

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TATIANA MARACAÍPE CORRÊA

**ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE
PODRIDÃO MOLE (*Rhizopus stolonifer*)
EM UVA (*Vitis vinifera* BRS Carmem)**

Palmas-TO
2020

TATIANA MARACAÍPE CORRÊA

**ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE
PODRIDÃO MOLE (*Rhizopus stolonifer*)
EM UVA (*Vitis vinifera* BRS Carmem)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de pesquisa PPGCTA: Controle de qualidade e segurança alimentar.

Orientador: Dr. Raphael Sanzio Pimenta

Coorientadora: Dr^a. Eskálath Morganna Silva Ferreira.

Palmas-TO

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- CS24e Corrêa, Tatiana Maracaípe .
ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE PODRIDÃO MOLE (*Rhizopus stolonifer*) EM UV(*Vitis vinifera* BRS Camem). / Tatiana Maracaípe Corrêa. – Palmas, TO, 2020.
65 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2020.
Orientador: Raphael Sanzio Pimenta
Coorientadora : Eskálath Morganna Silva Ferreira
1. Controle Biológico . 2. Podridão mole . 3. Leveduras Antagonistas . 4. *Vitis vinifera* . I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TATIANA MARACAÍPE CORRÊA

**ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE
PODRIDÃO MOLE (*Rhizopus stolonifer*)
EM UVA (*Vitis vinifera* BRS Carmem)**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 17 de dezembro de 2020, pela
Banca Examinadora constituída pelos membros:



Prof. Dr. Guilherme Nobre L. do Nascimento
UFT



Prof.ª Dr.ª Katia Cristina Kupper – IAC



Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta - UFT

A Deus, por me conceder saúde e sabedoria para completá-lo, à minha família (mãe e irmãos) e ao meu paizinho, Nilson Corrêa Macedo (in memoriam)

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, todo poderoso, que me concedeu o dom da vida e me deu a oportunidade de trabalhar na SUA “VINHA” durante esses dois anos. À virgem Maria, minha mãe do céu, a qual sou consagrada. Ao santos de devoção que sempre me ensinaram a amar a Deus sobre todas as coisas, São Francisco de Assis (ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro) e Santa Tereza D’Ávilla (nada te pertube, nada te amedronte. Tudo passa, só Deus basta).

À minha mãe, **SUELY MARACAÍPE CORRÊA**, serva de Deus, viúva, educadora, persistente, humilde, caridosa, alegre e inteligente. Além de me mostrar desde a infância que o caminho da educação é o mais seguro para se chegar à prosperidade, ainda me encanta com seus belos exemplos cotidianos de superação e determinação.

Aos meus irmãos, Nilson Corrêa Macedo Júnior e Tamira Maracaípe Corrêa, pelo apoio financeiro, incentivo, amor, carinho e principalmente orações e presença constante na minha vida. Vocês são os melhores exemplos de resiliência que eu já conheci.

Ao meu namorado Marcelino, pelo incentivo e carinho em todos os momentos. Seus conselhos e sugestões me abriram novas possibilidades e me deram a confiança para acreditar que eu sou capaz de vencer. Em você encontro o irmão, o amigo, o amor, o franciscano, o músico e o homem de Deus que me faz uma pessoa melhor a cada dia.

Aos grandes amigos do LMGA (Mirelle, Geo, Raul, Gaby, Luiz, Breno, Bia, Pedro, Michelle, Drielly, Sara e seu Raimundo). Aprendi muito com cada um. Vocês são especiais. Saudades do riso fácil em muitos momentos juntos.

À Morganna, coorientadora e amiga. MUITÍSSIMO obrigada pelas instruções, pela paciência, e principalmente pela disposição em ir para a bancada para me ensinar as novas metodologias inclusive aos sábados e feriados. Saimos do laboratório várias vezes tarde da noite.

Ao meu orientador Raphael Sanzio Pimenta pela amizade, paciência e confiança.

Muito obrigada!

RESUMO

As doenças pós-colheita em uvas causam perdas consideráveis de frutos durante o transporte e armazenamento. Os fungicidas sintéticos são métodos usualmente usados para controlá-los. No entanto, a tendência recente consiste na utilização de métodos mais seguros e sustentáveis para o controle da deterioração pós-colheita. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo propor uma estratégia sustentável e eficaz para o controle de *R. stolonifer* em uvas, por meio da utilização de leveduras antagonistas isoladas do fruto, assim como associar o controle biológico das leveduras a substâncias GRAS. Foram isoladas leveduras epifíticas de amostras de uvas da espécie *Vitis vinifera* BRS Carmem e de mosto na fase inicial e final da fermentação. A seleção das leveduras antagonistas biocontroladoras constou da avaliação de teste de crescimento a 4, 10, 25, e 37°C, avaliação da produção das enzimas pectinase e celulase e avaliação da produção de substâncias antagônicas contra o fitopatógeno. Foi testado o efeito antifúngico de diferentes substâncias GRAS contra *R. stolonifer* e verificada a capacidade das leveduras crescerem em diferentes concentrações de substâncias GRAS. Após a seleção, foi avaliado a eficácia do biocontrole desenvolvido pela levedura em uvas contra *R. stolonifer*, através do biocontrole tradicional e integrado. Foi obtido um total de 38 isolados de leveduras sendo agrupados em 14 morfotipos distintos. Dentre estas, foram selecionadas duas leveduras para utilização como possíveis agentes de biocontrole, sendo identificadas molecularmente como *Hanseniaspora guilliermondii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Nos testes *in vivo* de controle biológico *Saccharomyces cerevisiae* conseguiu reduzir sozinha a incidência da doença causada por *R. stolonifer* em cerca de 56% e 70% a severidade, já no biocontrole integrado a substância GRAS (bicarbonato de sódio) em conjunto com a *S. cerevisiae* reduziu 80% a incidência e 84% a severidade. O isolado identificado como *H. guilliermondii* reduziu sozinha a incidência em 64% e 74% a severidade, sendo que no teste integrado com bicarbonato de sódio reduziu a incidência da doença em 80% e a severidade a 88%. Isso demonstra que a seleção destas leveduras podem constituir uma estratégia promissora de biocontrole utilizada para o controle da podridão mole em uvas.

Palavras-chave: Controle biológico, podridão mole, leveduras antagonistas, *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

Post-harvest diseases, which affects grape cultures, can cause considerable damage to the fruits during transportation and storage. Synthetic fungicides are commonly used methods able to control these diseases. However, there is a growing tendency of using more reliable and sustainable methods to control post-harvest deterioration. Thus, the present study aimed to present a sustainable and efficient strategy for the control of *R. stolonifer* in grapes through the use of antagonist yeasts isolated from the fruit as well as the association of the biological control of yeasts to GRAS substances. For this purpose, epiphytic yeasts from samples of grapes of *Vitis vinifera* BRS Carmen and must in the initial and final phase of fermentation were isolated. The selection of the antagonist yeasts for biological control was based on growing tests for 4, 10, 25, and 37°C, on the assessment of the production of pectinase and cellulase enzymes, and on the evaluation of the production of antagonistic substances against the phytopathogen. The antifungal effect of various GRAS substances against *R. stolonifer* was assessed and the ability of yeasts to grow under different concentrations of GRAS substances was verified. Following the selection, the effectiveness of the biocontrol developed by the yeast in grapes against *R. stolonifer* applying the traditional and integrated biocontrol. It was obtained a total of 38 isolated yeasts grouped in 14 different morphotypes. Among these, two yeasts, identified as *Hanseniaspora guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*, were selected as possible biocontrol agents. For the biocontrol *in vivo* tests, *Saccharomyces cerevisiae* managed to reduce alone the incidence of the disease caused by *R. stolonifer* by 56% and 70% the severity. On the other hand, for the biocontrol integrated to the GRAS substance (sodium bicarbonate) associated to the *S. cerevisiae* the incidence was reduced in 80% and the severity in 84%. The isolated identified as *H. guilliermondii* decreased alone the disease incidence by 64% and the severity by 74%, and, for the integrated test with sodium bicarbonate, the incidence reduced by 80% and the severity 88%. The results attests that the use of these yeasts may constitute a promising biocontrol strategy able to control soft rot of grapes.

Keywords: Biological control, soft rot, yeast antagonists, *Vitis vinifera*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Viticultura e uvas de mesa.....	12
2.2 Microbiota da uva.....	13
2.3 Controle Biológico.....	14
2.4 Doenças pós-colheita de uva.....	17
2.4.1 <i>Rhizopus stolonifer</i>	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 MATERIAL E METÓDOS	19
4.1 Obtenção das amostras	19
4.2 Obtenção do fitopatógeno.....	20
4.3 Obtenção dos isolados de leveduras antagonistas	20
4.3.1 Isolamento das leveduras epifíticas	20
4.3.2 Isolamento das leveduras do mosto	21
4.3.3 Identificação morfológica das leveduras.....	22
4.4 Seleção das leveduras como agentes de controle biológico	23
4.4.1 Teste para verificação da temperatura ideal de crescimento	23
4.4.2 Teste da produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas.....	23
4.4.3 Teste de verificação da produção de compostos difusíveis e voláteis.....	24
4.5 Atividade inibitória de substâncias GRAS <i>in vitro</i> ao fitopatógeno	25
4.6 Teste de resistência das leveduras a substâncias GRAS selecionadas	25
4.7 Testes de controle biológico <i>in vivo</i> utilizando o controle clássico e integrado a substância GRAS.....	25
4.7.1 Controle biológico clássico	26
4.7.2 Controle biológico integrado a substâncias GRAS	27
4.8 Verificação da capacidade das leveduras pré-selecionadas em permanecerem viáveis na superfície dos frutos.....	27
4.9 Identificação molecular das leveduras.....	27

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Isolamento e caracterização morfológica dos isolados.....	28
5.2 Seleção das leveduras como agentes de controle biológico	30
5.2.1 Teste para verificação da temperatura ideal de crescimento e teste da produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas.....	30
5.2.2 Teste de verificação da produção de compostos difusíveis e voláteis.....	34
5.3 Atividade antifúngica de substâncias GRAS <i>in vitro</i> ao fitopatógeno <i>Rhizopus stolonifer</i>	36
5.4 Teste de resistência das leveduras a substâncias GRAS selecionadas	38
5.5 Testes de controle biológico <i>in vivo</i> utilizando o controle clássico e integrado a substância GRAS selecionada.....	39
5.5.1 Levedura UFT9555	40
5.5.2 Levedura UFT9547.....	44
5.6 Verificação da capacidade das leveduras pré-selecionadas em permanecerem viáveis na superfície dos frutos.....	46
5.7 Identificação molecular das leveduras.....	48
6 CONCLUSÃO	49
7 REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O controle de doenças durante a fase pós-colheita de frutos é essencial para impedir as perdas ocasionadas durante o armazenamento e comercialização dos frutos. O controle de tais doenças é baseado, tradicionalmente, na aplicação de fungicidas químicos (VERO et al., 2016). Todavia, o uso indiscriminado de fungicidas sintéticos têm um efeito prejudicial à saúde humana e ambiental (SANCHEZ et al., 2019) e pode ocasionar várias doenças ao homem, dentre essas pode-se destacar: insuficiência renal crônica (VALCKE et al., 2017), câncer no colo do útero, desenvolvimento de leucemia mielóide (SOUZA et al., 2019) e alterações dos hormônios da tireóide (LERRO et al., 2018; SHRESTHA et al., 2018).

O Brasil, junto com EUA, União Européia e China está entre um dos quatro maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (PAUMGARTTEN, 2020). A utilização de pesticidas atinge todos os continentes, abrangendo desde pequenas áreas urbanas, aldeias até atingir grandes propriedades rurais (SEEMA PATEL e SUSHREE SANGEETA, 2019). O número de registros de intoxicação por agrotóxicos aumentou duas vezes entre 2007 e 2016 (LARA et al., 2019). E várias agências ambientais e de saúde alertam sobre o perigo do uso indiscriminado de pesticidas, e isso leva a acreditar que se a política agrícola não for reformulada, o custo do uso de pesticidas por agricultores e consumidores e os danos ambientais serão maiores que a produção agrícola (PIMENTA et al, 2019).

Em detrimento ao uso abusivo de pesticidas químicos, métodos alternativos têm sido explorados como forma de controle a doenças pós-colheita, dentre aos quais podem ser aplicados métodos físicos, químicos e biológicos (BŁASZAK et al., 2019; ARRARTE et al. 2017).

Dentre os métodos biológicos utilizados o controle biológico têm aumentado nos últimos anos no Brasil e no mundo. Sendo definido tradicionalmente pelo uso de uma ou mais espécies antagonistas, objetivando-se a redução da densidade de inóculos ou das atividades produtoras de enfermidades de um organismo patogênico (BAKER e COOK, 1974; FERREIRA et al., 2015a).

Diversos microrganismos podem ser utilizados na aplicação de controle biológico, entretanto, o uso de leveduras antagonistas tem se destacado devido as características como: estarem presentes naturalmente nas superfícies dos frutos, não produzirem esporos ou micotoxinas, além de possuírem pouca demanda nutricional levando uma rápida colonização na superfície de frutos, e serem tolerantes ao stresse gerado pelo uso de fungicidas. (FREIMOSER et al., 2019; SANCHEZ et al., 2019; SHEN et al., 2019).

A eficiência do controle biológico tradicional pode ser melhorada pela associação de

leveduras antagonistas com substâncias GRAS (*Generally Recognized As Safe*) que são produtos de baixa toxicidade normalmente utilizados como conservantes de alimentos e são seguros para ingestão, além disso podem possuir efeitos antifúngicos (PALOU et al., 2016). E são isentos de intolerâncias de resíduos em todas as commodities agrícolas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (ZAMANI-ZADEH et al., 2014).

A uva é um fruto típico não climatérico, que possui uma casca fina e alto teor de umidade e açúcares, devido a essas características são mais sensíveis às condições de armazenamento e transporte do que outros tipos de frutos. (ZAHEDIPOUR et al., 2019; XIAO et al., 2019). E podem possuir perdas que variam em torno de 20 a 95% durante a fase pós-colheita (CHOUDHURY e COSTA, 2017).

Dentre os principais fatores de perdas, as doenças fúngicas representam prejuízos econômicos consideráveis no setor vitivinícola, sendo importante o controle dessas fitopatologias (DZEDZE et al., 2019). Além dos prejuízos acarretados a ocorrência de fungos durante a fase de armazenamento em uvas pode resultar na produção de micotoxinas, que podem efetivamente representar uma preocupação para as indústrias e a saúde dos consumidores (WELKE, 2019).

Um dos principais fungos fitopatogênicos que acometem as uvas na fase pós-colheita é o *Rhizopus stolonifer* (VENDITTI et al., 2017; LORENZINI et al., 2019). Esse fungo pode ocorrer em todas as regiões de cultivo de frutos como uvas, maçãs (OGOSHI et al., 2019) e morangos (OLIVEIRA et al., 2019), desenvolvendo uma doença conhecida como podridão mole. O *R. stolonifer* apresenta maior ocorrência em uvas cultivadas e armazenadas em regiões e locais de climas quentes e úmidos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2014; TANČINOVÁ et al., 2017).

O estado do Tocantins possui um clima propício para o desenvolvimento desse fitopatógeno, visto que possui um clima tropical de savanas, que é caracterizado por uma estação chuvosa (de outubro a abril) e outra seca (de maio a setembro), favorecendo portanto a contaminação e disseminação da podridão mole em uvas (EMBRAPA, 1988).

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo isolar, selecionar e identificar leveduras epifíticas provenientes da microbiota da casca da uva e do mosto destinado à fabricação de vinho tinto, e utilizá-las em protocolos de controle biológico tradicional e integrado a substâncias GRAS para o controle da doença pós-colheita produzida por *R. stolonifer* em frutos de uva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Viticultura e uvas de mesa

As primeiras vinhas que foram produzidas no Brasil eram de origem europeia trazidas pelos colonizadores portugueses em 1532. A variedade de uva americana “Isabel” foi introduzida por italianos imigrantes no século XIX, assim tornando-se a base para o desenvolvimento da vinificação comercial nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. No início do século XX, a viticultura paulista substituiu as cultivares da variedade “Isabel” para “Niágara Branca” e “Seibel II” (WURZ et al., 2017). No mesmo período, com incentivos do governo, o Rio Grande do Sul intensificou o plantio de variedades de videira, tendo sua produção concentrada na região da Serra Gaúcha, território vitivinícola consolidado, em nível estadual e nacional, formado a partir de um processo socioeconômico histórico que teve início com a colonização do espaço geográfico pelo “colono” italiano (PIEROZAN, 2017).

Conforme o Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN) a viticultura brasileira se tornou o quinto maior produtor de vinho do hemisfério Sul e é um dos ramos que mais cresce no mundo. A área de produção vitivinícola no Brasil corresponde a cerca de 83,7 mil hectares (OIV, 2019). Atualmente, existem mais de 1,1 mil vinícolas espalhadas pelo país, a maioria instalada em pequenas propriedades.

A videira (*Vitis* spp.) tornou-se uma das espécies modelo para plantações perenes que acumularam uma enorme diversidade genética. Apesar da grande diversidade de genótipos existentes, atualmente, apenas um pequeno número de cultivares de uva são comercialmente cultivados em todo o mundo (SABIR e KUCUKBASMACHI, 2020).

A uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) é uma das frutas mais cultivadas e consumidas (frescas ou em passas) no mundo. De acordo com as estatísticas anuais publicadas pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), a produção destinada ao consumo *in natura* aumentou nos últimos cinco anos. Esse consumo tem crescido, em parte, pela maior procura por uva de mesa “sem sementes” ou “apirênicas”. O crescimento tem sido acompanhado pelo aumento de exigência qualitativa por parte dos consumidores (MARTINS et al., 2019) e usado, principalmente, para a fabricação de vinhos e destilados (OIV, 2014; SANCHO-GALÁN et al., 2020).

A uva é uma fruta não climatérica com baixa atividade fisiológica. Além disso, é sensível à perda de água e à infecção fúngica durante o cultivo e armazenamento. É uma das principais fontes de polifenóis entre as frutas (KADER, 2002; LÓ'AY, et al., 2017). Além de polifenóis contém também, antocianinas, flavonóides, ácidos fenólicos, catequinas e estilbeno

(SAMOTICHA et al., 2017). É uma fruta rica em sabores, bem como fitonutrientes que fornecem alto valor nutricional e dietética. O armazenamento a baixas temperaturas, possibilitada pelo uso da tecnologia de refrigeração, é recomendada para reduzir a perda de qualidade e os riscos de contaminação das uvas de mesa durante toda a fase pós-colheita (FENG et al., 2014; QI, et al., 2014; AKABERI e HOSSEINZADEH, 2016).

Segundo a EMBRAPA (2020), a produção de uvas no Brasil em 2019, foi de 1.445.705 toneladas. Os principais estados brasileiros produtores em 2019 foram o Rio Grande do Sul, Pernambuco, São Paulo e Bahia que produziram respectivamente 666.423, 420.830, 148.379 e 74.142 toneladas.

A produção de uva do estado do Tocantins foi de 12 toneladas em 2018 e 2019 (MELLO e MACHADO, 2020). As principais regiões de produção da cultura, no Tocantins, se encontram nos municípios de Porto Nacional e Lagoa da Confusão. As espécies cultivadas no estado são Niágora Branca, Niágora Rosada, BRS Carmem, BRS Vitória, Isabel Precoce, Rede Globe e Itália. Segundo dados do Governo do Tocantins (2020), o cerrado do estado, produz uvas mais doces que outras regiões do Sul do país, na qual após oito meses de experimentação feita pelo Instituto Rural do Tocantins-Ruraltins, foi constatado que as boas condições de solo, com adubação correta e a alta temperatura ajudam na produção de um fruto com teor de açúcar mais elevado. Esses resultados estão relacionados às altas temperaturas e a grande luminosidade encontrada na região que favorecem a produção de um elevado teor de açúcar nos frutos e, concomitantemente, reduz a acidez do fruto, produzindo uvas mais doces e mais saborosas.

2.2 Microbiota da uva

A microbiota presente em frutos de uva é vasta e pode conter leveduras, bactérias da fermentação acética, bactérias do ácido láctico e fungos (PINTO et al., 2014). A variedade de microrganismos que coloniza a superfície das uvas varia entre as regiões geográficas (FELSOCIOVÁ, 2016). Os microrganismos residentes podem interagir dinamicamente, e isso determina a ecologia microbiana da superfície do fruto em seu tempo de colheita e a comunidade microbiana transferida para o vinho e o suco de uva (LI et al., 2010).

O conhecimento acerca da microbiota presente em frutos de uva é importante para a produção de um vinho com melhor qualidade e atributos desejáveis, além de fornecer informações importantes sobre a população residente e possíveis aplicações biotecnológicas (BARATA et al., 2012).

Alguns microrganismos são encontrados apenas na superfície das uvas, outros têm a

capacidade de sobreviver no vinho. Sendo assim, dentre os microrganismos presente nesse habitat as leveduras são mais estudadas porque são encontradas com mais frequência do que as bactérias, pois exercem papel fundamental na fermentação alcoólica.

As leveduras *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Torulaspota*, *Issatchenkia*, *Candida*, *Dekkera*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia* são normalmente encontradas na superfície das uvas (BARATA et al., 2012) incluindo o gênero *Saccharomyces*, *Hanseniaspora. uvarum*, *Candida lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii* e *Metschnikowia pulcherrima* (OLIVA et al., 2020). Durante a fermentação alcoólica, complementam a ação da espécie *Saccharomyces cerevisiae* as espécies *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces* e *Kluyveromyces* que são responsáveis por oferecer aroma e sabor ao vinho (ROMANO et al., 2003).

Resíduos de pesticidas podem afetar direta ou indiretamente o processo fermentativo realizado por leveduras. Alguns deles podem afetar negativamente a diversidade da comunidade, outros afetam o crescimento e as contagens finais de leveduras e, portanto, podem atrasar a fermentação. Esses efeitos também podem alterar as concentrações de certos compostos responsáveis pela qualidade sensorial de vinhos em geral e o aroma em particular (ARGABATI et al., 2019; REGUEIRO et al., 2015; BRIZ-CID et al., 2018).

Devemos levar em consideração que a viticultura orgânica tem grande importância para se conseguir resultados satisfatórios na produção de uvas para consumo tanto de sucos como de vinhos, resultando assim em uma microbiota mais populosa e diversificada (EMBRAPA, 2020; BORSATO et al., 2020).

2.3 Controle Biológico

O controle biológico é descrito por Fontes et al. (2020) como a redução das populações de organismos indesejáveis que ocorrem nos agroecossistemas nos quais inimigos naturais mantenham sob controle qualquer população com potencial nocivo à atividade humana, como as pragas e doenças da agricultura. Existem três formas de manipulação do controle biológico as quais podem ser usadas isoladamente ou combinadas, entre eles existe o controle biológico por importação ou controle biológico clássico que é quando um antagonista natural, originário de outra área geográfica e diferente da região do fitopatógeno é introduzido na região de ocorrência da doença tendo em vista o seu controle.

Estratégias, o controle biológico conservativo que é quando os agroecossistemas podem ser manejados com objetivo de preservar e aumentar as populações de inimigos naturais; controle biológico aumentativo, definido como a liberação em larga escala do número de indivíduos do

agente de controle biológico em campo com o objetivo de suprimir a praga num prazo relativamente curto para serem bem sucedidas dependem da disponibilidade de formulações efetivas do agente de biocontrole, da sobrevivência do organismo, durante a estocagem e de sua rápida multiplicação e da colonização após a inoculação (FONTES et al., 2020)

O controle biológico é importante pois caracteriza uma nova opção no controle de patógenos que deterioram frutos assim como as uvas, e pode substituir completamente ou parcialmente ao uso de fungicidas químicos. Golge e Kabak (2018) encontraram 59,6% de um ou mais resíduos de agrotóxicos detectados em uvas de mesa coletadas em supermercados, feiras e mercearias. Isso mostra que os agrotóxicos ainda são utilizados de forma indiscriminada, levando assim, a saúde dos consumidores a riscos.

Portanto, o objetivo principal no desenvolvimento e implementação de produtos de controle biológico é melhorar a capacidade dos antagonistas de sobreviverem e terem sucesso no controle de doenças pós-colheita sob uma ampla gama de condições e com variabilidade mínima (DROBY et al., 2009; MARÍN et al., 2016). A eficácia do controle biológico pode ser ainda potencializada pela associação de leveduras com substâncias GRAS, já que estas substâncias podem deter capacidade fungicida ou fungistática (HONG et al., 2014).

Antagonistas, incluindo leveduras, fungos filamentosos e bactérias, são também usados como agentes de controle de doenças de pós-colheita contra patógenos, como *B. cinerea* e *Penicillium* spp., em frutos e vegetais e a podridão de *Rhizopus*, em diversos produtos (PARVEEN et al., 2016). Concomitantemente, alguns produtos à base de levedura são utilizados na proteção de frutas da deterioração fúngica pós-colheita e da extensão da vida útil de diversos produtos alimentícios. Essas aplicações bem-sucedidas sugerem que as leveduras podem ser consideradas uma alternativa também no manejo pré-colheita e outras doenças fúngicas de plantas (FERRAZ et al., 2019).

As leveduras são mencionadas na literatura como agentes de controle biológico para tratar tais doenças em uvas. No trabalho de Ponsone et al. (2016) duas cepas de leveduras antagonistas de *Lachancea thermotolerans* isoladas de uvas viníferas na Argentina mostraram atividade de controle biológico *in vitro* reduzindo o crescimento de fungos ocratoxigênico e formação de ocratoxina A (OTA). Yang et al. (2017) estudou o efeito da levedura *Yarrowia lipolytica* e comprovou sua eficácia na decomposição de uvas na pós-colheita causada por *Talaromyces rugulosus*.

Zhou et al. (2019) utilizou como controle biológico a Kombucha que é uma bebida fermentada por simbiose através de leveduras, resultando em redução da deterioração da uva de mesa, durante o armazenamento refrigerado.

Existem uma vasta opção de espécies de leveduras antagonistas disponíveis na literatura

com resultado eficaz no controle de doenças pós-colheita em uvas. *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodosporidium paludigenum*, *Rhodosporidium fluviale* e *Wickerhamomyces anomalus* contra *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus uvarum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus aculeatus*, *Talaromyces rugulosus*, *Penicillium georgiense*, *Penicillium expansum* (SOLAIRAJ et al., 2020) e *Pichia anomala* contra *Penicillium expansum* (GODANA et al., 2020).

Estudos demonstraram que o controle biológico utilizando antagonistas microbianos e produtos naturais podem ser eficazes no controle pós-colheita de doenças, demonstrando o mesmo percentual de controle que os fungicidas comerciais (BAZIOLI et al., 2019). O estudo desenvolvido por Assaf et al. (2020) contra *P. expansum* em uvas de mesa, onde leveduras isoladas de diferentes locais foram eficazes no controle de *P. expansum* e reduziram a patogenicidade do fungo testado. Wang et al. (2019) também obtiveram resultados satisfatórios com uma levedura antagonista utilizada como controle biológico em deterioração pós-colheita de uvas de mesa causada por *Penicillium rubens*, onde a levedura *Yarrowia lipolytica* controlou significativamente a doença e reduziu significativamente o conteúdo de ocratoxina A (OTA) produzido pelo fungo.

Exemplos de formulações comerciais de biofungicidas disponíveis no mercado nacional e internacional incluem espécies de *Trichoderma* usadas contra diversos patógenos de solo e de partes aéreas da planta, como *R. solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfisii*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora* spp., *Gaeumannomyces graminis*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria* spp., *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Cercospora* sp., *Ascochyta* sp., *Macrophomina phaseolina* (HARMAN, 2006; KAEWCHAI et al., 2009; HEYDARI; PESSARAKLI, 2010; PARVEEN et al., 2016). Também existem formulações com, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseoviridis* e *Gliocladium virens* sendo relatados para aplicação contra diferentes patógenos fúngicos de plantas (BAZIOLI et al., 2019; SPADARO e DROBY., 2016; LIU et al., 2013).

Botector, Remeo e Shemer são formulações comerciais à base de *Aureobasidium pullulans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Metschnikowia fructicola* respectivamente usadas para controlar *Botrytis*, *Erysiphe*, *Plasmopara*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Aspergillus* em uvas e morangos (WISNIEWSKI et al., 2016).

O mecanismo de ação desses microrganismos apresenta um papel importante na atividade de biocontrole, entre eles estão: antibiose, micoparasitismo, produção de enzimas líticas, predação, indução de resistência, e competição por espaço e nutrientes. Muitas vezes, mais de um desses mecanismos estão envolvidos no processo (DROBY et al., 2016). Sendo assim, todas essas espécies foram descritas na literatura como agentes inibitórios de doenças em uvas, demonstrando eficácia nos tratamentos e comprovando a utilização dos mesmos na intervenção

de doenças pós-colheita em frutas, especialmente em uvas.

2.4 Doenças pós-colheita de uva

As doenças fúngicas são um dos maiores problemas durante a produção, manuseio e armazenamento da vinha (GRIMALT e DEHOUCK, 2016). Muitas espécies de fungos podem crescer à baixas temperaturas como também ocasionar doenças em uvas de mesa. Alguns fungos são danosos do ponto de vista econômico (OLIVEIRA et al., 2019) uma vez que causam infecções quiescentes e/ou adquiridas. As infecções quiescentes podem ser inibidas através de mecanismos de defesa fisiológica do fruto hospedeiro, impedindo o desenvolvimento dos fitopatógenos até a fase de maturação dos frutos e são ocasionadas normalmente por fungos dos gêneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia* e *Botrytis*, já as adquiridas são colonizadas por *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e, outros que precisam de fermentos e degradam as bagas manifestando rapidamente indícios de podridões (TERAO et al., 2007).

As principais espécies de fungos fitopatógenos responsáveis por doenças pós-colheita em uvas são: *Aspergillus niger*, *Apergillus flavus*, *Apergillus terreus*, *Apergillus ochraceus*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium expansum*, *P. funiculosum*, *Phomopsis viticola*, *Lasioplodia theobromae* e *Rhizopus stolonifer* (LICHTER et al., 2002).

2.4.1 *Rhizopus stolonifer*

A podridão causada por *Rhizopus* é comum em frutas macias e, mais abundante em frutas cultivadas em regiões de climas quente e úmido, quando comparado com a viticultura de clima frio. Em condições de clima úmido, o fungo pode se espalhar para outras bagas em um cacho, causando uma podridão de cacho (KASSEMAYER, 2017). *R. stolonifer* apresenta micélio bem desenvolvido, hifas cenocíticas, esporângios escuros sustentados por esporangióforos longos, além de rizóides que fixam a hifa ao substrato para absorção de nutrientes (PINTO, 2013).

O fungo produz esporângios com muitos esporos – aplanósporos – e columela proeminente. O ciclo da doença se inicia quando os esporos são disseminados pelo vento e caem na superfície do fruto. Os esporos de *R. stolonifer* são comuns na atmosfera, e a infecção ocorre principalmente em lesões ocasionadas durante as fases de campo, colheita e embalagem (PINTO et al., 2013).

Uma vez na superfície da uva, esse patógeno causa uma mancha circular aquosa e conseqüentemente uma deterioração da cutícula. O tecido afetado torna-se mole, correspondendo ao nome característico da doença que é denominada de podridão mole. A partir daí ocorre extravasamento do suco da baga e promove um odor fermentado. O suco carrega esporos e esse se dissemina infectando as bagas adjacentes (TERAO et al., 2007). Inicialmente o fungo coloniza o cacho produzindo micélio de coloração esbranquiçada, tornando-se com aspecto preto devido à esporulação.

Após o fruto ser infectado, *R. stolonifer* se multiplica resultando no apodrecimento total da fruta no período de três a quatro dias, por isso é considerado dentre os fitopatógenos existentes com maior potencial destrutivo (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2014). Durante a colheita ou embalagem onde os frutos se encontram em temperaturas em torno de 5° C, o fungo coloniza pelas injúrias e se espalha rapidamente pelo fruto, podendo se disseminar para as frutas adjacentes (BONATERRA et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Propor uma estratégia eficaz de controle da podridão mole em uvas, através da utilização de leveduras antagonistas, associadas, ou não, com substâncias GRAS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, purificar e caracterizar a diversidade de leveduras epifíticas obtidas da superfície das uvas (*Vitis vinifera* BRS Carmem) e do mosto destinado a produção de vinho tinto;
- Selecionar os isolados de leveduras obtidos que apresentaram potencial de utilização como agentes de controle biológico em uvas, através de testes de temperaturas, teste para verificação da capacidade de produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas, e verificação da produção de substâncias antagônicas contra o fitopatógeno *in vitro*;
- Testar o efeito antifúngico de diferentes substâncias GRAS contra *R. stolonifer*;
- Verificar a capacidade das leveduras em crescerem em diferentes concentrações de substâncias GRAS selecionadas;

- Testar a eficiência biocontroladora das leveduras previamente selecionadas, através de testes de controle biológico *in vivo* contra o fungo *R. stolonifer* utilizando o controle clássico e integrado a substâncias GRAS selecionadas.
- Verificar a capacidade das leveduras pré-selecionadas em permanecerem viáveis na superfície dos frutos inoculados com as leveduras.

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 Obtenção das amostras

As uvas da espécie *Vitis vinifera* BRS Carmem e o mosto foram obtidos da fazenda Slongo (latitude 10°4527.60'S; longitude 49°3526.23'O), situada próximo à rodovia TO-255, Km 515, zona suburbana, do município de Lagoa da Confusão, estado do Tocantins.

Foram obtidos 20 cachos de uva, sem lesões e injúrias, em pontos distintos da parreira no mês de fevereiro de 2019, acondicionados em sacos plásticos estéreis. O mosto foi coletado de dornas de fermentação para a produção de vinhos. Foram realizadas uma coleta no início da fase de fermentação e outra no oitavo dia de fermentação, obtendo-se 3 amostras de cada fase.

Todas as amostras coletadas foram transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada- LMGA, da Universidade Federal do Tocantins – UFT, campus Palmas-TO, onde foram processadas. A figura 1 indica o local da coleta das amostras.

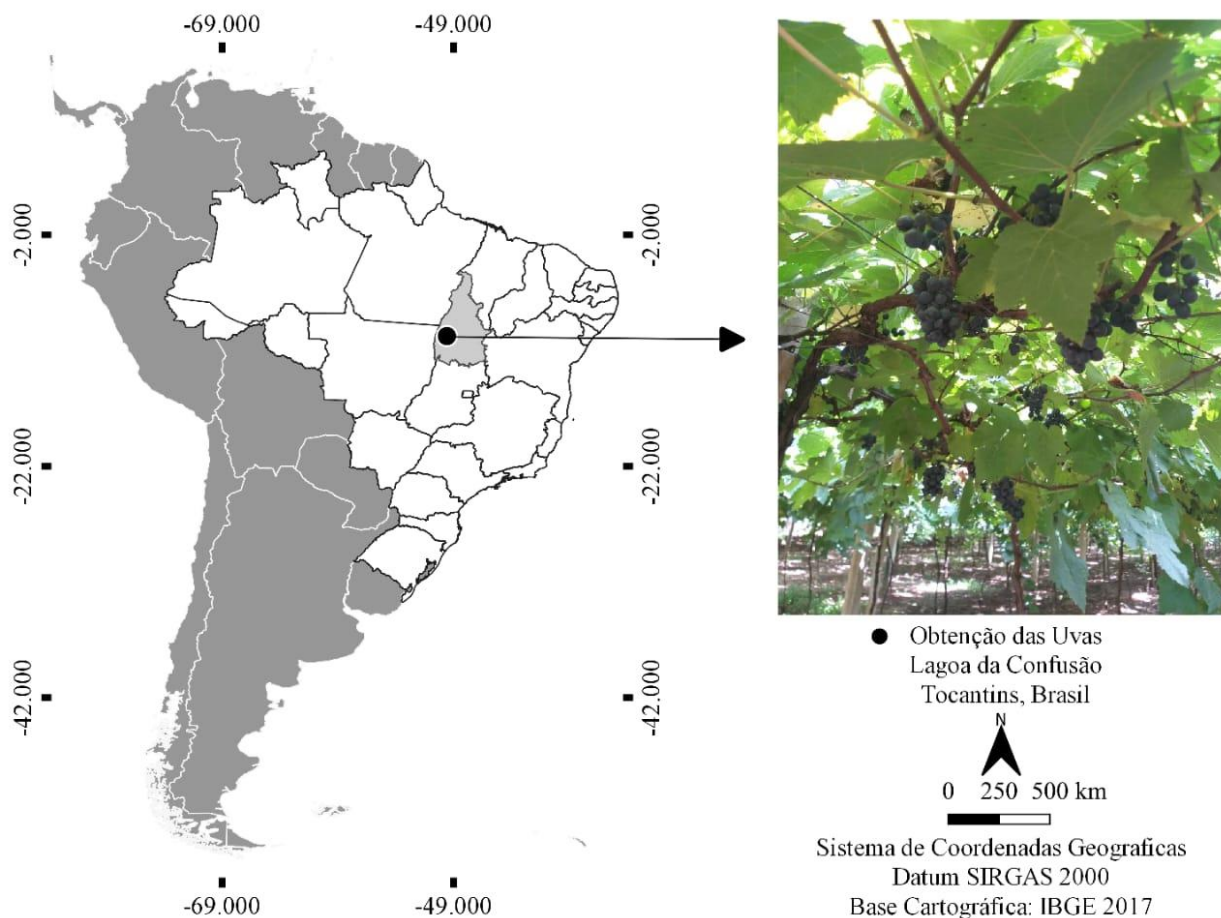


Figura 1. Representação esquemática do ponto de coleta

4.2 Obtenção do fitopatógeno

Rhizopus stolonifer foi obtido da coleção de cultura Carlos Rosa do laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada-LMGA. Para reativação, um disco do micélio fúngico foi retirado de uma cultura que estava armazenada em freezer a -80°C e foi inoculado em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (PDA, Difco), e posteriormente incubado a 25°C por dois dias.

4.3 Obtenção dos isolados de leveduras antagonistas

4.3.1 Isolamento das leveduras epifíticas

Os frutos de uva coletados foram lavados em água corrente, desinfetados em uma solução de 0,5% de hipoclorito de sódio durante 5 minutos, álcool a 70 % por 3 min., lavados com água estéril e deixados secar naturalmente. O isolamento foi realizado de acordo com a

metodologia proposta por Janisiewicz et al. (2010) com adaptações. Após a desinfecção dos vinte cachos de uva, duas uvas foram retiradas de cada cacho, transferidas para Erlenmeyer e lavadas com solução salina a 0,85%. As uvas ficaram sob agitação manual durante 1 minuto e logo após a agitação, a solução foi descartada e adicionou-se uma nova solução salina ao qual foi sonicada em banho maria ultrassônico (Ultra cleaner 1600 A, UNIQUE) durante 1 min. Uma alíquota de 100µL da solução de lavagem obtida foi diluída até 10^{-3} e semeada em meio de cultura Ágar Nutriente Dextrose de Levedura- NYDA (0,3% extrato de carne, 0,5% extrato de levedura, 0,5 % peptona, 1% glicose e 1,8% ágar) em triplicata. As culturas foram incubadas a 25°C por um período de 72 h.

4.3.2 Isolamento das leveduras do mosto

Após a coleta, as três amostras do mosto do início da fermentação, sendo cada amostra acondicionada em um recipiente, foram processadas adicionando-se as três amostras num único frasco a fim de se obter uma maior homogeneidade, em seguida retirou-se uma alíquota de 100 µL e posteriormente foram realizadas diluições seriadas conforme a metodologia citada anteriormente. Da mesma forma procedeu-se com as amostras do mosto do final da fermentação. O isolamento das leveduras obtidas encontra-se detalhados na Figura 2.

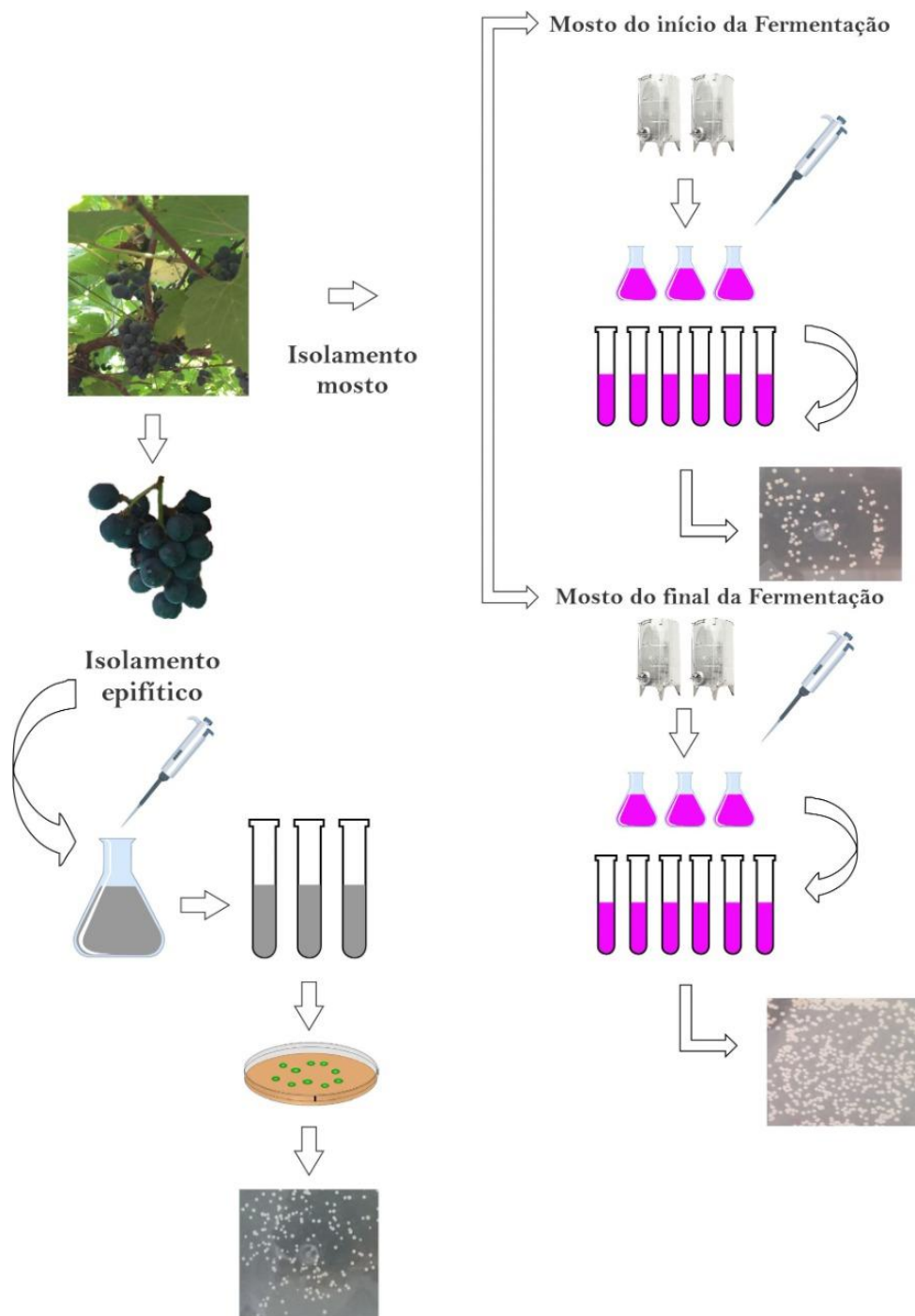


Figura 2. Isolamento epifítico e isolamento do mosto

4.3.3 Identificação morfológica das leveduras

A caracterização dos isolados foi realizada através da observação dos aspectos morfológicos, macroscópicos e microscópicos das colônias obtidas. As observações macroscópicas foram caracterizadas com relação ao tamanho, elevação, bordas, cor e aspecto das colônias características de leveduras (KURTZMAN et al., 2011b). As características microscópicas foram realizadas através de lâminas a fresco, sendo observadas características

como a formação de esporos de reprodução sexuada, brotamento, e a morfologia celular predominante.

Amostras de cada isolado foi purificado e armazenados em tubos criogênicos, contendo caldo GYMP (Caldo glicose, extrato de levedura, malte e peptona) acrescido de 20% de glicerol e foram mantidos a -80°C e depositadas na coleção de culturas Carlos Rosa do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da Universidade Federal do Tocantins.

4.4 Seleção das leveduras como agentes de controle biológico

As leveduras foram testadas quanto às seguintes características: crescimento a 4° , 10° , 25° e 37°C , produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas, produção de compostos voláteis e difusíveis antagonicos ao fungo fitopatogênico e resistência a substâncias GRAS selecionadas. As leveduras que apresentaram características adequadas a um bom agente de controle biológico foram selecionadas e aplicadas nos testes *in vivo*.

4.4.1 Teste para verificação da temperatura ideal de crescimento

Todas as leveduras obtidas foram crescidas a 4° , 10° , 25° e 37°C . Para tanto, todos os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo o meio sólido NYDA e incubadas nas respectivas temperaturas. Para as temperaturas de 25° e 37°C as placas foram mantidas por um período de 72h, no entanto, as cepas submetidas 4°C e 10°C foram armazenadas por um período de 5 dias. A avaliação do crescimento foi realizada de forma qualitativamente através da observação do surgimento de colônias (MARTINEZ et al., 2016).

4.4.2 Teste da produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas

O teste de enzimas pectinolíticas e celulolíticas foi realizado conforme metodologia descrita por Carrasco et al. (2012) com adaptações. Foi realizado um pré-crescimento das leveduras em meio NYDA por 48 h antes do início dos testes de enzimas pectinolíticas e celulolíticas. Para o teste de enzimas celulolíticas, as leveduras foram inoculadas em meio de cultura sólido YNB-Yeast Nitrogen Base (0,67%) suplementado com 1% de celulose. As placas foram então incubadas a temperatura de 10°C por 5 dias e a 25° e 37°C durante 72h. Decorrido o período de incubação foi realizada a detecção da presença da enzima, usando uma solução reveladora de vermelho congo (0,1%) sobre a placa, com posterior lavagem com solução de NaCl 1M. A atividade enzimática foi definida como positiva quando houve formação de um halo claro em torno das colônias em um fundo vermelho.

Para verificar a produção das enzimas pectinolíticas as leveduras foram cultivadas em meio de cultura sólido YNB- Yeast Nitrogen Base (0,67%) suplementado com 1% de pectina e pH ajustado 6,0. Foram incubadas a 10°C por um período de cinco dias e a 25°e 37°C por 72 h. Posteriormente ao período de incubação, as culturas foram avaliadas quanto à atividade enzimática através de um banho com uma solução de lugol a 1%. A atividade foi determinada como positiva quando houve formação de um halo claro em torno das colônias em um fundo marrom

4.4.3 Teste de verificação da produção de compostos difusíveis e voláteis

O teste de antagonismo para a produção de compostos difusíveis, no meio de cultura, foi realizado entre os isolados de leveduras e o fungo fitopatígeno. Para tanto as leveduras foram crescidas previamente em meio NYDA na forma de estrias em um dos lados da placa de Petri, e foram incubados a temperatura de 25 °C por 48 h. Após o período de incubação um disco de 5 mm de diâmetro contendo micélio do fungo *R. stolonifer* foi inoculado do lado oposto da placa. O fitopatígeno cultivado isoladamente foi utilizado como controle. As culturas foram incubadas a 25°C por 2 dias. O crescimento radial do patógeno foi medido em relação ao antagonista e posteriormente comparado ao raio da colônia controle. Para tanto, empregou-se a seguinte fórmula: Crescimento micelial (%) = [(C- T) / C] x 100, onde: C=controle e T=tratamento. Os experimentos foram repetidos três vezes (MARI et al., 1996).

Para determinação dos compostos voláteis, uma cultura da levedura cultivada previamente por 48 h foi inoculada através de 50 µL de uma suspensão de células a 1×10^7 células/mL, determinada previamente por câmara de Neubauer e espalhada uniformemente com ajuda de uma alça de Drigalski estéril em placas de Petri que continham meio NYDA. Em uma outra placa, um disco de 5 mm de diâmetro foi inoculado da cultura de *R. stolonifer* com um dia de crescimento e sem apresentar esporulação. Ambas as placas de Petri foram unidas (patógenos e leveduras inoculadas) e foram lacradas com duas camadas de Parafilme® com a finalidade de unir os conjuntos de placas contendo o patógeno e a levedura, criando uma câmara fechada (ARRARTE et al., 2017).

O diâmetro das colônias foi mensurado na placa que continha o patógeno com auxílio de um paquímetro digital. Os diâmetros estimados foram comparados com os diâmetros observados nos controles. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, foi aplicada a mesma fórmula do teste de compostos difusíveis.

4.5 Atividade inibitória de substâncias GRAS *in vitro* ao fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*

O efeito do carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido propiônico, ácido acético e ácido láctico no crescimento micelial radial de *Rhizopus stolonifer* foi avaliado de acordo com a metodologia de Karaca et al. (2014) com modificações. Placas de Petri foram previamente preparadas com meio NYDA e suplementadas com sais e ácidos nas concentrações de 0,5%, 1% e 3% (v/v). O fungo *R. stolonifer* foi reativado previamente em meio de cultivo NYDA e incubado a 25°C em BOD por 24h. Após este tempo, um disco de 5 mm de diâmetro do fungo foi inoculado no centro de cada placa contendo o meio NYDA acrescido das substâncias GRAS, nas três concentrações indicadas. Para o controle foram usadas placas com meio NYDA contendo o fitopatógeno, porém sem a presença das substâncias GRAS. As culturas foram incubadas a 25°C por 72 horas. O teste foi realizado em triplicata e a avaliação se deu pela medição do diâmetro da colônia do fungo e, comparado com o diâmetro da cultura do fungo no tratamento controle.

Os resultados foram expressos como porcentagem da inibição do crescimento micelial: $[(dc-dt) / dc] \times 100$, em que dc = média do diâmetro da colônia de fungos nas placas de controle e dt = diâmetro médio da colônia de fungos em placas acrescidas das substâncias GRAS (KARACA et al., 2014).

4.6 Teste de resistência das leveduras a substâncias GRAS selecionadas

As mesmas substâncias utilizadas para testar a resistência do fitopatógeno foram utilizadas para testar a sensibilidade dos isolados de leveduras selecionados. As leveduras foram crescidas previamente em meio de cultivo NYDA e incubadas a 25°C por 48 horas. Com o auxílio de uma alça foram inoculadas em meio NYDA acrescido das substâncias GRAS carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido propiônico, ácido láctico e ácido acético nas concentrações (0,5%, 1% e 3%). As culturas foram incubadas a 25°C em BOD por 5 dias. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7 Testes de controle biológico *in vivo* utilizando o controle clássico e integrado a substância GRAS

4.7.1 Controle biológico clássico

As leveduras previamente selecionadas que apresentaram boas características de agentes de controle biológico, conforme os critérios elegidos nesse estudo foram utilizadas nesse teste. Usou-se 45 uvas para cada tratamento (controle positivo, controle negativo, e as concentrações de 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 células/mL das leveduras). As uvas foram previamente lavadas, sanitizadas e após a secagem natural, efetuou-se inicialmente uma lesão de aproximadamente 3 mm de largura e 3 mm de profundidade em cada fruto onde foram depositados os inóculos dos tratamentos empregados. Inicialmente foram inoculados 10 μ L da suspensão de células na concentração de 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 células/mL das leveduras nos frutos lesionados a fim de se observar quais das concentrações seria a mais eficaz contra o fitopatógeno.

Posteriormente a inoculação das leveduras foi realizada a inoculação do fitopatógeno realizada através da deposição de 10 μ L da suspensão de conídios do fungo *R. stolonifer* na concentração de 1×10^5 esporos/mL no local do ferimento. Os frutos foram dispostos em bandejas de plástico, contendo chumaços de algodão embebidos em água estéril, as bandejas foram fechadas com parafilme para conservar a umidade relativa e foram então incubados em câmara úmida a 25°C por 3 dias e o teste também foi realizado em refrigerador a temperatura de 1°C, incubados por 14 dias.

O controle positivo foi efetivado pela inoculação de 10 μ L da solução de esporos do (1×10^5 esporos/mL). Enquanto que o controle negativo foi produzido pela inoculação somente de 10 μ L de água estéril sem a presença do patógeno ou levedura. Após o período de incubação avaliou-se a efetividade da incidência e severidade do controle biológico através da interação do patógeno com a levedura.

A porcentagem de redução da incidência e da severidade da doença foram calculadas segundo equações propostas por Assis et al. (1999): A redução da incidência foi baseada na seguinte equação: $RID (\%) = (N^{\circ}Fd - N^{\circ}Ft) / N^{\circ}Fd \times 100$, onde: $N^{\circ}Fd$ = número de frutos afetados pela doença e $N^{\circ}Ft$ = número de frutos tratados. Já a redução da severidade baseou-se nesta: $RSD (\%) = (DLC - DLT) / DLC \times 100$. Onde: RSD = Redução da Severidade da Doença, DLC = diâmetro da lesão no controle positivo e DLT = diâmetro das lesões dos frutos tratados.

As variáveis quantitativas referentes aos testes *in vivo* foram submetidas aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (Levene). O teste *Kruskal-Wallis*, seguido do teste *post-hoc* de *Dunn* foi realizado entre os tratamentos. Os dados são apresentados em forma de frequência, bem como média \pm desvio padrão. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.7.2 Controle biológico integrado a substâncias GRAS

A concentração da levedura selecionada nos testes prévios foi avaliada quanto a eficácia de realizar biocontrole integrado a substâncias GRAS também previamente selecionada contra o fitopatógeno em frutos de uvas. Para tanto 45 frutos foram inoculados para cada tratamento, conforme a metodologia citada no item 4.7.1. As uvas foram dispostas em bandejas de plástico, contendo chumaços de algodão embebidos em água estéril, as bandejas foram fechadas com parafilme. Os frutos foram armazenados por 3 dias no tratamento cuja temperatura foi de 25°C em BOD e por 15 dias no tratamento à 1°C. Após o período de incubação foram calculadas a porcentagem de redução da incidência e da severidade da doença conforme descrito no item anterior (4.7.1 Controle biológico clássico).

4.8 Capacidade das leveduras pré-selecionadas em permanecerem viáveis na superfície dos frutos

As leveduras selecionadas para o teste *in vivo* foram avaliadas quanto ao tempo de permanência na superfície das uvas. Desta forma, os frutos foram lavados, sanitizados e as leveduras na concentração mais adequada foram inoculadas em lesão de aproximadamente 3 mm de largura e 3 mm de profundidade, em seguida foram armazenados em BOD à 25°C e em refrigerador à 1°C. Uma amostra da lesão de cada fruto foi retirada, transferida para tubos de eppendorfes contendo 900 µL de solução salina a 0,85% e agitados em vortéx. Posteriormente, 100 µL da diluição da solução salina contendo a amostra do fruto, foram inoculados na superfície de placas de Petri com meio de cultura NYDA e incubadas a 25°C por até 48h. Em seguida foi efetuada a avaliação da dinâmica do crescimento da população da levedura em diferentes tempos de armazenamento (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias) para o tratamento à 25°C e em (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias) para 1°C. Os resultados foram expressos em Log₁₀ e cada tratamento constituiu-se de três repetições (LI et al., 2017b).

4.9 Identificação molecular das leveduras

A identificação das espécies das leveduras selecionadas como agente de biocontrole foi realizada pelo sequenciamento de DNA do domínio D1/D2 da subunidade do gene 26S rRNA (KURTZMAN et al., 2011a). A amplificação foi realizada usando primers NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3')

(KURTZMAN e ROBENETT, 1998). As reações de PCR foram realizadas num termociclador, utilizando 5 µL de tampão 10X e 3,0 µL de MgCl₂ a 25 mM, 2 µL de dNTP, 1 µL do iniciador NL1 a 10 pmol e 1 µL do iniciador NL4 a 10 pmol, 0,25 µL de Taq DNA polimerase, 3 µL de DNA e água ultrapura para obter volume final de 50 µL. As condições do ciclo de PCR consistiram em uma etapa inicial a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto de PCR foi purificado e sequenciado por Libkind et al. (2003). As sequências de DNA obtidas foram comparadas com o banco de dados GenBank (BLAST, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isolamento e caracterização morfológica dos isolados

A partir das amostras dos frutos de uvas e do mosto obtido das dornas de fermentação, foram obtidas um total de 38 leveduras que foram agrupados em 14 morfotipos. Dentre os isolados, observou-se que em relação às características macromorfológicas houve diferenças com relação a elevação das colônias, do tipo achatadas e côncavas, a cor entre branco e creme, bordas regulares e irregulares e aspecto seco ou cremosa brilhante/opaca (Tabela 1).

Foram obtidos 3 morfotipos a partir do mosto na fase inicial (MT7, MT8 e MT9) apresentando uma frequência equivalente à uma colônia por placa. A baixa diversidade de isolados de leveduras encontrados no mosto inicial pode ter ocorrido devido ao tipo de armazenamento, em que o mosto inicial ou cultura starter é armazenado sob refrigeração através do congelamento lento. Esse fator pode resultar na diminuição da carga microbiana e afetar a diversidade, visto que o método de conservação pelo frio pode ocasionar lesões estruturais através da desidratação das células, o que leva a um dano permanente devido ao aumento da concentração de solutos intracelulares e colapso da estrutura celular (SOUZA et al., 2013; BRASIL, 2014).

Na fase final de fermentação do mosto foi encontrado um número maior de morfotipos (MT10, MT11, MT12, MT13 e MT14) que apresentou uma frequência mais elevada de isolados. A presença de mais morfotipos obtidos nessa fase pode ter decorrido do fato de que ao longo dos dias a fermentação natural pode ter propiciado o desenvolvimento de espécies distintas, e também é durante essa etapa que são produzidos por leveduras compostos aromáticos e as leveduras do

gênero *Saccharomyces* são comumente mais predominantes nos processos de vinificação (MASNEUF-POMAREDE et al., 2016).

Tabela 1: Morfotipos, frequência de isolamento e caracterização morfológica dos isolados de leveduras epifíticas e do mosto de uvas destinadas a produção de vinho.

Morfotipos	Frequência	Elevação	Borda	Cor	Aspecto
Leveduras epifíticas					
MT1	7	Achatada	Irregular	Branca	Seca
MT2	5	Côncava	Irregular	Creme	Cremosa/Opaca
MT3	3	Achatada	Irregular	Creme	Cremosa/Opaca
MT4	3	Côncava	Regular	Creme	Seco
MT5	2	Côncava	Irregular	Branca	Cremosa/Brilhante
MT6	2	Achatada	Regular	Branca	Cremosa/opaca
Mosto - fase inicial da fermentação					
MT7	1	Achatada	Regular	Branca	Seco
MT8	1	Côncava	Regular	Creme	Cremosa/brilhante
MT9	1	Achatada	Irregular	Branca	Cremosa/Opaca
Mosto - fase final da fermentação					
MT10	4	Côncava	Irregular	Creme	Cremosa/Brilhante
MT11	4	Côncava	Regular	Branca	Seco
MT12	1	Côncava	Irregular	Branca	Cremosa/Opaca
MT13	2	Achatada	Regular	Creme	Cremosa/Brilhante
MT14	2	Apiculada	Regular	Creme	Cremosa/Opaca
TOTAL	38	-	-	-	-

*MT: morfotipos

Ye et al. (2019) conseguiram 480 isolados de levedura durante a fermentação espontânea de seis variedades de uva de mesa. As espécies e populações de leveduras diferiram entre as

variedades de uvas. Nesse trabalho foi encontrado diferentes morfotipos de leveduras, apesar de terem sido isoladas de apenas uma variedade de uva, apontando que é satisfatório a quantidade de microrganismos encontrados no estudo. Guimarães (2005) obteve 14 isolados de leveduras diferentes, obtidas da casca de uvas, enquanto, Nandhini et al. (2019) isolaram trinta e três leveduras epifíticas na superfície das uvas. Resultados que também corroboram com o presente estudo e demonstram um número de leveduras e morfotipos aceitáveis para microbiota epifítica de uvas.

Alguns produtos químicos como Dhitane M45, Cercubin 875 WG, Calda Bordalesa e Ridomil Gold MZ cujos princípios ativos são respectivamente Mancozebe, Tiofanato-metílico, Sulfato de cobre e Mancozebe (Agrolink, 2020) são pulverizados na videira onde se obteve as uvas e o mosto que foram destinados ao isolamento. O uso frequentemente desses fungicidas durante o cultivo é fator importante para a redução da microbiota superficial, confirmando assim o potencial dessas leveduras, uma vez que são resistentes a estes fungicidas (LODEWYCKX et al., 2002).

No entanto, sabe-se que a identificação de espécies utilizando apenas as características morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas são consideradas insuficientes, necessitando de uma confirmação mais precisa através de métodos moleculares (KURTZMAN et al., 2011b). Sendo assim, as leveduras isoladas com maior potencial antagônico ao final de todos os testes *in vitro* foram identificadas molecularmente para definir com maior precisão as suas espécies.

5.2 Seleção das leveduras como agentes de controle biológico

5.2.1 Teste para verificação da temperatura ideal de crescimento e teste da produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas

Os 38 isolados de leveduras obtidos foram testados quanto à capacidade de crescimento nas temperaturas de 4°, 10°, 25° e 37°C. Das leveduras testadas, nenhuma cresceu à temperatura de 4°C, no entanto, todas apresentaram crescimento nas temperaturas de 10°, 25° e 37°C (Tabela 2). Para o teste de pectinase e celulase utilizou-se as temperaturas de incubação de 10°, 25° e 37°C. Cinco isolados produziram pectinases em todas as temperaturas testadas (UFT9520, UFT9528, UFT9531, UFT9546 e UFT9551) e nenhum produziu celulase. Estes 5 isolados foram descartados dos posteriores testes uma vez que foram positivos para pectinase. Os dados estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Seleção das leveduras antagonistas isoladas da superfície de uvas e do mosto de fermentação submetidas aos testes de temperaturas, enzimas pectinolíticas e celulolíticas em diferentes temperaturas.

Isolados	<i>Teste de leveduras antagonistas</i>									
					<i>Pectinase</i>			<i>Celulase</i>		
	4°C	10°C	25°C	37°C	10°	25°	37°	10°	25°	37°
UFT9520	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
UFT9521	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9522	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9523	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9524	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9525	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9526	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9527	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9528	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
UFT9529	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9530	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9531	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
UFT9532	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9533	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9534	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9535	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9536	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9537	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Continua no final da tabela.

UFT9538	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9539	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9540	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9541	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9542	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9543	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9544	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9545	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9546	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
UFT9547	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9548	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9549	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9550	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9551	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
UFT9552	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9553	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9554	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9555	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9556	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UFT9557	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Leveduras que não resistiram as temperaturas nem produziram pectinase e celulase (-) ; Levedura que resistiram as temperaturas e produziram pectinase (+)

O fato do não crescimento a baixa temperatura (4°C), pode ter ocorrido devido os isolados de levedura terem sido obtidos a partir de frutos cultivados em clima tropical, no estado do Tocantins. Visto que no estado prevalecem elevadas temperaturas durante vários meses do ano com predominância de estação seca no inverno e comportamento climato-meteorológico com variações pouco significativas (INPE, 2014; GONTIJO e LIMA., 2017). O que explica as leveduras não resistirem ou se adaptarem em temperaturas extremamente baixas e também justificar o crescimento à temperatura mais elevadas, como observados no estudo.

A temperatura máxima e mínima de crescimento de um microrganismo pode variar de acordo com cada espécie e linhagem. É importante se obter microrganismos resistentes a diferentes faixas de temperaturas tanto baixas, quanto altas, pois, pode aumentar o grau de resistência dessas leveduras nos frutos em condições de armazenamento tanto a frio, quanto em temperatura ambiente (PEREZ et al., 2016; PEREZ et al., 2017). Sabendo-se que uvas são armazenadas a baixas temperaturas, é de grande interesse que se encontre leveduras que mesmo isoladas de clima com elevadas temperaturas cresçam em temperaturas menores como a 10°C. Sendo assim, a utilização de microrganismos que sobrevivem a temperaturas de refrigeração pode favorecer o armazenamento de frutos que precisam permanecer por mais dias em conservação até que sejam consumidos (VERO et al., 2013).

Cinco leveduras foram excluídas a partir do teste de pectinase (UFT9520, UFT9528, UFT9531, UFT9546 e UFT9551) por produzirem esta enzima em todas as temperaturas testadas. As pectinas são polímeros de ácido galacturônico encontrados nas paredes celulares e espaços intercelulares dos tecidos vegetais. Uma grande variedade de microrganismos é capaz de produzir enzimas pectinolíticas, incluindo bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos e nematoides (FAVELA-TORRES et al., 2005).

As leveduras produtoras de pectinase são relatadas na literatura como agentes causadores de deterioração nos frutos pois contribuem com a evolução da degradação da pectina, onde as enzimas degradativas deixam o fruto com a consistência mole, ou aspecto molhado (WILLIAMS et al., 2019; PINTO et al., 2018). A seleção de leveduras não pectinolíticas se mostra satisfatória pelo fato destas não degradarem o fruto (ARRARTE et al., 2017).

Os resultados dos testes de celulase se mostraram satisfatórios, pois, o esperado era selecionar cepas que não produzissem esta enzima, visto que a celulase é uma enzima que degrada a celulose e é um dos constituintes da parede celular vegetal, que é um homopolissacarídeo não-ramificado constituído unicamente por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (FARINAS, 2011; LAKHUNDI et al., 2015). Portanto, para não haver degradação do fruto pela presença das enzimas celulolíticas e pectinolíticas foram

escolhidas leveduras que não apresentassem essa característica. Visto que cepas não produtoras dessas enzimas são relatadas como possíveis agentes de biocontrole (CAVELLO et al., 2019).

5.2.2 Teste de verificação da produção de compostos difusíveis e voláteis

Trinta e três leveduras foram então testadas quanto a capacidade de produzir compostos antagonísticos, tanto difusíveis como voláteis, aos quais todos apresentaram algum grau de antagonismo para *R. stolonifer* (Tab. 3). Para os testes de antagonismo pareado por difusão as taxas de inibição variaram de 2,5% a 19,1%. Todavia, a melhor inibição de crescimento micelial do fungo foi observado 4 potenciais leveduras antagonistas (UFT9521, UFT9529, UFT9547 e UFT9555) que apresentaram capacidade de inibição de: 15,3%; 12,2%; 16,6% e 19,1% respectivamente. A produção de compostos antifúngicos voláteis foi observada em 32 cepas de leveduras antagonistas variando de 2,9 a 19,4%, sendo as cepas (UFT9521, UFT9523, UFT9525, UFT9527, UFT9542, UFT9543, UFT9547, UFT9554 e UFT9555) as que apresentaram melhores capacidades inibitórias.

Tabela 3. Ensaios de atividade antagonista *in vitro* de leveduras antagonistas.

Leveduras	<i>inibições do crescimento do patógeno (%)</i>	
	Compostos difusíveis	Compostos voláteis
UFT9521	15,3±13,8	18,7±15,8
UFT9522	6,5±3,5	12,6±13,8
UFT9523	7,2±6,4	17,0±14,5
UFT9524	4,5±0,8	12,2±20,1
UFT9525	7,8±4,9	18,9±4,8
UFT9526	9,0±0,1	12,4±17,9
UFT9527	8,0±2,0	19,1±4,1
UFT9529	12,2±4,5	7,0±6,1
UFT9530	9,4±0,8	2,9±3,8
UFT9532	7,4±0,9	-1,1±3,6 ^b
UFT9533	8,5±1,8	10,3±1,3
UFT9534	11,0±3,5	6,0 ±0,8
UFT9535	8,0±1,0	6,2±1,4
UFT9536	6,6±0,5	6,2±1,2
UFT9537	6,3±0,2	3,2±0,6
UFT9538	8,3±0,5	13,4±9,0

Continua no final da tabela.

UFT9539	8,17±1,34	10,3±4,2
UFT9540	12,0±0,2	12,0±5,8
UFT9541	7,1±0,2	10,0±9,8
UFT9542	11,0±1,5	17,8±13,9
UFT9543	8,1±2,7	18,9±17,8
UFT9544	8,8±1,7	11,2±5,0
UFT9545	8,2±2,3	4,6±3,4
UFT9547	16,6±1,9	19,2±1,21
UFT9548	8,9±0,9	7,3±2,9
UFT9549	8,6±2,7	8,9±1,6
UFT9550	6,3±2,5	8,4±5,4
UFT9552	9,3±0,3	17,9±0,4
UFT9553	8,0±3,1	12,3±17,3
UFT9554	9,8±0,9	15,1±10,2
UFT9555	19,1±10,8	19,4±5,4
UFT9556	10,2±2,8	14,3±0,1
UFT9557	8,8±0,1	14,4±1,3

Os dados de inibição do crescimento do patógeno são expressos como média \pm DP. ^b- Inibição foi negativa.

Com base nos resultados de ensaios antagonísticos contra *R. stolonifer*, foram selecionadas três cepas de leveduras (UFT9521, UFT9547 e UFT9555) que obtiveram a melhor capacidade de inibição pela produção de compostos difusíveis e voláteis para serem utilizadas nas etapas posteriores de seleção.

Kasfi et al. (2018) isolaram leveduras epifíticas antagonísticas associada a bagas e folhas de uva, tendo a maior atividade *in vitro* contra o fungo *B. cinerea*. Wang et al. (2018) também obtiveram o mesmo resultado de controle com *Saccharomyces cerevisiae*, onde a levedura conseguiu inibir o crescimento de *Botrytis cinerea*. Cordero-Bueso et al. (2017) isolaram a partir de bagos de uvas (*Vitis vinifera* ssp. *Sylvestris*) populações de cepas de leveduras antagonistas capazes de inibirem ou retardarem o crescimento de patógenos através da produção de compostos voláteis.

Arrarte et al. (2017) isolaram leveduras psicotróficas não pectinolíticas e com capacidade de desenvolvimento em suco de maçã, como potenciais agentes de controle biológico. Isolados, identificados como *Candida saque*, que produziram compostos orgânicos voláteis (VOCs) antifúngicos inibiram o crescimento de 5 patógenos da maçã (*P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, e *A. arborescens*).

Os compostos Orgânicos Voláteis (COVs) são compostos de baixo peso molecular produzidos por fungos, bactérias e leveduras (BENNETT et al., 2012). Representam uma alternativa para o controle de doenças pós-colheita de frutos, uma vez que podem ser usadas em mercadorias que são armazenadas em contêineres fechados durante o armazenamento e o transporte (ARRARTE et al., 2017). A produção dos compostos orgânicos voláteis antifúngicos depende de vários fatores como o estágio de crescimento dos microrganismos que os produzem, temperatura e tempo de incubação destes microrganismos, como também, da composição desses compostos (Di FRANCESCO et al., 2015)

5.3 Atividade antifúngica de substâncias GRAS *in vitro* ao fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*

Cinco substâncias GRAS foram utilizadas para o teste, sendo dois sais (carbonato de sódio e bicarbonato de sódio) e três compostos orgânicos voláteis (ácido propiônico, ácido acético e ácido lático). Carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido acético e ácido propiônico apresentaram resultados positivos para a inibição do fungo *R. stolonifer* obtendo 100% de inibições das colônias do fungo. Somente o ácido lático não foi capaz de inibir o fitopatógeno nas menores concentrações testadas (0,5% e 1%), os resultados estão demonstrados nas Figuras 3 e 4.

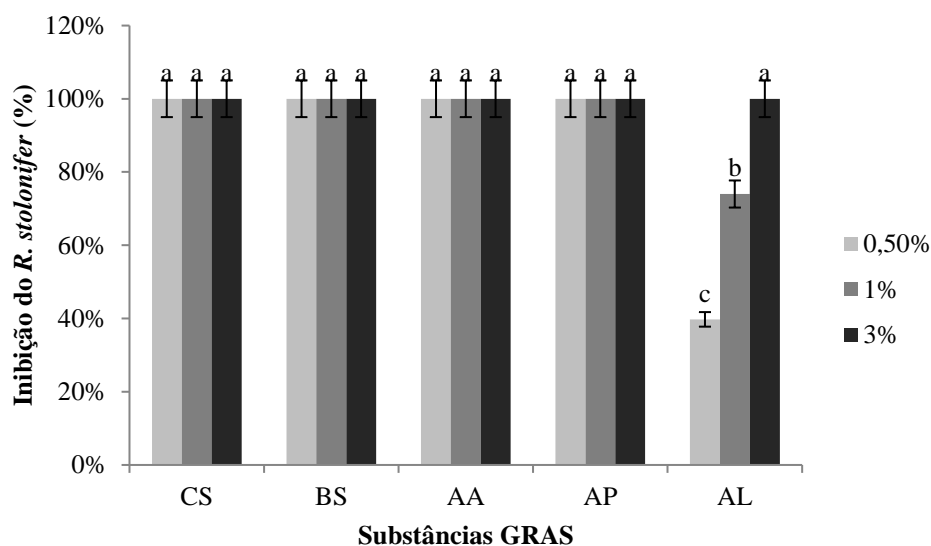


Figura 3 Efeito das substâncias GRAS no desenvolvimento das colônias de *Rhizopus stolonifer* após 72 horas de incubação. CS: Carbonato de Sódio; BS: Bicarbonato de Sódio; AA: Ácido Acético; AP: Ácido Propiônico e AL: Ácido Lático. Os dados de inibição do crescimento do patógeno são expressos pela média de três repetições.

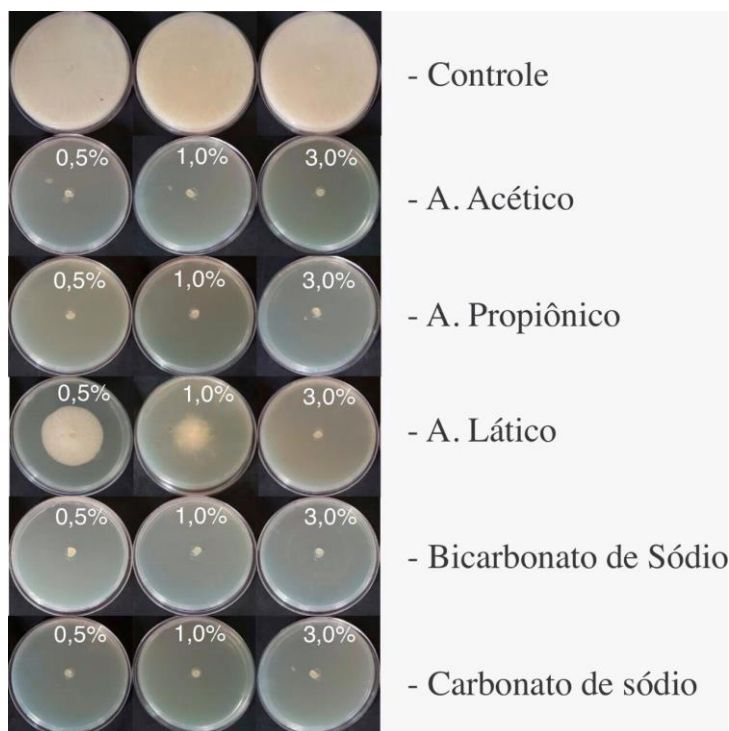


Figura 4. Efeito inibitório de substâncias GRAS contra *R. stolonifer* cultivados em placas de Petri. Após 72 horas de incubação das culturas a 25°C.

As substâncias utilizadas nesse trabalho são descritas na literatura por apresentarem alguma propriedade antifúngica e serem usadas na preservação de alimentos, como o uso de ácido acético é realizado para impedir a deterioração por fungos e aumentar o tempo de vida de prateleira de alimentos (DEBONNE et al., 2020; PALOU, 2018) ou carbonato de sódio já relatado na inibição *R. stolonifer* em frutos de ameixa (*Prunus domestica* L.) (ABBAS et al., 2019).

As principais vantagens do uso de substâncias GRAS para auxiliar na ação antagônica dos agentes biológicos incluem sua disponibilidade, custo relativamente baixo e alta solubilidade em água. O mais acessível economicamente é o bicarbonato de sódio que apresentou resultados satisfatórios em nossos testes, podendo ser o mais indicado por ser viável economicamente e de fácil comercialização (MARTINEZ-BLAY et al., 2020). E a menor concentração de 0,5% foi escolhida, pois apesar das três concentrações (0,5, 1,0 e 3,0%) inibirem o patógeno, a menor concentração é sempre mais a rentável para o produtor ou empresário que deseja utilizá-lo no controle biológico.

Ferreira et al. (2015b) utilizaram substâncias GRAS no controle de fungos fitopatogênicos, causadores de diversas doenças pós-colheita em frutos. Os resultados mostraram uma redução do crescimento dos fungos pelas substâncias: bicarbonato de sódio e carbonato de sódio que inibiram 100% do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Por outro lado,

carbonato de sódio inibiu em 100% o crescimento de *Fusarium guttiforme* em todas as concentrações. Foram positivos também, bicarbonato de sódio nas concentrações de 3% e 5%.

Em outra pesquisa desenvolvida por Kareem et al. (2018), isolados de *R. stolonifer* foram reduzidos em 75% utilizando bicarbonato de sódio como agente antifúngico. Esses dados comprovam a eficácia dos nossos resultados e mostram a relevância de um sal GRAS com propriedades antifúngicas que podem auxiliar no controle biológico, substituindo o uso parcial ou total de fungicidas.

5. 4 Teste de resistência das leveduras a substâncias GRAS selecionadas

Com base nos resultados de ensaios antagônicos contra *R. stolonifer*, foram selecionadas 3 cepas de leveduras (UFT9521, UFT9547 e UFT9555) para verificar a resistência a carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido acético, ácido propiônico e ácido lático. A cepa UFT9521 não foi resistente a carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido acético e ácido propiônico em nenhuma concentração, mas foi resistente apenas ao ácido lático conforme a tabela 5. Dessa forma foi descartada do estudo por apresentar um baixo potencial de resistência a substâncias GRAS.

A levedura UFT9547 não teve o seu crescimento inibido quando cultivada em meio NYDA acrescido de bicarbonato de sódio e ácido acético, nas concentrações de 0,5 e 1%, porém, quando as substâncias foram utilizadas com uma maior concentração (3%), inibiram o desenvolvimento da levedura. O isolado UFT9547 não teve o seu crescimento afetado pelo ácido propiônico a 0,5%, porém, a levedura foi inibida quando o ácido foi usado nas maiores concentrações (1 e 3%). A levedura UFT9555 se desenvolveu na menor concentração (0,5%) de bicarbonato de sódio e do ácido acético, mas foi inibida nas concentrações mais elevadas (1 e 3%). As três leveduras não foram inibidas pelo ácido lático em todas as concentrações avaliadas (Tabela 5).

Tabela 5. Verificação da resistência a substâncias GRAS após 72 horas de incubação

Leveduras	% Inibição GRAS Leveduras															
	CS			BS			AA			AP			AL			
	0,5%	1,0%	3,0%	0,5%	1,0%	3,0%	0,5%	1,0%	3,0%	0,5%	1,0%	3,0%	0,5%	1,0%	3,0%	
UFT9521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
UFT9547	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	
UFT9555	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	

- Levedura sensível; + Levedura resistente. CS: Carbonato de Sódio; BS: Bicarbonato de Sódio; AA: Ácido Acético; AP: Ácido Propiônico e AL: Ácido Lático. Os dados são expressos como média de três repetições.

O sal bicarbonato de sódio é um sal acessível no comércio, de custo baixo, com boa disponibilidade no mercado e com grande facilidade de armazenamento, além de fácil manuseio e aplicação. O ácido lático por mais que tenha sido positivo para o teste de resistência é mais difícil de ser adquirido por produtores de lavoura e por aqueles que comercializam a fruta. Sendo assim, o bicarbonato de sódio é indicativo de ser o mais promissor nos testes futuros. Ferreira et al. (2015a) também testaram a resistência de seus isolados de leveduras a substâncias GRAS, e entre as 4 cepas avaliadas, apenas uma foi capaz de sobreviver 7 dias na presença de bicarbonato de sódio nas 3 concentrações testadas. Isso mostra a fragilidade que estes isolados possuem às substâncias testadas e a incompatibilidade de uso destas substâncias com o controle biológico integrado com estas leveduras que não apresentaram resistência.

5.5 Testes de controle biológico *in vivo* utilizando o controle clássico e integrado a substância GRAS selecionada

A partir dos resultados prévios foram selecionados os isolados UFT9555 e UFT9547 por apresentarem as características de temperatura ideal de crescimento, não produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas, produção de compostos difusíveis e voláteis e resistência a substâncias GRAS. Essas características foram elencadas para escolher um bom agente de biocontrole.

5.5.1 Levedura UFT9555

A Figura 5 mostra a incidência (A) e a severidade (B) da doença, quando os frutos de uvas foram tratados com as leveduras e inoculados com o patógeno. Pelos dados obtidos pode-se observar que houve a redução da incidência e da severidade da doença em frutos tratados com a levedura, independente da concentração utilizada.. A redução da incidência do fungo foi maior nas concentrações mais elevadas da levedura. Da mesma forma, a redução da severidade da doença aumentou quando se inoculou no fruto a maior concentração da levedura, no entanto não houve diferenças estatísticas significativas entre as três concentrações analisadas (1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 células/mL) tanto para o grau de severidade da doença, quanto para a incidência.

A incidência é definida como a porcentagem (frequência) de plantas doentes ou partes de plantas doentes em uma amostra ou população. A severidade é definida como a porcentagem da área ou do volume de tecido coberto por sintomas (AMORIM, 1995). Desta forma foi considerado a utilização da menor concentração (10^7) por ter apresentado a mesma eficácia que as concentrações mais elevadas. Parte desses resultados corroboram com os obtidos por Yang et al. (2021), que ao testarem as concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 , e 10^9 da levedura *Metschnikowia pulcherrima* E1 contra o fungo *Pestalotiopsis vismiae* em nêspera a 20°C , observaram que dentre essas concentrações a mais indicada para o uso foi a de 10^9 células/mL, já que não diferenciava estatisticamente da menor concentração que era de 10^8 células/mL.

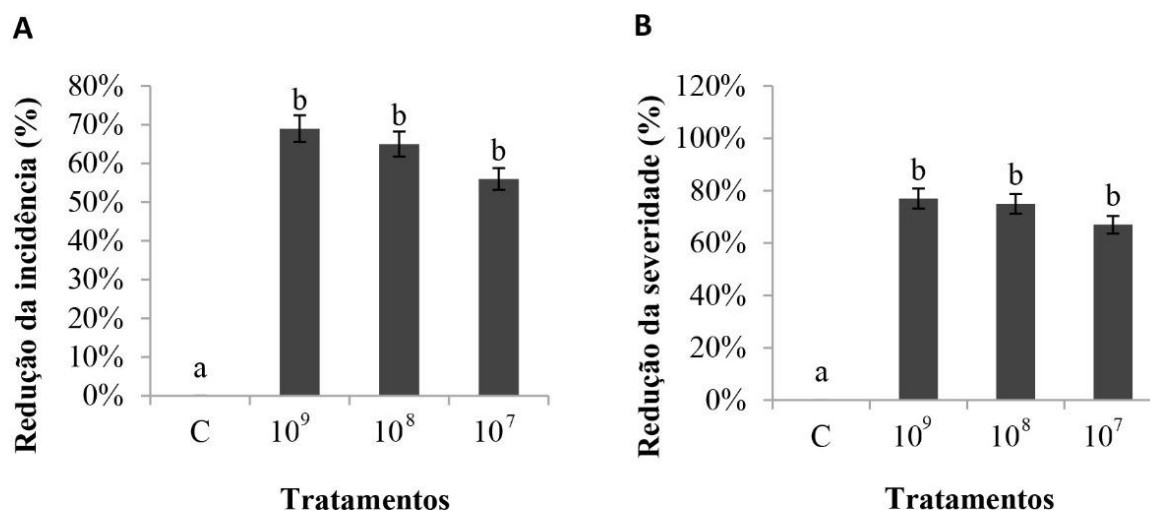


Figura 5. Redução da incidência e severidade de uvas tratadas com a levedura UFT9555 em diferentes concentrações e inoculadas com *Rizophus stolonifer*. Os controles foram tratados apenas com o patógeno e as determinações foram realizadas após 3 dias de armazenamento a 25°C . As barras representam a média de cada tratamento. Semelhanças estatísticas são indicadas por letras iguais. Enquanto letras diferentes representam diferença significativa. Teste Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn onde considerou um $p < 0,05$.

A partir da escolha da concentração da levedura de (10^7) foi realizado o teste de controle integrado da levedura com a substância GRAS contra o fitopatógeno (Figura 6). Neste ponto os resultados obtidos mostraram que para a temperatura de 25°C, o isolado selecionado (UFT9555) conseguiu reduzir sozinho a incidência e a severidade da doença causada por *Rhizopus stolonifer* (Figura 6- A1 e A2) em cerca de 56 e 70% respectivamente da doença em 3 dias de incubação. Por outro lado, o bicarbonato de sódio sozinho teve redução da incidência (Figura 6 – A1) de 72%, e severidade em 80% (Figura 6 – A2). Quando realizado o teste integrado da levedura associada ao bicarbonato de sódio tivemos um valor de 72% para incidência e 82% para severidade. Entretanto, estatisticamente, os valores não diferenciaram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

Para a temperatura de 1°C (figura 6- B1 e B2), apenas o tratamento com a levedura, reduziu sozinho a incidência e a severidade em 56% e 71% respectivamente. O controle integrado obteve redução da incidência de 80% e redução da severidade de 84%. Apenas bicarbonato de sódio teve 80 e 83% na redução da incidência e da severidade. Os resultados da levedura integrada à substância GRAS não diferiram estatisticamente entre si, o que aponta que tanto a utilização da levedura com a substância GRAS como a substância GRAS sozinha (bicarbonato de sódio) podem ser utilizados para o controle da doença. Com relação a temperatura de incubação as duas apresentaram resultados satisfatórios, pois, mantiveram a atividade das leveduras no controle do fitopatógeno.

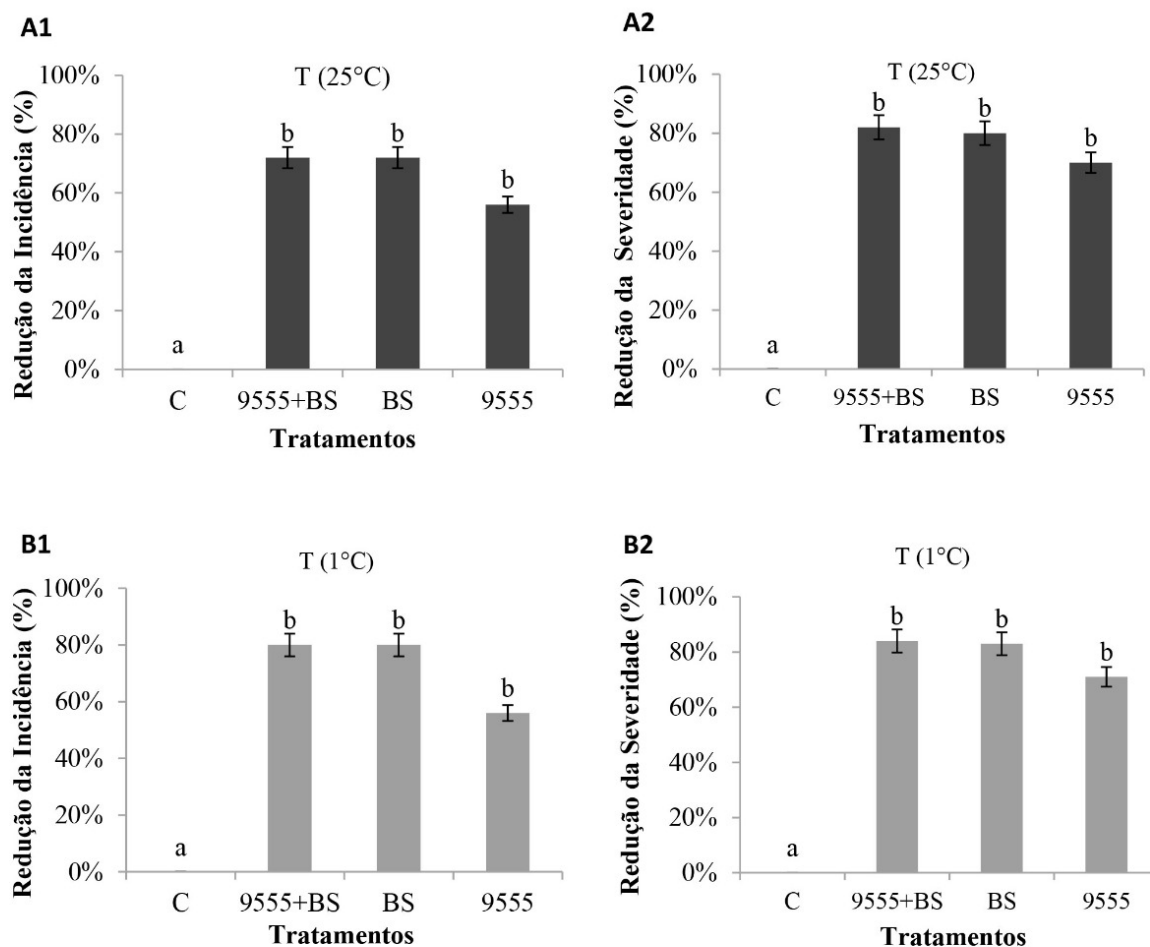


Figura 6. Redução da incidência e severidade de uvas tratadas com a levedura UFT9555 e inoculadas com o *Rhizopus stolonifer*. Os controles foram tratados apenas com o patógeno e as determinações foram realizadas após 3 dias de armazenamento a 25°C e após 14 dias a 1°C. As barras representam a média de cada tratamento. Semelhanças estatísticas são indicadas por letras iguais. Enquanto letras diferentes representam diferença significativa. Teste Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn onde considerou um $p < 0,05$. (C)= controle; (9555+BS) = levedura UFT9555+bicarbonato de sódio; (BS)= bicarbonato de sódio; (9555) = levedura UFT9555.

É recomendada a combinação de dois ou mais métodos de controle de doenças pós-colheita. Para este fim, o aprimoramento destes mecanismos de ação é importante para uma boa utilização e obtenção de resultados. Zhang et al. (2018) relataram que estratégias combinadas de compostos químicos não convencionais e agentes de controle biológicos têm contribuído para vários graus de controle de doenças pós-colheita. Os efeitos benéficos destes métodos dependem da combinação adequada dos agentes com base no conhecimento adequado de seus canais de ação no sistema de controle. Pelos testes moleculares a levedura (UFT9555) foi identificada como *Saccharomyces cerevisiae*, ela é relatada como uma boa opção para ser utilizada em controles

biológicos que fazem apelo a substituição ao uso de agrotóxicos e pesticidas no combate ao controle de doenças nas uvas provocadas por fungos patogênicos (LIU et al., 2017; WANG et al., 2018; WANG et al., 2019).

Algumas leveduras antagonistas por serem eficazes no controle biológico de patógenos são estudadas por terem um mecanismo de ação que levam a levedura a formar um biofilme na superfície da ferida em frutas que inibem a invasão de fungos patogênicos impedindo-o de estabelecer uma infecção (YANG et al., 2021). Zhang et al. (2020) obtiveram resultados semelhantes aos nossos quando estudaram leveduras antagonistas. Em seu trabalho os autores investigaram a eficácia do controle biológico de *Pichia membranefaciens* contra a podridão por *Rhizopus* em pêssegos.

Já Nandhini et al. (2019) avaliaram o potencial inibitório de leveduras isoladas de bagas de uvas contra *R. stolonifer* e observaram que nos testes *in vivo* a colonização de leveduras no local da ferida teve efeito inibitório do fungo de 71,1% comparado com o controle. Em nosso estudo teve efeito inibitório de 71% apenas em frutos tratados com a levedura, e 84% com controle integrado em temperatura de 1°C. Tal fato indica que esta levedura *S. cerevisiae* tem grande potencial para ser empregada como agente antagonista para tratamento de doenças em pós-colheita de uvas, tanto em temperaturas altas, como, em temperaturas baixas.

Para ressaltar a utilização da levedura promissora (UFT9555) nos nossos testes, Liu et al. (2017) obtiveram resultados positivos com a mesma espécie de levedura. Estas foram isoladas de vinhos e de 216 isolados, três desses, foram testados positivos para antagonizar *C. gloeosporioides*. Os isolados antagonistas de *S. cerevisiae* poderiam representar agentes de controle biológicos importantes de doenças em uvas causados por fungos que são responsáveis por perdas econômicas na viticultura.

S. cerevisiae é extremamente eficiente durante as primeiras 48 horas de fermentação porque utiliza de sua absorção rápida de fonte de açúcar e nitrogênio (GUITIPERREZ et al. 2016). Essas fontes são imediatamente armazenadas no vacúolo e posteriormente, durante o processo de fermentação, mobilizado para fora do vacúolo para suportar o crescimento após esgotamento do nitrogênio externo. Essa capacidade impede que outras leveduras dominem a cultura, tornando as cepas de *Saccharomyces* mais bem adaptadas à fermentação do mosto (MANDAKOVIC et al., 2020). Por isso, pode-se conferir a ela, ter sido a melhor cepa de levedura antagonista isolada da fase final da fermentação do mosto, pois, além de realizar o controle biológico ela pode ajudar no processo de fermentação na produção de vinho.

5.5.2 Levedura UFT9547

Os resultados do controle biológico utilizando a Levedura UFT9547, mostraram que houve diferença significativa, reduzindo a incidência e a severidade da doença em relação ao controle, independente das concentrações da levedura utilizadas (Figura 7 – A e B). Dentre as concentrações da levedura avaliadas, os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 10⁸ e 10⁹ células/mL, com reduções da incidência e severidade da doença em torno de 60 e 70%, respectivamente. Shen et al. (2019) e Liu et al. (2020) utilizaram em seus trabalhos as concentrações de 10⁶, 10⁷, 10⁸, e 10⁹ células/mL das leveduras *Sporidiobolus pararoseus* e *Pichia kudriavzevii* contra *B. cinerea* e *R. stolonifer* respectivamente e observaram que a concentração de 1 x 10⁸ foi a mais promissora de todas, sendo a escolhida para os testes *in vivo* integrado e clássico.

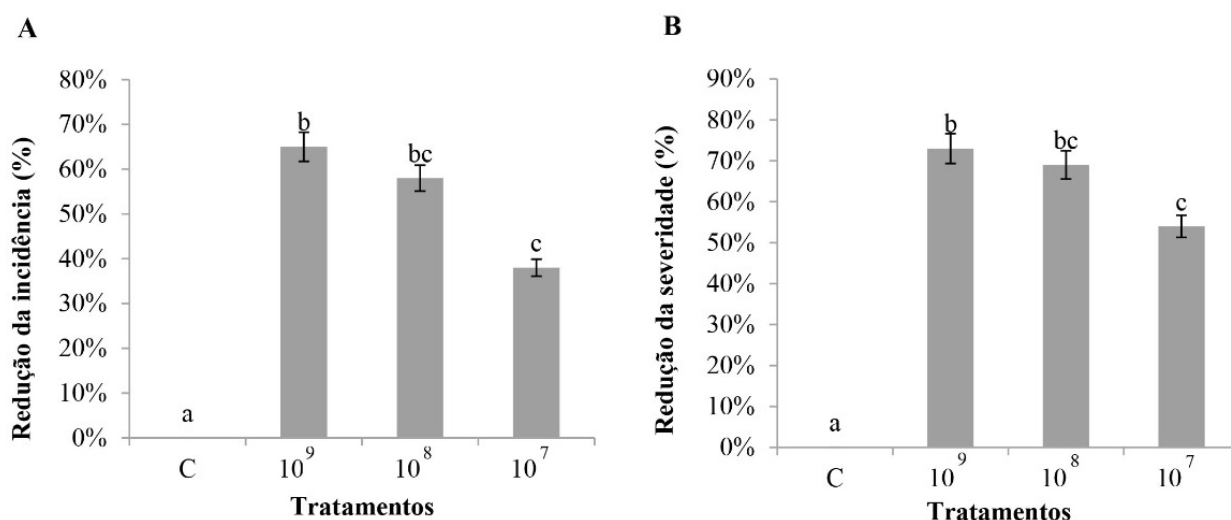


Figura 7. Redução da Incidência e da severidade de uvas tratadas com a levedura UFT9547 em diferentes concentrações e inoculadas com *Rhizopus stolonifer*. Os controles foram elaborados com a inoculação exclusiva do patógeno e as determinações foram realizadas após 3 dias de armazenamento a 25°C. As barras representam a média de cada tratamento. Semelhanças estatísticas são indicadas por letras iguais. Enquanto letras diferentes representam diferença significativa. Teste Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn onde considerou um $p < 0,05$.

A partir da escolha da concentração da levedura (10⁸ células/mL) foi testado o controle integrado com levedura, substância GRAS e fitopatógeno (Figura 8). Os resultados obtidos mostraram que a 25°C o isolado de levedura selecionado (UFT9555) na concentração de 10⁸ células/mL, conseguiu reduzir sozinho a incidência e severidade da doença causada por *R. stolonifer* (Figura 7 – A1 e A2) em cerca de 64 e 74% respectivamente, após 3 dias de incubação. Já o bicarbonato de sódio sozinho apresentou redução da incidência 71% (A1) e severidade em

80% (A2). Realizando o teste integrado da levedura mais bicarbonato de sódio tivemos um valor de 80% para incidência (A1) e 88% para severidade (A2). Entretanto, estatisticamente, os valores não diferenciaram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os frutos incubados a temperatura de 1°C (Figura 8 – B1 e B2), tanto a incidência quanto na severidade, foram reduzidas apenas pela levedura com 72% e 79%, respectivamente. O controle integrado reduziu a incidência em 87% e severidade em 89%. Apenas bicarbonato de sódio teve 80 e 83% na redução de incidência e severidade respectivamente. Esses resultados não diferem entre si pelo teste estatístico.

Pode-se observar que nos testes a 1°C para os tratamentos com apenas bicarbonato de sódio as duas leveduras UFT9547 e UFT9555 obtiveram praticamente os mesmos valores de redução da incidência e severidade (80 e 83%) da doença, indicando a capacidade de inibição do bicarbonato de sódio e a eficácia do mesmo nos tratamentos para controle do fitopatógeno.

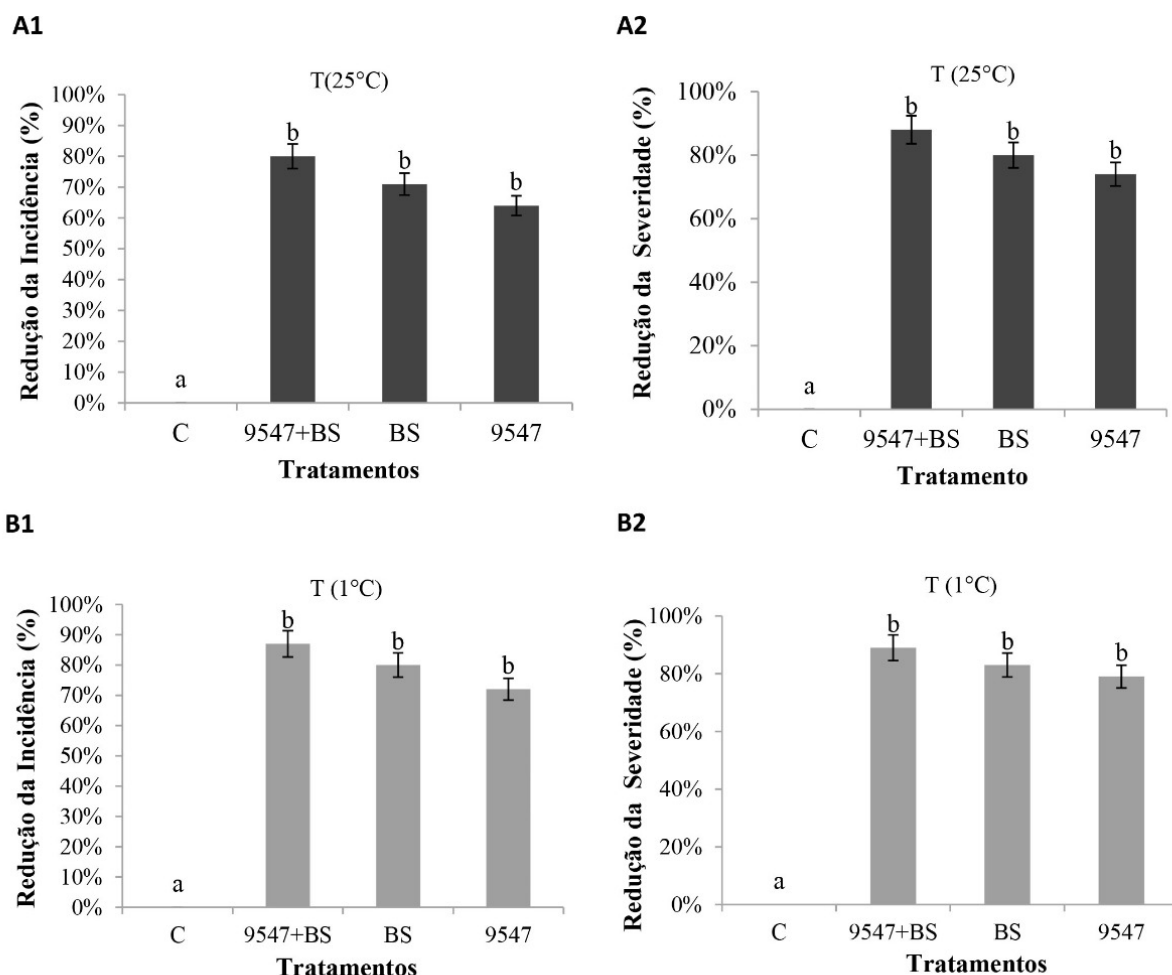


Figura 8. Redução da Incidência e da severidade de uvas tratadas com a levedura UFT9547 em diferentes concentrações e inoculadas com *Rhizopus stolonifer*. Os controles foram tratados apenas com o patógeno e as determinações foram realizadas após 3 dias de armazenamento a 25°C e após 14 dias a 1°C. As barras

representam a média de cada tratamento. Semelhanças estatísticas são indicadas por letras iguais. Enquanto letras diferentes representam diferença significativa. Teste *Kruskal-Wallis* seguido do teste *post-hoc* de *Dunn* onde considerou um $p < 0,05$. (C) = controle; (9547+BS) = levedura UFT9547+bicarbonato de sódio; (BS) = bicarbonato de sódio; (9547) = levedura UFT9547.

A levedura UFT9547 identificada no teste molecular como *Hanseniaspora guilliermondii* apresentou menos eficiência que a levedura anterior, mas ela representa uma proporção significativa da microbiota normal das uvas abundantes em mostos de uva, particularmente nas fases iniciais da fermentação (GRANGETEAU et al., 2016), proporcionando, ainda, ótimas características no vinho e bons resultados em nosso estudo como controle biológico, principalmente por ser uma espécie não *Saccharomyces*, é discutido as aplicações potenciais dessa espécie para a vinificação (LOMBARDI et al., 2018; TESTA et al., 2020); e as características biotecnológicas em outras áreas (VARELA e BORNEMAN et al., 2017).

Xu et al. (2020) realizaram a técnica de cultivar uvas orgânicas, e fermentação espontânea de uvas onde foram identificadas 36 espécies de microrganismos incluindo entre eles 18 espécies de leveduras. *Hanseniaspora* e *Saccharomyces* foram os dois gêneros dominantes. *Hanseniaspora* era superior no início da fermentação, enquanto a abundância relativa de *Saccharomyces* crescia durante o processo.

A aplicação de leveduras como agentes de controle biológico é de grande importância pois além de impedir ou diminuir a deterioração microbiana causada nos frutos, reduz-se também o uso de fungicidas. Mewa-Ngongang et al. (2019) usaram leveduras selvagens como produtoras de compostos de biopreservação através de extratos de bagaço de uva. Com isso se entende a importância de se isolar leveduras do próprio fruto, pois, além de contribuir para a caracterização do microbioma sugere o uso promissor de um possível agente antimicrobiano (MALTA et al., 2019).

5.6 Verificação da capacidade das leveduras pré-selecionadas em permanecerem viáveis na superfície dos frutos

Os testes mostraram que as duas leveduras podem sobreviver e se multiplicarem na superfície de frutos de uva a 25 °C e a 4 °C (Figura 9 – A e B). Isso confirma que as duas cepas adaptaram-se ao local de inoculação, ferida, e à superfície da fruta. Leveduras que colonizam a superfície de frutos e crescem em lesões são capazes de inibir esporos de fungos competindo por

espaço e nutrientes (FILONOW, 1998). Esses resultados sugerem que a competição das leveduras UFT9547 e UFT9555 por nutrientes e espaço pode explicar a capacidade que esses isolados tem de reduzir o crescimento de *R. stolonifer* em frutos de uva.

As populações iniciais das leveduras UFT9555 e UFT9547 foram respectivamente 10^6 e 10^7 células/mL nas temperaturas de 1°C e 25°C . Elas ainda se mantiveram numa concentração aceitável após 14 e 20 dias nas temperaturas de 25 e 3°C respectivamente. Na Figura 9 (A) a temperatura de 25°C mostra que as populações das duas leveduras apresentaram o mesmo comportamento durante os dois primeiros dias de inoculação aumentando exponencialmente e a partir do dia 3. Houve uma pequena redução tornando-se estável até o décimo quarto dia. Já à temperatura de 1°C , Figura 9 (B), as populações das duas leveduras também aumentaram na superfície da fruta até o segundo dia. A partir do segundo dia as populações foram decaindo. O gráfico abaixo (Figura 9B) mostra que a levedura UFT9555 apresentou uma população menor, reduzindo aos poucos até o oitavo dia quando a partir desta data houve uma queda significativa na morte das células. Já a levedura UFT9547 obteve uma população maior que a levedura anterior no segundo dia, mas também apresentou morte significativa das células ao passar dos dias de inoculação.

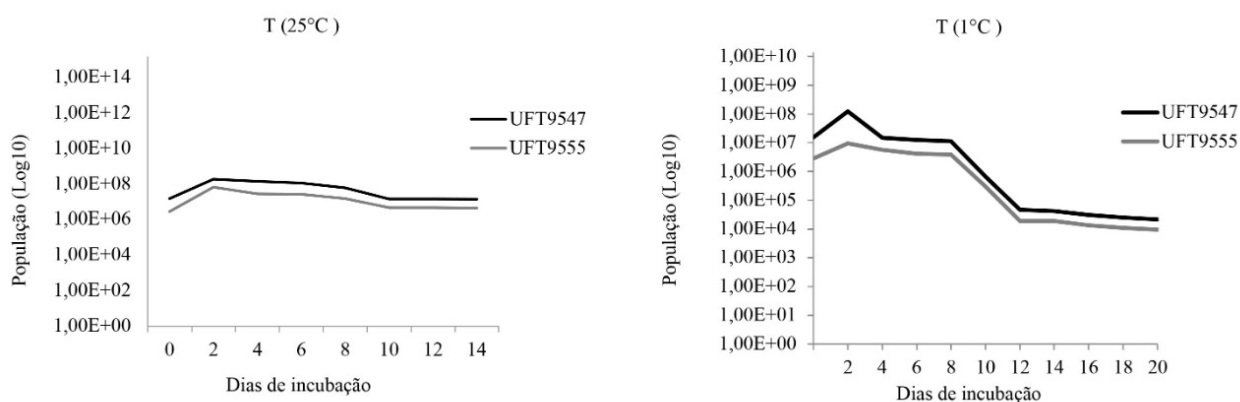


Figura 9. Dinâmica populacional de crescimento da levedura UFT9547 (*Hanseniaspora guilliermondii*) e UFT9555 (*Saccharomyces cerevisiae*) a 25°C (figura A) e a 1°C (figura B) *in vivo* em frutos tratados sob lesões.

Essa queda significativa pode ter ocorrido pela incapacidade das duas leveduras se adaptarem a baixas temperaturas num tempo prolongado de armazenamento. No entanto, o fato da população das duas leveduras decaírem nas duas temperaturas provavelmente pode estar relacionada a uma menor disponibilidade de nutrientes na superfície do fruto.

A viabilidade de leveduras em superfície de frutos pode variar de acordo com a espécie e o fruto utilizado. Wang et al. (2020) notaram que a levedura *Metschnikowia citriensis* permaneceu

viável na superfície de laranjas por 9 dias a 25°C e por 18 dias a 4°C. Shen et al. (2019) estudaram a viabilidade da levedura *Sporidiobolus pararoseus* na superfície de morangos a 20°C e 4°C por 15 dias. A dinâmica da população de *S. cerevisiae*, isoladas previamente de mosto e testadas na superfície de uvas a 25°C, foi reduzida em 4 dias segundo Liu et al. (2017) corroborando com nossos resultados em que nessa mesma temperatura houve redução da levedura até 14 dias.

O tempo de armazenamento da uva a temperatura ambiente é de 7 dias, em baixas temperaturas (0 a 3°C) e o tempo médio de prateleira chega a 21 dias (CHITARRA et al., 2005). Assim, os dois isolados UFT9547 e UFT9555 mantiveram-se na superfície da uva, confirmando ser possível a utilização desses microrganismos como agentes de controle biológico. É importante salientar que obtivemos leveduras que são promissoras pois permaneceram mais tempo viáveis na superfície do fruto que a vida de prateleira sugere o que assegura o controle biológico durante sua vida útil como também a partir desses resultados pode-se definir a frequência da aplicação de cada levedura nos frutos de uva variando de acordo com a temperatura de armazenamento.

5.7 Identificação molecular das leveduras

Neste trabalho identificamos duas leveduras provenientes do mosto destinado à fabricação de vinho. A levedura UFT9547 foi identificada como sendo da espécie *Hanseniaspora guilliermondii* e a UFT9555 da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A *H. guilliermondii* é uma levedura predominante do mosto na fase inicial (Jolly et al., 2014; Lleoxà et al. 2016) e *S. cerevisiae* é predominante da fase final de produção de vinho (GARCIA et al., 2016).

As leveduras que compõem o mosto são conhecidas como não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* e compõem uma grande diversidade de espécies dos gêneros *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Kluyvomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Dekkera* e *Schizosaccharomyces* (PRETORIUS et al., 1999). Algumas dessas espécies não-*Saccharomyces* iniciam a fermentação alcoólica espontânea do mosto e seu crescimento limita-se até o segundo ou terceiro dia quando começam a morrer pela ação tóxica do etanol e são superadas pelo crescimento de leveduras *Saccharomyces* que dominam o processo até o final, frequentemente sendo a única espécie encontrada nessas fases (GRAÇA et al., 2015).

Esta descoberta é valiosa pois a *S. cerevisiae* é uma levedura utilizada para produção de vinho. E além dessa produção ela pode ser utilizada como agente de biocontrole na produção de uvas, além de melhorar os processos fermentativos na produção do vinho. Um dos pontos

importantes nesta levedura encontra-se na substância trealose, um dissacarídeo não redutor. A função da trealose é servir como um protetor de estresse em condições extremas (dessecação, frio e calor) levando à redução de células e danos oxidativos às proteínas (ZHANG et al., 2018). E esse é um fator importante que pode levar a resposta porque as espécies *Saccharomyces* dominam os processos de fermentação de sucos de uvas. As leveduras *S. cerevisiae* também mostram uma outra utilidade. Além de ser usada como agente de biocontrole, pode ser aplicada também como aditivos probióticos (ELGHANDOUR et al., 2020).

6 CONCLUSÃO

Foram obtidos 38 isolados de leveduras e pelos testes de seleção foram selecionadas duas leveduras para utilização como agentes de biocontrole. Estas leveduras foram identificadas molecularmente como sendo das espécies *Saccharomyces cerevisiae* (UFT9547), e a *Hanseniaspora guilliermondii* (UFT9555). Ambas foram consideradas como sendo promissoras para utilização como agentes de controle biológico de uvas tanto no controle integrado quanto no controle clássico, se destacando a linhagem *Saccharomyces cerevisiae*, que foi capaz de inibir o fitopatógeno com uma concentração inferior à *Hanseniaspora guilliermondii*. O uso integrado do bicarbonato de sódio com as leveduras citadas é uma alternativa segura e de baixo custo no controle do *Rhizopus stolonifer* em uva, mas a realização de testes adicionais tais como: verificação dos mecanismos de ação ainda são necessários a fim de se compreender melhor os mecanismos de controle biológico que elas exercem.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, M.; GHAZANFAR, M. U.; RAZA, W.; IQBAL, Z.; AHMAD, S. Inorganic salts and salicylic acid for the control of *Rhizopus stolonifer* on plum. **International Journal of Biosciences**. v. 14, n. 4, p. 103-111, 2019.

AGROLINK, agrolinkfito. Bula Ridomil Gold MZ. Acesso em: 17/11/20. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/ridomil-gold-mz_3108.html.

AKABERI, M.; HOSSEINZADEH, H. Grapes (*Vitis vinifera*) as a potential candidate for the therapy of the metabolic syndrome. **Phytotherapy Research**. 30(4), p. 540-556, 2016.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: MANUAL de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 647–671. 1995.

ARGABATI, A., CANONICO, L., CIANI, M., COMITINI, F. The impact of fungicide treatments on yeast biota of Verdicchio and Montepulciano grape varieties. **PloS One**, v. 14, p.6, 2019.

ARRARTE, E.; GARMENDIA, G.; ROSSINI, C.; WISNIEWSKI, M.; VERO, S. Volatile. Organic compounds produced by antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. **Biological control**. v. 109, p. 14-20. 2017.

ASSAF, L. A. R.; PEDROZO, L. P.; NALLY, M. C.; PESCE, V. M.; TORO, M. E.; CASTELLANOS DE FIGUERO, L. I.; VAZQUEZ, F. Use of yeasts from different environments for the control of *Penicillium expansum* on table grapes at storage temperature. **International Journal of Food Microbiology**. v. 320, p. 2, 2020.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. San Francisco: W.H. Freeman, p. 433, 1974.

BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**. v. 153, p. 243-259, 2012.

BAUTISTA-BAÑOS, E.B.; MOLINA, L.L.; BARRERA-NECHA. Postharvest Decay: Control Strategies, In: Romanazzi, G; Feliziane, E. (Eds.). **Botrytis cinerea (gray mold)**, p. 131-140, 2014.

BAUTISTA-BAÑOS, S., BOSQUEZ-MOLINA, E., BARRERA-NECHA, L. *Rhizopus stolonifer* (softrot). In: Bautista-Baños, S. (Ed.), Postharvest Decay: Control Strategies. Academic Press, United States of America, p. 1–44, 2014.

BAZIOLI, J. M.; BELINATO, J. R.; COSTA, J. H.; AKIYAMA, D.Y.; PONTES, J. G. DE M. KUPPER, K. C. AUGUSTO, F. CARVALHO, J. E. DE.; FILL, T. P. Biological Control of Citrus Postharvest Phytopathogens. **Toxins**. v. 11, p. 460, 2019.

BŁASZAK, M.; NOWAK, A.; LACHOWICZ, S.; MIGDAŁ W.; OCHMIAN, I. E-Beam Irradiation and Ozonation as an Alternative to the Sulphuric Method of Wine Preservation. **Molecules**. Vol. 18, p.24, 2019.

BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L.; MONTESINOS, E. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in post-harvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. **International Journal of Food Microbiology**. v. 84, p. 93 – 104, 2003.

BORSATO, E.; ZUCCHINELLI, M.; D'AMMARO, D.; GIUBILATO, E.; ZABEO, A.; CRISCIONE, P.; PIZZOL, L.; COHEN, Y.; TAROLLI, P.; LAMASTRA, L.; MARINELLO, F. Use of multiple indicators to compare sustainability performance of organic vs conventional vineyard management. **Science of the Total Environment**. v. 711, 2020.

BRASIL. Norma Regulamentadora nº 4/2014 – DIVISA/SVS/SES. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=281122>. Acesso em: 08/01/2020.

BRIZ-CID, N.; CASTRO-SOBRINO, L.; RIAL-OTERO, R.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GANDARA, J. Fungicide residues affect the sensory properties and flavonoid composition of red wine. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 66, p.185–192; 2018.

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. acesso em: 11/11/2020. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>,

CARRASCO, M.; ROZAS, M.J.; BARAHONA, S.; ALCAINO, J.; CIFUENTES, V.; BAEZA, M. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from king George Island, the sub-Antarctic region. **BMC Microbiology**. v. 12, p. 251, 2012.

CAVELLO, I. A.; BEZUS, B.; MARTINEZ, A.; GARMENDIA, G.; VERO, S.; CAVALITTO, S. Yeasts from the Province of Tierra Del Fuego (Argentina): Biodiversity, Characterization and Bioprospecting of Hydrolytic Enzymes. **Geomicrobiology Journal**, v. 9, p. 847-85, 2019.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. Lavras: **Universidade Federal de Lavras**, p. 785, 2005.

CHOUDHURY, M. M; COSTA, T. S. Colheita e pós-colheita. In: LEÃO, P. C. de S. Cultivo da Videira. **Embrapa Semiárido**. Petrolina, PE. Disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=156149&biblioteca=vazio&busca=156149&qFacets=156149&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 23 ago. 2020.

CORDERO-BUESO, G.; MANGIERI, N.; MAGHRADZE, D.; FOSCHINO, R.; VALDETARA, F.; CANTORAL, J. M.; VIGENTINI, I. Wild Grape-Associated Yeasts as Promising Biocontrol Agents against *Vitis vinifera* Fungal Pathogens. **Front. Microbiol.** v. 8, 2017.

DEBONNE, E.; VERMEULEN, A.; BOUBOUTIEFSKI, N.; RUYSSSEN, T.; BOCKSTAELE, F. V.; EECKHOUT, M.; DEVLIEGHER, F. Modelling and validation of the antifungal activity of DL-3-phenyllactic acid and acetic acid on bread spoilage moulds. **Food Microbiology**. v. 88, 2020.

DI FRANCESCO, A.; ROBERTI, R.; MARTINI, C.; BARALDI, E.; MARI, M. Activities of *Aureobasidium pullulans* cell filtrates against *Monilinia laxa* of peaches. **Microbiological Research**. v.181, p.61 – 67, 2015.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p.137-145, 2009.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; TEIXIDÓ, D.; SPADARO, D.; HAISSAM, J. M. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest*. **Biology and Technology**. v. 122, p. 22-29. 2016.

DZEDZE, N.; BREDA, V. V.; HART, R. S.; WYK, J. V. Wine chemical, sensory, aroma compound and protein analysis of wines produced from chemical and biological fungicide treated Chenin blanc grapes. **Food Control**. v. 105, p. 265-276 2019.

EMBRAPA. Notícias - Agricultura familiar e Agroecologia e produção orgânica. Prosa Rural - **Produção de uvas e vinhos orgânicos**. 2009. Acesso em: 27/09/2020. Disponível em: <https://www.google.com/search?q=tradutor&oq=tr&aqs=chrome.2.69i5913j0j69i6012j69i61j69i60.1922j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>

ELGHANDOUR, M. M. Y.; TAN, Z. L.; ABU HAFSA, S. H.; ADEGBEYE, M. J.; GREINER, R.; UGBOGU, E. A.; MONROY, J. C.; SALEM, A. Z. M. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. **Journal of Applied Microbiology**. v. 9, p, 644, 2019.

EMBRAPA. Climas. 1988. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/clima.htm> Acesso em 19 de outubro de 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Ageitec (Agência Embrapa de Informação Tecnológica) Uva de mesa. Brasília, DF - Brasil - CEP 70770-901. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uvademesa/arvore/CONT000g27fxqwx02wx5ok0ha2lip5tm4ku6.html>. Acesso em: 26 de setembro de 2020.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). <http://www.fao.org/faostat/en/#home> Accessed 08.06.17.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos: **Embrapa Instrumentação**. (Embrapa Instrumentação. Documentos) p, 13; 2011.

FAVELA-TORRES E. et al. Pectinases. In: Enzyme technology. New Delhi: **Asiatech publisher**. p. 273–296. 2005.

FELŠÖCIOVÁ, S. Mycotoxin-producing *Penicillium* and other fungi isolated from Slovak wine grapes at various stages of maturation. **J. Microbiol. Biotech Food Sci.** v. 6, n.1, p. 747–751, 2016.

FENG, J.; WANG, X.; FU, Z.; MU, W. Assessment of consumers' perception and cognition toward table grape consumption in China. **British Food Journal.** v. 116, n. 4, p. 611-628. 2014.

FERRAZ, P.; CÁSSIO, F.; LUCAS, C. Potential of Yeasts as Biocontrol Agents of the Phytopathogen Causing Cacao Witches' Broom Disease: Is Microbial Warfare a Solution? **Front. Microbiol.** v. 10, 2019.

FERREIRA, M.; FERREIRA, V. Wines of Brazil: From the past to the future. **BIO Web of Conferences.** Vol, 9, 2017.

FERREIRA, E. M. S.; MALTA, C. M.; GONZAGA, L. V.; BICALHO, J. O.; PIMENTA, R. S. Resistance evaluation biological controller yeast to substances "gras" - (generally regarded as safe) / avaliação da resistência de leveduras biocontroladoras à substâncias "gras" - (generally regarded as safe). **Journal of Bioenergy and Food Science.** Macapá, v. 2, n.4, p.178-182, 2015a.

FERREIRA, E. M. S.; MALTA, C. M.; COELHO, C. M.; PIMENTA, R. S. GRAS substances in control of colletotrichum gloeosporioides growth and fusarium guttiforme vitro / substâncias gras no controle do crescimento de colletotrichum gloeosporioides e fusarium guttiforme in vitro. **J. Bioen. Food Sci.** v. 02, n.4, p, 183-188; 2015b.

FILONOW, A. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Sci. Technol.** v. 8, p. 243–256, 1998.

FREIMOSER, F. M.; RUEDA, M. P.; TILOCCA, B.; MIGHELI, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v. 35, p.154, 2019.

GARCIA, M.; ESTEVE-ZARZOSOB, ARROYO, T. Non-Saccharomyces yeast: Biotechnological role for wine production. In: Grape and wine biotechnology. **Biotechnologia da uva e do vinho.** Alcalá de Henares, Espanha, 2016, v, 11, p, 250–271.

GODANA, E. A.; YANG, Q.; WANG, K.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; ZHAO, L.; ABDELHAI, M. H.; LEGRAND, N. N. G. Bio-control activity of *Pichia anomala* supplemented with chitosan against *Penicillium expansum* in postharvest grapes and its possible inhibition mechanism. **LWT - Food Science and Technology.** v. 124; 109188, 2020.

GOLGE, O.; KABAK, B. Pesticide Residues in Table Grapes and Exposure Assessment. **J. Agric. Food Chem.** v. 66, n. 7, p. 1701-1713, 2018.

GONTIJO, TRAJANO MACHADO.; LIMA, MARIANA BRITO DE. Estudo de conforto térmico: do levantamento à seleção das estratégias construtivas relacionadas ao clima de Palmas – TO. **Revista Sítio Novo**. v.1, 2017.

GRAÇA, A.; SANTO, D.; ESTEVES, E.; NUNES, C.; ABADIAS, M.; QUINTAS, C. Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. **Food Microbiology**. v. 51, p. 179-185, 2015.

GRANGETEAU, C.; GERHARDS, D., V.; WALLBRUNN, C.; ALEXANDRE, H.; ROUSSEAU, S.; GUILLOUX-BENATIER, M. Persistence of two non-*saccharomyces* yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmerella*) in the cellar. **Microbiol.** v.7, n.268, 2016.

GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **J. Chromatogr. A**. v.1433, p. 1-23, 2016.

GOVERNO DO TOCANTINS – Notícias. (KÁSSIA, M.). Cerrado do Tocantins produz uvas mais doces que outras regiões do Sul do país. **Portal de notícias do Tocantins**. 2019. Acesso em: 26 de setembro de 2020. Disponível em: <https://portal.to.gov.br/noticia/2019/6/13/cerrado-do-tocantins-produz-uvas-mais-doces-que-outras-regioes-do-sul-do-pais/#:~:text=As%20uvas%20produzidas%20no%20estado,da%20fruta%20%C3%A9%20de%2017%20%25.>

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005, 118 f. Tese (mestrado em ciências farmacêuticas) Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2005.

GUTIÉRREZ, A.; SANCHO, M.; BELTRAN, G.; GUILLAMON, J.M.; Warringer, J. Replenishment and mobilization of intracellular nitrogen pools decouples wine yeast nitrogen uptake from growth. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.100, p. 3255-3265, 2016.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**. v. 96, n. 2, p. 190-194; 2006.

HEYDARI, A.; PESSARAKLI, M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. **Journal of Biological Sciences**. v. 10, n. 4, p. 273-279, 2010.

HONG, P.; HAO, W.; LUO, J.; CHEN, S.; HU, M.; ZHONG, G.; Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 88, p. 96-102, 2014.

HUANG, R.; LI, G.Q.; ZHANG, J.; YANG, L.; CHE, H.J.; JIANG, D.H.; HUANG, H.C. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. **Phytopathology**. v. 101, p, 859-869; 2011.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 26/09/2020.

INPE: BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**. Estação de Palmas: Climatologia, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO (IBRAVIN). História do Vinho no Brasil. Disponível em: Acesso em: 24 de setembro de 2020.

INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE (OIV). Disponível em: <http://www.oiv.int/>. Acesso em: 24 de setembro de 2020 - oiv life

INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE (OIV). <http://http://www.oiv.int/es.2017> acesso em 25 de setembro de 20.

JANISIEWICZ, W. J.; CONWAY, W.S. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. An international journal for reviews in postharvest biology and technology. 2010.

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

KADER A. A. Postharvest Technology of Horticulture Crops. **Third Edition**. v.1, p. 51, 2002.

KAEWCHAI, S.; SOYTONG, K.; HYDE, K. D. Micofungicides and fungal biofertilizers. **Fungal Diversity**. v. 38, p. 25-50, 2009.

KARACA, H.; PÉREZ-GAGO, M. B.; TABERNER, V.; PALOU, L. Evaluating food additives as antifungal agents against *Monilinia fructicola* in vitro and in hydroxypropyl methylcellulose–lipid composite edible coatings for plums. **International Journal of Food Microbiology**. v. 179, p. 72-79, 2014.

KAREEM, K. T.; AFOLABI, Q. O.; SHORINMADE, A. Y.; AKINBODE, O.A. Management of Seed-Borne Fungi in Cowpea Using Leaf Extracts and Sodium Bicarbonate. **J. Appl. Sci. Environ. Manage.** v. 22, n. 4, p. 565 – 570, 2018.

KASFI, K.; TAHERI, P.; JAFARPOUR, B.; TARIGHI, S. Identification of epiphytic yeasts and bacteria with potential for biocontrol of grey mold disease on table grapes caused by *Botrytis cinerea*. **Spanish Journal of Agricultural Research**. v. 16, n. 1, p. 16, 2018.

KASSEMAYER, H.-H.; Chapter 4. Fungi of Grapes. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. p. 103-132, 2017.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. Gene sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. The Yeasts: a Taxonomic Study, 5th edn. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (eds), **Science B.V., Elsevier**, Amsterdam, p. 137–144. 2011a.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts: Phenotypic, Ultrastructural, Biochemical and Molecular Properties Used for Yeast Classification. **The Yeasts, a Taxonomic Study Elsevier**. Cap 7. 2011b.

KURTZMAN C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v.73, p.331–371. (1998).

LAKHUNDI, S.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of Acanthamoeba infections. **Parasites & Vectors**. v. 8, p. 23, 2015.

LARA, S. S. DE; PIGNATI, W. A.; PIGNATTI, M. G.; LEÃO, L. H. DA C.; MACHADO J. M. H. A agricultura do agronegócio e sua relação com a intoxicação aguda por agrotóxicos no Brasil. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**. v. 15. p. 1-19, 2019.

LERRO, C. C.; FREEMAN, L. E. B.; DELLAVALLE, C. T.; KIBRIYA, M. G.; KILFOY, B. A.; JASMIN, F.; KOUTROS, S.; PARKS, C. G.; SANDLER, D. P.; ALAVANJA, M. C. R.; HOFMANN, J. N.; WARD, M. H.; Occupational pesticide exposure and subclinical hypothyroidism among male pesticide applicators. **Occupational and Environmental Medicine**. n. 104431, p. 1-11, 2018.

LIBKIND, D .; BRIZZIO, S .; RUFFINI, A .; GADANHO, M .; BROOCK, M .; SAMPAIO, J.P. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 84, p. 313–322, 2003.

LICHTER, A.; ZUTCHY, Y.; SONEGO, L.; DVIR, O.; KAPLUNOV, T.; SARIG, P.; BEN-ARIE, R. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**. v. 24, p. 301–308, 2002.

LI, Q.; LI, C.; LI, P.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; ZHENG, X.; YANG, Q.; APALIYA, M. T.; BOATENG, N. A. S.; SUN, Y. The biocontrol effect of *Sporidiobolus pararoseus* Y16 against postharvest diseases in table grapes caused by *Aspergillus niger* and the possible mechanisms involved. **Biological Control**. v. 113, p. 18-25, 2017.

LI, S.; CHENG, C.; LI, Z.; CHEN, J.; YAN, B.; HAN B.; REEVES, M. Yeast species associated with wine grapes in China. **International Journal of Food Microbiology**. v.138, p. 85-90, 2010.

LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, Y. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **Int. J. Food Microbiol.** v. 167, p, 153–160, 2013.

LIU, X.; GAO, Y.; YANG, H.; LI, L.; JIANG, Y.; LI, Y.; ZHENG, J. *Pichia kudriavzevii* retards fungal decay by influencing the fungal Community succession during cherry tomato fruit storage. **Food Microbiology**. 2020.

LIU, Z.; DU, S.; REN, Y.; LIU, Y. Biocontrol ability of killer yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from wine against *Colletotrichum gloeosporioides* on grape. **J Basic Microbiol.** v. 58, p-1–8, 2017.

LO'AY, A. A. Preharvest salicylic acid and delay ripening of 'superior seedless' grapes. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 4, p. 227–230, 2017.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 21, p. 583-606, 2002.

LOMBARDI, S. J.; PANNELLA, G.; IORIZZO, M.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; TREMONTE, P.; SUCCI, M.; SORRENTINO, E.; MACCIOLA, V.; RENZO1, M. D.; COPPOLA, R. Sequential inoculum of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae* for winemaking Campanino on an industrial scale. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 34, n. 161, p. 3-10, 2018.

LORENZINI, M.; CAPPELLO, M. S.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A.; ZAPPAROLI, G. New records of *Penicillium* and *Aspergillus* from withered grapes in Italy, and description of *Penicillium fructuariae-cellae* sp. nov. **Phytopathologia Mediterranea**. v. 58, n. 2, p. 323-340, 2019.

LORENZINI, M.; ZAPPAROLI, G. Epiphytic bacteria from withered grapes and their antagonistic effects on grape-rotting fungi. **International Journal of Food Microbiology**. v. 319, 2020.

LIU, X.; GAO, Y.; YANG, H.; LI, L.; JIANG, Y.; LI, Y.; ZHENG, J. *Pichia kudriavzevii* retards fungal decay by influencing the fungal Community succession during cherry tomato fruit storage. **Food Microbiology**. v. 88, 2020.

MALTA, C. M.; FERREIRA, E. M. S.; SILVA, T. H. DA; OLIVEIRA, D. A. B.; SILVA, F. M. P. DA; PIMENTA, R. S. Isolation of epiphytic yeasts from *Eugenia dysenterica* DC. fruits and evaluation of their antimicrobial activity against phytopathogenic fungi. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. **Ciências Naturais**. v. 14, n. 2, 2019.

MANDAKOVIC, D.; PULGAR, R.; MALDONADO, J.; MARDONES, W.; GONZÁLEZ, M.; CUBILLOS, F. A.; CAMBIAZO, V. Fungal Diversity Analysis of Grape Musts from Central Valley-Chile and Characterization of Potential New Starter Cultures. **Microorganisms**. v. 8, p. 956, 2020.

MARI, M.; GUIZZARDI, M.; PRATELLA, G. C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. **Biol Control**. v. 7, p. 30-37, 1996.

MARÍN, A.; CHÁFER, M.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A.; TORRES, R.; USAL, J.; TEIXIDÓ, N. Effect of different coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* on grapes. **Biological Control**. v. 96, p. 108–119, 2016.

MARTINEZ, A.; CAVELLO, I.; GARMENDIA, G.; RUFO, C.; CAVALITTO, S.; VERO, S. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. **Extremophiles**. v. 20, p. 759-769, 2016.

MARTÍNEZ-BLAY, V.; PÉREZ-GAGO, MARÍA B.; FUENTE, B. DE LA; CARBÓ, R.; PALOU, L. Edible Coatings Formulated with Antifungal GRAS Salts to Control Citrus Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and Preserve Postharvest Fruit Quality. **Coatings**. v.10, p.730, 2020.

MARTINS, E. A. Q. **Avaliação do efeito da gestão de diferentes enrelvamentos na qualidade da uva de mesa, nas castas "Red Globe" e "Crimson Seedless"**. 2019. 61 f. Tese (Mestrado em agronomia) Instituto politécnico de Beja escola superior agrário, Beja, 2019.

MASNEUF-POMAREDE, I. et al. The genetics of non-conventional wine yeasts: current knowledge and future challenges. **Frontiers in microbiology**. v. 6, n. 1563, 2016.

MELLO, L. M. R. DE.; MACHADO, C. A. E.; Vitivinicultura brasileira: panorama 2019. **Embrapa**. COMUNICADO TÉCNICO 214, 2020.

MEWA-NGONGANG, M.; PLESSIS, H. W. DU.; NTWAMPE, S. K.; CHIDI, B. S.; HUTCHINSON, U. F.; MEKUTO, L.; JOLLY, N. P.; Grape Pomace Extracts as Fermentation Medium for the Production of Potential Biopreservation Compounds. **Foods**. v. 8; n. 51, 2019.

NANDHINI, M.; HARISH, S.; BEAULAH, A.; AIYANATHAN, K. E. A. Antagonistic activity of epiphytic yeast against grapes mold caused by *Rhizopus sp.* **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** ; v.8, n.3, p. 2302-2306, 2019.

OGOSHI, C.; ARGENTA, L. C.; MONTEIRO, F. P.; PINTO, F. A. F. M.; GONÇALVES M. W. Postharvest apple rot: economic losses and alternative management. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 9 2019.

OLIVA, J.; GIRON, F.; CAYUELA, J. M.; MULERO, J.; ZAFRILLA, P.; MIGUEL, A. C. Effect of fungicides on the yeast population during spontaneous fermentation in the vinification of monastrell grapes. **LWT**. v. 131, 2020.

OLIVEIRA, J.; PARISI, M. C. M.; BAGGIO, J. S.; SILVA, P. P. M.; PAVIANI, B.; SPOTO, M.H. F.; GLORIA, E.M. Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. **International Journal of Food Microbiology**. v. 292, p. 150-158, 2019.

PALOU, L.; ALI, A.; FALLIK, E.; ROMANAZZI, G. GRAS, plant- and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. **Postharvest Biology and Technology**. v. 122, p. 41-52, 2016.

PALOU, L. Postharvest Treatments with GRAS Salts to Control Fresh Fruit Decay. **Horticulturae**. v, 4, n. 46, 2018.

PARVEEN, S.; ABDUL, H. W.; BHAT, M. Y.; KOKA, J. A. Biological control of postharvest fungal rots of rosaceous fruits using microbial antagonists and plant extracts – a review. **Czech Mycolog**. v. 68, n. 1, p. 41-66, 2016.

PEREZ, M.F.; CONTRERAS, L.; GARNICA, N.M.; FERNÁNDEZ-ZENOFF, M.V.; FARÍAS, M.E.; SEPULVEDA, M.; RAMALLO, J.; DIB, J.R. In: _____. **Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons**. San Francisco, California, v. 10, p. 11, 2016.

PEREZ, M. F.; IBARRECHE, J. P.; ISAS, A. S.; SEPULVEDA, M.; RAMALLO, J.; DIBA, J. R. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. **Biological Control**. v. 115, p. 135-140, 2017.

PIEROZAN, V. L. **O território da viticultura orgânica no território da vitivinicultura da “Serra Gaúcha” o caso dos viticultores de Cotiporã – RS.** 2017, 132 f. Tese (Dissertação de mestrado). Universidade federal do rio grande do sul instituto de geociências. Porto Alegre, 2017.

PIMENTA, R.S.; FERREIRA, E. M. S.; SILVA, J.F.M. da.; NASCIMENTO, G.N.L. New Brazilian law may put food production safety in check. **Public Health.** v. 167, p. 159-160, 2019.

PINTO, C.; PINHO, D.; SOUSA, S.; PINHEIRO, M.; EGAS, C.; GOMES, A.C. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. **Plos One.** v. 9, 2014.

PINTO, L. R. **R. *Stolonifer* apresenta micélio bem desenvolvido, hifas cenocíticas, esporângios escuros sustentados por esporangióforos longos, além de rizóides que fixam a hifa ao substrato.** 2013. 63 f. Tese (Mestrado em Ciências - fitopatologia). Universidade de São Paulo. Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2013.

PINTO, U. M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; Deterioração Microbiana Dos Alimentos. **Abia, Artigo para azeites.** Universidade de São Paulo, USP 2018. Acesso em: 28 de Outubro de 2020. Disponível em: <https://www.abia.org.br/vsn/temp/z2018918ArtigoparaazeitesDeterioracaomicrobianadosalimentos11Set2018...pdf>

PONSONE, M. L.; NALLY, M. C.; CHIOTTA, M. L.; COMBINA, M.; KÖHL, J.; CHULZE, S. N. Evaluation of the effectiveness of potential biocontrol yeasts against black sur rot and ochratoxin A occurring under greenhouse and field grape production conditions. **Biological Control.** v. 103, p. 78-85, 2016.

PRETORIUS, I.S.; WESTHUIZEN, V.D.T.J.; AUGUSTYN, O.P.H. Yeast bioversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. **S Afr J Enol Vitic.** v. 20, p. 61–74, 1999.

QI, L.; XU, M.; FU, Z.; MIRA, T.; ZHANG, X. (CSLDS)-S-2: A WSN-based perishable food shelf-life prediction and LSFO strategy decision support system in cold chain logistics. **Food Control.** v. 38, p. 19- 29, 2014.

REGUEIRO, J.; LOPEZ-FERNANDEZ, O.; RIAL-OTERO, R.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GANDARA, J. A review on the fermentation of foods and the residues of pesticides-biotransformation of pesticides and effects on fermentation and food quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v. 55, p. 839-863, 2015.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CAPECE, A. Role of yeast species and strains in wine flavor. **Int. J. Food Microbiol.** v. 86, p.169-180, 2003.

SABIR, A.; KUCUKBASMACHI, H. Agronomic response of ‘Michele palieri’ (*Vitis vinifera* L.) table grape to intraspecific diploid and interspecific tetraploid pollinizers. **Scientia Horticulturae**. v. 272, 2020.

SAMOTICHA, J.; WOJDYŁO, A.; GOLIS, T. Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidante activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. **Food Chemistry**. v. 215, p. 263–273, 2017.

SANCHEZ, A. D.; OUSSET, M. J.; SOSA, M. C.; Biological control of *Phytophthora collar* rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. **Biological Control**. v. 135, p. 124-134, 2019.

SANCHO-GALÁN, P.; AMORES-ARROCHA, A.; PALACIOS, V.; JIMÉNEZ-CANTIZANO, A. Preliminary Study of Somatic Variants of Palomino Fino (*Vitis vinifera* L.) Grown in a Warm Climate Region (Andalusia, Spain). **Agronomy**. v.10, n. 5, p. 654, 2020.

SEEMA PATEL e SUSHREE SANGEETA. Pesticides as the drivers of neuropsychotic diseases, cancers, and teratogenicity among agro-workers as well as general public. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 26, p. 91-100, 2019.

SHEN, H.; WEI, Y.; WANG, X.; XU, C.; SHAO, X. The marine yeast *Sporidiobolus pararoseus* ZMY-1 has antagonistic properties against *Botrytis cinerea* *in vitro* and in strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 150, p. 1-8, 2019.

SHEN, Y. F.; YANG, H. Q. Effect of preharvest chitosan-g-salicylic acid treatment on postharvest table grape quality, shelf life, and resistance to *Botrytis cinerea*-in-duced spoilage. **Scientia Horticulturae**. v. 224, p. 367-373, 2017.

SHRESTHA, S.; PARKS, C. G.; GOLDNER, W. S.; KAMEL, F.; UMBACH, D. M.; WARD, M. H.; LERRO, C. C.; KOUTROS, S.; HOFMANN, J. N.; FREEMAN, L. E. B.; SANDLER, D. P. Incident thyroid disease in female spouses of private pesticide applicators. **Environment International**. v. 118, p. 282-292, 2018.

SABIR, A.; KUCUKBASMACHI, H. Agronomic response of ‘Michele palieri’ (*Vitis vinifera* L.) table grape to intraspecific diploid and interspecific tetraploid pollinizers. **Scientia Horticulturae**. 272 (2020) 109589

SOLAIRAJ, D.; LEGRAND, N. N. G.; YANG, Q.; ZHANG, H. Isolation of pathogenic fungi causing postharvest decay in table grapes and *in vivo* biocontrol activity of selected yeasts against them. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.110, 2020.

SOUZA, J. S.; LAUREANO-MELO, R.; HERAI, R. H.; CONCEIÇÃO, R. R. DA.; OLIVEIRA, K. C.; SILVA, I. D. C. G. DA.; DIAS-DA-SILVA, M. R.; ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; MACIEL, R. M. DE B.; CHIAMOLERA, M. I.; GIANNOCCO, G.; Maternal glyphosate-based herbicide exposure alters antioxidant-related genes in the brain and serum metabolites of male rat offspring. **NeuroToxicology**. v. 74, p. 121-131, 2019.

SOUZA, M. C. DE.; TEIXEIRA, L. J. Q.; ROCHA, C. T. DA.; FERREIRA, G. A. M; FILHO, T. L. Emprego do frio na conservação de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 9, n.16, 2013.

SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends Food Sci. Technol.** v. 47, p, 39-49, 2016.

TANČINOVÁ, D.; MAŠKOVÁ, Z.; RYBÁRIK, L.; MICHALOVÁ, V. Species of genera *Botrytis*, *Fusarium* and *Rhizopus* on grapes of the slovak origin. **Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences** . v. 11, n. 1, p. 403-409, 2017.

TERAO, D.; TAVARES, S.C.C.H.; SILVA, I.L.S.S.; SARAIVA, A.C.M.; CHOUDHURY, M.M. Patologia Pós-colheita de uva. **Frutos do Brasil**. EMBRAPA. v. 12, p. 55, 2007.

TESTA, B.; LOMBARDI, S. J.; IORIZZO, M.; LETIZIA, F.; MARTINO, C. D.; RENZO1, M. D.; STROLLO, D.; TREMONTE, P.; PANNELLA, G.; IANIRO, M.; SORRENTINO, E.; SUCCI, M.; COPPOLA, R. Use of strain *Hanseniaspora guilliermondii* BF1 for winemaking process of white grapes *Vitis vinifera* cv Fiano. **European Food Research and Technology**. v. 246, p. 549-561, 2020.

USDA, 2015. USDA Website. Data & Analysis. Foreign Agricultural Service. <http://www.fas.usda.gov/data>.

VALCKE, M.; LEVASSEUR, M.E.; SILVA, S. A.; WESSELING, C. Pesticide exposures and chronic kidney disease of unknown etiology: an epidemiologic review. **Environ Health**. v. 16, p. 49-69, 2017.

VARELA, C.; BORNEMAN, A. R. Yeasts found in vineyards and wineries. **Yeast Primer**. v. 34, p. 111–128, 2017.

VENDITTI, T.; LADU, G.; CUBAIU, L.; MYRONYCHEVA, O.; D’HALLEWIN, G.; Repeated treatments with acetic acid vapors during storage preserve table grapes fruit quality. **Postharvest Biology and Technology**. v. 125, p. 91-98, 2017.

VERO, S.; GARMENDIA, G.; GONZALEZ, M.B.; BENTACUR, O.; WISNIEWSKI, M. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus X domestica*). **FEMS Yeast Res.** v. 13, p. 189-199, 2013.

VERO, S.; GARMENDIA, G.; SANGORRIN, M.; VARGAS, M. Controle biológico de doenças em pós-colheita. In: DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, Bernardo et al. Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

YANG, H.; WANG, L.; LI, S.; GAO, X.; WU, N.; YIFAN ZHAO, Y.; SUN, W. Control of postharvest grey spot rot of loquat fruit with *Metschnikowia pulcherrima* E1 and potential mechanisms of action, **Biological Control** . v. 152 , p. 104-406, 2021.

YANG, Q.; WANG, H.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; APALIYA, M. T.; ZHENG, X.; MAHUNU, G. K. Effect of *Yarrowia lipolytica* on postharvest decay of grapes caused by *Talaromyces rugulosus* and the protein expression profile of *T. rugulosus*. **Postharvest Biology and Technology**. v. 126, p. 15-22, 2017.

YE, D. Q.; SUN, Y.; SONG, Y.; MA, X. L.; REN, X. N.; GONG, X.; LIU, Y. L.; YE D.-Q.; SUN Y.; SONG Y. Y.; MA X. L.; REN X. N.; GONG X., LIU Y. L. Diversity and identification of yeasts isolated from tumultuous stage of spontaneous table grape fermentations in central China. **South African Journal of Enology and Viticulture**. v. 40, n. 1, p. 1-7, 2019.

WANG, M.; ZHAO, L.; ZHANG, X.; DHANASEKARAN, S.; ABDELHAI, M. H.; YANG, Q.; JIANG, Z.; ZHANG, H. Study on biocontrol of postharvest decay of table grapes caused by *Penicillium rubens* and the possible resistance mechanisms by *Yarrowia lipolytica*. **Biological Control**. v. 130, p. 110–117, 2019.

WANG, S.; RUAN, C.; YI, L.; DENG, L.; YAO, S.; ZENG, K.; Biocontrol ability and action mechanism of *Metschnikowia citriensis* against *Geotrichum citri-aurantii* causing sour rot of postharvest citrus fruit. **Food Microbiology**. v. 87. p. 103375, 2020.

WANG, X.; GLAWE, D. A.; KRAMER, E.; WELLER, D.; OKUBARA, P. A. Biological Control of *Botrytis cinerea*: Interactions with Native Vineyard Yeasts from Washington State. **Phytopathology**. v. 108, p. 691-701, 2018.

WELKE, JULIANE ELISA. Fungal and mycotoxin problems in grape juice and wine industries. **Current Opinion in Food Science**. v. 29, p. 7-13, 2019.

WILLIAMS, D. L.; SCHÜCKEL, J.; VIVIER, M. A.; BUFFETTO, F.; ZIETSMAN, A. J.J. Grape pomace fermentation and cell wall degradation by *Kluyveromyces marxianus* Y885. **Biochemical Engineering Journal**. v. 150, p. 107282, 2019.

WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; NOELLI, J.; LIU, J.; SCHENA, L. Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. **Postharvest Biol. Technol.** v. 122, p. 3–10, 2016.

WURZ, D. A.; BEM, B. P. DE; ALLEBRANDT, R.; BONIN, B.; DALMOLIN, L. G.; CANOSSA, A. T.; RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A. A. New wine-growing regions of Brazil and their importance in the evolution of Brazilian wine. **BIO Web of Conferences.** v. 9, 2017.

XIAO, H.; FENG, LI.; SONG, D.; TU, K.; PENG, J.; PAN, L.; Grading and Sorting of Grape Berries Using Visible-Near Infrared Spectroscopy on the Basis of Multiple Inner Quality Parameters. **Sensors (Basel).** v. 11, 2019.

XIAO, X.; HE, Q.; LI, Z.; ANTOCE, A. O.; ZHANG, X. Improving traceability and transparency of table grapes cold chain logistics by integrating WSN and correlation analysis. **Food Control.** v. 73, p. 1556-1563, 2017.

XU, W.; LIU, B.; WANG, C.; KONG, X. Organic cultivation of grape affects yeast succession and wine sensory quality during spontaneous fermentation. **LWT - Food Science and Technology.** v. 120, p. 108894, 2020.

ZAMANI-ZADEH, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; GOLI, S. A. H.. Integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit. *Postharvest biology and technology*, 92, 149-156. 2014.

ZAHEDIPOUR, P.; ASGHARI, M.; ABDOLLAHI, B.; ALIZADEH, M.; DANESH, Y. R.; A comparative study on quality attributes and physiological responses of organic and conventionally grown table grapes during cold storage. **Scientia Horticulturae.** v. 247, p. 86-95, 2019.

ZAMANI-ZADEH, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; GOLI, S. A. H.. Integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit. **Postharvest biology and technology.** v. 92, p. 149-156, 2014.

ZHANG, H.; MAHUNU, G. K. CASTORIA, R.; YANG, Q.; APALIYA, M. T. Recent developments in the enhancement of some postharvest biocontrol agents with unconventional chemicals compounds. **Trends in Food Science & Technology.** v. 78, p. 180-187, 2018.

ZHANG, X.; WU, F.; GU, N.; YAN, X.; WANG, K.; DHANASEKARAN, S.; GU, X.; ZHAO, L.; ZHANG, H.. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot and the mechanisms involved in induced disease resistance of peaches by *Pichia membranefaciens*. **Postharvest Biology and**

Technology. v. 163, p. 111-146, 2020.

ZHOU, X.; TAN, J.; GOU, Y.; LIAO, Y.; XU, F.; LI, G.; CAO, J.; YAO, J.; YE, J.; TANG, N.; CHEN, Z.; The biocontrol of postharvest decay of table grape by the application of kombucha during cold storage. **Scientia Horticulturae**. v. 253, p. 134-139, 2019.