

INTRODUÇÃO

A utilização de fungicidas durante o ciclo vegetativo das videiras é amplamente difundido, sendo recorrente encontrá-los na fermentação vínica, podendo mudar a população de leveduras presente nas uvas (Calhelha *et al.*, 2006). O clorotalonil é um desses fungicida utilizado durante esse ciclo, atualmente não apresenta seu modo de ação e mecanismo de morte celular completamente estabelecido, sendo descrito como um fungicida com atividade em múltiplos alvos (Bouchama *et al.*, 2014). Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi determinar o mecanismo de morte celular do fungicida clorotalonil sobre *Saccharomyces cerevisiae* e sua interferência em processos fermentativos.

METODOLOGIA

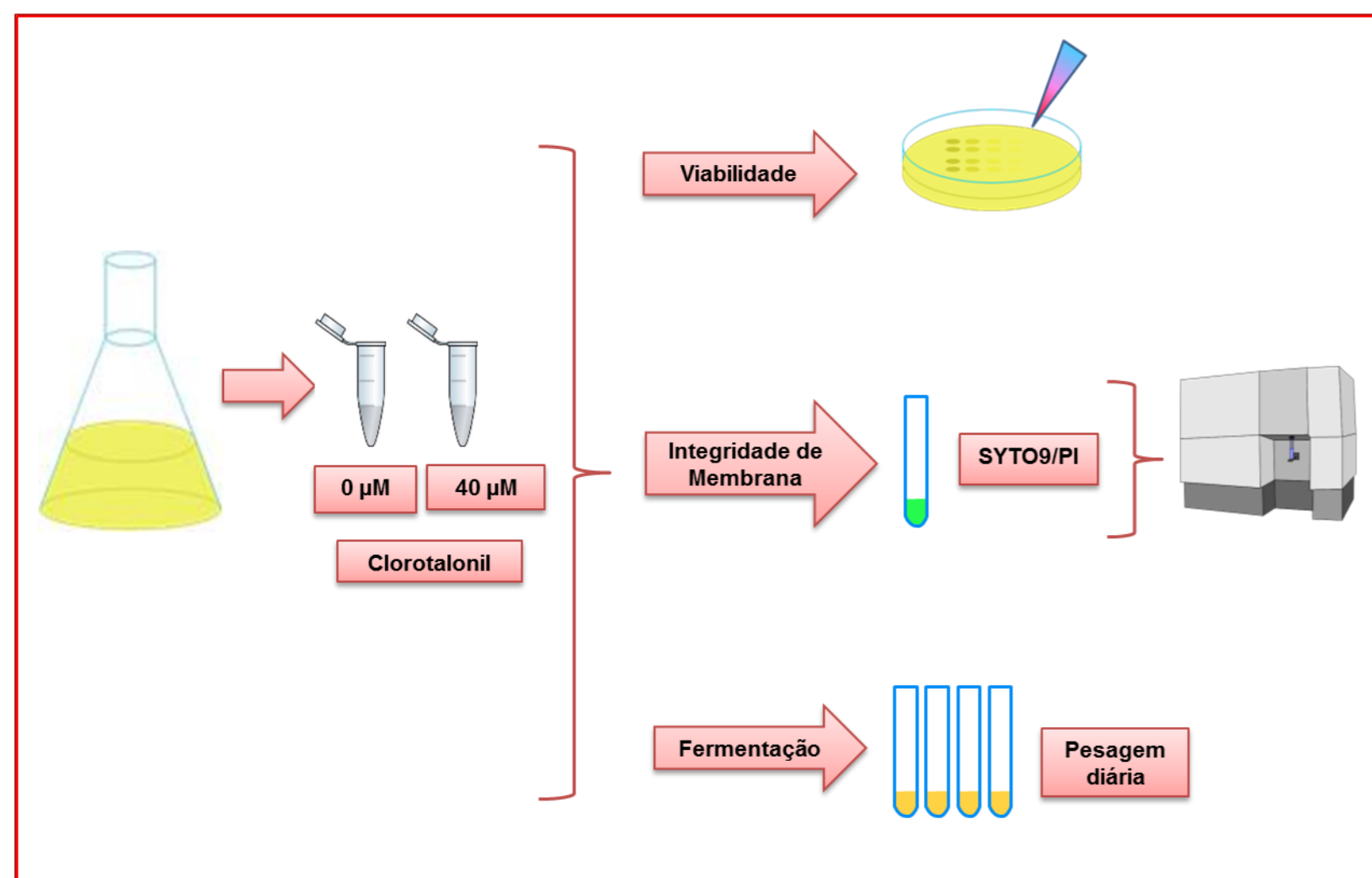
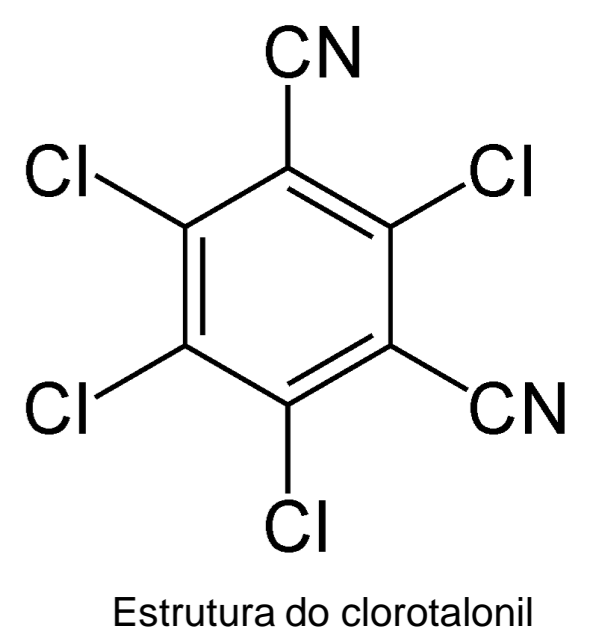


Fig. 1: Esquema representativo das metodologias utilizadas neste trabalho.

As leveduras utilizadas neste trabalho foram: wt (BY4741), e $\Delta aif1$, $\Delta nuc1$ e $\Delta yca1$ com deleções em genes relacionados à apoptose e para avaliação fermentativa, a cepa Y904. O efeito do clorotalonil sobre a viabilidade celular de *S. cerevisiae* foi avaliado em leveduras crescidas até fase exponencial e tratadas com distintas concentrações de clorotalonil (0 a 40 μM), avaliadas em diferentes tempos (0 a 12 h). Para os experimentos fermentativos, a levedura Y904 foi crescida até a fase exponencial e a inoculação foi padronizada em 2×10^6 células/ml em mosto sintético. As fermentações foram conduzidas a 21°C e monitoradas por liberação de CO_2 (Fig. 1).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A redução da viabilidade de leveduras tratadas com clorotalonil mostrou um efeito dependente da dose e do tempo. O tratamento com 40 μM de fungicida, por um período de seis horas foi a condição selecionada para os outros ensaios, por ter reduzido a viabilidade celular próximo a 75% (Fig. 2).

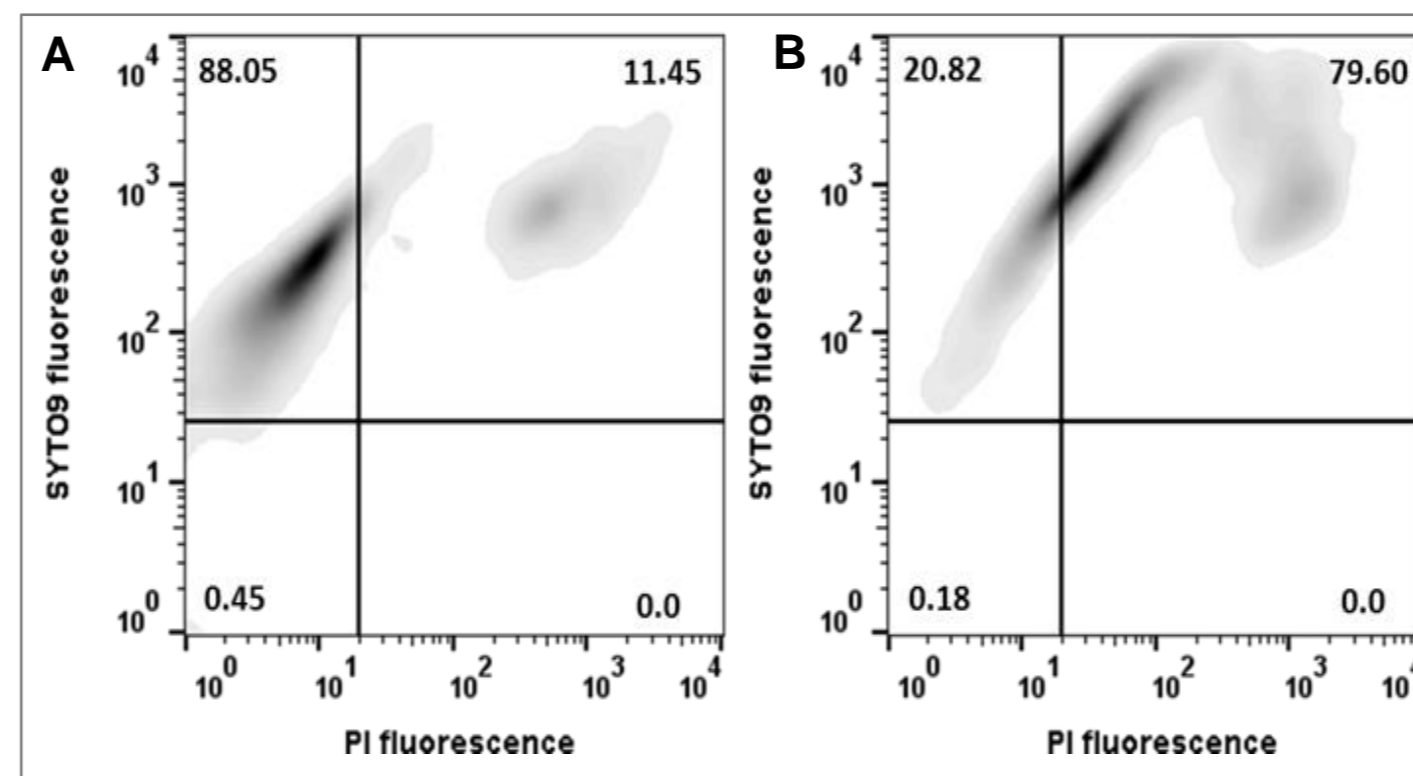
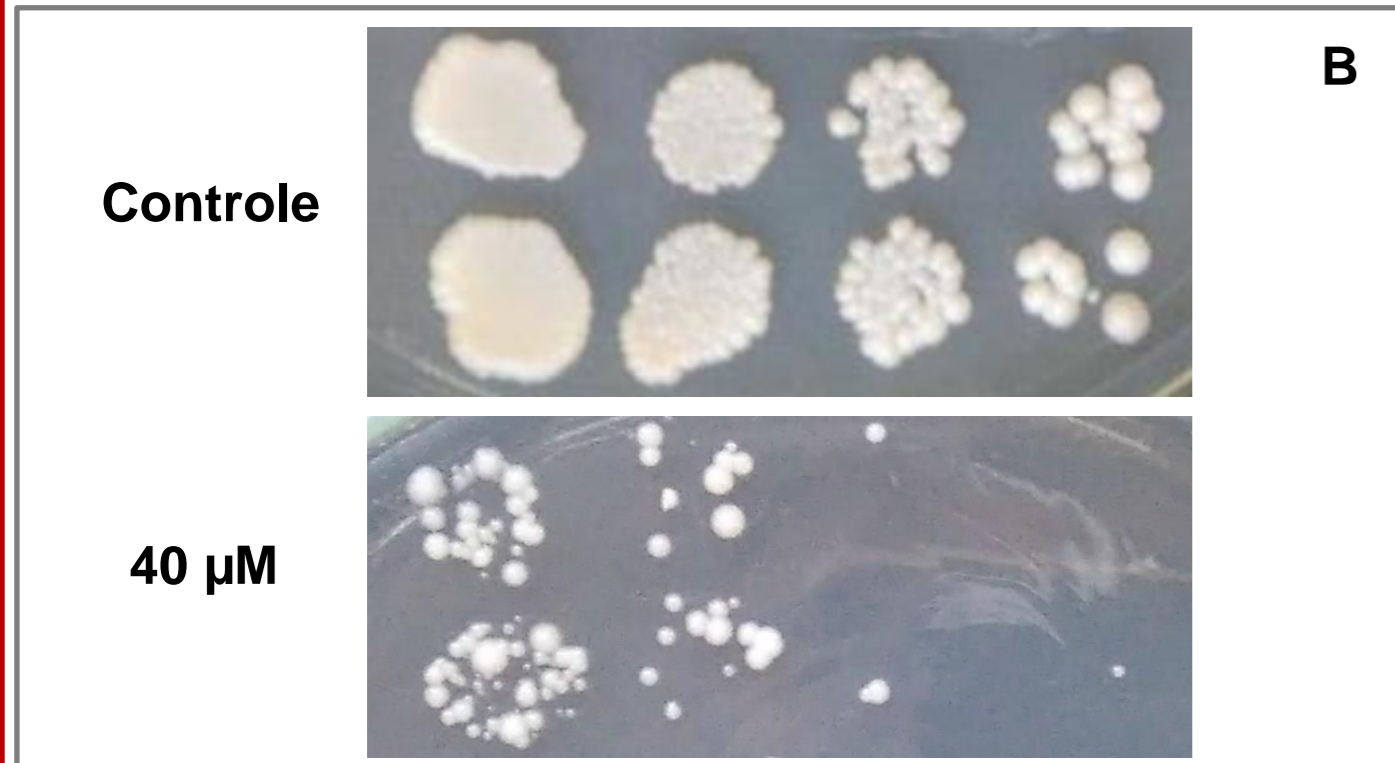
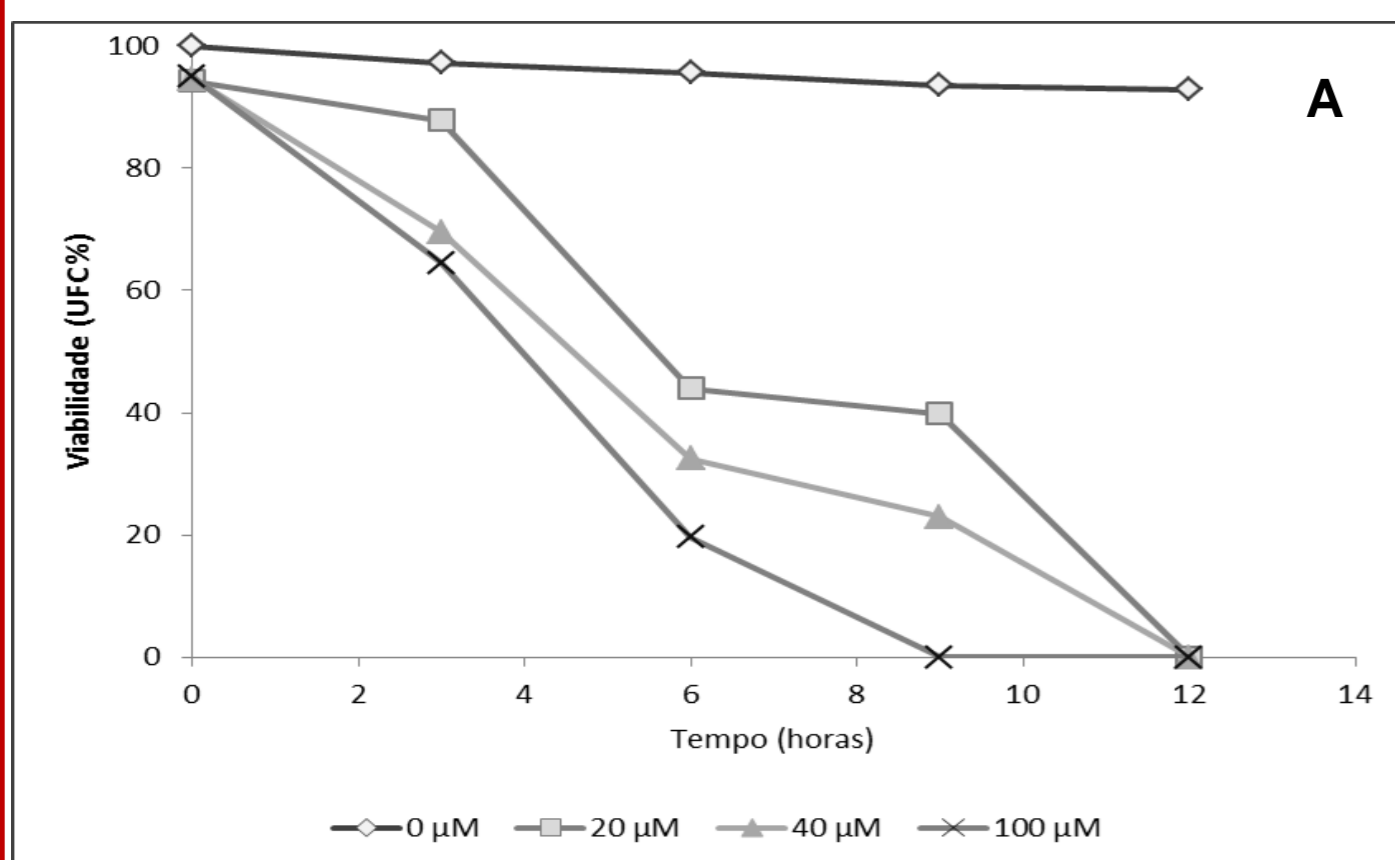


Fig. 3 – Avaliação da integridade da membrana citoplasmática. (A) leveduras sem tratamento com fungicida, (B) com tratamento de 35 μM de clorotalonil.

O tratamento com clorotalonil não alterou a viabilidade das linhagens mutantes em relação a linhagem selvagem (dados não apresentados). Isso indica que a morte celular ocasionada por clorotalonil não envolve mecanismos apoptóticos

A avaliação da integridade da membrana citoplasmática mostrou que o clorotalonil na concentração 35 μM leva a um aumento de 79.6% (fig. 3B) na quantidade de leveduras com alterações na membrana citoplasmática em comparação com as células sem tratamento, 11.45% (fig. 3A). A perda da integridade da membrana citoplasmática é um conhecido marcador necrótico (Eisenberg *et al.*, 2010).

Fig. 2 – Efeito de distintas concentrações de clorotalonil em diferentes tempos de exposição sobre *S. cerevisiae* (A). Detalhe do plaqueamento das leveduras após 6 h (B).

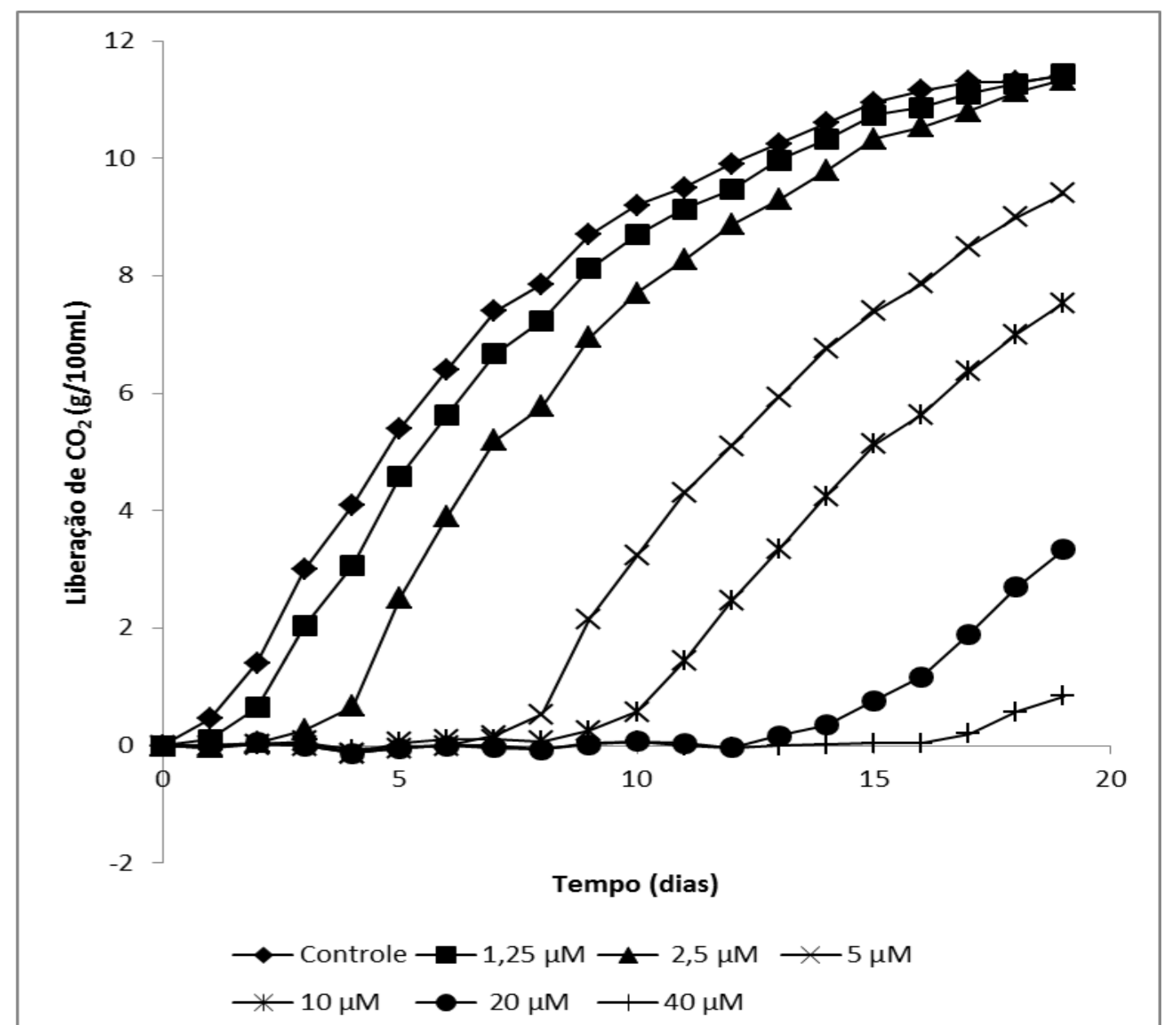


Fig. 4 – Fermentação em diferentes concentrações de mosto sintético YEPD com a linhagem Y904.

Os resultados dos ensaios fermentativos mostraram que a concentração de 40 μM de clorotalonil inibiu completamente a fermentação, mas em dosagens menores, o fungicida determinou um atraso dose dependente no início da fermentação (aumento da fase *lag*), com um aumento de 1, 3, 5, 9 e 13 dias na presença de 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μM de clorotalonil, respectivamente (fig. 4).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostram que o clorotalonil leva a levedura *S. cerevisiae* a morte celular por necrose, além disso, o atraso de fermentação causado pelo fungicida foi associado à redução da viabilidade das leveduras. Contudo, aquelas células que sobreviveram ao choque inicial se adaptaram, cresceram e reassumiram a fermentação, terminando-a. Sendo assim possível relatar que o fungicida pode atrasar o início ou interromper a fermentação dependendo da concentração residual presente no mosto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Bouchama S.; Sainte-Claire P. de; Arzoumanian E. et al (2014). Photoreactivity of the Fungicide Chlorothalonil in Aqueous Medium. **Environmental Science: Processes Impacts**. 839 40: 546 – 574.
Calhelha R. C.; Ferreira I. C. F. R.; Andrade J. V. et al (2006). Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. **Elsevier: Food Microbiology**. 23: 393 – 398.
Eisenberg T.; Büttner S.; Tavernarakis N. et al (2010). Necrosis in yeast. **Springer Link: Apoptosis**. 15: 257–268.

AGRADECIMENTOS

