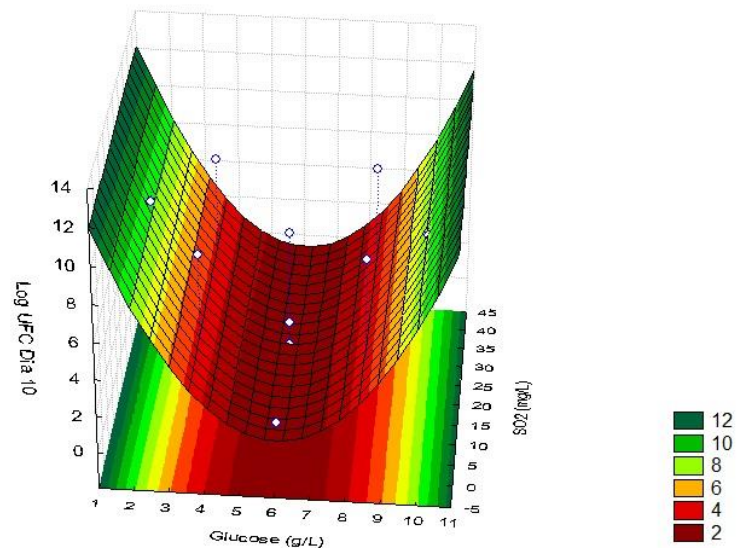


Figura 29 - Superfície de resposta para a estirpe *O. oeni* ajustada aos pontos experimentais correspondentes ao log do crescimento no Dia 10 em UFC/mL, considerando os factores de glucose (g/L) e de SO₂ (mg/L).

3.2.2 Resultados obtidos por HPLC

A determinação da viabilidade das estirpes, nos diferentes ensaios, foi acompanhada pela avaliação dos metabolitos produzidos ou consumidos no final do processo. Para se obter uma base correcta de comparação foi realizada uma análise aos compostos que inicialmente compoñham os ensaios. É de salientar que esta análise apenas foi realizada uma vez, assumindo-se que os valores iniciais seriam idênticos para todas as estirpes. Os resultados desta análise, por serem muito extensos encontram-se no Anexo X.

Como já foi referido anteriormente, por lapso a glucose que compõe o meio sintético MRS Broth, não foi considerada no delineamento experimental. Assim, todos os valores de glucose apresentam-se compreendidos entre 22 e 30g/L quando o desejado seria entre 2 e 10g/L.

Pela observação dos resultados, podemos observar que sempre que os valores de etanol eram inferiores a 14%, a glucose era consumida e convertida em ácido láctico. Existe um ligeiro aumento das quantidades de ácido láctico, provavelmente devido ao consumo de outros açúcares existentes no meio. Para valores de etanol acima dos 14%, não ouve consumo de glucose, revelando-se o etanol inibidor a partir desse valor.

É de salientar que os ensaios que apresentaram valores de etanol de 12,5% revelaram-se inibidores para a estirpe *Oenococcus oeni*. Contudo como as outras estirpes apenas apresentaram o seu crescimento exponencial nos ensaios com valores de etanol de 12,5%, entre os dias 5 e 10, pode não se tratar de um fator inibidor mas sim de uma fase de latência que é mais acentuada nessa estirpe que nas restantes. Como se pode verificar pela observação dos resultados, muitas estirpes apresentam ainda algumas quantidades de glucose por consumir ao dia 10, quando os valores de etanol são de 12,5%.

A quantidade de etanol ao dia 10 está ligeiramente inferior ao valor inicial, provavelmente devido ao fenómeno de evaporação.

4 Conclusão e perspectivas futuras

O presente trabalho teve como objectivo verificar a influência da glucose, etanol e dióxido de enxofre, no crescimento da BAL em vinho, através de um delineamento experimental composto central, pelo RSM.

Contudo os resultados dos ensaios preliminares em vinho revelaram-se infrutíferos, optando-se por realizar o ensaio do delineamento experimental em meio sintético MRS Broth.

Apesar de serem infrutíferos os resultados dos ensaios preliminares em vinho, estes devem ser repetidos no futuro. A adaptação ao etanol, realizada nesses ensaios foi uma excelente base para o ensaio do delineamento experimental, pois se as estirpes tivessem sido inoculadas directamente no meio com o etanol, provavelmente acabariam por morrer. Esta adaptação permitiu simular a adaptação das BAL durante o processo de vinificação. Para além disso, um ensaio futuro deverá ter em linha de conta o vinho a escolher para o ensaio, pois este terá sido provavelmente o fator que determinou a ausência de resultados nos ensaios de crescimento em vinho. O vinho em questão era um vinho engarrafado, pronto a consumir e portanto com o processo de vinificação terminado, possivelmente foi sujeito a fatores tecnológicos agressivos que o tornaram num vinho sem conteúdo a nível nutricional, para que as BAL se pudessem desenvolver.

Futuramente seria interessante realizar este delineamento experimental e os ensaios preliminares de crescimento em mosto, vinho após fermentação alcoólica e vinho após fermentação maloláctica.

Relativamente ao delineamento experimental, pode concluir-se que o fator que significativamente exerceu influência sobre o crescimento das bactérias foi o etanol, sob a forma de agente inibidor. As BAL foram inibidas em percentagens de etanol de acima de 12,5%, para a *Oenococcus oeni* e 14% para as restantes estirpes. A ausência de significância da glucose pode ser explicada, devido a um erro técnico, que ocorreu durante a preparação do delineamento experimental e acompanhou todo o ensaio, não se considerando a quantidade de glucose já existente no meio sintético MRS Broth, aproximadamente 20g/L. Este valor revela-se excessivo comparativamente aos valores inicialmente delineados tornando impossível avaliar até que ponto as reduzidas concentrações de glucose seriam inibidoras no crescimento das bactérias. Contudo, a glucose foi consumida pelas BAL e convertida em ácido láctico.

Apesar de ser conhecido como agente inibidor, antisséptico e antioxidásico do vinho, impedindo o desenvolvimento da maioria dos microrganismos, o dióxido de enxofre, não se manifestou durante o ensaio experimental, muito possivelmente porque a sua forma livre se terá combinado com os compostos carbonados livres existentes no meio MRS Broth, devido ao pH do meio ser tão alto.

É de salientar o ensaio experimental foi realizado em meio sintético, não sendo por isso os seus resultados aplicados a outro meio que não o mesmo, incluindo o vinho. Contudo seria importante voltar a ser realizado este delineamento experimental tanto em vinho como em meio enriquecido.

5 Bibliografia

- Aukrust, T. & Blom., H., 1992. Transformation of Lactobacillus strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Research International*. 25, p. 253–261.
- Axelsson, L., 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. Third Edition*. . New York.: Marcel Dekker, Inc..
- Bartowsky, E., 2005. Oenococcus oeni and malolactic fermentation - moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Volume 11 (2), pp. 174-187.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P. & Villar, L. S., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.. *Talanta* 76, p. 965–977.
- Box, G. & Wilson, K., 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society*, p. Serie B vol. 13 No. 1.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G. F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50 (1-2), pp. 131-149.
- Carrascosa, A., Muñoz, R. & González, R., 2011. *Molecular Wine Microbiology*. USA: Elsevier Inc..
- Carreté, R., Vidal, M. T. & Bordons, A. C. M., 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of Oenococcus oeni. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 211(2), pp. 155-159.
- Carr, F. J., Chill, D. & Maida, N., 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4), pp. 281-370.
- Cavin, J. F., Etievant, P. X. & Diviès, C., 1993. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *Am. J. Enol. Vitic.*, Volume 44, p. 76–80.
- Costello, P. J., Morrison, G. J., Lee, T. H. & Fleet, G. H., 1983. Numbers and species of lactic acid bacteria in wine during vinification. *Food Technol. Austr.*, Volume 35, p. 14–18.
- Couto, J. A. & Hogg, T. A., 1994. Diversity of ethanol-tolerant lactobacilli isolated from Douro fortified wine: Clustering and identification by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. *J Appl Bacteriol*, Volume 76 (5), pp. 487-491.
- Couto, J., Campos, F., Figueiredo, A. & Hogg, T., 2006. Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.*, Volume 57, p. 166–171.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Fleet, G. H. & Lee, T. H., 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39, p. 137–142.

- Davis, C., Wibowo, D., Lee, T. & Fleet, G., 1986. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, Volume 51, p. 539–545.
- Demazeaud, M. & de Roissart, H., 1994. Métabolisme général des bactéries lactiques. In: *Bactéries Lactiques*. Loriga, Uriage: s.n., pp. 169-208.
- Du Toit, M. & Pretorius, I., 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal – A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Volume 21, p. 74–96.
- Fernandes, L., Loureiro, V. & Mendes-Faia, A., 1991. Efeito do etanol no crescimento de bactérias lácticas. *Rev. Port. Farm*, Volume XL, pp. 144-48..
- Firme, P., Leitão, M. C. & San Romão, M. V., 1994. The metabolism of sugar and malic acid by *Leuconostoc oenos*: effect of malic acid, pH and aeration conditions. *Journal of Applied Bacteriology*, Volume 76, p. 173–181.
- Fleet, G. H., 1993. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Switzerland: Harwood Academic Publishers.
- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S. & Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of yeasts and Lactic Acid Bacteria during fermentation and storage of Bordeaux Wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, Volume 48 (5), pp. 1034-1038.
- Fugelsang, K., 1997. Lactic Acid Bacteria. In: *Wine Microbiology*. Chapman & Hall. London: Chapman & Hall. London.
- Fugelsang, K. C. & Edwards, C., 2007. *Wine Microbiology*. USA: Springer.
- Gobbetti, M. & Corsetti, A., 1997. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiology*. 14, p. 175–187.
- Gottschalk, G., 1986. *Bacterial metabolism*. 2^o ed. Verlag, New York: Springer.
- Henick-Kling, T., 1995. Control of malo-lactic fermentation in wine: Energetics, flavour modifications and methods of starter preparation. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(529-537).
- Inês, A., 2007. *Abordagem polifásica na caracterização e selecção de bactérias do ácido láctico de vinhos da Região Demarcada do Douro de vinhos da Região Demarcada do Douro*, Vila Real: UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO.
- Jay, J., Loessner, M. & Golden, D., 2005. Milk, Fermentation, and Fermented and Nonfermented Dairy Products. In: *Modern Food Microbiology (eds)*. New York, USA: Springer, pp. 149-169.
- Kandler, O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Volume 49 (3), pp. 209-224.

- Krieger, S., 2005. Determining when to add malolactic bacteria. In: *Malolactic fermentation. Understanding the science and practice*. Lallemand Inc Montréal, Canada: Morenzoni, R. & Specht, K.S. (eds), pp. 12.1-12.9.
- Kuipers, O., Buist, G. & Kok, J., 2000. Current strategies for improving food bacteria. *Research Microbiology*, Volume 151 (10), p. 815–822.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. & Ribéreau-Gayon, P., 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl Environ Microbiol*, Volume 46 (4), pp. 874-880.
- Liu, M., van Enckevort, F. & Siezen, R. J., 2005. Genome update: lactic acid bacteria genome sequencing is booming. *Microbiology*. 151, pp. 3811-3814.
- Liu, S. Q., 2002. Malolactic fermentation in wine: beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*. 92, p. 589–601.
- Liu, S. Q., 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 83(2), pp. 115-31.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76, p. 317–331.
- Makarova, K. S. & Koonin, E. V., 2007. Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology* 189 (4), pp. 1199-1208.
- Mendes-Faia, M. A., 1987. *Crescimento e metabolismo de bactérias lácticas provenientes de vinhos da região de Trás-os-Montes. Sua intervenção na fermentação maloláctica*, s.l.: PhD thesis, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro..
- Montgomery, D., 1997. Response surface methods and other approaches to process optimization. In: *Design and analysis of experiments*. New York: John Wiley and Sons, p. 427–510.
- Moreno-Arribas, M. V. & Polo, M. C., 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Volume 45 (4), pp. 265-286.
- Pozo-Bayón, M., Pardo, I., Ferrer, S. & Moreno-Arribas, M., 2009. Molecular approaches for the identification and characterisation of oenological lactic acid bacteria. *African Journal of Biotechnology*, Volume 8(7), pp. 3995-4001.
- Pretorius, I. S., 2001. Gene technology in winemaking: New approaches to an ancient art. *Agric.Conspec. Sci.*, Volume 66, p. 27–47.
- Reguant, C., Carreté, R., Constantí, M. & Bordons, A., 2005. Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 246(1), pp. 111-117.

Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L. & Lonvaud-Funel, A., 1999. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation. Influence on wine aroma.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 47, pp. 4003-4008.

Ribereau-Gayon, P., 1985. New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.*, Volume 36, pp. 1-10.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. & Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.

Romano, P. & Suzzi, G., 1993. Sulphur dioxide and wine microorganisms. In: G. Fleet, ed. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.

Singleton, V. L., 1995. Maturation of wines and spirits: comparisons, facts, and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.*, Volume 46, p. 98–115.

Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36 (1), pp. 1-29.

Van Rensburg, P. & Pretorius, I., 2000. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations - A review. *South African J. Enol. Vitic.*, Volume 21, pp. 52-73.

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

Vuyst, L. & Degeest, B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*. 23, pp. 153-177.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. & Fleet, G. & L. T., 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, Volume 36 (4), pp. 302-313.

6 Anexos

6.1 Anexo I – Análises do vinho – resumo dos boletins analíticos

Primeira Análise

Parâmetros Analíticos	Quantidade	Método
Massa volúmica a 20°C (g/dm ³)	0,9927	NP 2142
Teor alcoólico volumétrico a 20°C (%v/v)	12,7	NP 2143
Acidez total (g/dm ³ ácido tartárico)	4,9	NP 2139
Acidez fixa (g/dm ³ ácido tartárico)	4,1	NP 2141
Acidez volátil (g/dm ³ ácido acético)	0,62	NP 2140
pH	3,50	-----
SO ₂ livre (mg/dm ³)	34	NP 2220
SO ₂ total (mg/dm ³)	140	NP 2220
Fenóis totais (A280 nm × 100)	58,1	-----
Intensidade (A420+ A520+A620)	0,937	-----
Tonalidade (A420 /A520)	0,8256	-----

Segunda Análise

Parâmetros Analíticos	Quantidade	Método
Massa volúmica a 20°C (g/dm ³)	-----	NP 2142
Teor alcoólico volumétrico a 20°C (%v/v)	15,6	NP 2143
Acidez total (g/dm ³ ácido tartárico)	4,8	NP 2139
Acidez fixa (g/dm ³ ácido tartárico)	3,9	NP 2141
Acidez volátil (g/dm ³ ácido acético)	0,71	NP 2140
pH	3,49	-----
SO ₂ livre (mg/dm ³)	19	NP 2220
SO ₂ total (mg/dm ³)	106	NP 2220
Fenóis totais (A280 nm × 100)	-----	-----
Intensidade (A420+ A520+A620)	1,013	-----
Tonalidade (A420 /A520)	0,756	-----

Terceira Análise

Parâmetros Analíticos	Quantidade	Método
Massa volúmica a 20°C (g/dm ³)	-----	NP 2142
Teor alcoólico volumétrico a 20°C (%v/v)	15,8	NP 2143
Acidez total (g/dm ³ ácido tartárico)	5,1	NP 2139
Acidez fixa (g/dm ³ ácido tartárico)	4,2	NP 2141
Acidez volátil (g/dm ³ ácido acético)	0,69	NP 2140
pH	3,44	-----
SO ₂ livre (mg/dm ³)	9	NP 2220
SO ₂ total (mg/dm ³)	78	NP 2220
Açucares (g/dm ³)	1,9	NP 2223
Fenóis totais (A280 nm × 100)	56,3	-----
Intensidade (A420+ A520+A620)	0,75	-----
Tonalidade (A420 /A520)	1,15	-----

6.2 Anexo II - Ajuste do etanol e neutralização do dióxido de enxofre

Com base nos resultados das análises aos parâmetros analíticos do vinho procedeu-se à neutralização do SO₂ e ao ajuste do Teor Alcoólico através do seguinte protocolo:

Procedimento para o ajuste do Teor Alcoólico:

- Foi adicionado ao vinho um volume de etanol a 99,5% (v/v) (nos cálculos seguintes será considerado 100% uma vez que a diferença, para o volume em causa é desprezável).
- Cálculo do volume a adicionar através da diferença entre o teor alcoólico que se têm e o que se pretende obter para 10L de vinho:

Teor alcoólico inicial → 12,5%

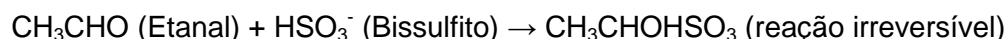
Teor alcoólico pretendido → 16,4%

Percentagem a adicionar pela diferença → 16,4 – 12,5 = 3,9%

Volume de etanol a adicionar nos 10L → 3,9 × 10000 ÷ 100 = 390mL

Procedimento para a neutralização do Sulfuroso Livre:

Foi adicionado ao vinho um volume de uma solução stock de acetaldeído ou etanal, para neutralizar o dióxido de enxofre livre existente no vinho, que resulta da reação da seguinte equação:



Peso Molecular:

Etanal - 44g/mol

Bissulfito – 81g/mol

Foram necessárias duas adições de etanal para neutralizar o SO₂, por cada uma das adições utilizou-se uma solução stock de acetaldeído diferente, ou seja, com a concentração requerida para que a neutralização ocorresse.

Para calcular a quantidade de etanal a adicionar em 10L de vinho com 34mg/dm³ e 19mg/dm³ de SO₂ Livre, usou-se a seguinte fórmula, baseada no peso molecular:

44 g/mol Etanal ----- 81 g/mol Bissulfito

X mg/dm³ Etanal ----- 34 ou 19 mg/dm³ Bissulfito no vinho

X = 18,47 e 10,32 mg/dm³ respetivamente foram as quantidades de Etanal necessária a adicionar por cada litro de vinho com 34 ou 19mg/dm³ de SO₂ Livre.

Para 10 litros eram necessários 184,7 e 103,2 mg, respectivamente.

Como se trata de uma quantidade muito baixa, recorreu-se à preparação de uma solução stock de etanal, com uma concentração de 184,7mg/mL e 103,2mg/mL, pois o objetivo foi transferir para o vinho toda a quantidade necessária com apenas a adição de 1mL.

Preparação de uma solução stock de etanal:

- Para uma solução stock de etanal de 10mL foram necessárias 1,032g de etanal (no caso de ter uma concentração de 103,2mg/mL, para uma concentração de 184,7mg/mL será 1,847g) e aproximadamente 10mL de água destilada;
- Num balão volumétrico de 10mL coloca-se alguns mililitros de água destilada fria (aproximadamente 4mL), pois o etanal é bastante volátil;
- Numa balança analítica, tarou-se o peso do balão com a água destilada e pesou-se gota a gota a quantidade de etanal requerida;
- Perfez-se o volume até aos 10mL com água destilada e agitou-se.
- Retirou-se 1mL da solução stock de etanal e adicionou-se ao vinho.

6.3 Anexo III – Solução stock de ácido tartárico

De seguida apresenta-se o protocolo para a preparação da solução stock de ácido tartárico e preparação do vinho com diferentes percentagens de etanol.

Para preparar um litro de solução stock de ácido tartárico deve ter-se em consideração a acidez total do vinho. Esta (solução stock ácido tartárico) deve ter uma concentração idêntica à acidez total do vinho, que neste caso é de aproximadamente 5g/dm^3 , para tal,

- Pesou-se rigorosamente 5g de ácido tartárico;
- Num balão volumétrico de 1000mL adicionou-se o ácido tartárico, previamente pesado, e perfez-se o volume com água destilada;
- Homogeneizou-se a amostra, se necessário com a ajuda de um aparelho de ultrassons.

Cálculos necessários para a determinar o volume de vinho e de solução tartárica a adicionar:

Para obter 100mL de vinho com um teor alcoólico de 12,5% com,

Teor alcoólico inicial – 15,8%

Teor alcoólico pretendido – 12,5%

$$16,4 \times X = 12,5 \times 100 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow 12,5 \times 100 \div 16,4 = 79,11\text{mL} \rightarrow \text{este valor será o volume de vinho inicial, ou}$$

seja, com 16,4% de etanol, que que teremos de adicionar, o restante até aos 100mL será de solução tartárica, que se calcula pela diferença.

Então serão colocados num copo 79,11mL de vinho e a diferença ($100 - 79,11 = 20,88\text{mL}$) de solução tartárica, para se obter uma percentagem de 12,5% de teor alcoólico.

O teor alcoólico inicial foi o mesmo para todas as percentagens de vinho (15,8% (v/v)) e o procedimento foi o mesmo descrito acima:

Teor Alcoólico pretendido (v/v)	Volume de vinho a adicionar (mL)	Volume de Solução tartárica a adicionar (mL)
1,5%	9,5	90,5
3%	19	81
5%	31,6	68,4
7,5%	47,5	52,5
10%	63,3	36,7
11%	69,6	30,4
12%	75,9	24,1
12,5%	79,1	20,9
13%	83,3	17,7

6.4 Anexo IV – Soluções stock de glucose e SO₂

As concentrações das soluções stock de glucose e SO₂ preparadas para o ensaio do RSM foram as seguintes:

	Concentração				
	Sulfuroso mg/L	8	20	32	40
Glucose g/L	2	3,6	6	8,4	10

Protocolo para a preparação das soluções stock de glucose:

- Para uma solução stock de glucose de 50mL, com uma concentração de 2g/L;
- Como o volume nos tubos de ensaio foi de 12.5mL, seria necessário adicionar apenas a cada um 0,025g de glucose;
- $X = 2 \text{ g} \times 12,5 \text{ mL} \div 1000 \text{ mL}$
- No entanto, como se trata de uma quantidade muito baixa, recorreu-se à preparação de uma solução stock de glucose. Assim, a adição precisa e a esterilização são facilitadas;
- 1 mL da solução stock correspondente à concentração de 2g/L deverá conter 0,025g de glucose como tal os 50mL terão,
- $0,025 \times 50 = 1,25 \text{ g}$ de glucose.
- Num balão volumétrico de 50mL será então adicionado 1,25g de glucose, previamente pesado numa balança, perfazendo-se o restante volume com água destilada;
- Agita-se e homogeneiza-se se necessário com recurso aos ultrassons.

Para as restantes concentrações as quantidades usadas foram:

Concentração Glucose (g/L)	Glucose em 12,5mL	Glucose em 50 mL (g)
2	0,025	1,25
3,6	0,045	2,25
6	0,075	3,75
8,4	0,105	5,25
10	0,125	6,25

Protocolo para a preparação das soluções stock de dióxido de enxofre (SO₂):

As soluções stock de dióxido de enxofre foram preparadas da mesma forma que as soluções de glucose, de forma a obter num mililitro a concentração requerida para essa solução. Neste caso específico interessa-nos apenas considerar a forma livre do dióxido de enxofre será essa a concentração pretendida.

Para a adição do SO₂ foi efectuada uma solução stock de metabissulfito de potássio (MK). Por não se tratar de um composto puro teve de ser relacionar as quantidades de SO₂ existentes no MK com as de SO₂ pretendidas para o efeito.

Sabendo que em cada 100 mg/dm³ de MK temos 50 mg de SO₂ total (cerca ½), e que desse 50 mg, 16.67 mg são de SO₂ livre (cerca de 1/3), para o que pretendemos teremos simetricamente:

SO ₂ Livre (mg/dm ³)	SO ₂ Total (mg/dm ³)	MK (mg/dm ³)
8	24	48
20	60	120
32	96	192
40	120	240

Os valores acima descritos foram retirados de uma Tabela de conversão de MK em SO₂.

Concentração SO ₂ Livre (mg/dm ³)	Quantidade de MK a adicionar em 12,5 mL (mg)	Quantidade de MK a adicionar em 50 mL (mg)
8	0,6	30
20	1,5	75
32	2,4	120
40	3	150

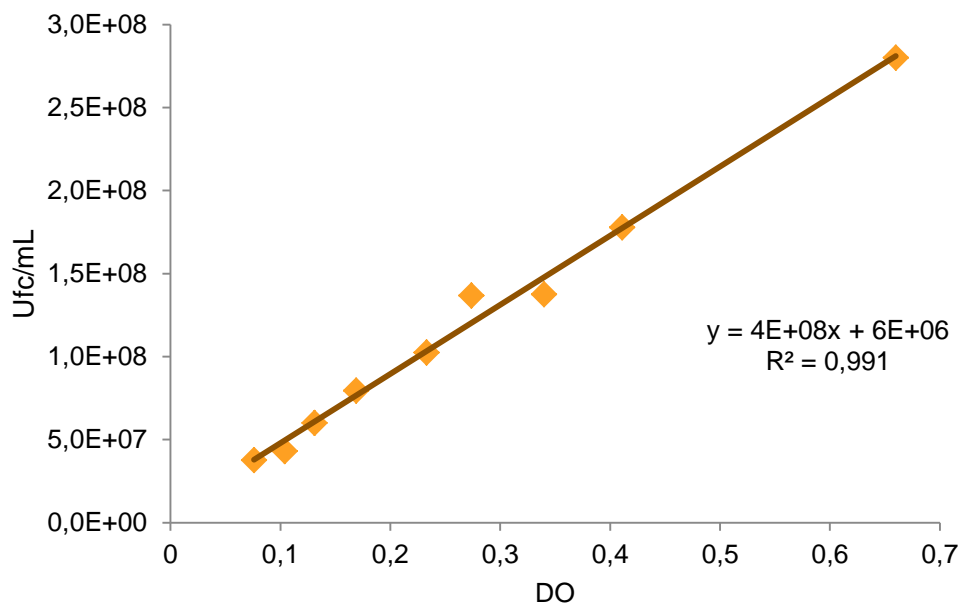
6.5 Anexo V – Taxas de crescimento e tempo de duplicação das Curvas de crescimento

Os gráficos representados neste anexo correspondem à fase exponencial das curvas de crescimento das BAL. Estão demonstrados os gráficos correspondentes às unidades formadoras de colónias associadas à densidade óptica, e os gráficos do logaritmo de base e da densidade óptica em função do tempo. Cada gráfico apresenta as respectivas equações da recta, o coeficiente de determinação e os cálculos para a determinação da fase de duplicação e taxa específica de crescimento (μ_c , h^{-1}). Equação para o cálculo da taxa específica de crescimento:

$$\ln DO_t = \mu_c \times t + \ln DO_0$$

Com t representando o tempo em (h) e DO a densidade óptica.

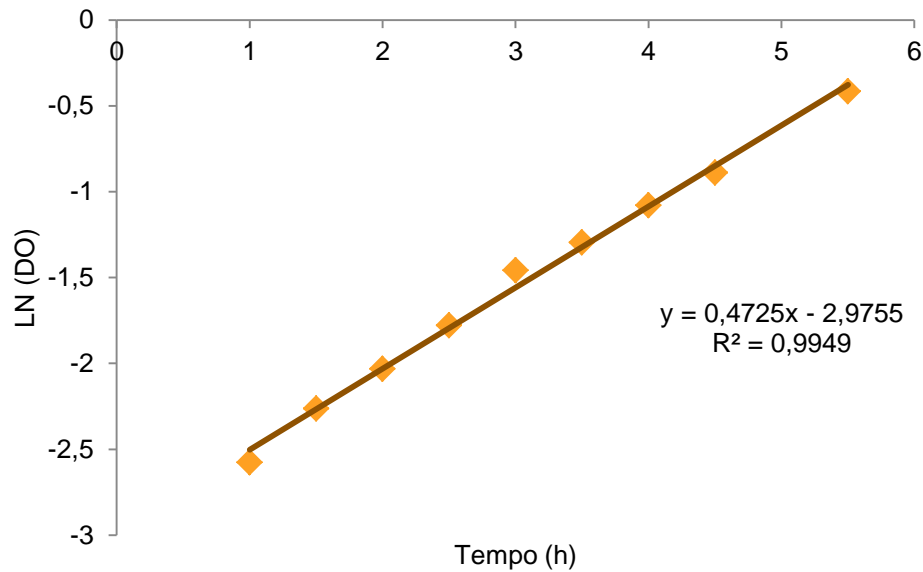
Lactobacillus plantarum



A recta de calibração entre a unidade formadora de colónias (Y) e densidade óptica (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima:

$$\frac{UFC}{mL} = 4 \times 10^8 \times DO + 6 \times 10^6$$

E apresenta um fator de correlação de 0,991 (R^2).



A recta de calibração entre o logaritmo de base e da densidade óptica (Y) em função do tempo (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima:

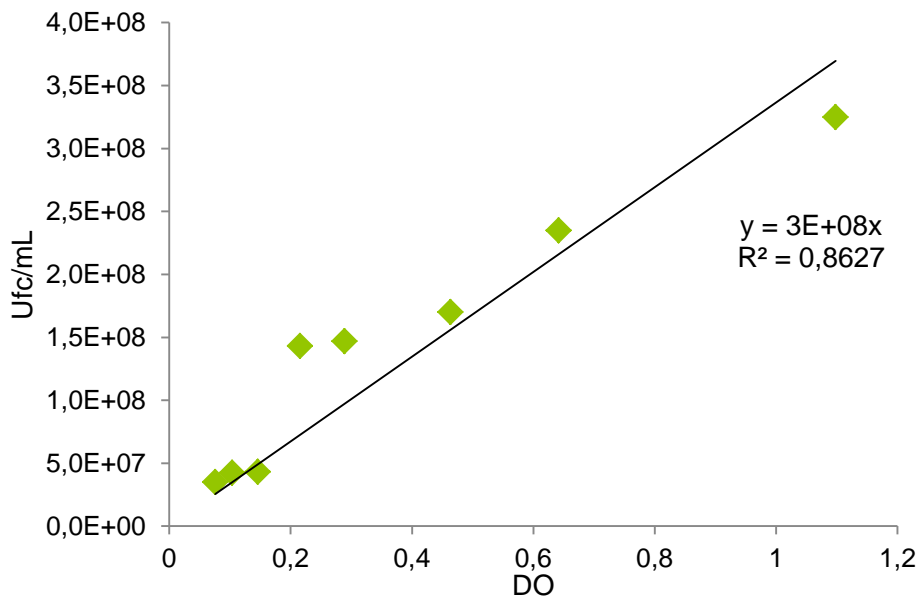
$$LN(DO) = 0,4725 \times t - 2,9755$$

E apresenta um fator de correlação de 0,9949 (R^2). Esta equação tem no seu declive a taxa específica de crescimento (μ) correspondente a $0,4725 \text{ h}^{-1}$.

Através deste valor vamos calcular a o tempo de duplicação (t_d , h), correspondente a esta bactéria, pela equação:

$$t_d = LN(2) / \mu \Leftrightarrow t_d = LN(2) / 0,4725 \Leftrightarrow t_d = 1,45h$$

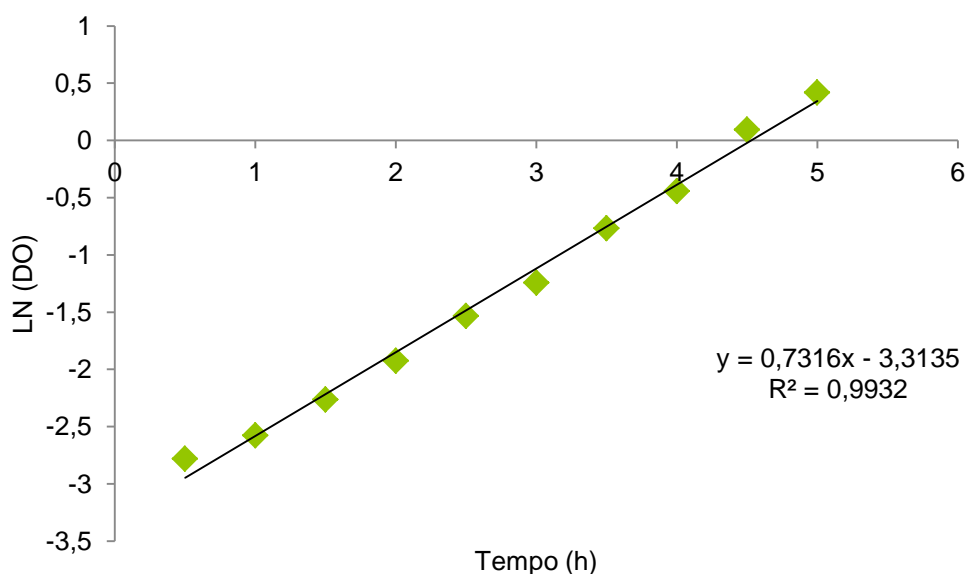
Lactobacillus mali



A recta de calibração entre a unidade formadora de colónias (Y) e densidade óptica (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima mencionado:

$$\frac{UFC}{mL} = 3 \times 10^8 \times DO$$

E apresenta um fator de correlação de 0,8627 (R²).



A recta de calibração entre o logaritmo de base e da densidade óptica (Y) em função do tempo (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima:

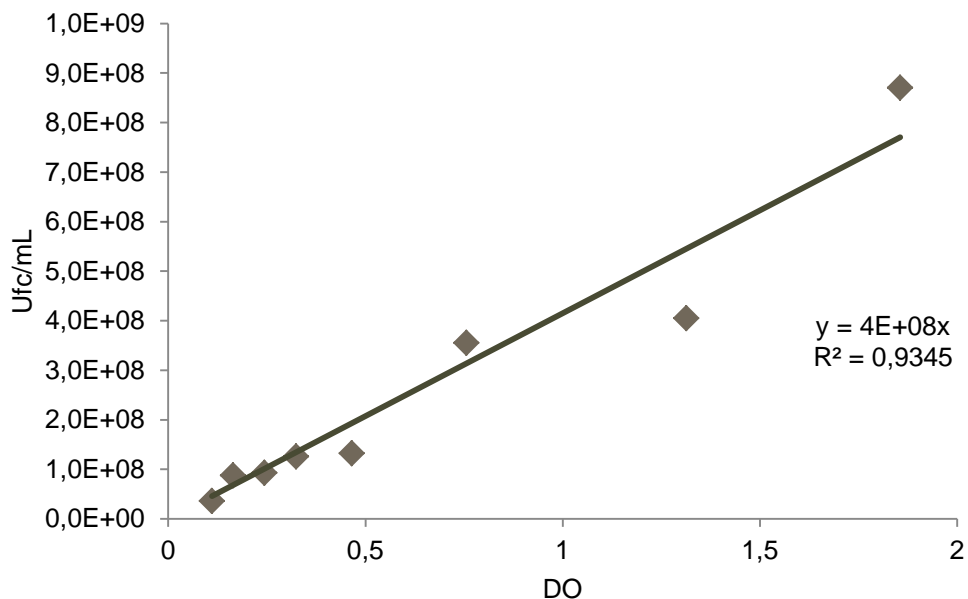
$$LN(DO) = 0,7316 \times t - 3,3135$$

E apresenta um fator de correlação de 0,9932 (R^2). Esta equação tem no seu declive a taxa específica de crescimento (μ , h^{-1}) correspondente a $0,7316 h^{-1}$.

Através deste valor vamos calcular a o tempo de duplicação (t_d , h), correspondente a esta bactéria, pela equação:

$$t_d = LN(2) / \mu \Leftrightarrow t_d = LN(2) / 0,7316 \Leftrightarrow t_d = 0,95 h$$

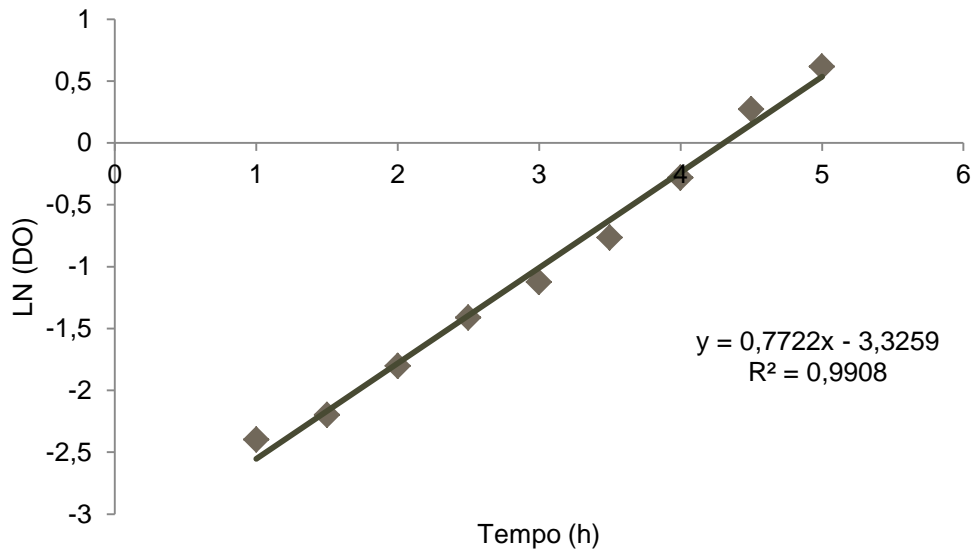
Lactobacillus hilgardii



A recta de calibração entre a unidade formadora de colónias (Y) e densidade óptica (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima mencionado:

$$\frac{UFC}{mL} = 4 \times 10^8 \times DO$$

E apresenta um fator de correlação de 0,9345 (R^2).



A recta de calibração entre o logaritmo de base e da densidade óptica (Y) em função do tempo (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima:

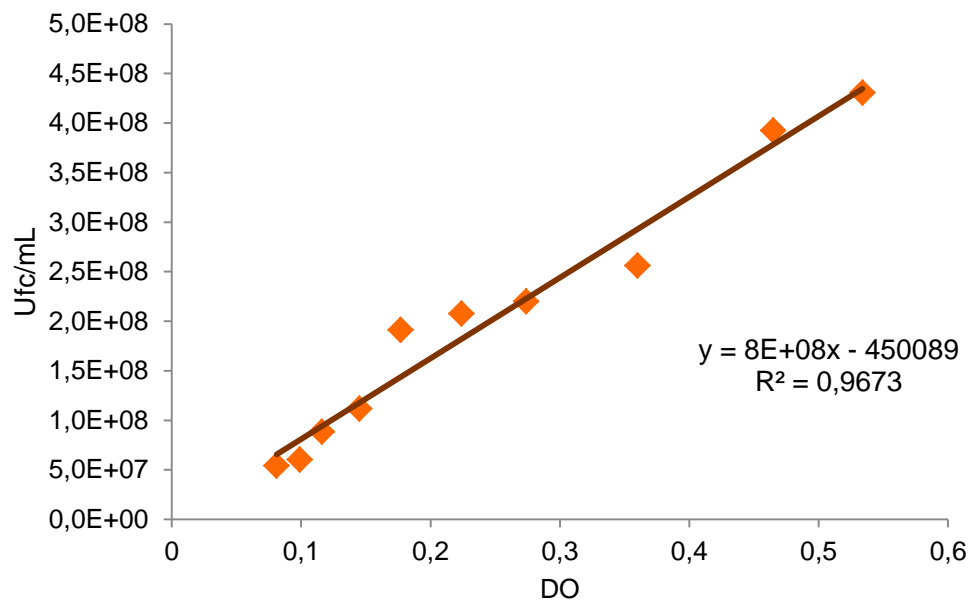
$$LN(DO) = 0,7722 \times t - 3,3259$$

E apresenta um fator de correlação de 0,9908 (R^2). Esta equação tem no seu declive a taxa específica de crescimento (μ , h^{-1}) correspondente a $0,7722 h^{-1}$.

Através deste valor vamos calcular a o tempo de duplicação (t_d , h), correspondente a esta bactéria, pela equação:

$$t_d = LN(2) / \mu \Leftrightarrow t_d = LN(2) / 0,7722 \Leftrightarrow t_d = 0,90 h$$

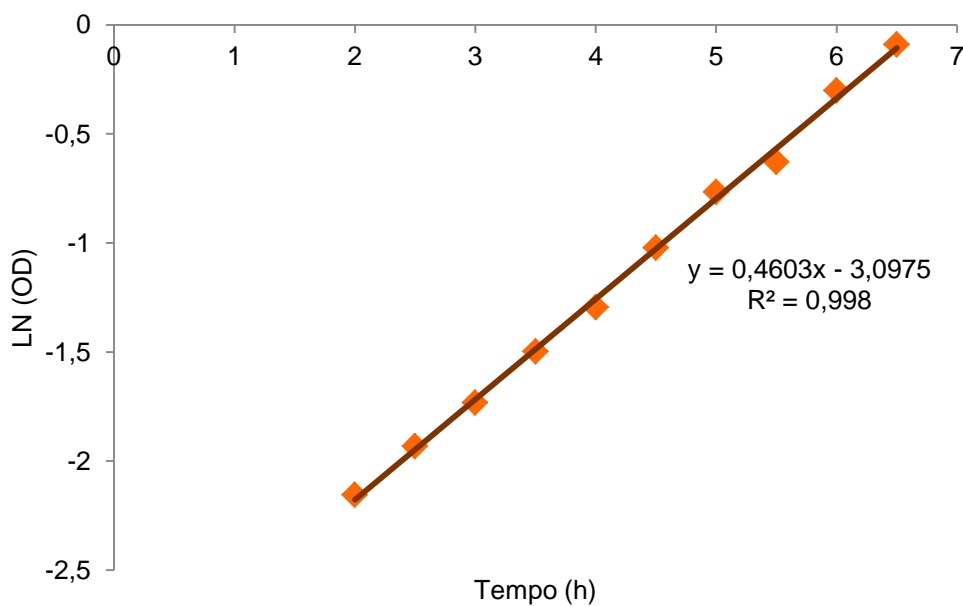
Leuconostoc mesenteroides



A recta de calibração entre a unidade formadora de colónias (Y) e densidade óptica (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima mencionado:

$$\frac{UFC}{mL} = 8 \times 10^8 \times DO - 450089$$

E apresenta um fator de correlação de 0,9673 (R^2).



A recta de calibração entre o logaritmo de base e da densidade óptica (Y) em função do tempo (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima:

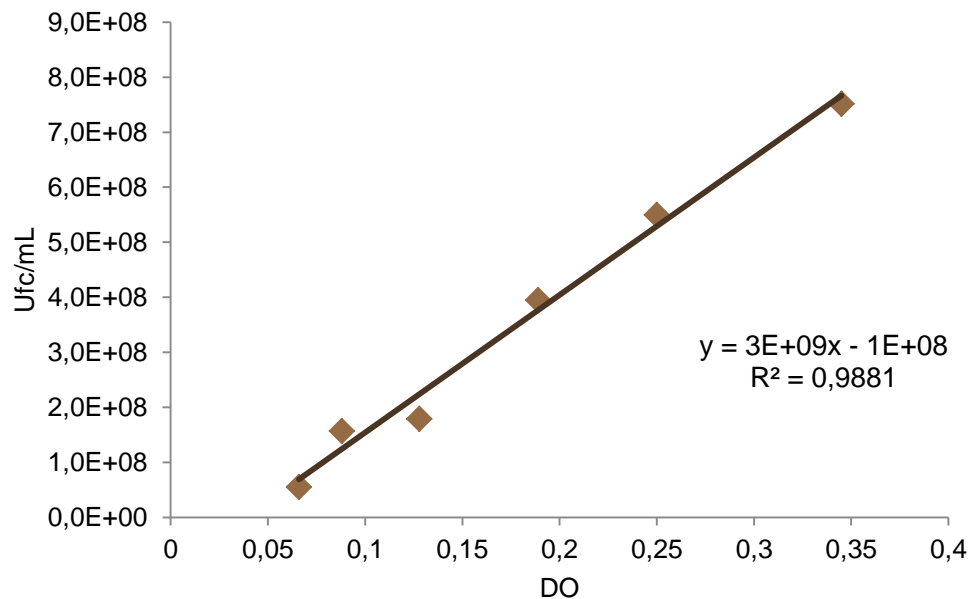
$$LN(DO) = 0,4603 \times t - 3,0975$$

E apresenta um fator de correlação de 0,998 (R^2). Esta equação tem no seu declive a taxa específica de crescimento (μ , h^{-1}) correspondente a $0,4603 h^{-1}$.

Através deste valor vamos calcular a o tempo de duplicação (t_d , h), correspondente a esta bactéria, pela equação:

$$t_d = LN(2) / \mu \Leftrightarrow t_d = LN(2) / 0,4603 \Leftrightarrow t_d = 1,50 h$$

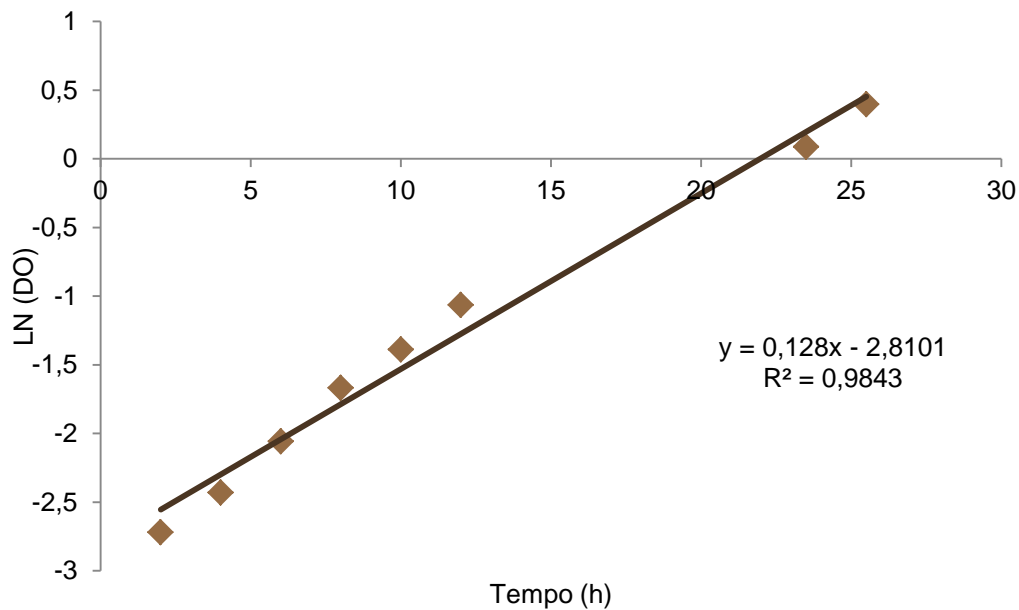
Oenococcus oeni



A recta de calibração entre a unidade formadora de colónias (Y) e densidade óptica (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima mencionado:

$$\frac{UFC}{mL} = 3 \times 10^9 \times DO - 1 \times 10^8$$

E apresenta um fator de correlação de 0,9881 (R^2).



A recta de calibração entre o logaritmo de base e da densidade óptica (Y) em função do tempo (X) na fase exponencial da curva de crescimento é dada pela equação do gráfico acima:

$$LN(DO) = 0,128 \times t - 2,8101$$

E apresenta um fator de correlação de 0,9843 (R^2). Esta equação tem no seu declive a taxa específica de crescimento (μ , h^{-1}) correspondente a $0,128 h^{-1}$.

Através deste valor vamos calcular a o tempo de duplicação (t_d , h), correspondente a esta bactéria, pela equação:

$$t_d = LN(2) / \mu \Leftrightarrow t_d = LN(2) / 0,128 \Leftrightarrow t_d = 5,40 h$$

Estirpe	Taxa de crescimento específica, μ (h^{-1})	Tempo de duplicação, t_d (h)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,4603	1,50
<i>Lactobacillus mali</i>	0,7316	0,95
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	0,7722	0,90
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,4603	1,50
<i>Oenococcus oeni</i>	0,128	5,40

6.6 Anexo VI – Densidades ópticas e valores médios de UFC das diferentes estirpes para obtenção das Curvas de Crescimento

ISA 3960 - *Lactobacillus plantarum*

	Tempo (h)	OD lida	Diluição p/OD 1:	OD real	Média UFC	LN (UFC)	LN (OD)
T0	0	0,053	1	0,053	3,50E+07	17,37086	-2,93746
T1	1	0,076	1	0,076	3,78E+07	17,4465	-2,57702
T2	1,5	0,104	1	0,104	4,30E+07	17,57671	-2,26336
T3	2	0,131	1	0,131	6,00E+07	17,90986	-2,03256
T4	2,5	0,169	1	0,169	7,95E+07	18,19127	-1,77786
T5	3	0,233	1	0,233	1,03E+08	18,44537	-1,45672
T6	3,5	0,274	1	0,274	1,37E+08	18,73366	-1,29463
T7	4	0,34	1	0,34	1,38E+08	18,73913	-1,07881
T8	4,5	0,411	1	0,411	1,78E+08	18,99589	-0,88916
T9	5	0,244	2	0,488	1,78E+08	18,99589	-0,71744
T10	5,5	0,33	2	0,66	2,80E+08	19,4503	-0,41552
T11	6	0,369	2	0,738	2,82E+08	19,45742	-0,30381
T12	6,5	0,365	2	0,73	3,50E+08	19,67344	-0,31471
T13	7	0,508	2	1,016	6,10E+08	20,22897	0,015873
T14	7,5	0,393	3	1,179	6,23E+08	20,24925	0,164667
T15	8	0,428	3	1,284	1,73E+09	21,27139	0,24998
T16	8,5	0,358	4	1,432	3,18E+09	21,88015	0,359072
T17	9	0,371	4	1,484	3,54E+09	21,98739	0,394741
T18	9,5	0,412	4	1,648	4,40E+09	22,20487	0,499562
T19	10	0,467	4	1,868	4,84E+09	22,30018	0,624868

ISA 3961 - *Lactobacillus mali*

	Tempo (h)	OD lida	Diluição p/OD 1:	OD real	Média UFC	LN (UFC)	LN (OD)
T0	0	0,059	1	0,059	1,80E+07	16,70588	-2,83022
T1	0,5	0,062	1	0,062	2,28E+07	16,94008	-2,78062
T2	1	0,076	1	0,076	3,50E+07	17,37086	-2,57702
T3	1,5	0,104	1	0,104	4,25E+07	17,56501	-2,26336
T4	2	0,146	1	0,146	4,33E+07	17,58251	-1,92415
T5	2,5	0,216	1	0,216	1,43E+08	18,7801	-1,53248
T6	3	0,289	1	0,289	1,47E+08	18,80594	-1,24133
T7	3,5	0,464	1	0,464	1,70E+08	18,95131	-0,76787
T8	4	0,321	2	0,642	2,35E+08	19,2751	-0,44317
T9	4,5	0,366	3	1,098	3,25E+08	19,59934	0,09349
T10	5	0,507	3	1,521	1,37E+09	21,03442	0,419368
T11	5,5	0,366	5	1,83	2,10E+09	21,4652	0,604316
T12	6	0,412	6	2,472	2,15E+09	21,48641	0,905028
T13	6,5	0,466	7	3,262	2,42E+09	21,60807	1,182341
T14	7	0,476	8	5,904	2,52E+09	21,64752	1,77563
T15	7,7	0,415	12	6,422	2,91E+09	21,79142	1,85973
T16	8,2	0,428	14	6,888	1,21E+10	23,2144	1,929781
T17	9,2	0,381	19	7,228	2,16E+10	23,79411	2,04485

ISA 3962 - *Lactobacillus hilgardii*

	Tempo (h)	OD lida	Diluição p/OD 1:	OD real	Média UFC	LN (UFC)	LN (OD)
T0	0	0,055	1	0,055	1,48E+07	16,50675	-2,90042
T1	0,5	0,073	1	0,073	2,03E+07	16,82367	-2,6173
T2	1	0,091	1	0,091	2,15E+07	16,88356	-2,3969
T3	1,5	0,111	1	0,111	3,58E+07	17,39206	-2,19823
T4	2	0,165	1	0,165	8,75E+07	18,28715	-1,80181
T5	2,5	0,244	1	0,244	9,28E+07	18,34542	-1,41059
T6	3	0,325	1	0,325	1,26E+08	18,64981	-1,12393
T7	3,5	0,466	1	0,466	1,33E+08	18,70209	-0,76357
T8	4	0,378	2	0,756	3,55E+08	19,68763	-0,27971
T9	4,5	0,438	3	1,314	4,05E+08	19,8194	0,273076
T10	5	0,464	4	1,856	8,70E+08	20,584	0,618424
T11	5,5	0,418	5	2,09	1,44E+09	21,08617	0,737164
T12	6	0,451	6	2,706	1,62E+09	21,20569	0,995472
T13	6,5	0,48	7	3,36	1,90E+09	21,36512	1,211941
T14	7	0,507	8	4,056	2,40E+09	21,59873	1,400197
T15	7,5	0,421	12	5,052	3,70E+09	22,0316	1,619784
T16	8	0,395	14	5,53	4,32E+09	22,1871	1,710188
T17	9	0,372	19	7,068	4,34E+09	22,19114	1,955578

ISA 3963 – *Leuconostoc mesenteroides*

	Tempo (h)	OD lida	Diluição p/OD 1:	OD real	Média UFC	LN (UFC)	LN (OD)
T0	0	0,06	1	0,06	3,03E+07	17,22501	-2,81341
T1	1	0,081	1	0,081	5,43E+07	17,80911	-2,51331
T2	1,5	0,099	1	0,099	6,03E+07	17,91401	-2,31264
T3	2	0,116	1	0,116	8,83E+07	18,29568	-2,15417
T4	2,5	0,145	1	0,145	1,12E+08	18,52954	-1,93102
T5	3	0,177	1	0,177	1,91E+08	19,06778	-1,73161
T6	3,5	0,224	1	0,224	2,08E+08	19,15064	-1,49611
T7	4	0,274	1	0,274	2,20E+08	19,20914	-1,29463
T8	4,5	0,36	1	0,36	2,56E+08	19,36069	-1,02165
T9	5	0,465	1	0,465	3,93E+08	19,78805	-0,76572
T10	5,5	0,267	2	0,534	4,31E+08	19,88046	-0,62736
T11	6	0,37	2	0,74	4,43E+08	19,90795	-0,30111
T12	6,5	0,457	2	0,914	5,25E+08	20,07891	-0,08992
T13	7	0,311	3	0,933	7,05E+08	20,37371	-0,06935
T14	7,5	0,322	3	0,966	7,30E+08	20,40856	-0,03459
T15	8	0,337	3	1,011	7,73E+08	20,46514	0,01094
T16	8,5	0,325	3	0,975	8,20E+08	20,52481	-0,02532

ISA 4279 – *Oenococcus oeni*

	Tempo (h)	OD lida	Diluição p/OD 1:	OD real	Média	LN (UFC)	LN (OD)
T0	0	0,049	1	0,049	1,2E+07	16,30042	-3,01593
T1	2	0,066	1	0,066	5,6E+07	17,83189	-2,71810
T2	4	0,088	1	0,088	1,6E+08	18,87335	-2,43042
T3	6	0,128	1	0,128	1,8E+08	19,00708	-2,05573
T4	8	0,189	1	0,189	4,0E+08	19,7944	-1,66601
T5	10	0,25	1	0,25	5,5E+08	20,12543	-1,38629
T6	12	0,345	1	0,345	7,5E+08	20,43825	-1,06421
T7	23,5	0,273	4	1,092	1,1E+09	20,78153	0,08801
T8	25,5	0,372	4	1,488	1,5E+09	21,11192	0,39743
T9	27,5	0,396	4	1,584	5,0E+09	22,3347	0,45995
T10	29,5	0,399	4	1,596	5,1E+09	22,35837	0,46750
T11	31,5	0,376	4	1,504	5,3E+09	22,39474	0,40812

6.7 Anexo VII – Resultados da experiência RSM - valores médios de UFC para cada estirpe utilizados para a análise estatística**ISA 3960 - *Lactobacillus plantarum***

Ensaio	Etanol	Glucose	SO ₂	LOG UFC/mL					
				Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 10
1	11	4	8	4,32	4,34	5,39	5,79	7,02	7,48
2	14	4	8	4,31	3,69	3,15	2,48	1,70	1,00
3	11	8	8	4,33	4,22	4,99	4,95	6,01	7,00
4	14	8	8	4,31	3,64	3,71	3,98	3,30	3,78
5	11	4	32	4,33	4,00	4,19	5,02	6,32	6,70
6	14	4	32	4,31	3,68	3,13	2,81	1,70	1,00
7	11	8	32	4,36	3,94	3,97	4,74	5,95	7,40
8	14	8	32	4,31	3,83	3,22	3,15	2,48	1,00
9	10	6	20	4,39	4,74	6,46	6,84	8,22	1,00
10	15	6	20	4,29	3,68	3,65	3,15	2,40	1,00
11	13	2	20	4,33	3,66	3,00	3,33	2,48	7,40
12	13	10	20	4,38	3,73	2,70	2,95	1,70	7,40
13	13	6	0	4,43	3,65	2,74	2,88	1,00	7,74
14	13	6	40	4,45	3,83	3,16	3,13	1,00	7,60
15 C	13	6	20	4,38	3,64	2,93	2,98	2,70	7,65
16 C	13	6	20	4,40	3,60	2,81	3,13	1,00	7,48
17 C	13	6	20	4,16	3,72	2,74	3,15	1,00	7,40

ISA 3961 - *Lactobacillus mali*

Ensaio	Etanol	Glucose	SO ₂	LOG UFC/mL					
				Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 10
1	11	4	8	4,00	3,88	4,16	4,76	6,30	7,00
2	14	4	8	4,16	3,48	2,98	3,32	1,70	1,00
3	11	8	8	4,33	3,54	3,64	4,10	5,69	6,70
4	14	8	8	4,20	3,51	2,65	3,02	1,70	1,00
5	11	4	32	4,23	3,60	3,56	4,34	6,12	7,00
6	14	4	32	4,10	3,41	2,70	3,11	1,70	1,00
7	11	8	32	4,19	3,61	3,85	4,71	6,20	6,70
8	14	8	32	4,30	3,35	3,04	3,81	2,00	1,00
9	10	6	20	4,11	5,14	6,00	6,47	8,46	1,00
10	15	6	20	4,05	3,44	4,08	2,88	2,00	1,00
11	13	2	20	4,21	3,53	3,06	2,93	1,00	7,18
12	13	10	20	4,08	3,53	2,70	2,81	1,00	7,40
13	13	6	0	4,33	3,35	2,60	2,78	1,00	7,54
14	13	6	40	4,26	3,53	3,02	2,85	2,00	6,70
15 C	13	6	20	4,30	3,50	3,00	2,78	1,00	7,00
16 C	13	6	20	4,14	3,39	2,88	2,74	1,00	7,60
17 C	13	6	20	4,28	3,65	2,60	2,85	1,00	7,48

ISA 3962 - *Lactobacillus hilgardii*

Ensaio	Etanol	Glucose	SO ₂	LOG UFC/mL					
				Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 10
1	11	4	8	4,82	5,69	6,86	8,13	8,63	1,00
2	14	4	8	4,75	4,83	4,48	4,00	3,98	1,00
3	11	8	8	4,81	5,68	6,56	8,01	8,18	7,48
4	14	8	8	4,81	4,62	4,37	3,73	3,68	2,42
5	11	4	32	4,63	5,63	6,57	7,98	8,18	7,00
6	14	4	32	4,77	4,45	4,18	3,50	3,08	1,00
7	11	8	32	4,84	5,69	6,39	7,94	8,47	7,48
8	14	8	32	4,70	4,48	4,16	3,68	3,19	1,00
9	10	6	20	4,82	6,25	7,84	8,85	8,41	1,00
10	15	6	20	4,81	4,81	3,68	3,51	3,08	0,70
11	13	2	20	4,95	5,30	5,17	5,74	6,13	8,02
12	13	10	20	4,83	5,14	5,02	5,18	5,68	8,30
13	13	6	0	4,82	5,00	4,94	5,14	5,78	8,54
14	13	6	40	4,73	5,12	4,97	5,65	6,41	8,19
15 C	13	6	20	4,94	4,95	5,11	5,69	6,28	8,23
16 C	13	6	20	4,81	5,13	5,24	5,99	6,36	8,35
17 C	13	6	20	4,85	5,03	5,13	5,81	6,28	8,27

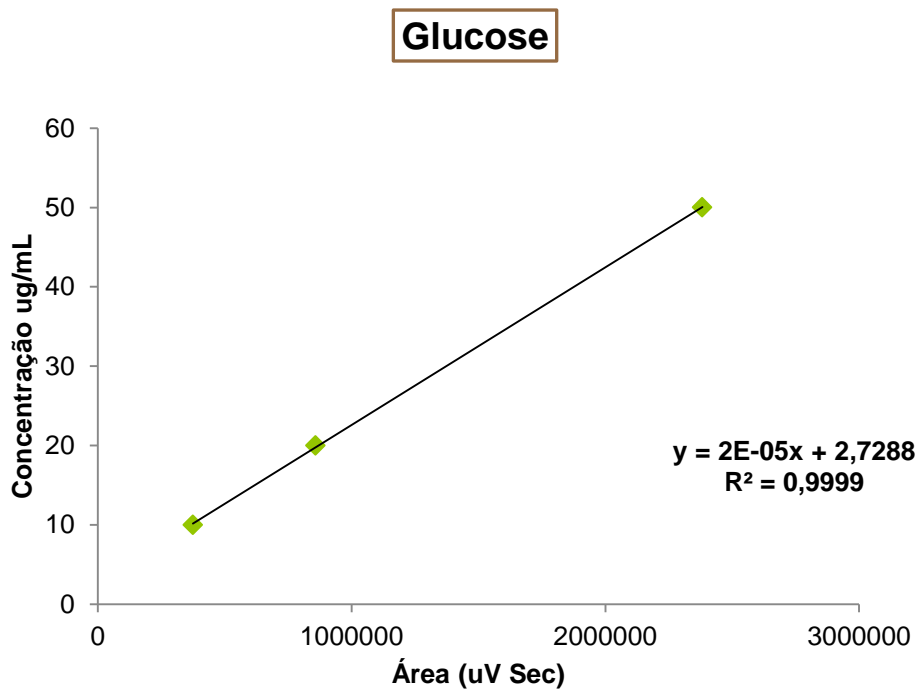
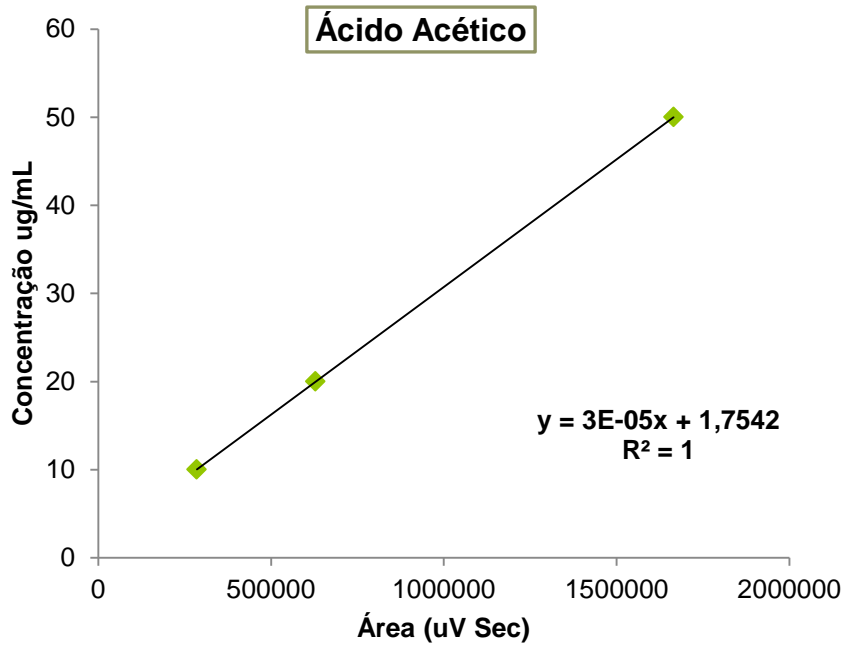
ISA 3963 – *Leuconostoc mesenteroides*

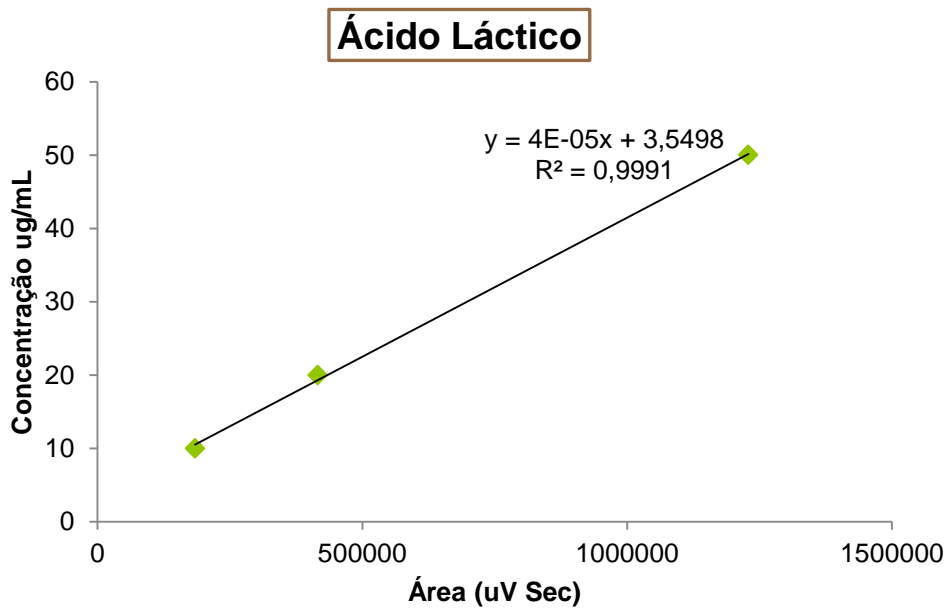
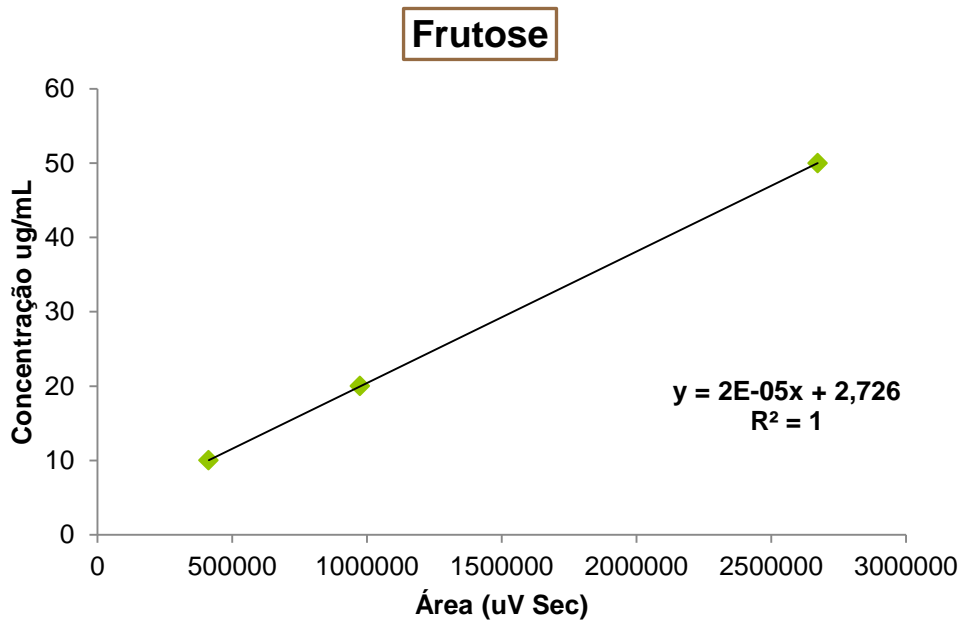
Ensaio	Etanol	Glucose	SO ₂	LOG UFC/mL					
				Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 10
1	11	4	8	4,26	4,82	6,08	6,96	6,86	1,00
2	14	4	8	3,98	3,86	3,63	3,13	1,70	1,00
3	11	8	8	3,88	4,38	5,55	6,15	8,06	1,00
4	14	8	8	3,95	2,93	3,79	3,16	2,30	1,00
5	11	4	32	3,88	4,42	5,71	5,50	6,64	1,00
6	14	4	32	3,88	3,00	2,60	2,00	1,00	1,00
7	11	8	32	3,89	4,31	5,16	5,91	7,16	1,00
8	14	8	32	3,55	3,18	2,65	2,00	1,70	1,00
9	10	6	20	3,69	4,93	6,63	7,24	7,18	1,00
10	15	6	20	3,74	2,90	2,30	2,40	1,00	1,00
11	13	2	20	3,73	4,17	4,60	3,92	4,09	7,37
12	13	10	20	3,79	4,10	4,26	3,93	4,00	7,54
13	13	6	0	4,02	3,81	3,48	3,10	2,54	1,00
14	13	6	40	3,78	3,92	4,28	3,92	3,65	7,60
15 C	13	6	20	3,73	4,04	4,06	3,95	3,99	7,00
16 C	13	6	20	3,72	4,06	4,36	4,18	4,01	7,30
17 C	13	6	20	3,61	3,98	4,37	4,38	4,02	6,70

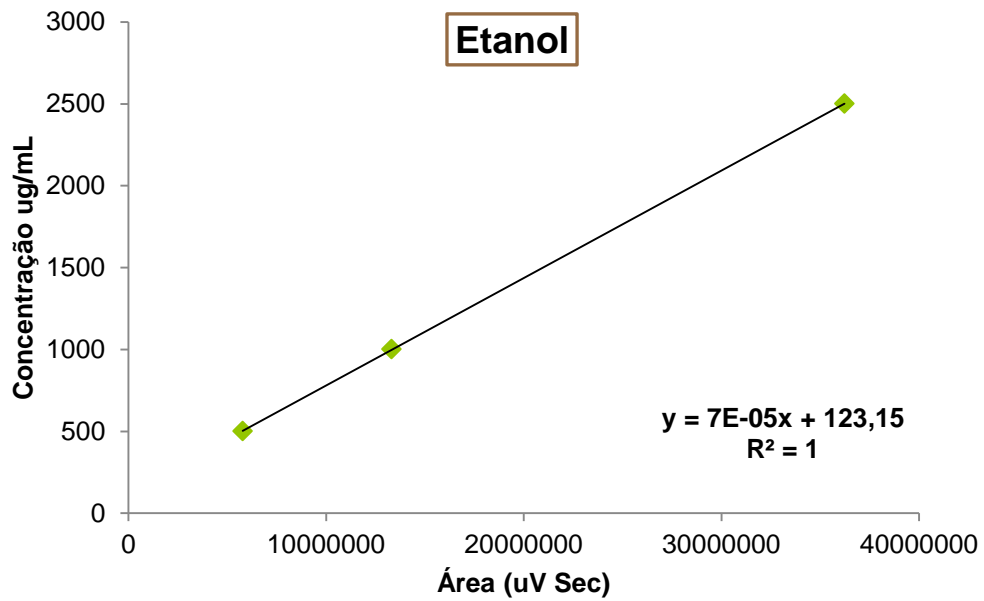
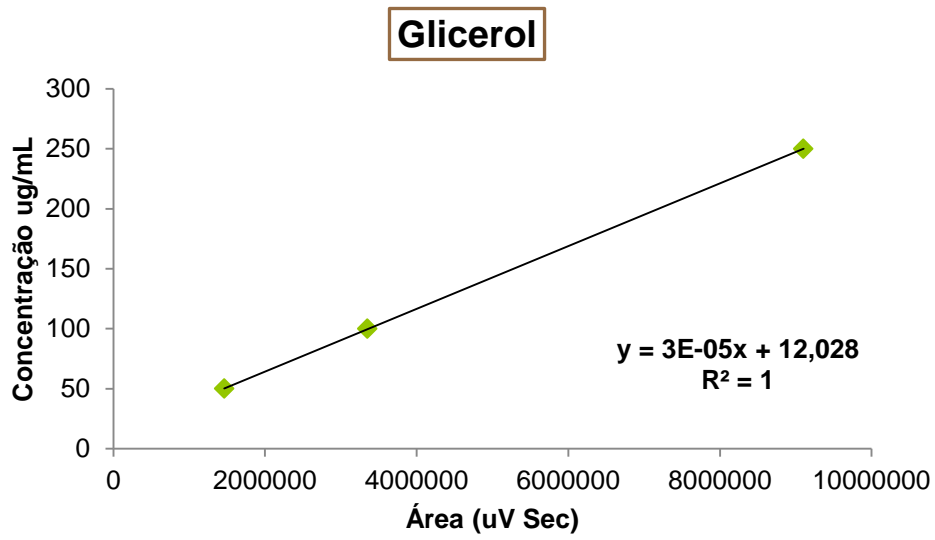
ISA 4279 – *Oenococcus oeni*

Ensaio	Etanol	Glucose	SO ₂	LOG UFC/mL					
				Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 10
1	11	4	8	3,92	2,54	3,23	4,74	6,50	8,16
2	14	4	8	3,94	3,06	2,30	2,00	2,30	1,00
3	11	8	8	3,94	3,00	2,30	3,73	5,69	8,38
4	14	8	8	3,87	3,10	2,00	1,00	2,18	1,00
5	11	4	32	3,92	3,18	2,48	4,41	5,85	8,63
6	14	4	32	3,89	3,13	2,00	1,00	1,00	1,00
7	11	8	32	3,82	2,78	2,30	3,40	5,50	8,49
8	14	8	32	3,87	3,24	2,48	1,70	2,18	1,00
9	10	6	20	3,93	3,41	4,86	6,42	8,53	7,18
10	15	6	20	3,85	3,13	1,00	1,70	1,70	1,00
11	13	2	20	3,88	2,98	2,00	1,00	2,54	8,49
12	13	10	20	4,00	2,70	2,18	1,70	2,18	7,41
13	13	6	0	3,86	2,88	1,70	1,00	1,00	1,00
14	13	6	40	3,92	2,95	2,30	1,00	2,00	1,00
15 C	13	6	20	3,90	2,93	2,00	1,00	2,18	1,00
16 C	13	6	20	3,76	2,95	2,18	1,00	2,18	2,22
17 C	13	6	20	3,98	3,02	2,00	1,00	2,18	1,00

6.8 Anexo VIII – Curvas de calibração do HPLC para determinação das concentrações dos compostos: ácido acético, glucose, frutose, ácido láctico, glicerol, e etanol.

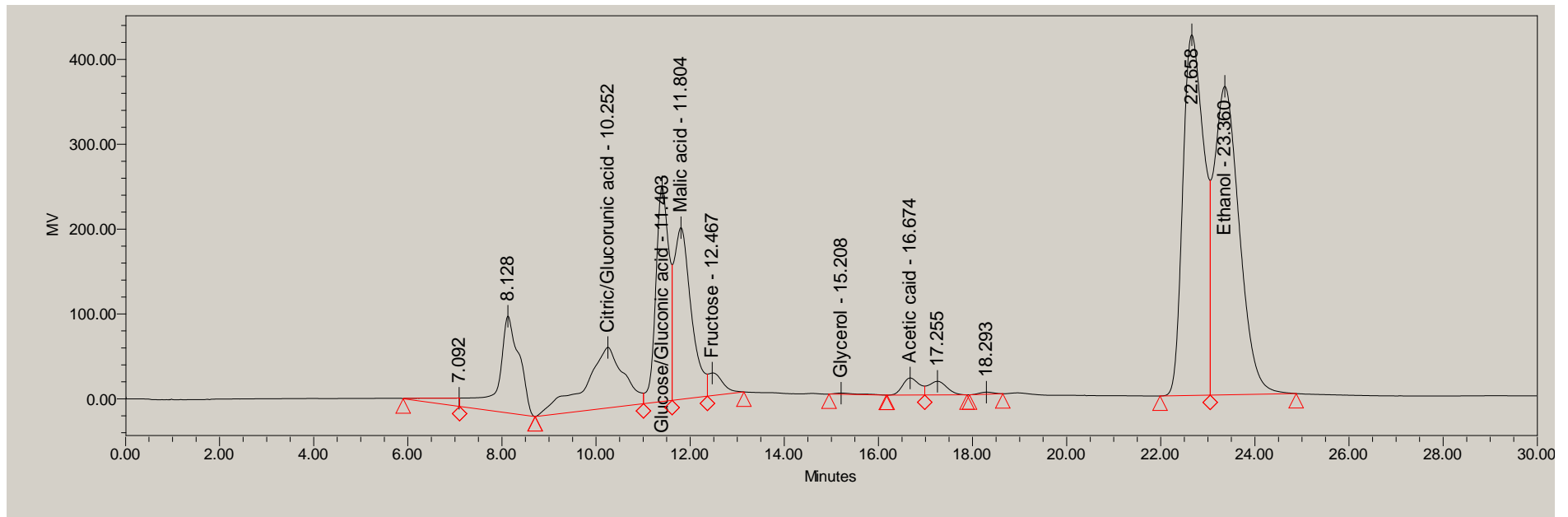




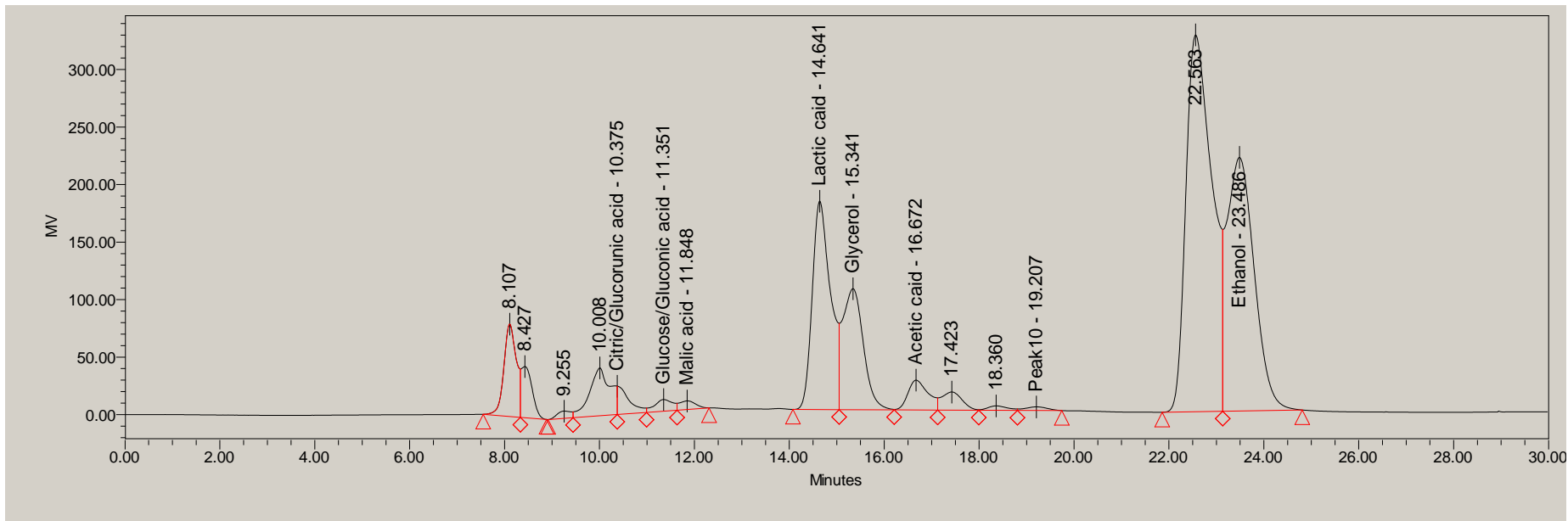


6.9 Anexo IX – Exemplo de cromatograma de HPLC, para a estirpe *Oenococcus oeni*.

Cromatograma correspondente ao ensaio 1, no dia da inoculação, para a estirpe *Oenococcus oeni*.



Por oposição, em baixo esta o cromatograma correspondente ao ensaio 1, após 10 dias de incubação, para a estirpe *Oenococcus oeni*.



6.10 Anexo X – Evolução das concentrações dos compostos: glucose, ácido láctico e etanol por análise de HPLC.

Ensaio	Estirpe	Tempo (Dia)	Glucose	Ácido Láctico	Etanol
	Todas	1	19,6	0	10,8
1*	<i>L. plantarum</i>	10	0,8	29,6	9,8
	<i>L. mali</i>	10	2,2	26,6	10,2
	<i>L. hilgardii</i>	10	0,6	31,6	9,6
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	4	24,2	8,8
	<i>O. oeni</i>	10	1,4	30,6	10,2
	*Fatores da Matriz	Etanol – 11%	Glucose – 3,6g/L	SO ₂ – 8mg/L	
	Todas	1	20,4	0	15
2*	<i>L. plantarum</i>	10	24	3,6	12
	<i>L. mali</i>	10	23,6	0	12,8
	<i>L. hilgardii</i>	10	24	0	11,2
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	25,8	0	11,4
	<i>O. oeni</i>	10	25,8	0	13,8
	*Fatores da Matriz	Etanol – 14%	Glucose – 3,6g/L	SO ₂ – 8mg/L	
	Todas	1	25	0	11,6
3*	<i>L. plantarum</i>	10	6,8	31,4	9,2
	<i>L. mali</i>	10	5,8	27	9,2
	<i>L. hilgardii</i>	10	1	39	9,4
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	18,8	20	10,8
	<i>O. oeni</i>	10	5,8	31,6	9,8
	*Fatores da Matriz	Etanol – 11%	Glucose – 8,4g/L	SO ₂ – 8mg/L	
	Todas	1	27,4	0	15,8
4*	<i>L. plantarum</i>	10	33,4	0	12,4
	<i>L. mali</i>	10	31,4	0	12,2
	<i>L. hilgardii</i>	10	32,4	0	12,2
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	33	0	13,4
	<i>O. oeni</i>	10	33	0	13,8
	*Fatores da Matriz	Etanol – 14%	Glucose – 8,4g/L	SO ₂ – 8mg/L	

Ensaio	Estirpe	Tempo (Dia)	Glucose	Ácido Láctico	Etanol
	Todas	1	21,2	0	12,6
5*	<i>L. plantarum</i>	10	0,4	29	9,6
	<i>L. mali</i>	10	1,8	24,4	9,4
	<i>L. hilgardii</i>	10	0,4	30,4	10,4
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	7,4	21,4	9,2
	<i>O. oeni</i>	10	1,4	31	11
	*Fatores da Matriz	Etanol – 11%	Glucose – 3,6g/L	SO ₂ – 32mg/L	
	Todas	1	19,8	0	15,4
6*	<i>L. plantarum</i>	10	24,6	0	12,6
	<i>L. mali</i>	10	24,8	0	13,2
	<i>L. hilgardii</i>	10	25	0	13
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	25,4	0	12
	<i>O. oeni</i>	10	25,6	0	13,6
	*Fatores da Matriz	Etanol – 14%	Glucose – 3,6g/L	SO ₂ – 32mg/L	
	Todas	1	26,2	0	12,4
7*	<i>L. plantarum</i>	10	7	29,2	8,6
	<i>L. mali</i>	10	8,6	30,4	10,4
	<i>L. hilgardii</i>	10	1,6	39,8	11
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	11,8	27,8	10
	<i>O. oeni</i>	10	6,2	32,2	10,2
	*Fatores da Matriz	Etanol – 11%	Glucose – 8,4g/L	SO ₂ – 32mg/L	
	Todas	1	25,6	0	15,6
8*	<i>L. plantarum</i>	10	34	0	11,8
	<i>L. mali</i>	10	31,4	0	12,8
	<i>L. hilgardii</i>	10	32,2	0	14,6
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	33,6	0	12,8
	<i>O. oeni</i>	10	33,8	0	13,6
	*Fatores da Matriz	Etanol – 14%	Glucose – 8,4g/L	SO ₂ – 32mg/L	

Ensaio	Estirpe	Tempo (Dias)	Glucose	Ácido Láctico	Etanol
9	Todas	1	23,4	0	11,2
	<i>L. plantarum</i>	10	1	35,4	9,2
	<i>L. mali</i>	10	2,4	26,2	8,4
	<i>L. hilgardii</i>	10	0,6	37,4	11,4
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	6,4	30,4	9,2
	<i>O. oeni</i>	10	0,6	31,4	8,8
*Fatores da Matriz		Etanol – 10%	Glucose – 6,0g/L	SO ₂ – 20mg/L	
10	Todas	1	23,4	0	17,6
	<i>L. plantarum</i>	10	29,4	0	13
	<i>L. mali</i>	10	28,8	0	14,6
	<i>L. hilgardii</i>	10	29,8	0	17
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	28,6	0	6,4
	<i>O. oeni</i>	10	29,6	0	15,2
*Fatores da Matriz		Etanol – 15%	Glucose – 6,0g/L	SO ₂ – 20mg/L	
11	Todas	1	17,8	0	14,2
	<i>L. plantarum</i>	10	4,2	22,2	10,6
	<i>L. mali</i>	10	7,2	14,8	10,2
	<i>L. hilgardii</i>	10	1,4	26,4	12,8
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	19	9,2	11,4
	<i>O. oeni</i>	10	16,6	10,4	12,6
*Fatores da Matriz		Etanol – 12,5%	Glucose – 2,0g/L	SO ₂ – 20mg/L	
12	Todas	1	25,2	0	13,4
	<i>L. plantarum</i>	10	25,6	17,2	10,6
	<i>L. mali</i>	10	22,4	12,6	11,6
	<i>L. hilgardii</i>	10	13,4	28,4	14
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	32,6	7	10,2
	<i>O. oeni</i>	10	32,4	0	10,6
*Fatores da Matriz		Etanol – 12,5%	Glucose – 10g/L	SO ₂ – 20mg/L	

Ensaio	Estirpe	Tempo (Dias)	Glucose	Ácido Láctico	Etanol
	Todas	1	25,2	0	15,8
13	<i>L. plantarum</i>	10	13	22,8	11,6
	<i>L. mali</i>	10	12,6	19	10,6
	<i>L. hilgardii</i>	10	4,2	31	12,2
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	32	0	11,2
	<i>O. oeni</i>	10	32,4	0	12,4
*Fatores da Matriz		Etanol – 12,5%	Glucose – 6,0g/L	SO ₂ – 0mg/L	

	Todas	1	20,2	0	14,4
14	<i>L. plantarum</i>	10	22	10,6	11,6
	<i>L. mali</i>	10	14,4	19,6	11,8
	<i>L. hilgardii</i>	10	3,6	33,6	13,2
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	15,8	15,6	10,2
	<i>O. oeni</i>	10	28,8	0	12,4
*Fatores da Matriz		Etanol – 12,5%	Glucose – 6,0g/L	SO ₂ – 40mg/L	

Ensaio	Estirpe	Tempo (Dias)	Glucose	Ácido Láctico	Etanol
	Todas	1	20,4	0	14
15	<i>L. plantarum</i>	10	7	26,8	10,8
	<i>L. mali</i>	10	11,8	22,2	11,8
	<i>L. hilgardii</i>	10	3,6	33,4	13,6
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	24,6	8,4	10,2
	<i>O. oeni</i>	10	27	0	11,4
*Fatores da Matriz		Etanol – 12,5%	Glucose – 6,0g/L	SO ₂ – 20mg/L	

	Todas	1	22	0	14,6
16	<i>L. plantarum</i>	10	15,4	15,8	11,2
	<i>L. mali</i>	10	13,4	17	11
	<i>L. hilgardii</i>	10	2	35,2	13,2
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	23,4	9,4	9,4
	<i>O. oeni</i>	10	30,2	0	12,8
*Fatores da Matriz		Etanol – 12,5%	Glucose – 6,0g/L	SO ₂ – 20mg/L	

	Todas	1	23,4	0	16,2
17	<i>L. plantarum</i>	10	20	11,8	11,2
	<i>L. mali</i>	10	9	24	12,2
	<i>L. hilgardii</i>	10	3	32	12,2
	<i>Leu. mesenteroides</i>	10	23,2	9,2	8,8
	<i>O. oeni</i>	10	29,8	0	12,6
*Fatores da Matriz		Etanol – 12,5%	Glucose – 6,0g/L	SO ₂ – 20mg/L	