



**ANA CLÁUDIA TERRA**

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS E FUNGOS  
FILAMENTOSOS EM UVAS SYRAH UTILIZADAS  
PARA PRODUÇÃO DE VINHOS DE INVERNO**

**LAVRAS – MG  
2022**

**ANA CLÁUDIA TERRA**

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS EM UVAS SYRAH  
UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE VINHOS DE INVERNO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

**LAVRAS – MG  
2022**

**ANA CLÁUDIA TERRA**

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS EM UVAS SYRAH  
UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE VINHOS DE INVERNO**

**DIVERSITY OF YEAST AND FILAMENTOUS FUNGI IN SYRAH GRAPES USED  
IN WINTER WINE PRODUCTION**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 20/09/2022.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani	UFLA
Ms. Nádja Miranda Vilela Goulart	UFLA

Prof. Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2022**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a minha família pelo apoio em todos os momentos da minha trajetória desenvolvendo esse trabalho, em especial minha mãe Rose e meu pai Cláudio. Vocês tornaram real o meu sonho.

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, pela orientação e pela oportunidade de iniciar um trabalho de iniciação científica no laboratório que contribuíram para o meu crescimento e por poder finalizar o meu Trabalho de Conclusão de curso.

À minha coorientadora Dr(a) Fabiana, pela amizade e colaboração em todas as etapas deste trabalho.

À doutora e amiga Nathasha, pela orientação e pelas infinitas ajudas no laboratório. Sem seu apoio e ajuda em compartilhar seus conhecimentos, muito obrigada por tudo, você foi essencial para esse trabalho.

À mestre e amiga Nádja, por me ajudar em toda rotina de laboratório e a obter meus resultados.

Ao meu companheiro e amigo Inacio por toda ajuda durante toda a minha graduação, sem você eu não teria chegado até aqui.

As minhas amigas da república Essacana, Beatriz, Rafaela, Ester, Ana Clara, Larissa, Nery-anne, Raíssa e Janayna por toda amizade, por todas as risadas e por deixar minha trajetória em Lavras muito mais feliz. Muito obrigada.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, setor de Microbiologia de alimentos pela oportunidade concedida para a realização deste projeto de pesquisa.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado e, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

A uva Syrah é uma variedade de videira de *Vitis vinífera* L, destinada à produção de vinhos tintos. Porém, a qualidade geral do vinho, a sua estabilidade e os parâmetros sensoriais não dependem apenas da qualidade da matéria-prima, mas também das práticas enológicas, da gestão da viticultura, do clima, da localização geográfica e também da diversidade microbiana presente na uva. Os microrganismos apresentam um papel importante na definição das características do vinho uma vez que é possível observar as influências positivas e negativas nas características do produto final. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade de leveduras e fungos filamentosos nas uvas da variedade Syrah. As análises foram realizadas em diluição seriada em meios de cultivo DRBC (Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol) e Extrato de levedura Peptona e Glicose (YEPG) para obter o isolamento dos microrganismos. Para as técnicas de identificação morfológica foram observadas as características macroscópicas e microscópicas para fungos e para as leveduras. Os resultados encontrados para fungos filamentosos foram do Complexo *Cladosporium cladosporioides*, do gênero *Aspergillus sp*, com as espécies identificadas *A. japonicus*, *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus*, do gênero *Penicillium sp*, com as espécies *P. paxilli*, *P. variable*, *P. glabrum* e *P. citrinum*. Para leveduras a espécie identificada foi a *Auerobasidium pullulans*. A identificação de apenas uma espécie de levedura, leva a concluir que estudos futuros devem ser realizados para se obter uma melhor caracterização da diversidade de microrganismos. Contudo, foi possível obter a diversidade microbiana dentro dos limites das técnicas utilizadas, e analisar a influência de cada microrganismo na qualidade final do vinho na região.

**Palavras-chave:** Diversidade de microrganismos, *Terroir*, *Auerobasidium pullulans*.

## ABSTRACT

The Syrah grape is a vine variety of *Vitis vinifera* L, intended to produce high-quality red wines. However, the general quality of the wine, its stability, and organoleptic parameters depend not only on the quality of the raw material but also on oenological practices, viticulture management, climate, geographical location, and microbial diversity present in the grape. Microorganisms play an essential role in defining wine characteristics since it is possible to observe the positive and negative influences on the features of the final product. The present work aimed to evaluate the diversity of yeasts and filamentous fungi in Syrah grapes. The analysis were carried out in serial dilution in Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar and Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPG) culture media to obtain the isolation of microorganisms. For the morphological identification techniques, the macroscopic and microscopic characteristics for filamentous fungi and yeasts. The results found for filamentous fungi were from the *Cladosporium cladosporioides* Complex, of the genera *Aspergillus* sp, with the identified species *A. japonicus*, *A. ochraceus*, *A. niger* and *A. flavus*, of the genera *Penicillium* sp, with the species *P. Paxilli*, *P Variabile*, *P. Glabrum* and *P. citrinum*. For yeasts, the specie identified was *Auerobasidium pullulans*. The identification of only one yeast species leads to the conclusion that future studies should be carried out to better characterize the diversity of microorganisms. However, it was possible to obtain the microbial diversity within the limits of the techniques used and to analyze the influence of each microorganism on the final quality of the wine in the region.

**Keywords:** Diversity of microorganisms, *Terroir*, *Auerobasidium pullulans*.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	6
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	7
2.1	Viticultura no Brasil e em Minas Gerais .....	7
2.2	Variedade Syrah .....	8
2.3	Produção de vinhos de inverno .....	9
2.4	Diversidade de microrganismos .....	11
2.5	Leveduras com potencial enológico .....	12
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
3.1	Amostragem .....	15
3.2	Isolamento de microrganismos .....	16
3.3	Identificação de leveduras por espectrometria de massa (Maldi-Tof) .....	17
3.4	Identificação morfológica de fungos filamentosos.....	17
4	<b>RESULTADOS</b> .....	18
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	20
5.1	<i>Aureobasidium pullulans</i> e sua importância na viticultura .....	20
5.2	Impactos negativos dos fungos filamentosos.....	22
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	22
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23

## 1 INTRODUÇÃO

O vinho é produzido há milhares de anos. Algumas pesquisas apontam que o vinho foi produzido pela primeira vez no período neolítico, entre 6.000-5.000 a.C. (MCGOVERN et al., 2017). A viticultura, atividade que envolve desde o cultivo das uvas até a fabricação do vinho, é muito importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil, além de ser importante para a geração de emprego em grandes empreendimentos que produzem tanto uvas de mesa, quanto uvas para a fabricação de vinho (MELLO, 2011).

A qualidade geral do vinho, sua estabilidade e os parâmetros sensoriais dependem da composição físico-química das matérias-primas, das condições ambientais e da gestão da viticultura (JONES et al., 2014). A diversidade microbiana relevante da uva pode afetar o resultado da fermentação e a qualidade do vinho final produzido (GRIGGS et al., 2021). Essa diversidade afetou o processo de fermentação, levando a alterações na representação relativa das espécies microbianas pós-fermentativas (KAMILARI et al., 2021). Os microrganismos apresentam um papel importante na definição das características do vinho, como teor de etanol, quantidade de dióxido de carbono, manoproteínas e níveis de compostos aromáticos precursores. Esses compostos possuem uma contribuição positiva para as propriedades sensoriais e características do produto final (MARTÍNEZ-RODRIGUEZ; CARRASCOSA; POLO, 2001).

A espécie de levedura mais utilizada para a fermentação alcoólica é *Saccharomyces cerevisiae* (JEROMEL; KORENIKA; TOMAZ, 2019). O uso de culturas iniciadoras contendo leveduras não-*Saccharomyces* é considerado uma solução para garantir a conclusão da fermentação alcoólica, enquanto várias características sensoriais são melhoradas (MEDINA-TRUJILLO et al., 2017; WHITENER et al., 2017). Essas espécies não-*Saccharomyces* impulsiona a liberação de aroma pela secreção de proteínas, principalmente enzimas, e a síntese de novos metabólitos secundários. Além disso, contribuem para a estabilidade da cor do vinho e não esgotam o açúcar disponível no mosto. Assim, as espécies não-*Saccharomyces* são estrategicamente utilizadas para a criação de culturas multi-inicial, mistas ou sequenciais em combinação com *S. cerevisiae*. (VAN WYK et al., 2019).

A presença dos fungos filamentosos pode modificar a composição química das uvas, alterando o sabor, odor e cor dos vinhos. Os principais fungos responsáveis pela deterioração das uvas na época de colheita pertencem aos gêneros *Botrytis*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* (EINLOFT, 2012).



Embora a composição aromática final do vinho seja altamente dependente das espécies e cepas fermentativas, a microbiota da uva vem ganhando atenção, pois diversos trabalhos apontam para sua relevância nas propriedades sensoriais finais dos vinhos (BELDA et al., 2017).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade de microrganismos presentes nas amostras de uva Syrah cultivadas em ambientes diferentes, buscando entender como os microrganismos presentes nessas amostras podem influenciar a qualidade final do vinho.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Vitivinicultura no Brasil e em Minas Gerais**

A viticultura (ciência que estuda a produção da uva no Brasil) tem seu início estimado pelo ano de 1532, quando os portugueses trouxeram as primeiras cepas para o litoral de São Paulo. Mas só se tornou atividade comercial com a chegada dos imigrantes no Rio Grande do Sul, na Serra Gaúcha (MOTA et al., 2009).

Desde seu início até a década de 1960, a viticultura brasileira ficou restrita às Regiões Sul e Sudeste, mantendo as características de cultura de clima temperado, com ciclo vegetativo anual e período de repouso definido pela ocorrência das baixas temperaturas dos meses de inverno. A partir de então, o cultivo da uva “Itália” foi levado, com sucesso, para a região Semiárida do Vale do Submédio São Francisco, marcando o início da viticultura tropical no Brasil (PROTAS, J. F. DA S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, 2006).

Algumas regiões brasileiras se destacam na produção de uva viníferas, como o Sul do país, mais precisamente os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul; o Nordeste, na região do Vale do São Francisco; e o Sudeste, com destaque para Minas Gerais e São Paulo, onde apesar de não apresentar uma grande produção, tem alto potencial e vem ganhando destaque pelo manejo diferenciado em que o ciclo de produção ocorre no período mais adequado para a maturação das uvas (TROMBINI; BRISOLA; ÁVILA, 2022).

Minas Gerais tem investido em suas potencialidades na medida em que o estado se situa na Região Sudeste do Brasil entre os paralelos 14° 13' 57" e 22° 55' 47" de latitude sul e entre os meridianos 39° 51' 24" e 51° 02' 56" de longitude oeste. Abrange uma área de 582.586 km<sup>2</sup>, que representa 6,9% da área total do Brasil. Portanto, é um Estado inteiramente contido na zona intertropical qual favorece o cultivo de uvas viníferas (CUPOLILLO, 1997).

A produção de vinhos na região sul de Minas Gerais tem crescido constantemente. Isso se dá pelas condições edafoclimáticas favoráveis, o que podemos nomear também de *terroir*, e principalmente pelo manejo diferenciado, se destacando a dupla poda. Neste, o ciclo de produção ocorre no primeiro semestre, e a colheita é realizada no inverno, período favorável à maturação das uvas, uma vez que coincide com o menor índice pluviométrico no sudeste brasileiro. (FAVERO et al., 2008).

O surgimento de novas regiões produtoras de uva faz com que o estado se consolide cada vez mais no mercado vitícola além de dar alternativas para os produtores locais diversificarem sua produção, aumentando, conseqüentemente, seu lucro. Além disso, dá suporte ao desenvolvimento e contribuem para que a vitivinicultura seja uma atividade economicamente rentável (CAMARGO et al., 2016).

## 2.2 Variedade Syrah

A origem da variedade Syrah se deu pelo cruzamento entre da variedade '*Mondeuse Blanche*' e '*Dureza*', que ocorreu provavelmente no vale do Rio Rhone na França (MEREDITH et al., 1999). É uma variedade de videira de *Vitis vinifera*, destinada à produção de vinhos tintos de qualidade (VOUILLAMOZ; HEREDITY, 2006).

Seus cachos são medianos, cilíndricos e as bagas são medianas e ovaladas de coloração negro-azulada (Figura 1) e tendem a desidratar quando estão num estágio avançado de maturação (TAVARES; LIMA; MELO, 2009).

A adaptabilidade da variedade Syrah é bastante alta, embora prefira o clima continental com verões ensolarados e moderadamente quentes com noites mais frias, baixa umidade, características climáticas encontradas, como encontrado na França. Este clima leva à fabricação de vinho Syrah de sabores *premium*, forte, elegante e delicado. As características organolépticas do vinho Syrah variam de acordo com o solo da plantação, por exemplo, solos pedregosos e ácidos dão origem a vinhos mais robustos, vinhos personalizados, mais elegantes e de sabor delicado, enquanto solos arenosos dão origem a vinhos finos com aroma discreto (ROBINSON; HARDING, 2015).

Os vinhos Syrah caracterizam-se por uma cor intensa devido ao elevado teor de compostos fenólicos, especialmente antocianinas e taninos, com sabor frutado ou floral. Devido à composição química, especialmente os polifenóis, respondem muito bem ao amadurecimento e envelhecimento (VOUILLAMOZ; HEREDITY, 2006).

A variedade Syrah se destaca como a principal cultivar para vinhos tintos no Vale do São Francisco, pois ela se apresenta como uma cultivar que inicia sua maturação das bagas a

partir de 47 dias a 55 dias após a frutificação, considerada precoce. Quando comparada a outras cultivares, ela tem um acúmulo maior de sólidos solúveis totais. Quando elaborado com uva madura o vinho possui um bom potencial alcóolico, cor intensa, estruturado, com acidez moderada e aromático, adequado para o envelhecimento em barris (LIMA et al., 2005).

Figura 1 - Uva variedade Syrah



Fonte: Picarelli Martins, F (2002)

### **2.3 Produção de vinhos de inverno**

No estado de São Paulo, a vitivinicultura nasceu na região Leste, nos arredores das cidades de São Paulo e de Campinas. Nas primeiras décadas do século XX ganhou expressão no município de São Roque, como produtor de vinhos de mesa e expandiu-se ganhando expressão na região de Jundiaí. O cultivo de uvas finas de mesa desenvolveu-se nos municípios de São Miguel Arcanjo e Pilar do Sul. Mais tarde, na década de 1980, o cultivo da uva fina de mesa também ganhou expressão na região Noroeste do Estado com polo de referência no município de Jales (PROTAS; CAMARGO, 2010).

Como novidade no setor vitivinícola de São Paulo registra-se algumas iniciativas no sentido da produção de vinhos finos. Investimentos foram feitos em municípios como São Carlos, Espírito Santo do Pinhal, Itobi e Divinolândia, com o plantio de castas finas visando à produção de vinhos finos e vinhos espumantes de qualidade. O sistema/modelo de produção prevê a realização de dois ciclos vegetativos e uma colheita por ano, realizada no período entre os meses de julho a outubro, quando as condições climáticas apresentam baixa incidência de chuvas, muita insolação e temperaturas amenas, favoráveis à maturação da uva (PROTAS; CAMARGO, 2011; IBRAVIN 2012).

No sul de Minas Gerais o plantio das variedades viníferas encontrou dificuldades iniciais para o estabelecimento, principalmente devido à decorrência do ciclo normal de brotamento, amadurecimento e colheita das uvas. No hemisfério sul, a poda ocorre no inverno, durante o repouso da videira (abril a julho) e a colheita ocorre no verão (janeiro a março). No entanto, neste período, no Brasil ocorre a estação de chuvas, o que atrapalha o amadurecimento das uvas utilizadas na fabricação de vinhos. Devido a essas circunstâncias foi necessário alterar o ciclo da videira, ou seja, a uva foi induzida a mudar suas etapas de crescimento, amadurecimento e colheita, por meio da realização de duas podas, uma em agosto e a outra em janeiro. Essa poda dupla permite a formação de ramos produtivos e a eliminação de alguns cachos. Com isso, a planta muda seu ciclo, começando a brotar em fevereiro, a florescer em março e inicia a formação dos cachos em abril, sendo a colheita realizada no inverno. Essa mudança na inversão do ciclo da videira faz com que os frutos sejam colhidos no inverno, o que traz benefícios para o fruto (LIRA, 2017).

A produção de vinhos de qualidade em zonas tropicais ganhou perspectiva com a estratégia de produção da uva em regiões de altitude, com duas podas anuais e apenas uma colheita. A colheita é programada para o período de temperaturas mais baixas, coincidente com o período de estiagem, proporcionando uvas de excelente qualidade (DA MOTA; DE OLIVEIRA, 2011).

O manejo da dupla poda permite que a maturação da uva ocorra durante o outono/inverno, período de baixa precipitação, grande insolação e boa amplitude térmica. A luminosidade influencia no açúcar acumulado nos cachos. Em dias nublados ocorre baixa fotossíntese e conseqüentemente pouco açúcar é acumulado. Em dias claros ocorre alta fotossíntese e, portanto, mais açúcar. As baixas temperaturas noturnas, por sua vez, favorecem a síntese e acúmulo de polifenóis, que ditam a intensidade da cor do fruto e a produção de tanino, substância essencial para uma boa estrutura do vinho. Já a baixa umidade é importante porque evita o aparecimento de doenças, como podridões de cachos (FAVERO et al., 2008).

A técnica da dupla poda com colheita de inverno tem se mostrado eficiente no Sul de Minas Gerais para cultivares de *Vitis vinifera* tintas e brancas, permitindo melhores índices de maturação em relação à safra de verão (DA MOTA et al., 2010).

Situada numa região tradicionalmente produtora de café, Três Corações é um dos municípios onde se iniciou o projeto de desenvolvimento vitícola sob o regime de dupla poda com a variedade Syrah. Seu primeiro vinhedo experimental foi instalado em 2001 e primeira colheita ocorreu em julho de 2003, a partir de uma parceria entre a EPAMIG e a Fazenda da Fé, dando origem a expressão “Vinhos de Inverno”. As vinificações experimentais revelaram

um alto potencial qualitativo dos vinhos, estimulando a implantação de vinhedos comerciais já a partir do ano de 2004. Seu primeiro vinho foi lançado no mercado em 2013, sendo que, a partir de então, vários outros vinhedos foram instalados, todos eles empregando a técnica da dupla poda (FAVERO et al., 2008).

A busca pela otimização da produção e qualidade dos vinhos de inverno tem levado à execução de novos projetos de pesquisa, buscando introduzir novos cultivares, e ao mesmo tempo testar cultivares tradicionais em diferentes porta-enxertos que possam induzir melhor equilíbrio entre vegetação e produção em regime de dupla poda. O uso de porta-enxertos mais vigorosos melhora a produtividade da videira Syrah e também induz uma composição fenólica suficiente, equilíbrio de acidez e álcool na bebida final (DIAS et al., 2017).

#### **2.4 Diversidade de microrganismos**

O *terroir* é uma palavra de origem francesa que não tem tradução em nenhum outro idioma e está relacionada diretamente ao solo e ao microclima particular de uma região, ou seja, a localização geográfica do vinhedo, o qual irá influenciar no surgimento de características peculiares da uva que, conseqüentemente, determinarão a qualidade, a tipicidade e a identidade de um vinho (COSTA, E. R. C.; COELHO, 2017) além do cultivar e das práticas humanas que irão interagir na região. Vinhos produzidos em uma região, apresentarão características únicas, não podendo ser reproduzidas em outras regiões, mesmo utilizando as mesmas técnicas de vinificação (ANESI et al., 2015).

O vinho é um produto com elevado interesse sociocultural. Em particular, os vinhos com características autóctones distintivas têm uma grande procura entre consumidores e colecionadores, causando importantes conseqüências econômicas. Sabe-se que fatores físicos (clima) e biológicos (solo, variedade de uva e fauna), bem como técnicas de viticultura e enologia trabalham em conjunto para determinar as características sensoriais de um vinho de uma determinada região. Neste sentido importa referir que, para além destes fatores, estudos recentes destacam a contribuição da microbiota autóctone da vinha no processo de vinificação de vinhos de uma determinada região (KNIGHT et al., 2015).

Os microrganismos, predominantemente fungos, podem afetar significativamente o 'fenótipo' do vinho, em primeiro lugar, afetando a saúde e o desenvolvimento da videira e dos frutos e, portanto, a qualidade (BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012), e também interferindo no sabor, aroma e estilo do vinho devido às suas ações durante a fermentação (MASNEUF; AIGLE; DUBOURDIEU, 1996).

É conhecido que diferentes espécies de microrganismos afetam diferencialmente a saúde e o desenvolvimento da videira, e que diferentes espécies de leveduras, e mesmo diferentes genótipos de *S. cerevisiae*, produzem diferentes perfis de aroma no vinho (ANFANG; BRAJKOVICH; GODDARD, 2009). O vinho pode ser feito tentando remover o conjunto de microrganismos que estão naturalmente associados às uvas e, em seguida, inoculando deliberadamente com uma cepa comercial de levedura, ou permitindo que os microrganismos naturalmente associados às uvas conduzam o fermento (GODDARD, 2008). A primeira opção inoculada reduz o potencial dos micróbios de contribuir para o *terroir*, pelo menos durante a fermentação, e só está disponível comercialmente para os vinicultores desde 1965. A última tem sido empregada pelo homem desde os primórdios da civilização e é conhecida como fermentação espontânea ou selvagem, podendo compreender pelo menos dezenas de espécies e centenas de cepas de *S. cerevisiae* (GODDARD et al., 2010).

Uma vez que o vinho fermentado espontaneamente compreende uma diversidade de espécies de leveduras e cepas de *S. cerevisiae*, as interações metabólicas entre esses diferentes tipos também podem ser a chave para qualquer assinatura microbiana que contribua para o *terroir*. Devido à natureza complexa e muitas vezes imprevisível das interações microbianas, os efeitos da comunidade nas propriedades químicas e sensoriais do vinho são difíceis de controlar experimentalmente (KNIGHT et al., 2015).

## 2.5 Leveduras com potencial enológico

A fermentação alcoólica do mosto de uvas é conduzida principalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, a principal levedura do vinho. No entanto, durante a fermentação espontânea, várias outras leveduras encontradas naturalmente nas cascas das uvas, conhecidas como leveduras não-*Saccharomyces*, podem contribuir significativamente para a qualidade do vinho (FLEET, 2003). Embora as leveduras não-*Saccharomyces* iniciem a fermentação, a maioria delas não é detectável no final do curso, seja porque são intolerantes ao etanol ou incapazes de resistir ao antagonismo microbiano (MORTIMER et al., 1994).

A maioria das espécies não-*Saccharomyces* tem baixo poder fermentativo, o que torna necessário utilizá-las em fermentações sequenciais com *S. cerevisiae* para esgotar completamente os açúcares. Além disso, alguns deles têm cinética de fermentação lenta, o que é uma desvantagem para uma implantação competitiva em mostos contendo populações indígenas de *S. cerevisiae*. Tecnologias emergentes para controlar leveduras nativas selvagens podem facilitar o desenvolvimento, crescimento e atividade fermentativa das leveduras não-

*Saccharomyces* inoculadas e, portanto, a expressão adequada de suas propriedades metabólicas (MORATA et al., 2017).

A acidez do vinho, especialmente o pH, é um parâmetro chave no vinho que controla o desenvolvimento microbiano e a estabilidade química. O controle de pH tradicional é conduzido por processos de acidificação com ácido tartárico ou técnicas modernas de troca iônica, que infelizmente afetam a qualidade sensorial. A modulação biológica da acidez do vinho pode ser feita de forma eficiente por várias espécies não-*Saccharomyces*, pela produção de ácido láctico por *Lachancea thermotolerans* ou ácido succínico por *Candida stellata*, pela desmalicização por *Schizosaccharomyces pombe* ou *Pichia kudriavzevii*, e pelo controle da acidez volátil em fermentações com *Torulaspora delbrueckii* ou *Zygosaccharomyces florentinus* destacam as possibilidades de não-*Saccharomyces* na melhoria da acidez do vinho (VILELA, 2019).

O papel dessas leveduras é crucial na formação do sabor e aroma dos vinhos através da produção de metabólitos importantes, incluindo compostos voláteis, como aldeídos, ésteres ou cetonas, e compostos não voláteis, como glicerol e ácido láctico (SGOUROS et al., 2018). Entre outros metabólitos, cepas selecionadas de *Lachancea thermotolerans* podem produzir altos níveis de ácido láctico durante a fermentação alcoólica, aumentando assim a acidez dos vinhos (KAPSOPOULOU et al., 2006). *Lachancea thermotolerans* é uma dessas espécies de leveduras selvagens com grande potencial enológico, entre outras importantes aplicações biotecnológicas (MORATA et al., 2018). Deve-se notar, que o ácido láctico no vinho é produzido principalmente a partir da descarboxilação do ácido L-málico pela atividade metabólica das bactérias do ácido láctico durante a fermentação malolática que geralmente segue a fermentação alcoólica, resultando na redução da acidez do vinho. Essa capacidade torna a *L. thermotolerans* única entre as leveduras, pois a produção de ácido láctico por outras espécies é muito rara (HRANILOVIC et al., 2018).

A desacidificação do vinho por metabolização do ácido málico é uma etapa essencial na vinificação de vinhos tintos. Este ácido é instável durante a estabilização e envelhecimento e pode produzir névoas microbianas se não for eliminado previamente. Normalmente, o ácido málico é transformado em ácido láctico pela fermentação malolática produzida por bactérias lácticas, principalmente *Oenococcus oeni*, devido à composição específica do vinho. Alternativamente, *S. pombe* é capaz de metabolizar o ácido málico pela via de fermentação maloalcoólica. As vantagens são a degradação rápida e eficiente do ácido málico e ao mesmo tempo a *S. pombe* pode produzir a fermentação alcoólica. Além disso, seu uso reduz a formação de aminas biogênicas. Além disso, o metabolismo peculiar de *S. pombe* facilita a formação de

pigmentos de piranoantocianina de vitisina A, com efeitos positivos na estabilidade da cor (LOIRA et al., 2018).

*Candida spp.* é um dos gêneros de levedura comumente presentes no mosto em estágio inicial de fermentação (GONZÁLEZ-ALONSO et al., 2021). As leveduras deste gênero caracterizam-se como produtoras de alto glicerol e baixo teor de ácido acético, com efeitos negativos no teor de aldeídos e ésteres de acetato nos vinhos (JOLLY; VARELA; PRETORIUS, 2014). Tem a capacidade de produzir  $\beta$ -D-glucosidases que hidrolisam glicosídeos no mosto de uva (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ; DI STEFANO; BRIONES, 2003). A presença desta enzima pode contribuir para a formação de compostos aromáticos no vinho. Além disso, a produção de proteases pode promover o crescimento de microrganismos durante a fermentação devido à liberação de fontes de nutrientes assimiláveis como peptídeos e aminoácidos. *Candida* também pode produzir exopolissacarídeos de várias fontes de açúcar (GIENKA et al., 2016).

Dentre as espécies pioneiras utilizadas em enologia está a *T. delbrueckii*, com poder fermentativo médio, algumas cepas chegam a 9%–10% em álcool com alta pureza de fermentação. A produção de ésteres acéticos e outros aromas específicos torna esta levedura uma opção chave para melhorar o aroma do vinho, mas também tem efeitos interessantes no corpo e estrutura (RAMÍREZ; VELÁZQUEZ, 2018). Recentemente, tem sido utilizado em vinhos espumantes para fazer vinhos base mais complexos, ao mesmo tempo que aumenta a estrutura durante o envelhecimento em garrafa (IVIT; KEMP, 2018).

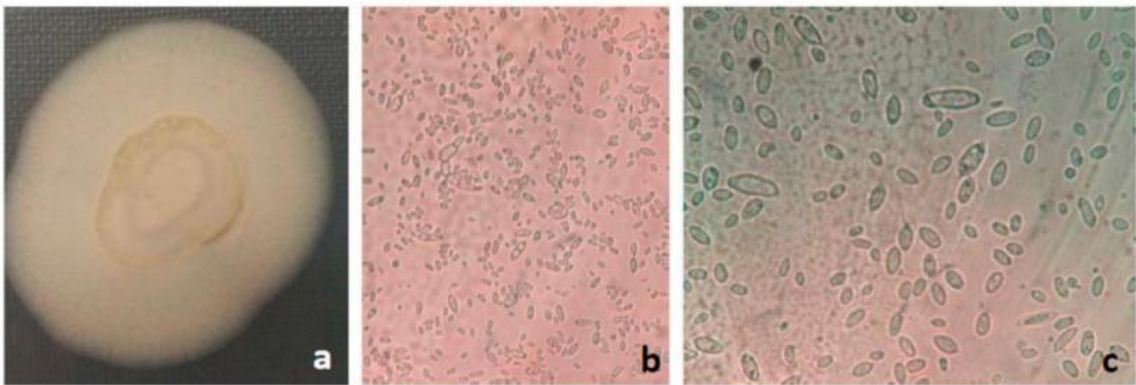
A produção de ésteres acéticos é uma estratégia interessante para melhorar o perfil aromático de um vinho. O uso de *Wickerhamomyces anomalus* ajuda a aumentar os teores de vários ésteres, especificamente 2-fenil-acetato de etila, com perfis florais positivos (PADILLA; GIL; MANZANARES, 2018). A principal desvantagem desta espécie é a alta produção de ácido acético, que pode ser parcialmente controlada com seleção adequada de linhagens, mas também através de seu uso em fermentação sequencial com *S. cerevisiae*. Espécies apiculadas, como os gêneros *Hanseniaspora* e *Kloeckera*, também são descritas como fortes produtoras de ésteres de acetato, e muitas espécies aumentam a formação de 2-fenilacetato de etila; alguns também produzem benzenoides ou nor-isoprenoides. Além disso, tendem a ter um efeito interessante na estrutura, produzindo vinhos encorpados (MARTIN et al., 2018).

Um amplo conjunto de atividades enzimáticas também pode ser encontrado em *Aureobasidium pullulans*, várias dessas enzimas podem ser purificadas com aplicações úteis em enologia. *Aureobasidium pullulans* produzem uma ampla gama de produtos naturais bem documentados na literatura internacional e que têm sido considerados seguros para aplicações biotecnológicas e ambientais (BOZOUZI; TSALTAS, 2018).



*Aureobasidium pullulans* está entre a microbiota dominante do suco de uva e considerada microrganismo antifitopatígeno (Figura 2), expressando atividade antifúngica e antibacteriana contra vários patógenos pós-colheita importantes, como como *Botrytis* e *Bacillus*. Além disso, essas espécies têm uma contribuição essencial para a cor do vinho, características sensoriais e eficiência de clarificação (ONETTO; BORNEMAN; SCHMIDT, 2020).

Figura 2 – *Aureobasidium pullulans* (a) colônia em Sabouraud Dextrose Agar (b) visão microscópica de células leveduriformes com pseudomicélio característico, (c) visão microscópica característica de células



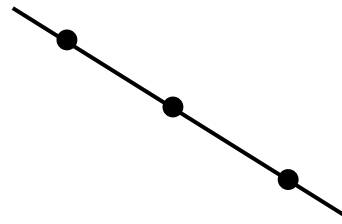
Fonte: Bozoudi e Tsaltas (2018)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem

As amostras de uva tinta da variedade Syrah foram coletadas em uma vinícola localizada na cidade de Espírito Santo do Pinhal, São Paulo. As amostras foram coletadas em dois ambientes diferentes nomeados como Syrah inferior e Syrah superior. Foram coletados 3 pontos equidistantes como mostra a Figura 3, três cachos de uva em cada um dos pontos (P1, P2 e P3) onde as coordenadas geográficas podem ser observadas na Tabela 1. Essas amostras foram coletadas e colocadas em sacos plásticos estéreis, que foram transportadas em caixas térmicas, para o laboratório de Micologia e Micotoxinas, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, onde foram congeladas e posteriormente analisadas.

Figura 3 – Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta das amostras de uvas



Fonte: (FREIRE, 2016)

Tabela 1 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de uvas da variedade Syrah localizadas em Espírito Santo do Pinhal, São Paulo

Variedade	Ponto	Informações de localização		
		Latitude	Longitude	Altitude (m)
Syrah superior	1	22°11'7,08" N	46°42'22,07" O	1121
	2	22°11'7,08" N	46°42'20,59" O	1121
	3	22°11'7,22" N	46°42'19,37" O	1118
Syrah inferior	1	22°11'5,46" N	46°42'18,25" O	1108
	2	22°11'4,42" N	46°42'18,40" O	1106
	3	22°11'3,12" N	46°42'18,68" O	1123

### 3.2 Isolamento de microrganismos

Para o isolamento foi utilizada a técnica de diluição seriada e do plaqueamento em superfície, onde foram coletadas 25g de bagas de uva aleatoriamente, adicionadas a 225ml de água peptonada a 0,1% para obtenção do mosto. As bagas foram maceradas e em seguida, mantidas sob agitação no Stomacher (METROTERM), a 490 batidas por 2 minutos. Posteriormente, foi realizada a diluição seriada do mosto (1:10, 1:100 e 1:1000) onde alíquotas de 0,1ml das diluições foram espalhadas na superfície dos meios de cultura até total esgotamento.

Os meios de cultura utilizados para isolamento de leveduras foram o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (10g de glicose; 5g de peptona bacteriológica; 1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5ml de solução 5% de rosa de bengala; 1,0ml de dicloran; 1.000ml de água destilada; 15g de ágar; 1mg de cloranfenicol) e Extrato de Levedura, Peptona e Glicose (YEPG) (Extrato de Levedura 1%; Peptona Bacteriológica 2%; Glicose 2%, Ágar 1,5%). Logo após a diluição seriada, as placas de DRBC e YEPG foram incubadas em BOD a

25°C por 48 horas. Após o período de incubação foi feita a caracterização dos microrganismos onde foram observados forma, tamanho, superfície, bordas, cor e perfil da colônia. Também foi utilizada a técnica da raiz quadrada para escolher o número de microrganismos que seriam isolados. Logo em seguida foram passados para meio de purificação YEPG a 28°C por 48 horas.

O procedimento foi igualmente repetido para isolamento dos fungos, no entanto, as placas de DRBC e YEPG foram incubadas em BOD a 25°C e 28°C por 7 dias respectivamente. Para a caracterização por morfotipos de fungos filamentosos, observou-se características de cor das colônias, cor do micélio, cor do reverso, textura, presença de exsudato/pigmentação. Logo após a caracterização por morfotipos, os isolados foram transferidos para o meio de purificação MA (ágar extrato de malte) e incubados em BODs de 25°C por um período de 5 a 7 dias.

### 3.3 Identificação de leveduras por espectrometria de massa (Maldi-Tof)

As leveduras isoladas foram cultivadas no meio de cultura YEPG por aproximadamente 24 horas à 28°C para realizar a análise do Maldi-Tof (técnica de dessorção/ionização a laser assistida por matriz, seguida de espectrometria de massas por tempo de voo). Uma pequena parte da biomassa foi transferida para microtubos e adicionados aproximadamente 7µL de solução de ácido fórmico 25% em água (v/v). As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e levadas para o sonicador durante 5 minutos. Imediatamente, 0,7µL de cada suspensão celular foi transferida para a placa do MALDI onde foi adicionado 1µL de solução matricial (ácido ciano-4-hidroxicinâmico [HCCA] (MIGUEL et al., 2017).

A aquisição do espectro foi realizada em um espectrômetro de massa Microflex (Bruker Daltonics). Cada espectro final foi gerado pela soma de 240 impulsos de laser acumulados por perfil. A lista de picos resultante foi exportada para o pacote de software MALDI Biotyper 3.0 (versão 3.0; Bruker Daltonics GmbH), que é uma base de dados comercial da Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha). No banco de dados essa lista de picos de amostra individuais resultante foi comparada com os espectros de referência e classificados automaticamente.

### 3.4 Identificação morfológica de fungos filamentosos

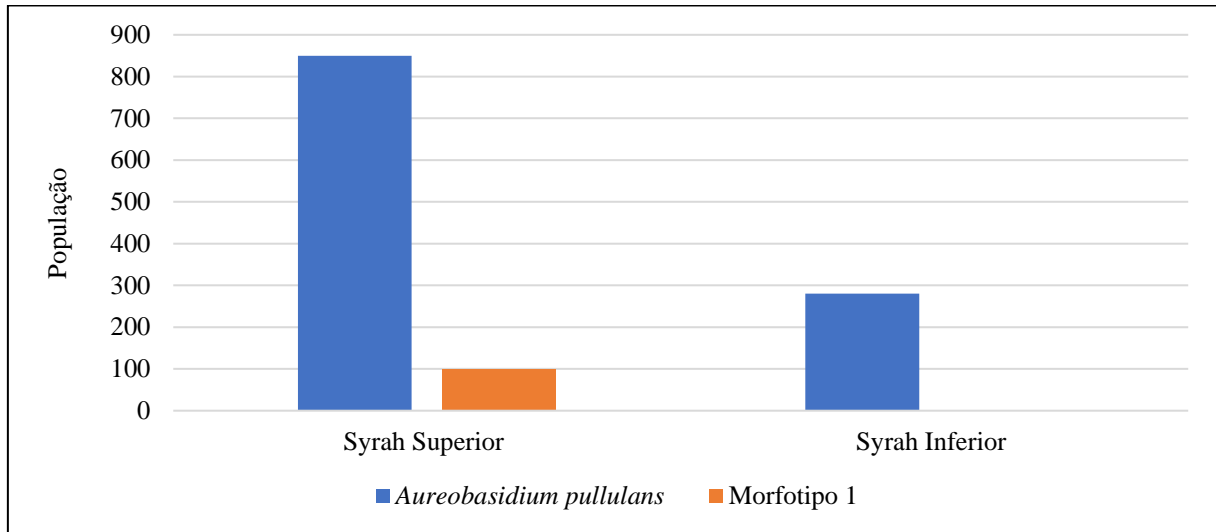
Após a obtenção das colônias puras de fungos filamentosos, os isolados foram transferidos para meios de cultura de acordo com a caracterização de cada morfotipo, permitindo assim a sua identificação. Para *Penicillium* e *Aspergillus*, usaram-se os meios Czapeck yeast Ágar – CYA (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1g; concentrado czapeck: 10ml; extrato de levedura: 5g, ágar: 15g, água destilada: 1.000ml); (concentrado czapeck: (NaNO<sub>3</sub>: 30g, KCl: 5g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 5g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05g, água destilada:

100ml), com incubação a 25°C e a 37°C por 7 dias, e o meio Ágar extrato de malte (MEA) (extrato de malte: 20g, peptona: 1g, glucose: 30g, ágar: 20g, água destilada: 1.000ml), a 25°C por 7 dias, de acordo com o Manual de Klich (KLICH, 2002) para o gênero *Aspergillus* e o Manual de Pitt (PITT, 2000) para o gênero *Penicillium*. Os demais gêneros foram inoculados em MEA (extrato de malte: 20g, peptona: 1g, glucose: 30g, ágar: 20g, água destilada: 1.000ml), a 25°C. Após sete dias de incubação, foram observadas as características macroscópicas (diâmetro da colônia, cor da colônia, cor do micélio, cor do reverso, presença de sulcos no reverso da colônia, pigmentação solúvel e cleistotécio/escleródios) e microscópicas para *Aspergillus* (comprimento, largura e textura do conidióforo, diâmetro e forma da vesícula, diâmetro, forma e textura dos conídios), e para *Penicillium* (comprimento, largura e textura do conidióforo, comprimento e textura da ramificação, comprimento e textura da métula, comprimento e textura da fiálide, além do diâmetro, forma e textura dos conídios), foram observadas e mensuradas, onde em seguida foram comparadas com os manuais de identificação.

#### **4 RESULTADOS**

A partir das amostras analisadas foi possível identificar um total de 36 leveduras na amostra Syrah Superior apresentando uma população média de  $4,5 \times 10^2$  UFC/g (Unidades formadoras de colônias/ grama), sendo elas *Aureobasidium pullulans* ( $8,5 \times 10^2$ ) e Morfotipo 1 ( $1,0 \times 10^2$ ), e na Syrah Inferior foram identificadas 31 leveduras com uma população de  $2,8 \times 10^2$  sendo representado apenas por *Aureobasidium pullulans* como ilustrado na Figura 4.

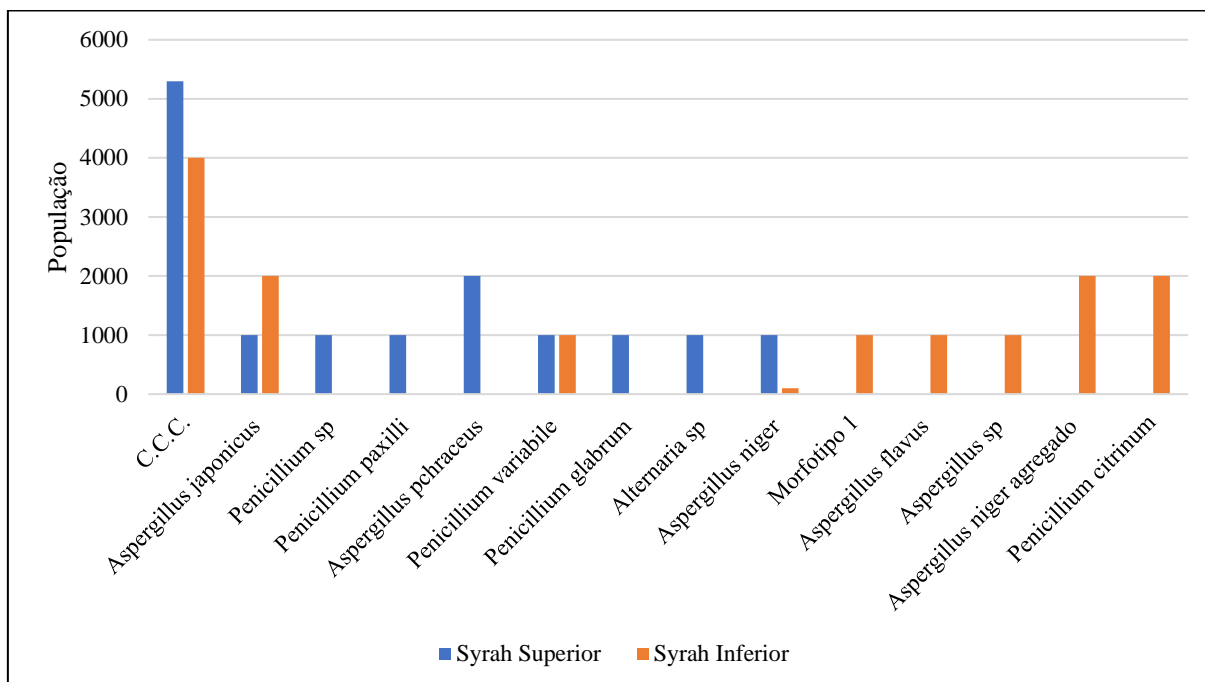
Figura 4 – Diversidade de leveduras nas amostras de uva das variedades Syrah Superior e Syrah Inferior



Dentre os isolados identificados *Aureobasidium pullulans* ( $8,5 \times 10^2$ ) apresentaram a maior população na variedade Syrah superior, e *Aureobasidium pullulans* ( $2,8 \times 10^2$ ) na Syrah inferior.

Na amostra de uva variedade Syrah superior foram identificados um total de 90 fungos filamentosos o que representa uma população média de  $5,3 \times 10^3$  UFC/g, sendo eles: *Cladosporium cladosporioides* complexo ( $5,3 \times 10^3$ ), *Aspergillus japonicus* ( $1,0 \times 10^3$ ), *Penicillium sp* ( $1,0 \times 10^3$ ), *P. paxilli* ( $1,0 \times 10^3$ ), *A. ochraceus* ( $2,0 \times 10^3$ ), *P. variable* ( $1,0 \times 10^3$ ), *P. glabrum* ( $1,0 \times 10^3$ ), ( $1,0 \times 10^3$ ) e *A. niger* ( $2,0 \times 10^3$ ). Já na amostra Syrah inferior foram identificados 80 isolados, com uma população média de  $4,56 \times 10^3$  UFC/g tendo como representantes *Cladosporium cladosporioides* complexo ( $4,0 \times 10^3$ ), *Aspergillus japonicus* ( $2,0 \times 10^3$ ), Morfotipo 2 ( $1,0 \times 10^4$ ), *P. variable* ( $1,0 \times 10^3$ ), *A. niger* ( $1,0 \times 10^2$ ), *A. flavus* ( $1,0 \times 10^3$ ), *A. sp* ( $1,0 \times 10^3$ ), *A. niger* agregado ( $2,0 \times 10^3$ ), *P. citrinum* ( $2,0 \times 10^3$ ) (Figura 5).

Figura 5 – Diversidade de fungos filamentosos nas amostras de uva das variedades Syrah Superior e Syrah Inferior (C.C.C: *Cladosporium cladosporioides* complexo)



Dentre os fungos filamentosos identificados, os que apresentaram a maior população nas uvas foi *Cladosporium cladosporioides* complexo,  $5,3 \times 10^3$  UFC/g, e  $4,0 \times 10^3$  UFC/g, na variedade Syrah superior e Syrah inferior respectivamente.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 *Aureobasidium pullulans* e sua importância na vitivinicultura

Bactérias e leveduras são mais propensas a mostrar um comportamento mutualista entre si, a fim de colonizar eficientemente as superfícies das bagas. Durante essas interações nas superfícies das bagas, elas podem ter maior capacidade de captura de nutrientes, resistindo a estresses ambientais e interagindo também com outras categorias de microrganismos, como fungos e vírus. Vários modos de ação podem estar envolvidos no controle biológico por antagonistas microbianos (ADIKARAM; JOYCE; TERRY, 2002) incluindo competição por espaço e nutrientes, parasitismo direto, exclusões de sítios e resistência induzida e produção de compostos voláteis antifúngicos. Conforme descrito por vários autores, o principal mecanismo pelo qual *A. pullulans* é eficaz em sua capacidade de biocontrole é devido à competição por nutrientes (DROBY et al., 2002). Da mesma forma, (ADIKARAM; JOYCE; TERRY, 2002) observaram que as uvas tratadas em seus locais de feridas com células de *A. pullulans* mortas pelo calor reduzem a decomposição na mesma extensão que as células vivas.

Neste estudo foi mostrado que o *A. pullulans* é amplamente encontrado no *terroir* da área de estudo. Tal observação também foi relatada por Gostincar et al., 2014, em que os autores afirmam que o *A. pullulans* é um dos organismos comuns facilmente encontrados na maioria dos habitats, incluindo videiras, com alta diversidade morfológica e genética. Essa abundância observada levou muitos cientistas a explorar seu potencial de biocontrole para doenças importantes da uva, como o mofo cinzento *Botrytis* (PARAFATI et al., 2015), e para a podridão do cacho causada por espécies de *Aspergillus* (PANTELIDES et al., 2015). Os mecanismos propostos para explicar essa atividade antifúngica foram exclusão por bactérias e leveduras de sítios de adesão fúngica (BENBOW; SUGAR, 2007) competição por nutrientes e produção de metabólitos ou enzimas antifúngicas. (VERO et al., 2002). A levedura *A. pullulans* secreta enzimas quitinase e glucanase capazes de hidrolisar fungos (IPPOLITO et al., 2000).

*Aureobasidium* é reconhecido como produtor de uma série de produtos de importância industrial. *A. pullulans* é relatado para produzir amilases (MANITCHOTPISIT et al., 2011), celulases, lipases (LEATHERS et al., 2013), xilanases (MANITCHOTPISIT et al., 2009), proteases e lacase (MA et al., 2007). Atualmente na indústria vinícola, pectinases, glucanases, xilanases e proteases são utilizadas para melhorar a clarificação e processamento do vinho. *A. pullulans* é um excelente produtor de xilanases,  $\beta$ -glicosidases além de glicose oxidase (IEMBO et al., 2002). Foi detectado que a glicosidase é usada para a liberação de aromas varietais de compostos precursores e glicose oxidase para a redução dos níveis de álcool (LEITE et al., 2008).

Além disso *A. pullulans* produz enzimas pectinolíticas extracelulares enquanto cresce em meio contendo pectina como única fonte de carbono (MANACHINI; PARINI; FORTINA, 1988). As pectinases na vinificação estão envolvidas na degradação de substâncias pécticas presentes nas paredes das células da casca da uva, levando a benefícios importantes, como maior rendimento de suco, prensagem mais fácil, clarificação e filtração mais eficientes do vinho, além de liberar mais compostos de cor e sabor aprisionados na casca da uva (CABEZA et al., 2009). Recentemente, há um interesse crescente no uso de leveduras não-*Saccharomyces* durante a vinificação devido à sua dotação enzimática benéfica, como enzimas pectinolíticas, que é capaz de produzir grande melhoria sensorial e tecnológica em vinhos (BELDA et al., 2016). Em trabalhos relatados sobre o microbioma da uva, *A. pullulans* emite componentes de sabor típicos e bem conhecidos do vinho tinto (ou seja, ácido 2-metilbutanóico, 3-metil-1-butanol e octanoato de etila) (VERGINER; LEITNER; BERG, 2010). Além disso a  $\beta$ -glicosidase e as pectinases estão envolvidas na produção de aroma (MERÍN; MORATA DE AMBROSINI, 2018).

## 5.2 Impactos negativos dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são de extrema importância pois atuam na estabilidade físico-química e propriedades sensoriais do vinho proveniente das uvas de origem, porém quando em estado de crescimento descontrolado em uvas antes da colheita, podem ocasionar a “podridão”, uma vez que levará ao desenvolvimento secundário de bactérias e leveduras. Eles estão presentes nas adegas, nas superfícies e também no ar, apesar de não tolerarem o etanol. (FUGELSANG, K.C., EDWARDS, 2007).

A podridão de *Cladosporium* (*Cladosporium spp.*) é uma doença comum em vinhedos. A incidência da doença muitas vezes excede 50% dos cachos devido a colheitas atrasadas. Este atraso é necessário para obter o amadurecimento fenólico para garantir o desenvolvimento de aroma e sabor necessário para a qualidade ideal do vinho. Nessas condições, as cultivares tintas costumam ser colhidas quando as uvas estão parcialmente senescentes, favorecendo a incidência e severidade da podridão de *Cladosporium*, que reduz o rendimento e afeta a qualidade do vinho. (BRICEÑO; LATORRE, 2008).

A podridão da baga, conhecida como podridão ácida ou podridão de *Aspergillus*, é principalmente causada por *Aspergillus* pretos, muito comuns em quintais. O solo e o lixo da videira no solo são as principais fontes de *Aspergillus spp.* pretos em vinhas (KAZI et al., 2008).

Sabe-se que *A. carbonarius* e *A. niger* são produtores de ocratoxina A, toxina que na bebida final, pode causar riscos à saúde do consumidor (ABRUNHOSA et al., 2001).

Apesar da predominância de algumas espécies de fungos, a comunidade presente nas amostras era diversificada, caracterizadas por gêneros como *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* derivados de ecossistemas de vinhedos. Essa comunidade pode estar mais relacionada a origem geográfica (localização do vinhedo), microclima e propriedades do solo (disponibilidade de nutrientes), do que a variedade da videira, estando de acordo com estudos da microbiota associada à videira. (MEZZASALMA et al., 2018)

Dimakopoulou e colaboradores (DIMAKOPOULOU et al., 2008) descobriram que o isolado de *A. pullulans* era tão eficaz quanto os fungicidas comerciais para a podridão dos cachos. *A. pullulans* também podem degradar e desintoxicar a ocratoxina A, prevenindo a contaminação do vinho (DE CURTIS; DE CICCIO; LIMA, 2012).

## 6 CONCLUSÃO

A partir do estudo foi possível observar a diversidade de leveduras e fungos filamentosos presentes na amostra de uva da variedade Syrah, juntamente com a influência que esses microrganismos tem na qualidade final do vinho.



A microbiota *terroir* da região de estudo avaliada a partir da amostra de uva Syrah é constituída em uma maior incidência por fungos filamentosos do complexo *Cladosporium cladosporioides* e os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os principais componentes da microbiota da uva sendo os microrganismos de maior predominância neste estudo, assim como as leveduras pertencentes a espécie *Aureobasidium pullulans*.

Os microrganismos isolados com potencial para produção de ocratoxina A é a espécie *A. carbonarius*. Esses microrganismos não foram encontrados com muita incidência na uva, o que diminui o risco dessa micotoxina no vinho produzido.

## 7 REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L. et al. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 240–242, 11 abr. 2001.

ADIKARAM, N. K. B.; JOYCE, D. C.; TERRY, L. A. Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. **Australasian Plant Pathology** 2002 **31:3**, v. 31, n. 3, p. 223–229, 2002.

ANESI, A. et al. Towards a scientific interpretation of the *terroir* concept: plasticity of the grape berry metabolome. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 7 ago. 2015.

ANFANG, N.; BRAJKOVICH, M.; GODDARD, M. R. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 1 fev. 2009.

ANGELUCCI DE AMORIM, D. et al. Produção extemporânea da videira, cultivar Syrah, nas condições do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 327–331, ago. 2005.

BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International journal of food microbiology**, v. 153, n. 3, p. 243–259, 15 fev. 2012.

BELDA, I. et al. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 223, p. 1–8, 16 abr. 2016.

BELDA, I. et al. Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. **Molecules** 2017, **Vol. 22, Page 189**, v. 22, n. 2, p. 189, 24 jan. 2017.

BENBOW, J. M.; SUGAR, D. Fruit Surface Colonization and Biological Control of Postharvest Diseases of Pear by Preharvest Yeast Applications. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.9.839>, v. 83, n. 9, p. 839–844, 23 fev. 2007.

BERGQVIST, J.; DOKOOZLIAN, N.; EBISUDA, N. Sunlight Exposure and Temperature Effects on Berry Growth and Composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 1, 2001.

BOZOUDI, D.; TSALTAS, D. The Multiple and Versatile Roles of Aureobasidium pullulans in the Vitivinicultural Sector. **Fermentation 2018, Vol. 4, Page 85**, v. 4, n. 4, p. 85, 9 out. 2018.

BRICEÑO, E. X.; LATORRE, B. A. Characterization of Cladosporium Rot in Grapevines, a Problem of Growing Importance in Chile. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-12-1635>, v. 92, n. 12, p. 1635–1642, 13 nov. 2008.

CABEZA, M. S. et al. Effect of a Pectinase-Surfactin Preparation on Extraction of Pigments and Total Polyphenol from Malbec Grape Skins. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 60, n. 4, 2009.

CAMARGO, U. A. et al. Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva. p. 64, 2016.

COSTA, E. R. C.; COELHO, L. N. C. Indicações Geográficas e Turismo Enogastronômico no Vale dos Vinhedos (RS) e no Vale do Rio São Francisco (PE/BA). **Revista Turismo, vol 6, numero especial**, v. 6, p. 48–77, 2017.

CUPOLILLO, F. Períodos de estiagem durante a estação chuvosa no Estado de Minas Gerais: espacialização e aspectos dinâmicos relacionados. 19 ago. 1997.

DA MOTA, A. C.; DE OLIVEIRA, R. P. Poaceae de uma área de floresta montana no sul da Bahia, Brasil: Chloridoideae e Panicoideae. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 515–545, 2011.

DA MOTA, R. V. et al. Composição físico-química de uvas para vinho fino em ciclos de verão e inverno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1127–1137, dez. 2010.

DIAS, F. A. N. et al. Rootstock on vine performance and wine quality of ‘Syrah’ under double pruning management. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 2, p. 134–141, 1 mar. 2017.

DROBY, S. et al. Induction of Resistance to Penicillium digitatum in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent Candida oleophila. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 393–399, 2002.

EINLOFT, T. C. **Caracterização micotoxicológica de uvas viníferas produzidas no Rio Grande do Sul**. [s.l: s.n.].

FAVERO, A. C. et al. Viabilidade de produção da videira “Syrah”, em ciclo de outono inverno, na região sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 685–690, set. 2008.

FAVERO, A. C. et al. **Double-pruning of ‘Syrah’ grapevines: a management**

**strategy to harvest wine grapes during the winter in the Brazilian Southeast.** Lavras: [s.n.].

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; DI STEFANO, R.; BRIONES, A. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. **Food Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 35–41, 1 fev. 2003.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1–2, p. 11–22, 1 set. 2003.

FREIRE, L. **Ocorrência de Aspergillus e Penicillium e a correlação entre espécies ocratoxigênicas e uvas viníferas da região topical do Brasil.** [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2016.

FUGELSANG, K.C., EDWARDS, C. G. Identification of Wine Microorganisms. **Wine Microbiology**, p. 241–272, 3 abr. 2007.

GIENTKA, I. et al. The exopolysaccharides biosynthesis by Candida yeast depends on carbon sources. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 31–37, 1 jul. 2016.

GODDARD, M. R. Quantifying the complexities of Saccharomyces cerevisiae's ecosystem engineering via fermentation. **Ecology**, v. 89, n. 8, p. 2077–2082, ago. 2008.

GODDARD, M. R. et al. A distinct population of Saccharomyces cerevisiae in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 1, p. 63–73, jan. 2010.

GONZÁLEZ-ALONSO, I. et al. Capturing yeast associated with grapes and spontaneous fermentations of the Negro Saurí minority variety from an experimental vineyard near León. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 12 fev. 2021.

GOSTINČAR, C. et al. Genome sequencing of four Aureobasidium pullulans varieties: Biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–29, 1 jul. 2014.

GRIGGS, R. G. et al. Sources and Assembly of Microbial Communities in Vineyards as a Functional Component of Winegrowing. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 836, 13 abr. 2021.

HRANILOVIC, A. et al. Oenological traits of Lachancea thermotolerans show signs of domestication and allopatric differentiation. **Scientific Reports 2018 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 4 out. 2018.

IEMBO, T. et al. Production, Characterization, and Properties of  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -Xylosidase from a Strain of Aureobasidium sp. **Applied Biochemistry and Microbiology 2002 38:6**, v. 38, n. 6, p. 549–552, 2002.

IPPOLITO, A. et al. Control of postharvest decay of apple fruit by Aureobasidium

pullulans and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, n. 3, p. 265–272, 1 jul. 2000.

IVIT, N. N.; KEMP, B. The Impact of Non-Saccharomyces Yeast on Traditional Method Sparkling Wine. **Fermentation** 2018, Vol. 4, Page 73, v. 4, n. 3, p. 73, 1 set. 2018.

JEROMEL, A.; KORENIKA, A. M. J.; TOMAZ, I. An Influence of Different Yeast Species on Wine Aroma Composition. **Fermented Beverages: Volume 5. The Science of Beverages**, p. 171–285, 1 jan. 2019.

JOLLY, N. P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S. Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 2, p. 215–237, 1 mar. 2014.

JONES, J. E. et al. Viticulture for Sparkling Wine Production: A Review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 65, n. 4, p. 407–416, 1 dez. 2014.

KAMILARI, E. et al. Metataxonomic Analysis of Grape Microbiota During Wine Fermentation Reveals the Distinction of Cyprus Regional terroirs. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 2675, 22 set. 2021.

KAPSOPOULOU, K. et al. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 2006 23:5, v. 23, n. 5, p. 735–739, 18 out. 2006.

KAZI, B. A. et al. Berry infection and the development of bunch rot in grapes caused by *Aspergillus carbonarius*. **Plant Pathology**, v. 57, n. 2, p. 301–307, 1 abr. 2008.

KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus Species**. [s.l.: s.n.].

KNIGHT, S. et al. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. **Scientific Reports** 2015 5:1, v. 5, n. 1, p. 1–10, 24 set. 2015.

LEATHERS, T. D. et al. Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters** 2013 35:10, v. 35, n. 10, p. 1701–1706, 26 jun. 2013.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 6 nov. 2008.

LIMA, M. DE et al. Evolução de compostos químicos durante a maturação de uvas para vinho tinto produzidas no Vale do São Francisco. 2005.

LIRA, N. DE A. Estudo da diversidade de fungos filamentosos da microbiota terroir em vinhedos do sul de Minas Gerais. 27 abr. 2017.

LOIRA, I. et al. Schizosaccharomyces pombe: A Promising Biotechnology for Modulating Wine Composition. **Fermentation 2018, Vol. 4, Page 70**, v. 4, n. 3, p. 70, 23 ago. 2018.

MA, C. et al. Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast Aureobasidium pullulans for bioactive peptide production from different sources. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 9, n. 3, p. 343–351, maio 2007.

MANACHINI, P. L.; PARINI, C.; FORTINA, M. G. Pectic enzymes from Aureobasidium pullulans LV 10. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 11, p. 682–685, 1 nov. 1988.

MANITCHOTPISIT, P. et al. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of Aureobasidium pullulans. **Mycological research**, v. 113, n. Pt 10, p. 1107–1120, out. 2009.

MANITCHOTPISIT, P. et al.  $\alpha$ -Amylase activity during pullulan production and  $\alpha$ -amylase gene analyses of Aureobasidium pullulans. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1211–1218, 1 set. 2011.

MARTIN, V. et al. Oenological Impact of the Hanseniaspora/Kloeckera Yeast Genus on Wines—A Review. **Fermentation 2018, Vol. 4, Page 76**, v. 4, n. 3, p. 76, 10 set. 2018.

MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, A. J.; CARRASCOSA, A. V.; POLO, M. C. Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of Saccharomyces cerevisiae during induced autolysis in a model wine system. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1–2, p. 155–160, 15 ago. 2001.

MASNEUF, I.; AIGLE, M.; DUBOURDIEU, D. **The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Example of Sauvignon blanc**. **FEMS Microbiology Letters** Oxford University Press (OUP), , maio 1996.

MCGOVERN, P. et al. Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 48, p. E10309–E10318, 28 nov. 2017.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira**. Bento Gonçalves, RS: [s.n.].

MEREDITH, C. P. et al. The Identity and Parentage of the Variety Known in California as Petite Sirah. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 3, 1999.

MERÍN, M. G.; MORATA DE AMBROSINI, V. I. Kinetic and metabolic behaviour of the pectinolytic strain Aureobasidium pullulans GM-R-22 during pre-fermentative cold maceration and its effect on red wine quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, p. 18–26, 20 nov. 2018.

MEZZASALMA, V. et al. Geographical and cultivar features differentiate grape microbiota in Northern Italy and Spain vineyards. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 946, 15 maio 2018.

MIGUEL, M. G. DA C. P. et al. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **LWT**, v. 77, p. 362–369, 1 abr. 2017.

MORATA, A. et al. Emerging preservation technologies in grapes for winemaking. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 36–43, 1 set. 2017.

MORATA, A. et al. Lachancea thermotolerans Applications in Wine Technology. **Fermentation 2018, Vol. 4, Page 53**, v. 4, n. 3, p. 53, 11 jul. 2018.

MORTIMER, R. K. et al. Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. **Yeast**, v. 10, n. 12, p. 1543–1552, 1 dez. 1994.

MOTA, C. S. et al. Disponibilidade hídrica, radiação solar e fotossíntese em videiras “Cabernet Sauvignon” sob cultivo protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 432–439, 2009.

ONETTO, C. A.; BORNEMAN, A. R.; SCHMIDT, S. A. Investigating the effects of *Aureobasidium pullulans* on grape juice composition and fermentation. **Food Microbiology**, v. 90, p. 103451, 1 set. 2020.

PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. **Fermentation 2018, Vol. 4, Page 68**, v. 4, n. 3, p. 68, 20 ago. 2018.

PANTELIDES, I. S. et al. Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. **Biological Control**, v. 88, p. 46–53, 1 set. 2015.

PARAFATI, L. et al. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, v. 47, p. 85–92, 1 maio 2015.

PEREIRA, A. G. et al. Management of Wine Aroma Compounds: Principal Basis and Future Perspectives. **Chemistry and Biochemistry of Winemaking, Wine Stabilization and Aging**, 25 jun. 2020.

Picarelli Martins, F. flickr.com. 20/05/2022. Disponível em :<<https://www.flickr.com/photos/39923705@N07/4078127950>> Acessado em: 30/08/2022.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common penicillium species / by John I. Pitt | National Library of Australia.** Disponível em: <<https://catalogue.nla.gov.au/Record/1643343>>. Acesso em: 9 ago. 2022.

PROTAS, J. F. DA S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. DE. **Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. - Portal Embrapa.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/536040/vitivinicultura-brasileira-regioes-tradicionais-e-polos-emergentes>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

RAMÍREZ, M.; VELÁZQUEZ, R. The Yeast *Torulaspota delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. **Fermentation 2018, Vol. 4, Page 94**, v. 4, n. 4, p. 94, 12 nov. 2018.

ROBINSON, J.; HARDING, J. *The Oxford companion to wine*. 2015.

SGOUROS, G. et al. Biodiversity and Enological Potential of Non-Saccharomyces Yeasts from Nemean Vineyards. **Fermentation 2018, Vol. 4, Page 32**, v. 4, n. 2, p. 32, 2 maio 2018.

SIEDENBERG, D. R.; THAINES, A. H.; BAGGIO, D. K. DESENVOLVIMENTO REGIONAL SOB A ÓTICA DO RECONHECIMENTO DA INDICAÇÃO GEOGRÁFICA: O CASE DO VALE DOS VINHEDOS, A PARTIR DA PERCEPÇÃO DOS ATORES SOCIAIS. **Gestão & Regionalidade**, v. 33, n. 99, 29 ago. 2017.

TAVARES, S. C. C. DE H.; LIMA, M. F.; MELO, N. F. DE. Principais doenças da videira e alternativas de controle. **A viticultura no Semi-Árido Brasileiro**, p. 293–346, 2009.

TROMBINI, C. N.; BRISOLA, E. M. A.; ÁVILA, M. A. x. **Interação - Revista de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 17 maio 2022.

VAN WYK, N. et al. The Whiff of Wine Yeast Innovation: Strategies for Enhancing Aroma Production by Yeast during Wine Fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 49, p. 13496–13505, 11 dez. 2019.

VERGINER, M.; LEITNER, E.; BERG, G. Production of Volatile Metabolites by Grape-Associated Microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8344–8350, 28 jul. 2010.

VERO, S. et al. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, n. 1, p. 91–98, 1 ago. 2002.

VILELA, A. Use of Nonconventional Yeasts for Modulating Wine Acidity. **Fermentation 2019, Vol. 5, Page 27**, v. 5, n. 1, p. 27, 18 mar. 2019.

VOUILLAMOZ, J.; HEREDITY, M. G. Genealogy of wine grape cultivars: 'Pinot' is

related to “Syrah”. **nature.com**, 2006.