



LAÍS CARVALHO SILVA

**ESTUDO DA MICROBIOTA *TERROIR* EM UVAS VINÍFERAS
UTILIZADAS NA ELABORAÇÃO DE VINHOS DE INVERNO:
MINAS GERAIS**

LAVRAS – MG

2019

LAÍS CARVALHO SILVA

**ESTUDO DA MICROBIOTA *TERROIR* EM UVAS VINÍFERAS UTILIZADAS NA
ELABORAÇÃO DE VINHOS DE INVERNO: MINAS GERAIS**

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

Orientador

Prof. Dr. LUÍS ROBERTO BATISTA

Coorientadora

M.e NATHASHA DE AZEVEDO LIRA

LAVRAS-MG

2019

LAÍS CARVALHO SILVA

**ESTUDO DA MICROBIOTA *TERROIR* EM UVAS VINÍFERAS UTILIZADAS NA
ELABORAÇÃO DE VINHOS DE INVERNO: MINAS GERAIS**

**TERROIR MICROBIOTE STUDY IN VINEYAR GRAPES USED IN WINTER
WINES: MINAS GERAIS**

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 22 de Novembro de 2019.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista - UFLA

M.e Nathasha de Azevedo Lira - UFLA

Profa. Dr(a) Fabiana Reinis Franca Passamani - UFLA

Orientador

Prof. Dr. LUÍS ROBERTO BATISTA

Coorientadora

M.e NATHASHA DE AZEVEDO LIRA

LAVRAS-MG

2019

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 Juliana, minha irmã Luciana e minha avó Maria Guides que sempre me colocou em orações, a toda minha família que me manteve motivada, me incentivando e me amparando nos momentos que senti dificuldades, sem vocês tenho certeza que não teria conseguido.

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, que mesmo na correria das nossas rotinas sempre tirou um tempinho para me ajudar e tirar minhas dúvidas, agradeço também por ter me dado a oportunidade de começar no laboratório em atividade vivencial, seguir para a iniciação científica e finalmente fazer o meu Trabalho de Conclusão de Curso na área de microbiologia, que tanto aprendi a gostar.

À minha coorientadora e amiga Nathasha Lira, não tem palavras que consigam demonstrar toda a minha gratidão à você, todos os ensinamentos, orientações, todas as risadas e conversas, todas as vezes que me ajudou, do início ao fim dos meus trabalhos no laboratório, sempre solícita e disposta. Foi um prazer enorme ser a sua “pupila” e ter aprendido tudo que sei sobre microbiologia com você. Muito obrigada por tudo, você foi essencial para que esse trabalho acontecesse.

A minha ajudante Ana Cláudia Terra, muito obrigada por ter dedicado tanto tempo para me ajudar na rotina do laboratório e a obter os meus resultados, espero que eu também tenha conseguido te ensinar um pouquinho do que aprendi.

A todos os meus amigos do laboratório e do Netax que sempre me ajudaram de “boa vontade” nas diversas atividades envolvidas neste trabalho, Lorena, Miriam, Suzana, Renan, Rafaela, Amanda, Anielli, Michelle, Fernanda, Luciano e Fabiana.

As minhas amigas que sempre me ajudaram tirando todas as minhas dúvidas sobre word, excel, formatação e normas para se escrever o TCC corretamente, Fernanda, Gabriela, Rafaela, Raíssa, Beatriz, Gabi Couto, Ana Elisa, Giovana e Lívia. A ajuda de todas vocês foi essencial.

Ao departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras pelo suporte e oportunidade e ao vitivinicultor que forneceu as amostras para que este projeto de pesquisa acontecesse. Muito obrigada!

RESUMO GERAL

A uva (*Vitis vinifera* L.) considerada uma matriz complexa é constituída por diversos compostos que possibilitam o desenvolvimento de microrganismos. Porém, não somente a uva deve ser levada em consideração para o estudo da microbiota *terroir*, fatores como os microrganismos, o clima, o solo, o relevo, as práticas enológicas e a localização geográfica do vinhedo são igualmente importantes, pois, influenciam na tipicidade, qualidade e no desenvolvimento de cada variedade de uva. Todos esses fatores afetam diretamente a elaboração dos vinhos, onde o estudo da microbiota *terroir* nas uvas se faz necessário pois é um importante elemento que indica a qualidade e segurança dos alimentos, uma vez que é possível observar as influências positivas e negativas dos microrganismos nas características presentes no vinho. Conseqüentemente, o objetivo do trabalho foi analisar a diversidade de leveduras, fungos filamentosos e bactérias de uvas viníferas da variedade Syrah de um vinhedo localizado em Três Pontas, Minas Gerais. Para isso, técnicas de identificação morfológica juntamente com a identificação por Maldi-TOF MS foram utilizadas. Os resultados encontrados para fungos filamentosos demonstram uma predominância dos gêneros *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. com as espécies identificadas *A. aculeatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, e o Complexo *Cladosporium Cladosporioides* e em menor incidência a espécie *Penicillium decumbens*. Para leveduras as espécies identificadas foram: *Aerobasidium pullulans*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora uvarum* e *Sarocladium strictum*. Nas bactérias totais foram identificadas as espécies *Arthrobacter gandavensis*, *Arthrobacter koreensis*, *Curtobacterium albidum*, *Pantoea aglomerans*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus warneri*. Para bactérias lácticas, nenhum dos isolados foram identificados e para bactérias acéticas, *Gluconobacter cerinus* e *Gluconobacter oxydans*. A partir dos testes realizados nos isolados potencialmente produtores de toxinas, somente a espécie *Aspergillus flavus* foi produtora de aflatoxina B1 e B2. Tanto para fungos filamentosos, leveduras e bactérias, um grande número de isolados não foram identificados pelas técnicas utilizadas devido a deficiência do banco de dados utilizado, nos levando a concluir que estudos futuros são necessários para se obter uma melhor caracterização da diversidade de microrganismos.

Palavras-chave: Maldi-TOF MS, diversidade de microrganismos, fungos filamentosos, leveduras, bactérias.

Sumário

1-Introdução	7
2- Objetivo Geral.....	8
2.1- Objetivo Específico.....	8
3. Referencial teórico	8
3.1 Regiões produtoras de vinhos no mundo	8
3.2 Vitivinicultura no Brasil.....	9
3.3 Minas Gerais	10
3.3.1 Forma de cultivo.....	12
3.3.2 Syrah	13
3.4 Uvas.....	14
3.5 Microbiota terroir	15
4 Materiais e Métodos	16
4.1 Amostragem	16
4.2 Isolamento e Identificação de fungos filamentosos, leveduras e bactérias	17
4.2.1 Isolamento de fungos filamentosos e leveduras	17
4.2.2 Identificação morfológica de fungos filamentosos.....	18
4.2.3 Isolamento de bactérias totais, bactérias lácticas e bactérias acéticas.....	19
4.3 Identificação por técnica de espectrometria de massa.....	20
4.4 Avaliação do potencial toxigênico	22
4.5 Preservação dos microrganismos em coleção de cultura	22
5 Resultados e Discussões.....	23
5.1 População total dos grupos de microrganismos isolados nas uvas Syrah	23
5.2 Diversidade de fungos filamentosos	24
5.3 Diversidade de leveduras	27
5.4 Diversidade de bactérias totais.....	30
5.5 Diversidade de bactérias lácticas	30
5.6 Diversidade de bactérias acéticas.....	32
6. Discussão.....	34
7. Conclusão.....	37
8. Referências.....	37

1-Introdução

A vitivinicultura brasileira, atividade que envolve desde o cultivo das vinhas até a fabricação do vinho, vêm aumentando a cada ano. Segundo dados da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) de 2017, os brasileiros consomem per capita cerca de 1,7 litros, uma vez que o Brasil contempla a 17ª posição no consumo da bebida fermentada da uva, com um total de 330 milhões litros consumidos. O consumidor está começando a procurar por vinhos finos, produzidos a partir de uvas viníferas à medida que a sua renda e busca por qualidade aumentam.

Segundo Protas e Camargo (2011), a produção vitivinícola em Minas Gerais, tem seu destino dividido em três tipos de produção, sendo elas, uvas para a elaboração de vinho de mesa e suco de uva, uvas de mesa para consumo e uvas viníferas para a elaboração de vinhos finos.

Os vinhos de inverno da região de Minas Gerais têm essa definição pois a colheita é realizada entre os meses de julho e outubro, período de estiagem que viabiliza a produção de uvas de alta qualidade, favorecendo o desenvolvimento de taninos, antocianinas e outros polifenóis que propiciam a produção de vinhos finos (PROTAS; CAMARGO, 2011).

A tipicidade e identidade de um vinho produzido em uma determinada região, é fortemente influenciada pela microbiota *terroir* da mesma, sendo esta formada pelas interações entre o ambiente físico e biológico como os microrganismo, o clima, o solo, a altitude, o relevo, a temperatura e o volume de chuvas (REVISTA ADEGA,2010). Os microrganismos vivem em co-associações complexas com as videiras, o que influencia nas características da planta, na produtividade das uvas, possibilitando melhorar os processos de fermentação (GILBERT; LELIE; ZARRAONAINDIA, 2014).

Portanto, o estudo sobre a diversidade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos contribuem para o cultivo de uvas com qualidade e conseqüentemente, influenciam na elaboração de vinhos que possuem atributos organolépticos únicos na bebida final.

2- Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade de microrganismos presentes em uvas viníferas, variedade Syrah, cultivadas em um vinhedo localizado na região de Três Pontas, Minas Gerais.

2.1- Objetivo Específico

- Avaliação da diversidade de microrganismos por técnica dependente de cultivo;
- Isolamento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos associadas a uvas Syrah para caracterização da microbiota *terroir* da região de estudo;
- Identificação dos microrganismos por técnica morfológica e através do perfil proteico;
- Preservação dos microrganismos identificados na coleção de cultura;

3. Referencial teórico

3.1 Regiões produtoras de vinhos no mundo

Regiões subtropicais, tropicais e de clima temperado são as principais localizações responsáveis pela produção mundial de vinhos. Nas regiões vitivinícolas de clima temperado, como na Itália, na França, nos países ibéricos e nas regiões próximas ao mar Mediterrâneo, o verão se mostra quente e seco. Outras regiões como os Estados Unidos, a Austrália e a África do Sul apresentam clima estival quente (GUERRA et al., 2006). Os três países que recebem o título de maiores produtores de vinhos do mundo são a França, a Itália e a Espanha (QUINTELA et al., 2011). Os países que se destacam por essa atividade na América do Sul são o Chile e a Argentina, sendo este último, a região produtora de vinhos localizadas nas províncias de Mendoza e San Juan (MAGNOLI et al., 2004).

Muitas regiões do mundo têm grande potencial para a produção em volume de vinhos tintos, por serem regiões consideradas tradicionais pela história e qualidade do vinho, como a região de Bordeaux, localizada no sudoeste da França, a mais importante produtora de vinhos tintos do mundo. Outra com grande destaque no setor é a região de Borgonha, produtora de vinhos tintos a partir de uma única variedade, a Pinot Noir. A Itália, segunda maior produtora mundial, na região da Toscana central, adota o vinho tinto por preferência nacional, o que corresponde a 80% de sua produção. Com 1,25 milhões de hectares de parreiras, a Espanha é considerada o terceiro maior país em produção mundial, com a maior área plantada em vinhedos de todo o mundo, sendo o norte da Espanha a região mais importante em relação aos tintos,

principalmente no cultivo da variedade Tempranillo. No oeste da península Ibérica, em Portugal, existem quase todos os estilos de vinhos tintos, onde a principal uva portuguesa é a Touriga Nacional, seguida pela Tempranillo (VIOTTI, 2010; INVESTIMENTOS E NOTÍCIAS, 2017).

3.2 Vitivinicultura no Brasil

A uva foi introduzida no Brasil no ano de 1532, em São Paulo. O cultivo das variedades de *Vitis vinífera* provenientes de Portugal e da Espanha permaneceu por algum tempo ficando limitado no território nacional à pequenas áreas dispersas (CALDAS et al., 2008). Até o final do século XIX, a variedade perdurou como cultura doméstica, convertendo-se em atividade comercial a partir da colaboração dos imigrantes italianos instituídos no sul do país no início do século XX (PROTAS et al., 2006).

No final do século XX, mais precisamente na década de 80, a partir de incentivos do mercado interno, houve um aumento de investimentos no setor industrial com a implantação e modernização das vinícolas (setor industrial), voltadas para a produção de uvas para a elaboração de vinhos finos de qualidade com base nas variedades de *Vitis vinífera* (GÓES, 2005; PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

As regiões vinícolas do Brasil abrangem o Sul, o Sudeste e o Nordeste, ocupando uma área de aproximadamente 71 mil hectares, desde de regiões localizadas próximas à Linha do Equador (latitude de 5° 11' 15'') até o extremo sul do país (latitude 30° 56' 15'').

Por apresentar extensão territorial vasta e diversas condições climáticas pelo país, existem diferentes áreas produtivas sendo elas: áreas temperadas com período de repouso hibernar , áreas subtropicais onde a parreira é cultivada em dois ciclos anuais e áreas de viticultura tropical, em que os ciclos vegetativos podem ser realizados de dois a três vezes por ano (PROTAS;CAMARGO;MELO, 2006).

No Brasil, podemos encontrar nove regiões onde a vitivinicultura é uma atividade tradicional que incluem o cultivo de uvas para a produção de sucos e/ou a fabricação de vinhos, classificadas em três zonas. As zonas tropicais destacam-se a região norte de Minas Gerais, o noroeste de São Paulo e o Vale do Submédio do São Francisco. O norte do Paraná é considerado uma zona subtropical. As regiões da Serra do Sudeste e Serra Gaúcha, no estado do Rio Grande do Sul; a região do Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina; as regiões da fronteira; a região sudeste de São Paulo e sul de Minas Gerais se caracterizam como sendo zonas temperadas (IBRAVIN, 2010).

Como consequência deste cenário histórico-cultural, diversidade de regiões e tipos de cultivo, alguns vinhos brasileiros têm conquistado reconhecimento nacional e internacional devido a evidente evolução qualitativa e notáveis melhorias em relação ao emprego de cultivares finas e as técnicas enológicas. Todavia, para o consumo de vinhos de mesa as melhorias não se aplicam devido à matéria prima utilizada ser de menor potencial enológico (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2001, 2006; TONIETTO, 2002).

A partir de dados levantados pela Organização Internacional do Vinho e da Vinha (OIV) (2017), o Brasil classificou-se entre os 20 países mais importantes do mundo na produção de vinhos, entre os anos de 2009 e 2012, onde de acordo com Protas et al., (2013), o estado do Rio Grande do Sul foi o responsável por 95% da produção de uvas no Brasil. Resultado que reafirma os investimentos em tecnologias modernas de vinificação e produção de uvas europeias com o intuito de melhorar a qualidade do vinho nacional, o que refletiu em diversos prêmios em provas nacionais e internacionais de vinhos (SATO e ANGELO, 2007).

Em 2017, a produção de uvas no Brasil destinadas ao processamento, sendo ele para vinho, suco e derivados, foi de 818.783 milhões de quilos, valor que representou 48,74% da produção total de uvas, e os outros 51,26% foi destinado ao consumo *in natura* (MELLO, 2017).

Vinhos são definidos pela legislação brasileira como sendo obtidos da fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura. Já a denominação de vinhos finos, é utilizada para a produção dos mesmos a partir de uvas da espécie *Vitis Vinifera L.* onde as principais variedades são: *Carbenet Sauvignon, Malbec, Pinot Noir, Tempranillo, Syrah*, dentre outras, e os vinhos classificados como comuns são produzidos de uvas americanas como a *Vitis labrusca* e suas variedades (*Concord, Isabel, Niágara Branca*, como por exemplo) e seus híbridos. A classificação emprega a diferenciação entre as espécies de uvas usadas na elaboração do vinho e não em critérios de qualidade (AMORIM et al., 2006).

3.3 Minas Gerais

Em Minas Gerais, a vitivinicultura iniciou suas atividades no século 19, a partir do cultivo de *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*, videiras de origem americana. Ao longo da história, os municípios de Caldas, Andradas e Santa Rita de Caldas, ficaram conhecidos como os principais produtores de vinhos de mesa, elaborados com as variedades Jacquez e Niágara além da variedade Bordô que ficou denominada na região por “Folha de Figo”, (PROTAS; CAMARGO, 2010).

No estado mineiro, a produção vitivinícola é formada por três segmentos sendo eles, um tradicional na região sul do estado, com objetivo principal o cultivo de uvas americanas e híbridas para a fabricação de suco de uva e vinho de mesa, um segundo segmento no norte do estado, na região de Pirapora, com foco na produção de uvas de mesa sob condições irrigadas e um terceiro, mais recente e propagado em áreas de altitude do estado, objetivando a produção de uvas viníferas para a elaboração de vinhos finos. Todos os três segmentos possuem características específicas relacionadas a estratégias de comercialização, tecnologia de produção e de estrutura fundiária (PROTAS; CAMARGO, 2011).

No início do século XX, pesquisadores do Núcleo Tecnológico Uva e Vinhos da EPAMIG, em parceria com a Fazenda Santa Fé localizada no município de Três Corações, começaram a estudar a possibilidade de adaptar o cultivo de variedades europeias (*Vitis vinífera*) na região de Minas Gerais. Após a realização de uma série de experimentos com as cultivares europeias testadas, a variedade Syrah foi a que melhor se adaptou ao clima temperado quente a uma altitude entre 800 e 900m (AMORIM; FAVERO; REGINA, 2005; IBRAVIN, 2012).

Posteriormente a esse estudo, cidades como Três Corações, Três Pontas, Cordislândia, Varginha, Diamantina, Andradas, Santana dos Montes, entre outras também começaram a cultivar a variedade Syrah (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS - EPAMIG, 2006).

Minas Gerais foi responsável pela produção de 13.070 toneladas de uvas no ano de 2017, com uma área de cultivo de 907 hectares, representando um aumento na produção de uvas de 16,45% quando comparado ao ano anterior, onde a produção foi de 11.224 toneladas em 911 hectares (MELLO, 2017).

O estado está despontando no mercado atual como produtor de uvas de qualidade utilizadas na elaboração de vinhos finos, com destaque especial para a cidade de Três Corações, na Fazenda da Fé, com o vinho Primeira Estrada, que venceu a Grande Prova de Vinhos do Brasil em 2016, sendo reconhecido como o primeiro vinho fino produzido em Minas Gerais (FOLHAPRESS, 2019). E também merece destaque o vinho Maria Maria Bel Sauvignon Blanc 2015, da cidade de Três Pontas com o cultivo da uva na Fazenda Capetinga, que foi vencedor da categoria bronze do prêmio Decanter World Wine Awards 2017 em Londres (VINHOSMARIAMARIA,2019).

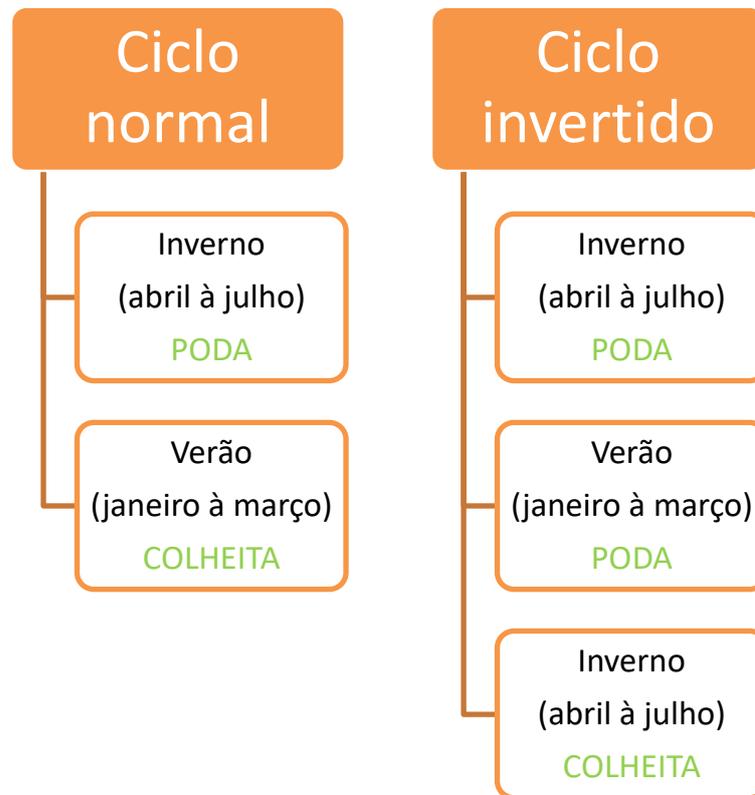
3.3.1 Forma de cultivo

Com a inserção da variedade europeia (*Vitis vinífera*) na região, observou-se que a videira encontrou dificuldades para o seu estabelecimento devido ao ciclo normal de brotamento, amadurecimento e colheita das uvas. No Brasil, na maioria das regiões, a poda ocorre entre os meses de repouso da videira (abril e julho), ou seja, no período de inverno e a colheita que ocorre entre os meses de janeiro e março é o período de verão, estação do ano onde há um alto índice pluviométrico o que não favorece o amadurecimento das uvas empregadas na elaboração de vinhos devido ao crescimento de fungos filamentosos deterioradores (MOTA et al., 2010).

Assim sendo, o ciclo da videira na região de Minas Gerais foi alterado por meio da realização de duas podas, uma em julho e outra em janeiro, permitindo a formação de ramos produtivos e a eliminação de alguns cachos, onde a planta começa a brotar em fevereiro, tem o início da floração em março e em abril a formação de cachos, sendo a colheita realizada no inverno, esse processo é denominado de ciclo invertido da videira. O inverno em Minas Gerais é caracterizado por noites frias e dias secos com grande amplitude térmica diária, fazendo com que essa inversão no ciclo da videira traga benefícios para o fruto tais como, a fixação de aromas, o acúmulo de polifenóis essenciais para a longevidade e estrutura do vinho, um lento amadurecimento da uva e uma alta concentração de açúcar devido ao amadurecimento fenólico completo, visto que não ocorrem chuvas durante a etapa da colheita (MOTA et al., 2010).

A diferença entre os dois ciclos pode ser vista pelo fluxograma abaixo (figura 1):

Figura 1: Ciclo normal e ciclo invertido da videira



Fonte: Da autora (SILVA,2019)

3.3.2 Syrah

A variedade Syrah é a variedade vinífera mais plantada no mundo e tem como característica a produção de vinhos com aroma e buquê marcantes, além de acumular altos teores de sólidos solúveis totais se comparada com outras variedades. Foi cultivada na França há muito tempo e se estendeu para outros países chegando ao Rio Grande do Sul em 1921, porém as condições climáticas para o cultivo não foram propícias. Atualmente, a variedade tem se desenvolvido e mostrado bons resultados nas áreas semiáridas do Nordeste, com destaque para a região do Vale do Submédio São Francisco bem como na região Sul de Minas Gerais, onde a variedade é a que mais se adaptou às características ambientais da região (GUERRA et al., 2009).

De acordo com a figura 2, a variedade possui cachos medianos, compactos, cilindros-cônicos com pedúnculos longos e suas bagas são ovaladas, de pequenas a medianas com uma coloração negro azulada que tendem a desidratar em estágio avançado de maturação.

Figura 2: Uva variedade Syrah



Fonte: Foto feita pela autora (SILVA,2019)

3.4 Uvas

A uva pode ser incorporada na alimentação humana de diversas maneiras, sendo consumida como uva passa, na forma de sucos, doces e usada na produção de vinhos visto que para cada destino final de produção há uma época certa para a colheita. Uvas destinadas ao consumo in natura, são colhidas quando o teor de açúcar e o grau de acidez atingem valores pré-estabelecidos, mínimo de 14% para o teor de açúcar e uma acidez que varia entre 5 a 10 g/L , assim ocorre também para uvas destinadas a elaboração de vinhos, onde fatores como a região, o tipo de vinho a ser fabricado e as condições naturais da safra, vão determinar a época certa da colheita (MATSUOKA, 2006). Além do estágio de maturação da uva e da disponibilidade de nutrientes, fatores como doenças, condições climáticas e as práticas agrícolas influenciam na diversidade microbiana de cada região (SETATI et al., 2012). Os microrganismos como bactérias, fungos e leveduras encontrados naturalmente nas uvas que atuam na etapa de vinificação e no tempo de armazenamento do vinho, podem influir tanto de forma negativa quanto positiva nas características dos vinhos (BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012).

Tanto na fermentação alcoólica quanto na malolática os microrganismos, naturalmente presente nas bagas das uvas, produzem compostos que promovem características específicas ao vinho, porém a existência de algumas espécies de fungos filamentosos patogênicos podem causar algumas doenças na videira como a podridão-negra e o míldio, levando a produção de micotoxinas e defeitos sensoriais, como aromas terrosos e de mofo. (LIKAR et al., 2015).

3.5 Microbiota *terroir*

A palavra *terroir* está diretamente relacionada as interações entre os fatores humanos e o meio natural, promovendo características únicas nas uvas que influenciarão na qualidade, tipicidade e identidade de um vinho denominado como “vinho de *terroir*”. Dentre os fatores relacionados ao meio natural podemos citar o solo, o clima, o relevo, a localização geográfica e os microrganismos, e associados a interações humanas, as práticas enológicas e a escolha das variedades (TONIETTO, 2007).

O *terroir* vitivinícola foi definido em 2010 pela Organização Internacional do Vinho e da Vinha (OIV) como sendo um conceito relacionado à um espaço reconhecido capaz de conferir características únicas a produtos originários desse espaço a partir de fatores biológicos e físicos identificadas no local, assim também como as práticas vitivinícolas realizadas na região.

Para o setor vitivinícola, é de extrema importância analisar a diversidade microbiana ligada as videiras com o intuito de garantir a produção de uvas saudáveis e como consequência vinhos de elevada qualidade (KNIGHT et al., 2015), uma vez que os microrganismos associados as plantas são importantes na modulação das características fisiológicas do vegetal, tanto no crescimento, fitossanidade, quanto no conteúdo nutricional (VACHER et al., 2016).

Vários estudos recentes apontam que o *terroir* microbiano, diferenças regionais na composição microbiana relacionada as uvas, está correlacionado com as características sensoriais e regionais de um vinho (BOKULICH et al., 2016; GILBERT; VAN DER LELIE; ZARRAONAINDIA, 2014), onde esses fatores regionais, climáticos e também a comunidade microbiana, são responsáveis por promover uma seleção não aleatória da microbiota *terroir* associada à um local ou produto (BOKULICH et al., 2014).

A partir desse conceito de *terroir*, os microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos presentes naturalmente na uva e quando associados aos fatores humanos e ambientais são de extrema importância na qualidade dos vinhos pois, toda essa carga microbiana inicial juntamente com as leveduras iniciadoras adicionadas ao mosto, cepas escolhidas propriamente para uso em processos de vinificação, irão agir na fermentação

produzindo metabólitos e enzimas que atuam diretamente na caracterização e qualidade do vinho (BARRAJÓN et al., 2009; FLEET, 2003).

Relacionando as espécies microbianas com a sua importância tecnológica na uva, elas podem ser divididas em três grupos, sendo eles: 1- espécies controladas facilmente, pois não fermentam açúcares e são incapazes de sobreviver e comprometer a qualidade na produção dos vinhos; 2- espécies utilizadas na fermentação, como a *Saccharomyces cerevisiae*, espécies fermentativa de grande importância; 3- espécies responsáveis por alterações nos vinhos, como por exemplo as leveduras do gênero *Pichia spp.* Responsável pela formação de uma película sobre o vinho causando *off-flavor* (MALFEITO-FERREIRA, 2011).

A levedura do gênero *Saccharomyces sp.* é a principal levedura utilizada no processo de fermentação, sendo encontrada de forma natural nas uvas, produzindo uma série de enzimas que lhe conferem características especiais (FLEET, 2003). Porém, os responsáveis pelas propriedades organolépticas dos vinhos são as leveduras não *Saccharomyces*, presentes no processo fermentativo inicial, dentre elas os gêneros *Kloeckera*, *Cryptococcus*, *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Metschnikowia*, *Debaromyces*, *Issatchenkia* e *Rhodotorula*, produzindo enzimas como a β -glicosidase, aumentando a quantidade de substâncias voláteis e o aroma no produto final (BEZERRA, 2012).

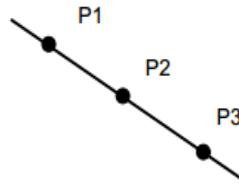
4 Materiais e Métodos

4.1 Amostragem

Amostras de uva tinta da variedade Syrah foram coletadas em uma vinícola localizada na cidade de Três Pontas, na região Sul de Minas Gerais. As amostras foram colhidas no mês de julho, caracterizando a safra 2018, no estágio final de maturação das bagas, ou seja, época da colheita.

A partir de um transecto diagonal (Figura 3) traçado ao longo do vinhedo, foi possível coletar em três pontos equidistantes, desprezando-se as extremidades, três cachos de uva em cada um dos pontos (P1, P2, P3), onde as coordenadas geográficas dos mesmos podem ser observadas na tabela 1.

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 uva da variedade Syrah na vinícola localizada em Três Pontas, região sul de Minas Gerais.

Pontos	Local de coleta	Coordenadas Geográficas		
		Latitude	Longitude	Altitude
P1	R30P25	21°36'49"	45°07'42"	989
P2	R60P50	21°36'47"	45°07'41"	988
P3	R90P75	21°36'50"	45°07'40"	985

R: rua; P: planta.

Fonte: Dados obtidos pela autora (2018).

Após a coleta, as amostras foram armazenadas em sacos estéreis, transportadas em caixas térmicas para a Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos no Laboratório de Micologia e Micotoxinas, onde foram congeladas e posteriormente analisadas.

4.2 Isolamento e Identificação de fungos filamentosos, leveduras e bactérias

4.2.1 Isolamento de fungos filamentosos e leveduras

Para o isolamento foi utilizada a técnica de diluição seriada e do plaqueamento em superfície, onde foram coletadas 25 g de bagas de uva, escolhidas aleatoriamente, adicionadas a 225 ml de água peptonada a 0,1% para obtenção do mosto. As bagas foram maceradas e em

seguida, mantidas sob agitação no Stomacher (METROTERM), 490 batidas por 2 minutos. Posteriormente, foi realizada a diluição seriada do mosto (1:10, 1:100 e 1:1000) onde alíquotas de 0,1 ml das diluições foram espalhadas na superfície dos meios de cultura até total esgotamento.

Os meios de cultura utilizados para isolamento de fungos filamentosos foram o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (10,0 g de glicose; 5,0 g de peptona bacteriológica; 1,0 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mL de solução 5% de rosa de bengala; 1,0 mL de dicloran; 1.000 mL de água destilada; 15,0 g de ágar; 1 mg de cloranfenicol) e Extrato de Levedura, Peptona e Glicose (YEPG) (Extrato de Levedura 1%; Peptona Bacteriológica 2%; Glicose 2%, Agar 1,5%) Logo após a diluição seriada, as placas de DRBC e YEPG foram incubadas em BOD à 25° C por 7 dias e 28°C por 7 dias respectivamente. Após o período de incubação, foram escolhidas placas onde a quantidade de colônias de fungos e leveduras estivessem entre 15 e 150, utilizando-se da técnica de raiz quadrada para determinar quantos microrganismos seriam isolados em diferentes morfotipos. Para a caracterização por morfotipos de fungos filamentosos, observaram-se características como 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.

O procedimento foi igualmente repetido para isolamento das leveduras, no entanto as placas de DRBC e YEPG foram incubadas por 48hs. Após a caracterização dos morfotipos, onde foram observadas forma, tamanho, superfície, bordas, cor e perfil da colônia os isolados foram passados para meio de purificação YEPG a 28°C por 48hs e em seguida as colônias consideradas puras foram caracterizadas quanto a sua morfologia e reprodução.

4.2.2 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 cada gênero permitindo assim a sua identificação. Para *Penicillium* e *Aspergillus*, usaram-se os meios Czapeck yeast Ágar (CYA) (K_2HPO_4 : 1,0 g; concentrado czapec: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1 L; (concentrado czapec: NaNO_3 : 30,0 g, KCl: 5,0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 5,0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,05 g, água destilada: 100 mL), com incubação a 25°C e a 37° por 7 dias e o meio Ágar extrato de malte (MEA) (extrato de malte: 20,0 g, peptona: 1,0 g, glucose: 30,0 g, ágar: 20 g, água destilada: 1 L), a 25°C por 7 dias, de

acordo com o Manual de Klich (2002) para o gênero *Aspergillus* e o Manual de Pitt (2000) para o gênero *Penicillium*. O Manual de Samson et al. (2000) foi utilizado para os demais gêneros, incubando os isolados em meio MEA, A 25°C. Após sete dias de incubação, 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, em seguida foram comparadas com os manuais de identificação.

4.2.3 Isolamento de bactérias totais, bactérias lácticas e bactérias acéticas

No isolamento de bactérias totais, utilizou-se o mesmo método de isolamento já descrito para fungos filamentosos e leveduras (4.2.1) ressaltando o meio de cultura, onde o meio Ágar nutriente (Peptona 5g, Extrato de carne 3g, Cloreto de sódio 8g, Ágar 15g) foi empregado. As placas foram incubadas em BOD à 30°C por um período de 48 hrs .

Para o isolamento de bactérias lácticas e acéticas, após o descongelamento das amostras, 10 g de bagas de uva escolhidas aleatoriamente foram adicionadas a 10 ml de água peptonada 0,1% representando uma diluição 1:1 para obtenção do mosto. As bagas de uva foram maceradas e mantidas sob agitação no Stomacher (METROTERM), 490 batidas por 2 minutos. Logo em seguida, alíquotas de 0,1ml da diluição foram espalhadas na superfície dos meios de cultura até total esgotamento.

O meio de cultura utilizado para o isolamento de bactérias lácticas foi o Ágar Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (peptona especial 10g, extrato de carne bovina 10g, extrato de levedura 5g, glicose 20g, citrato triamônio 2g, acetato de sódio 5g, sulfato de magnésio 0,2g, sulfato de manganês 0,05g, fosfato dipotássico 2g), onde as placas foram incubadas em BOD à 30°C por 5 dias em caixas de anaerobiose. Para bactérias acéticas, foi utilizado o meio de cultura GYEC (Extrato de Levedura 10g; Carbonato de Cálcio 20g; Ágar 20g) com pH 5.2 e incubadas à 30°C por 48hs.

Finalizado o período de incubação, foi realizada a caracterização por morfotipos e retirada a raiz quadrada para obter o número de isolados. As características morfológicas observadas para as bactérias foram as mesmas já citadas e utilizadas em leveduras. Para todos

os tipos de isolados de bactérias, os próprios meios utilizados para o isolamento foram usados na etapa de purificação. Após a obtenção das colônias puras foram realizadas análise de coloração de Gram e com o auxílio de microscópio foram observada a forma (cocos, bacilos, vibrião e espirilo), arranjo (diplococos, estreptococos, estafilococos) e a qual grupo pertenciam (Gram positiva ou Gram negativa) .

4.3 Identificação por técnica de espectrometria de massa

Os isolados de leveduras, fungos filamentosos e bactérias, após purificação e avaliação morfológica foram submetidos à técnica de espectrometria de massa pelo aparelho MALDI-TOF MS (técnica de dessorção/ionização a laser assistida por matriz, seguida de espectrometria de massas por tempo de voo) com o intuito de identificar os isolados à nível de gênero ou espécie e quando não possível, agrupar os mesmos a partir dos seus perfis de proteína ribossomais. Para tal, as colônias puras foram crescidas em meios específicos, incubadas em BODs por tempos e temperaturas determinadas como descrito na tabela abaixo:

Tabela 2: Discriminação das condições de crescimento dos microrganismos para identificação no Maldi-TOF MS.

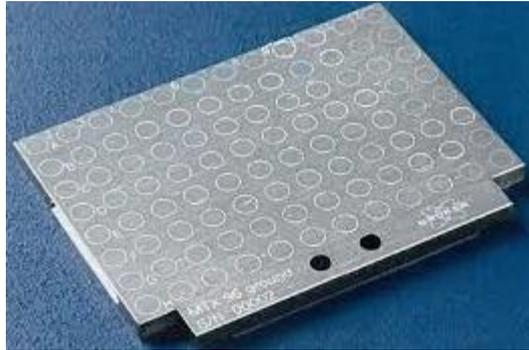
Microrganismo	Meio de cultura	Temperatura (T°) de incubação	Tempo de incubação
Fungos filamentosos	MA	25°C	3 dias
Leveduras	YEPG	28°C	20 horas
Bactérias lácticas	MRS*	30°C	20 horas
Bactérias acéticas	YEPG	30°C	20 horas
Bactérias totais	YEPG	30°C	20 horas

* Em anaerobiose

Fonte: Do autor (2019)

Após o crescimento, para fungos filamentosos, tomou-se uma amostra de cada colônia fresca e transferiu-se diretamente para a placa MALDI flex target (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), como na figura 4, onde foi adicionado em cada “pocinho” 1 uL de solução matriz (solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) 33% etanol; 33% acetoneitrila; 33% água com 10% de ácido trifluoracético - TFA) (OLIVEIRA et al. 2015).

Figura 4: Placa Maldi flex target



Fonte: Core facility net (2014)

Para leveduras, uma amostra de cada isolado foi transferida para microtubo estéril, onde foram adicionados aproximadamente 7 uL de solução de ácido fórmico 25% em cada microtubo e então homogeneizados por 1 minuto em vórtex. Logo após, os microtubos foram colocados no banho maria ultrassônico (Unique UltraSonic Cleaner) por 5 minutos e posteriormente, 0,7 uL desta suspensão foi transferido para os “pocinhos” da placa MALDI flex target, onde se esperou a quase completa evaporação para adicionar 1 uL da solução matriz (OLIVEIRA et al. 2015).

Para os isolados de bactérias, o procedimento segue a mesma metodologia das leveduras trocando-se apenas a solução de ácido fórmico por uma solução orgânica (33% etanol; 33% acetonitrila; 33% água com 10% de ácido trifluoracético - TFA) e retirando-se a etapa de passagem pelo UltraSonic. Para todos os microrganismos, as análises foram realizadas em triplicata permitindo a avaliação da reprodutibilidade e qualidade dos espectros (OLIVEIRA et al. 2015).

Foi empregado a cepa *Escherichia coli* K12 na calibração do equipamento, transferindo-se uma amostra de material celular de uma única colônia em triplicata para a placa MALDI flex target, adicionando-se a mesma solução matriz (LIMA, 2017).

Após a montagem das placas com a matriz, o material é inserido no MALDI-TOF MS, onde é bombardeado com um laser que o evapora e um sistema ioniza e aspira o material volatilizado, que chega aos detectores os quais registram o tempo de voo e sua quantidade. Cada microrganismo tem um espectro de massa característico gerado, processados através do pacote de software 3.0 do MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para uma possível identificação microbiana, onde a avaliação dos resultados foi feita mediante score obtido de acordo com a tabela 3:

Tabela 3: Discriminação dos valores de score gerados pelo MALDI -TOF MS

Intervalo do SCORE	Descrição
<1,700	Identificação de espécie não confiável
1,700-1,999	Provável identificação de espécie
>2,000	Alta probabilidade de identificação de espécie

Fonte: Bruker

Os dendogramas foram analisados a partir de um conjunto de informações sendo elas, a divisão por cor gerada pelo Maldi-TOF MS, o nível de distância, onde quanto mais próximo de zero mais os isolados terão um perfil proteico semelhante, juntamente com as características morfológicas de cada isolado coletadas previamente e descritas nesse trabalho para cada tipo de microrganismo.

4.4 Avaliação do potencial toxigênico

Os isolados fúngicos considerados potencialmente toxigênicos encontrados nas amostras de uva avaliadas, foram testados quanto a produção de Ocratoxina A e aflatoxina B1 e B2, G1 e G2 seguindo o Método de Plug Agar de acordo com Filtenborg e Frisvad (1980). Os fungos foram inoculados em meio YES (*Yeast Extract Sucrose Agar*) para a detecção da produção de aflatoxina B1 e B2, G1 e G2 e para a detecção de ocratoxina A, foram inoculados em CYA (*Czapeck Yeast Ágar*), sendo incubados em BOD à 25°C, por 7 dias. Placas de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (Merk-Sílica Gel 60, 20x20) foram empregues juntamente com solução padrão de aflatoxina B1 e B2, G1 e G2 (Sigma-Aldrich) e de ocratoxina A, com a fase móvel composta por tolueno, ácido fórmico 90% e acetato de etila, na proporção de 60:10:30. Foi utilizada a luz ultravioleta com comprimento de onda de λ 366 nm em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER) para a confirmação quando a produção das toxinas, obtendo a cor roxo para ocratoxina A e azul violeta para aflatoxina B1 e B2.

4.5 Preservação dos microrganismos em coleção de cultura

Para a preservação dos isolados de fungos filamentosos, discos de papel filtro de 5mm aproximadamente foram cortados, autoclavados a 121°C sob 1 atm por 15 minutos e espalhados na colônia pura dos isolados a serem guardados, e em seguida, colocados em eppendorfs estéreis. O procedimento foi realizado em duplicata utilizando a técnica de Criopreservação à uma temperatura de -80°C.

Para a preservação de cada isolado de levedura utilizou-se 4 eppendorfs, em 2 deles foram pipetados 500ul de caldo YEPG, inoculou-se amostras da colônia com a alça de Platina onde foram incubados em BOD à 28°C por 48 horas. Após o tempo de incubação, adicionou-se em cada um dos eppendorfs mais 500ul de solução de glicerol 40%. Para os outros 2 eppendorfs do mesmo isolado foram pipetados 500ul de solução de glicerol 20% com posterior inoculação da amostra da colônia do isolado, em seguida todos os eppendorfs foram preservados à temperatura de -80°C e -10°C.

Para o armazenamento das bactérias foram utilizados os mesmos procedimento das leveduras com uma ressalva para a temperatura de incubação em BOD, que foi de 37°C.

Todos os isolados foram depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos (CCDCA), do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

5 Resultados e Discussões

5.1 População total dos grupos de microrganismos isolados nas uvas Syrah

A partir da amostra de uva analisada, foi possível a obtenção da população total dos microrganismos para os diferentes tipos de meios de cultura conforme descrito na tabela 4.

Tabela 1. População microbiana total e médias (UFC/g) nos meios DRBC, YEPG, Ágar nutriente, GYEC e MRS presentes nas amostras de uva avaliada.

Amostra de uva Syrah			
Microrganismos	Meios de cultura	População Total por Meio (UFC/g)	Média Total (UFC/g)
Fungos filamentosos	DRBC	$7,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
	YEPG	$2,6 \times 10^5$	
Leveduras	DRBC	$6,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
	YEPG	$2,3 \times 10^5$	
Bactérias totais	Ágar nutriente	$1,5 \times 10^5$	-
Bactérias acéticas	GYEC	$6,0 \times 10^3$	-
Bactérias lácticas	MRS	$3,9 \times 10^3$	-

Fonte: Do autor (2019)

Como visto na tabela 4, as populações médias totais tanto para leveduras quanto para fungos filamentosos se mostraram na mesma faixa, entre $1,5 \times 10^5$ e $1,6 \times 10^5$ UFC/g respectivamente. Ainda sobre fungos filamentosos e leveduras, pode-se observar também que houve uma maior incidência de microrganismos encontrados no meio YEPG quando comparado ao DRBC, fato que pode ser explicado devido as suas composições onde, de acordo com a ficha técnica do meio DRBC (NEOGEN, 2016) e do meio YEPG (NEOGEN, 2011), o meio de cultura YEPG é mais rico em nutrientes onde a combinação dos mesmos juntamente com a temperatura de incubação apropriada, permitem uma maior detecção de microrganismos.

As bactérias totais foram as que apresentaram uma população com maior incidência, $1,5 \times 10^5$ UFC/g, seguida das bactérias acéticas com população de $6,0 \times 10^3$ UFC/g e em menor incidência, as bactérias lácticas, com população de $3,9 \times 10^3$ UFC/g.

5.2 Diversidade de fungos filamentosos

Foram obtidos um total de 63 isolados de fungos filamentosos, onde as espécies demarcadas por círculos na figura 5, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* foram as únicas espécies identificadas a partir do perfil proteico pelo método Maldi-TOF MS, identificação que quando comparada aos Manuais, foram as mesmas.

Os demais isolados de fungos filamentosos não foram identificados pelo método de perfil de proteínas, no entanto foi realizado um agrupamento, onde receberam uma denominação de acordo com a identificação morfológica obtida pelos Manuais, como pode ser observado pela tabela 5 e figura 5.

Tabela 5. Fungos filamentosos identificados morfológicamente e pelo perfil de proteínas.

Identificação Morfológica	Identificação por Maldi-TOF MS
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Aspergillus</i> sp.	-
Complexo <i>Cladosporium Cladosporioides</i>	-
<i>Fusarium</i> sp.	-
<i>Penicillium decumbens</i>	-
Morfotipo 1	-
Morfotipo 2	-

Os valores das populações dos isolados, de acordo com cada meio utilizado, estão dispostos na tabela 6, juntamente com a população total do mesmo na amostra de uva estudada.

Tabela 6. População de fungos filamentosos encontrada de acordo com cada meio utilizado.

Fungos filamentosos	População em DRBC (UFC/g)	População em YEPG (UFC/g)	População média total (UFC/g)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	-	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
<i>Aspergillus flavus</i>	-	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
<i>Aspergillus fumigatus</i>	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$
<i>Aspergillus niger</i>	$3,0 \times 10^3$	-	$3,0 \times 10^3$
<i>Aspergillus sp.</i>	$1,0 \times 10^4$	-	$1,0 \times 10^4$
Complexo			
<i>Cladosporium</i>	$3,2 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$
<i>Cladosporioides</i>			
<i>Fusarium sp.</i>	$8,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$6,5 \times 10^3$
<i>Penicillium decumbens</i>	$1,0 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$	$7,3 \times 10^2$
Morfotipo 1	-	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
Morfotipo 2	$1,0 \times 10^2$	-	$1,0 \times 10^2$
Morfotipo 3	$1,0 \times 10^4$	-	$1,0 \times 10^4$
Morfotipo 4	$1,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$

Fonte: Do autor (2019)

Foi possível observar que dentre os microrganismos encontrados, houve uma maior incidência do gênero *Cladosporium sp.* com população média total de $5,2 \times 10^4$, seguido da espécie *Aspergillus fumigatus*, do gênero *Aspergillus sp.*, das espécies *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus* e do morfotipo 3, com populações médias totais de $1,1 \times 10^4$, $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^4$ respectivamente. Na sequência, com uma incidência intermediária

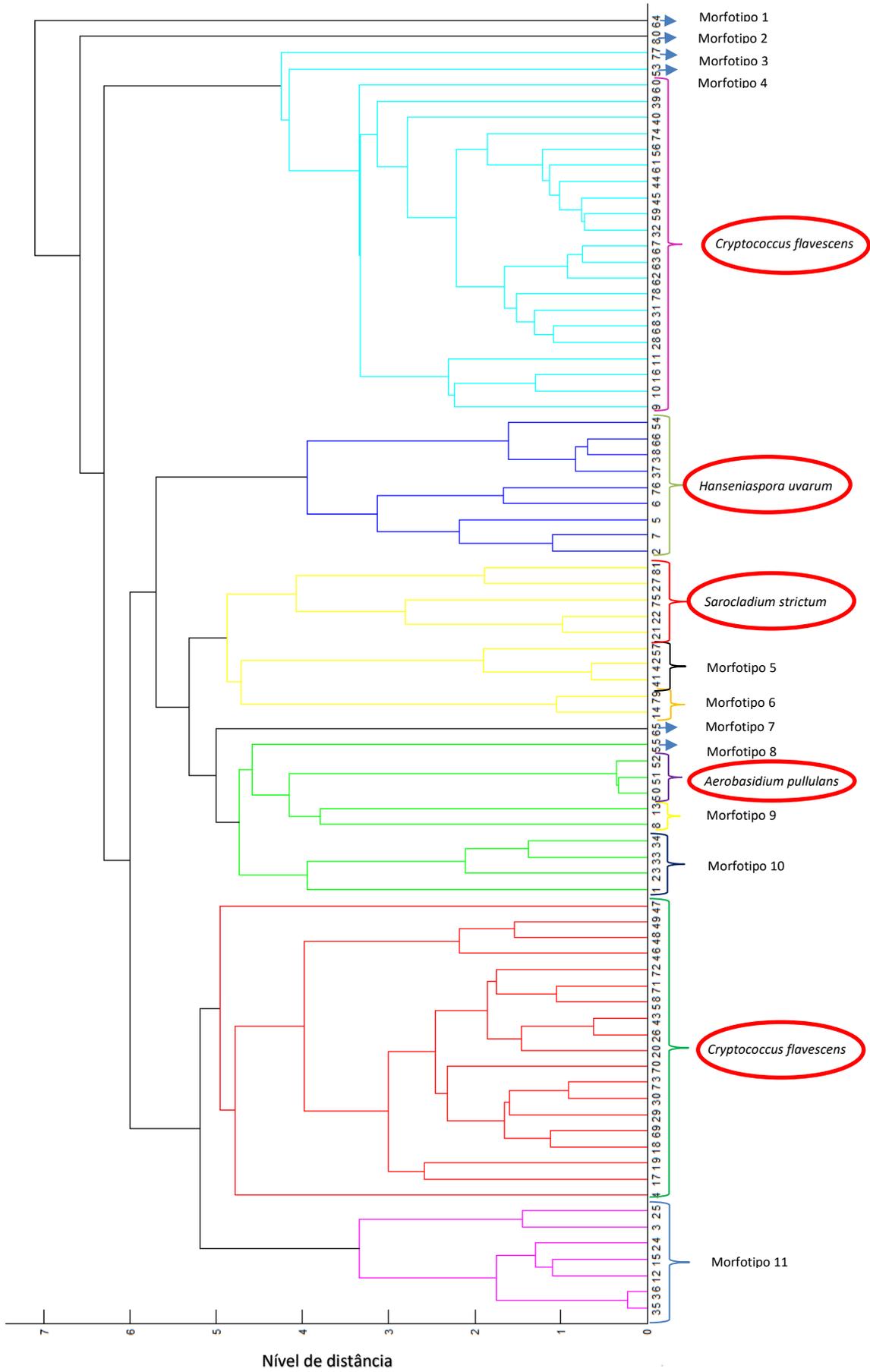
na amostra de uva avaliada, foram encontrados o gênero *Fusarium sp.*, a espécie *Aspergillus niger*, o Morfotipo 4 e o Morfotipo 1 com suas populações demonstradas pela tabela 5. Em menor incidência foi encontrada a espécie *Penicillium decumbens* e o Morfotipo 2 com populações de $7,3 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^2$ respectivamente.

A partir dos testes utilizados para detectar a produção de toxinas nos fungos potencialmente toxigênicos encontrados na amostra de uva avaliada, sendo eles, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, obtivemos como resultado que a espécie *Aspergillus niger* não foi produtora de ocratoxina A e a espécie *Aspergillus flavus* foi produtora de aflatoxina B1 e B2, sendo a segunda espécie encontrada com maior incidência.

5.3 Diversidade de leveduras

Foram isoladas um total de 81 leveduras, onde 4 espécies foram identificadas pelo Maldi-TOF MS e os isolados não identificados, foram agrupados pelo método, que juntamente com as características morfológicas e análises microscópicas, possibilitaram a caracterização em diferentes morfotipos como demonstrado pelo dendograma na figura 6.

Figura 6. Dendograma isolados de leveduras.



Fonte: Do autor (2019)

Os valores das populações dos isolados podem ser vistos na tabela 7, distribuídos pelo tipo de meio utilizado juntamente com a população total da levedura encontrada na amostra de uva estudada.

Tabela 7. População de leveduras em meio DRBC e YEPG

Leveduras	População em DRBC (UFC/g)	População em YEPG (UFC/g)	População média total (UFC/g)
<i>Aerobasidium pulullans</i>	6,0 x 10 ³	-	6,0 x 10 ³
<i>Cryptococcus flavescens</i>	1,3 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁴
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4,0 x 10 ³	3,6 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴
<i>Sarocladium strictum</i>	5,0 x 10 ³	3,5 x 10 ³	4,3 x 10 ³
Morfotipo 1	-	6,0 x 10 ³	6,0 x 10 ³
Morfotipo 2	-	1,5 x 10 ³	1,5 x 10 ³
Morfotipo 3	3,0 x 10 ³	-	3,0 x 10 ³
Morfotipo 4	1,0 x 10 ³	-	1,0 x 10 ³
Morfotipo 5	4,0 x 10 ³	7,0 x 10 ³	5,5 x 10 ³
Morfotipo 6	-	1,4 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴
Morfotipo 7	-	7,0 x 10 ³	7,0 x 10 ³
Morfotipo 8	1,0 x 10 ³	-	1,0 x 10 ³
Morfotipo 9	-	8,5 x 10 ³	8,5 x 10 ³
Morfotipo 10	5,0 x 10 ²	1,5 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³
Morfotipo 11	7,0 x 10 ³	4,7 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁴

Fonte: Do autor (2019)

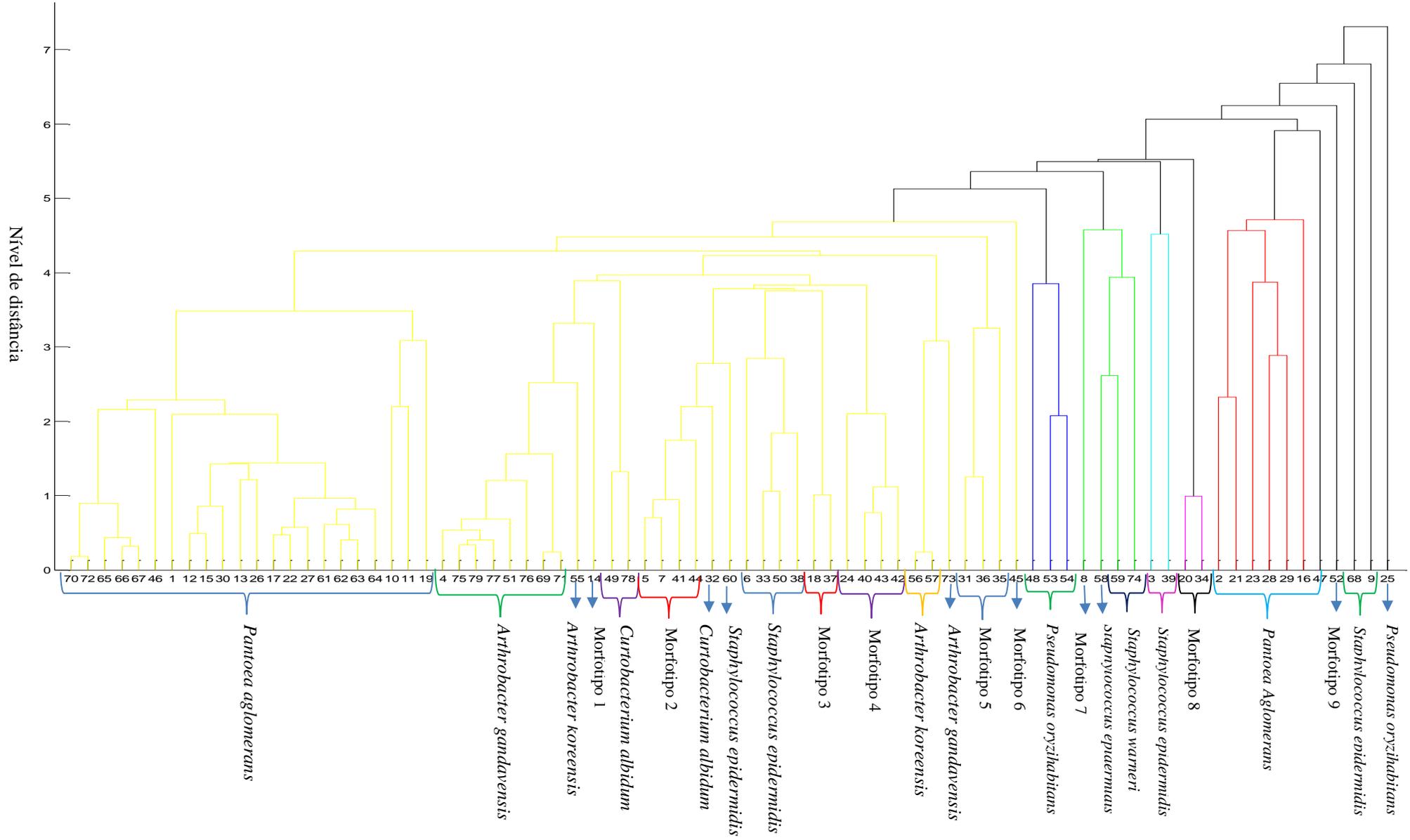
Dentre os isolados de levedura encontrados na amostra de uva avaliada, a maior incidência foi do Morfotipo 11 com população de 2,7 x 10⁴ seguido das espécies *Hanseniaspora uvarum*, *Cryptococcus flavescens*, e do Morfotipo 6 com populações em ordem decrescente de incidência, 2,0 x 10⁴, 1,7 x 10⁴, 1,4 x 10⁴, respectivamente. Na sequência, o Morfotipo 9, 10 e 7 apresentam incidência intermediária, de acordo com os valores das populações médias totais citados pela tabela 6. As espécies *Aerobasidium pulullans* e o Morfotipo 1, também com populações médias totais intermediárias, apresentam valores de populações iguais de 6,0 x 10³.

Continuamente, foram encontrados o Morfotipo 5, a espécie *Sarocladium Strictum* e o Morfotipo 3 com populações de $5,5 \times 10^3$, $4,3 \times 10^3$ e $3,0 \times 10^3$, respectivamente. E em menor incidência, os Morfotipos 2, 4 e 8 com populações médias totais de $1,5 \times 10^3$, $1,0 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^3$, respectivamente.

5.4 Diversidade de bactérias totais

Para bactérias totais foram obtidos um total de 79 isolados como demonstrado pelo dendograma abaixo (figura 7), onde os isolados foram identificados pelo Maldi-TOF MS e os que não possibilitaram a identificação devido à carência do banco de dados utilizado, foram agrupados em diferentes morfotipos, associado as informações obtidas pelas características morfológicas das colônias e análises microscópicas.

Figura 7. Dendograma isolados de bactérias totais.



Fonte: Do autor (2019)

Os valores das populações dos isolados de bactérias totais encontrada na amostra de uva estudada podem ser vistos pela tabela 8.

Tabela 8. População de bactérias totais.

Bactérias totais	População média total UFC/g
<i>Arthrobacter gandavensis</i>	6,0 x 10 ⁴
<i>Arthrobacter koreensis</i>	2,1 x 10 ⁴
<i>Curtobacterium albidum</i>	4,0 x 10 ³
<i>Pantoea Aglomerans</i>	1,9 x 10 ⁴
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1,7 x 10 ⁴
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,3 x 10 ⁴
<i>Staphylococcus warneri</i>	3,8 x 10 ³
Morfotipo 1	1,0 x 10 ³
Morfotipo 2	1,8 x 10 ⁴
Morfotipo 3	2,1 x 10 ³
Morfotipo 4	1,0 x 10 ⁴
Morfotipo 5	7,0 x 10 ²
Morfotipo 6	1,0 x 10 ²
Morfotipo 7	6,0 x 10 ³
Morfotipo 8	6,3 x 10 ²
Morfotipo 9	8,0 x 10 ³

Fonte: Do autor (2019)

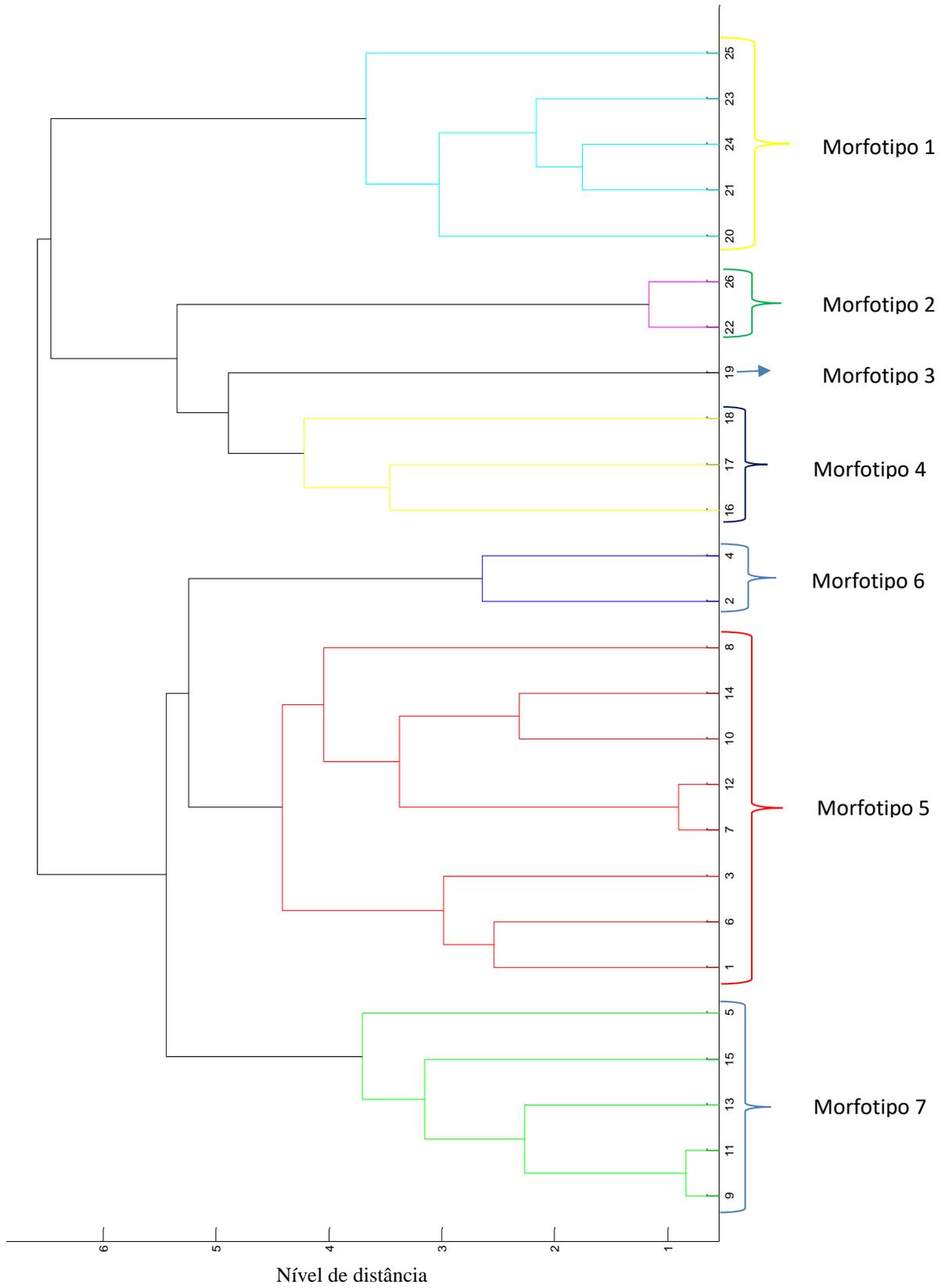
Dentre os isolados de bactérias totais, o que apresentou maior incidência foi a espécie *Arthrobacter gandavensis* com população de 6,0 x 10⁴, seguida das espécies *Staphylococcus epidermidis*, *Arthrobacter koreensis* e *Pantoea aglomerans* com populações de 2,3 x 10⁴, 2,1 x 10⁴ e 1,9 x 10⁴ respectivamente e em ordem decrescente de incidência dos valores de população. O Morfotipo 2, a espécie *Pseudomonas oryzihabitans*, o Morfotipo 4, 9 e 7 apresentam valores de populações intermediários como vistos pela tabela 7. As espécies *Curtobacterium albidum* e *Staphylococcus warneri*, juntamente com os Morfotipos 3, 1, 5, 8 e

6 apresentam respectivamente, menor incidência na amostra de uva avaliada, onde a menor população encontrada foi de $1,0 \times 10^2$.

5.5 Diversidade de bactérias lácticas

Para bactérias lácticas obtivemos um total de 26 isolados (figura 8), onde nenhum dos isolados foram identificados.

Figura 8. Dendograma de bactérias lácticas.



Fonte: Do autor (2019)

As populações dos isolados não identificados podem ser vistas na tabela 9.

Tabela 9: População de bactérias lácticas.

Bactérias lácticas	População média total UFC/g
Morfotipo 1	$8,0 \times 10^2$
Morfotipo 2	$4,0 \times 10^2$
Morfotipo 3	$1,0 \times 10^2$
Morfotipo 4	$5,0 \times 10^2$
Morfotipo 5	$1,6 \times 10^3$
Morfotipo 6	$4,8 \times 10^2$
Morfotipo 7	$3,4 \times 10^2$

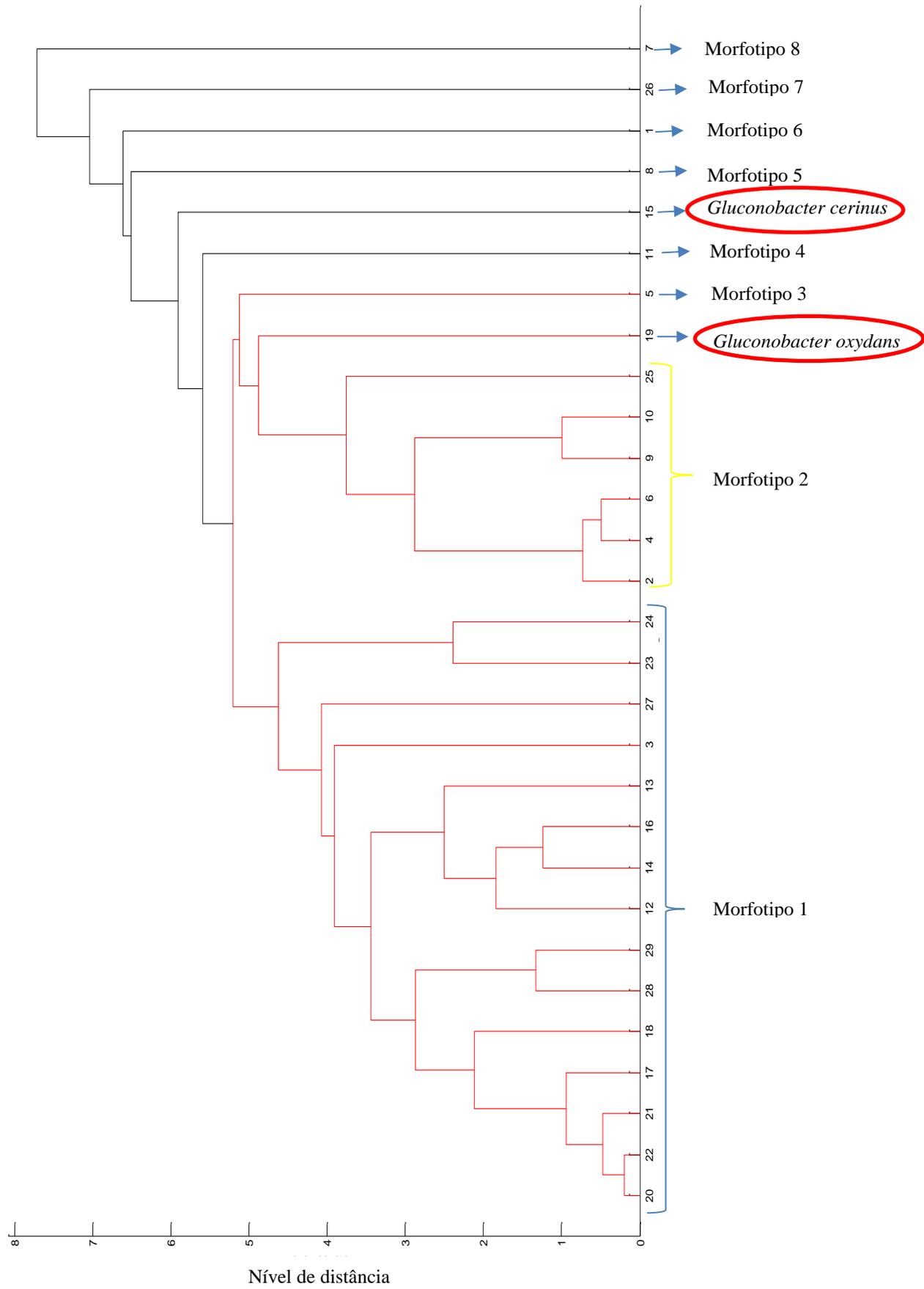
Fonte: Do autor (2019)

Dentre os morfotipos, aquele que apresentou maior incidência na amostra de uva estuda foi o Morfotipo 5 com população de $1,6 \times 10^3$, seguido dos Morfotipos 1, 4, 6 e 2 com valores de populações intermediários, e em menor incidência, os Morfotipos 7 e 3 com populações de $3,4 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^2$ respectivamente.

5.6 Diversidade de bactérias acéticas

Um total de 29 isolados de bactérias acéticas foram obtidos, como visto pelo dendograma abaixo (figura 9) com as espécies *Gluconobacter cerinus* e *Gluconobacter oxydans* identificadas pelo Método Maldi-TOF MS e os que não possibilitaram a identificação foram agrupados em diferentes morfotipos.

Figura 9: Dendograma de todos os isolados de bactérias acéticas



Os valores das populações totais dos isolados identificados e agrupados em morfotipos podem ser vistos pela tabela 10.

Tabela 10: População de bactérias acéticas.

Bactérias acéticas	População média total UFC/g
<i>Gluconobacter cerinus</i>	$3,4 \times 10^2$
<i>Gluconobacter oxydans</i>	$2,0 \times 10^2$
Morfotipo 1	$2,0 \times 10^3$
Morfotipo 2	$8,4 \times 10^2$
Morfotipo 3	$3,4 \times 10^2$
Morfotipo 4	$3,4 \times 10^2$
Morfotipo 5	$2,0 \times 10^2$
Morfotipo 6	$3,4 \times 10^2$
Morfotipo 7	$8,0 \times 10^2$
Morfotipo 8	$2,0 \times 10^2$

Fonte: Do autor (2019)

O Morfotipo 1 foi o que apresentou maior incidência dentre todos os isolados de bactérias acéticas com uma população de $2,0 \times 10^3$. Os Morfotipos 2, 7, 3, 4, 6, juntamente da espécie *Gluconobacter cerinus*, apresentaram respectivamente, valores intermediários de população. Em menor incidência, foi encontrada a espécie *Gluconobacter oxydans* com população de $2,0 \times 10^2$ e os Morfotipos 5 e 8, também com populações iguais de $2,0 \times 10^2$.

6. Discussão

Os gêneros *Aspergillus*, *Botrytis* e *Penicillium* são frequentemente encontrados em uvas e em uma quantidade menor, *Cladosporium*, *Moniliella* e *Phytophthora*. 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 et al., 2007).

Os gêneros de fungos filamentosos encontrados, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. foram os mais frequentes na amostra de uva estudada uma vez que, segundo Fugelsang et al., 2007, são gêneros que promovem características organolépticas fenólicas ou iodadas nos vinhos tanto tintos quanto brancos. Esses desvios aromáticos que são provenientes da transformação de aminoácidos nas uvas e de certos compostos fenólicos da película conferem ao vinho um forte amargor.

A presença de fungos do gênero *Cladosporium* sp., de acordo com BENSCH 2012, pode ser explicada pois são fungos facilmente encontrados em uvas viníferas, considerados fungos de campo, frequentemente encontrados no ar, solo, plantas, alimentos e outras matérias orgânicas, que conferem um sabor mofado as uvas e seus derivados.

Quanto a podridão ácida, alguns autores sugerem que os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* tenham a sua contribuição de forma negativa, promovendo o abaixamento do aroma varietal (vinho elaborado com uma única casta de uva) uma vez que estudos feitos em diferentes países apontam que as espécies *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*, sendo o fungo *Aspergillus niger* identificado neste trabalho, espécies predominantes nas vinhas (BATTILANI et al., 2006, BEJAOUI et al., 2006; TJAMOS et al., 2006; PERRONE et al., 2006; SERRA et al., 2003). A seção *Nigri* quando presente na uva e em condições ambientais ideias podem produzir ocratoxina A, toxina que na bebida final, pode causar riscos à saúde do consumidor (VARGA; KOSAKIEWICZ, 2006), porém sua incidência nesse trabalho foi baixa e a partir dos resultados obtidos pelo teste de produção de ocratoxina A, foi possível observar que a espécie em questão não foi produtora da mesma.

A espécie *Aspergillus flavus*, encontrada nesse trabalho e com produção de aflatoxina B1 e B2 comprovada pelo teste aplicado, é capaz de se desenvolver em condições de baixa atividade de água e também, é tolerante a uma ampla faixa de temperatura, entre 19 a 35° C, onde a temperatura de 28°C é a sua ideal de crescimento (SANCHIS; MAGAN, 2004). Assim sendo, são necessários mais estudos sobre a produção de aflatoxinas e as condições ambientais que favorecem o seu crescimento, além de medidas e estratégias de controle que ajudem a reduzir a incidência desse microrganismo nas uvas.

De acordo com Gravot et al., (2001) e Blancard et al., (2000), não somente os fungos são responsáveis pela podridão ácida, mais também as leveduras *Candida stellata*, *Pichia membranaefaciens* e *Hanseniaspora uvarum* (levedura presente na amostra de uva avaliada) como sendo as isoladas mais presentes em bagos de uva com podridão ácida.

O gênero *Hanseniaspora sp.* encontrado nesse trabalho, pode influenciar de forma positiva o perfil aromático de vinhos tintos uma vez que são capazes de sobreviver por um tempo considerável durante a fermentação alcoólica (MOREIRA et al., 2011).

Bactérias do gênero *Gluconobacter sp.* também foram isoladas no presente trabalho, onde segundo Sponholz (1992), são responsáveis por oxidar o etanol em ácido acético, uma vez que esse etanol é resultado do metabolismo dos açúcares presentes nas uvas pelas leveduras, onde o ácido acético pode promover no vinho sabor e aroma de vinagre. Tanto as leveduras quanto as bactérias acéticas fazem parte da microbiota natural da baga, demonstrando papel importante na alteração dos mesmos.

Segundo Gomes (2004) a podridão ácida é resultado da alteração da composição dos bagos, promovendo um aumento da acidez volátil, consequência da produção de ácido acético, aumento da acidez total e uma diminuição dos teores de álcoois superiores. Além disso, no mosto, é possível observar uma redução dos teores de açúcar o que promove vinhos com teores alcoólicos inferiores com um aumento na intensidade da cor. Em relação ao processo de vinificação, a podridão ácida pode afetar o crescimento das leveduras durante a fermentação alcoólica e também afetar as bactérias lácticas durante a fermentação malolática (SPONHOLZ,1992).

A levedura *Aerobasidium pullulans* e a bactéria *Gluconobacter oxydans* juntamente com outras não identificadas neste trabalho, são responsáveis pela produção de ácido glucônico (RAMACHANDRAN, 2006), onde o ácido em associação com o dióxido de enxofre, podem reduzir os teores de SO₂ livre no vinho, sendo necessário adicionar quantidades de SO₂ para protegê-lo do ataque de microrganismos durante as etapas de envelhecimento e armazenamento e também para proteger da oxidação (PEINADO,2009).

O fungo leveduriforme *Aerobasidium pullulans*, também pode ser benéfico na vinificação pois é utilizado para a produção de β-glicosidases e pectinases que incrementam as características dos vinhos (BAFFI et al., 2013; MERÍN et al., 2015).

As bactérias acéticas são divididas em: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* e *Gluconacetobacter hansenii* podendo ser encontradas onde o álcool está ausente ou em pequenas concentrações e em ambientes ricos em açúcar sendo necessário estas condições para que ocorram alterações dos produtos (FUGELSANG,2007). Elas se fazem presentes em todos os lados, nas adegas, nas uvas, nas paredes, nos solos e no interior de barricas onde quando presentes no vinho em toda a sua evolução, promovem baixos teores sulfurosos (PEYNAUD, 1981).

Positivamente, as bactérias láticas podem produzir alguns ésteres que contribuem para o aroma do vinho, como por exemplo o lactato de etil, proveniente da reação do ácido láctico com o etanol, produzindo um aroma frutado. O succinato de dietil é outro éster importante que influencia na caracterização do vinho, pois possui aroma adocicado vindo da reação do ácido succínico com moléculas de etanol (FUGELSANG,2007).

Os morfotipos presentes em todas as tabelas representam isolados que não permitiram identificação tanto morfológica quanto pelo método Maldi-TOF MS devido a carência do banco de dados utilizado, porém a técnica os agrupou devido aos seus perfis proteicos para que estudos futuros possam ser realizados utilizando técnicas mais avançadas, como a PCR, técnica molecular baseada na amplificação/sequenciamento do DNA.

7. Conclusão

Os resultados do presente estudo permitiram observar a diversidade de microrganismos presentes na amostra de uva avaliada, juntamente com as influências positivas e negativas desses microrganismos que influenciam na qualidade do vinho elaborado a partir delas.

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 gênero *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.* e *Fusarium sp.*, com as espécies identificadas: *A. aculeatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium decumbens* e o Complexo *Cladosporium Cladosporioides*. Para leveduras os gêneros *Cryptococcus sp.* e *Hanseniaspora sp.*, com as espécies identificadas: *Aerobasidium pullulans*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora uvarum* e *Sarocladium strictum*, para bactérias acéticas houve a predominância do gênero *Gluconobacter sp.*, com as espécies identificadas: *Gluconobacter cerinus* e *Gluconobacter oxydans*.

Para bactérias totais os gêneros *Arthrobacter sp.*, *Pantoea sp.* e *Staphylococcus sp.* com as espécies identificadas: *Arthrobacter gandavensis*, *Arthrobacter koreensis*, *Curtobacterium albidum*, *Pantoea aglomerans*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus warneri* e para bactérias láticas, nenhum gênero foi identificado, ocorrendo somente o agrupamento dos isolados em morfotipos pelo método Maldi-TOF MS.

8. Referências

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, DF, v. 2, n. 2, p. 236-251, jul./dez. 2004.

- AMORIM, D. A.; FAVERO, A. C.; REGINA, M. A. Produção extemporânea da videira, cv. Syrah, nas condições do Sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 327-331, ago. 2005.
- AMORIM, D. A. et al. Elaboração de vinho tinto fino. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 65-76, 2006.
- BAFFI, M. A., et al. Wine aroma improvement using a β -glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans*. **Applied biochemistry and biotechnology**. 169(2): 493-501, 2013.
- BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 3, p. 243-259, Feb. 2012.
- BARRAJÓN, N. et al. **Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region**. *Food Control*, Oxford, v. 20, n. 8, p. 778-783, 2009.
- BATILANI, P. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. tubingensis* strains isolated from grapes in Italy. **Applied Environmental Microbiology**. 72: p. 680-685, 2006.
- BEJAOUI, H., Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **International Journal of Food Microbiology**. 111: p. S42-S52, 2006.
- BENSCH, K., et al. The genus *cladosporium*. **Studies in Mycology**. 72: 1-401, 2012.
- BEZERRA, C. S. **Seleção de leveduras isoladas de uvas e mostos com atividade enzimática para melhoramento de vinhos**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2012.
- BLANCARD, D., **Association of Drosophilae with microorganisms in Bordeaux vineyards affected by sour rot**. IOBC/wprs Bulletin "Integrated Control in Viticulture" C. Lozzia Ed., Vol. 23 (4), 55-58, 2000.
- BOKULICH, N. A., et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 111(1): E139-E148, 2014.
- BOKULICH, N. A., et al. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. **MBio**. 7(3): e00631-00616, 2016.
- CALDAS, G. M. M. et al. Occurrence of patulin in grapes (*Vitis vinifera* L. CV. 'Rubi') with indication of the sour rot. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 14-18, jan./fev. 2008.
- CORE FACILITY NET, **PROTOCOL FOR OBTAINING MALDI-TOF MASS SPECTRA**. Disponível em: <<https://corefacilitynet.org/share/page/site/core-facility-net/dashboard>>. Acesso em: 09 de Novembro de 2019.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, n. 2, p. 128-130, 1980.

FLEET, G. H. **Yeast interactions and wine flavor. International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, p. 11-22, 2003.

FOLHAPRESS, **Produção de vinho em Minas Gerais ganha notoriedade no Brasil e no exterior.** Disponível em: <<https://www.gazetadopovo.com.br/bomgourmet/producao-de-vinho-em-minas-ganha-notoriedade-no-brasil-e-no-externior/>>. Acesso em: 9 de Novembro de 2019.

FREIRE, L. **Ocorrência de Aspergillus e Penicillium e a correlação entre espécies ocratoxigênicas e uvas viníferas da região topical do Brasil.** 2016. 155 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

FUGELSANG, K; Edwards, C. **Wine Microbiology - Pratical Applications and Procedure;** Second edition; Springer, 2007.

GILBERT, J. A.; LELIE, D. van der; ZARRAONAINDIA, I. Microbial terroir for wine grapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 1, p. 5-6, 2014.

GÓES, F. J. **Desenvolvimento e otimização do processo fermentativo para a produção de vinho branco a partir da uva Itália.** 2005. 158p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

GOMES, M.C.S.R. **A podridão ácida das uvas: Trabalho preliminar para a caracterização da microflora associada, na região da Bairrada.** Trabalho monográfico apresentado no âmbito do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto, 2004.

GRAVOT, E., La Pourriture acide. I. **Étiologie: recherché de causes de cette pourriture dans le vignoble bordelaise.** Phytoma. 543:36-39, 2001.

GUERRA, C. C. et al. Vinhos tropicais: novo paradigma enológico e mercadológico. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n 234, p. 100-104, set./out. 2006.

GUERRA, C. C. et al. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos.** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2009. 69 p. (Documento, 48).

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Regiões produtoras.** Disponível em: <<https://www.ibravin.org.br/Regioes-Produtoras>>. Acesso em: 08 de Outubro de 2019.

INVESTIMENTOS E NOTÍCIAS, Os 10 maiores produtores de vinho do mundo. Disponível em: <<http://www.investimentosenoticias.com.br/noticias/negocios/os-10-maiores-produtores-de-vinho-do-mundo>> . Acesso em: 10 de Novembro de 2019.

KLICH, M. A. **Identification of common Aspergillus species.** Utrecht: CBS, 2002. 116 p.

KNIGHT, S., et al. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. **Scientific reports**. 5: 14233, 2015.

LIKAR, M. et al. Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 505, p. 724-731, Feb. 2015.

LIMA, N.; SANTOS, C. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. **Current Opinion in Food Science**. 13:26–30. 2017.

MAGNOLI, C. et al. Mycoflora and ochratoxin producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 179-184, 2004.

MALFEITO-FERREIRA, M. Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. **Annals of microbiology**. 61(1): 95-102, 2011.

MATSUOKA, M. **Atributos biológicos de solos cultivados com videiras na região da Serra Gaúcha**. 2006. 173 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MELLO, L. M. R. **A vitivinicultura brasileira: panorama 2017**. Embrapa – Uva e Vinho, 2017.

MERÍN, M. G., et al. Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. **Brazilian Journal of Microbiology**. 46(3): 815-823, 2015.

MOREIRA, N., et al. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. **Food control**. 22(5): 662-667, 2011.

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

NEOGEN, **Ágar DRBC (7591)**. Disponível em: <https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7591_pt_pi.pdf>. Acesso em: 13 de novembro de 2019.

NEOGEN, **Ágar extrato de levedura YEAST EXTRACT AGAR (7707)**. Disponível em: <https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7707_pt_pi.pdf>. Acesso em: 13 de novembro de 2019.

OIV **RESOLUTION OIV/VITI 333/2010**. Eighth General Assembly of the Organisation Internationale de la Vigne et du Vin., Tbilisi, Georgia, 2010.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. **Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex**. Research in microbiology, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015.

PEINADO, R.A., Use of a *Schizosaccharomyces pombe* mutant to reduce the content in gluconic acid from must obtained from rotten grapes. **J. Agric. Food Chem**. 57: 2368-2377, 2009.

PERRONE, G., Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. tubingensis* strains isolated from grapes in Italy. **Applied Environmental Microbiology**. 72: p. 680-685, 2006.

PEYNAUD, E (1981) – Conhecer e trabalhar o vinho; **Editorial Presença**, 1981.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Melbourne: Food Science Australia, 2000. 187 p.

PROTAS, J. F. S. da; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. R. Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 7-15, set./out. 2006.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. **Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010**. Brasília: SEBRAE, 2011.

PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. **A viticultura brasileira: realidade e perspectiva**. Brasília: EMBRAPA, 2001. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/539461/a-viticultura-brasileira-realidade-e-perspectivas>>. Acesso em: 22 de Setembro de 2019.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. **Vitivinicultura brasileira: panorama setorial em 2010**. Bento Gonçalves: IBRAVIN; EMBRAPA Uva e Vinho, p.110, 2011.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U.A. **Vitivinicultura brasileira: panorama setorial**. Brasília: EMBRAPA, 2010. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-publicacoes/-/publicacao/922116/vitivinicultura-brasileira-panorama-setorial-em-2010>>. Acesso em: 23 de setembro 2019.

PROTAS, J. F. S., CAMARGO, U. A. e MELO, L. M. R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. Embrapa - Uva e Vinho, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>>. Acesso em: 26 de Setembro de 2019.

QUINTELA, S. et al. Occurrence of ochratoxin A in Rioja Alavesa Wines. **Food Chemistry**, London, v. 126, n.1, p. 302-305, May 2011.

RAMACHANDRAN, S., Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. **Food Technol. Biotechnol.** 44 (2): 185-195, 2006.

REVISTA ADEGA, **Qual o significado de terroir?** Disponível em: <https://revistaadega.uol.com.br/artigo/voce-sabe-qual-o-significado-deterroir_2655.html>. Acesso: 23 de setembro 2019.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-borne fungi**. 4th ed. Berlin: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2000. 322 p.

SANCHIS, V.; MAGAN, N. Environmental profiles for growth and mycotoxin production. **Mycotoxins in food: detection and control**. Cambridge: Woodhead, p. 174-189, 2004.

SATO, G. S. e ANGELO, J. A. As exportações brasileiras de vinhos e derivados: início de processo de internacionalização. **X SEMEAD – Seminários em Administração FEA-USP**, 2007. Disponível em: <<http://www.ead.fea.usp.br/semead/10semead/sistema/resultado/trabalhosPDF/563.pdf>>. Acesso em: 26 de Setembro de 2019.

SERRA, R., Black Aspergillus species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**. 88: p. 63-68, 2003.

SETATI, M. E. et al. **The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map**. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. 1-10, Dec. 2012.

SPONHOLZ, W.R., Über die Herkunft von Gluconsäure 2-und 5-oxo Gluconsäure sowie Glucuron- und Galacturonsäure in Mosten und Weinen. *Vitis* 24: 51-58. **In Wine Microbiology- Pratical Applications and Procedures**. Fugelsang, K e Edwards, C.G. (Ed.), Chapter 3, pp. 45-49. Springer, 1992.

TONIETTO, J. O conceito de denominação de origem como agente promotor da qualidade dos vinhos. **Viticultura e enologia: atualizando conceitos**. Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. P 151-163.

TONIETTO, J. **Afinal, o que é Terroir?** Bon Vivant, v.8, n.98, p.8, União Brasileira de Vitivinicultura–**Uvibra**, 2007. Disponível em: <<http://www.uvibra.com.br/>>. Acesso em: 29 de Julho de 2019.

TJAMOS, S.E., *Aspergillus* spp. distribution, population composition and ochratoxin A production in wine-producing vineyards in Greece. **International Journal Microbiology**. 111: S61-S66, 2006.

VACHER, C., et al. The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 47: 1-24, 2016.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 72-81, Feb. 2006.

VINHOS MARIA MARIA. Disponível em: <<https://vinhosmariamaria.com.br/>>. Acesso em: 30 de Novembro de 2019.

VIOTTI, E. **O vinho tinto**: volume 1. São Paulo: Folha de São Paulo, 2010.