

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Angelo Gava

**EFEITO DO DERIVADO DA 8-HIDROXIQUINOLINA SOBRE *Botrytis cinerea* E
Glomerella cingulata ISOLADOS DE UVA E SOBRE LEVEDURAS
*Saccharomyces cerevisiae***

Porto Alegre
2021

Angelo Gava

**EFEITO DO DERIVADO DA 8-HIDROXIQUINOLINA SOBRE *Botrytis cinerea* E
Glomerella cingulata ISOLADOS DE UVA E SOBRE LEVEDURAS
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Prof. Dr. Evandro Ficagna

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Gava, Angelo
EFEITO DO DERIVADO DA 8-HIDROXIQUINOLINA SOBRE
Botrytis cinerea E Glomerella cingulata ISOLADOS DE
UVA E SOBRE LEVEDURAS Saccharomyces cerevisiae /
Angelo Gava. -- 2021.
152 f.
Orientador: Saulo Fernandes de Andrade.

Coorientadores: Alexandre Meneghello Fuentefria,
Evandro Ficagna.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. 8-hidroxiquinolina. 2. antifúngicos. 3. Botrytis
cinerea. 4. Glomerella cingulata. 5. Saccharomyces
cerevisiae. I. de Andrade, Saulo Fernandes, orient.
II. Fuentefria, Alexandre Meneghello, coorient. III.
Ficagna, Evandro, coorient. IV. Título.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela oportunidade concedida.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, em especial ao Campus Bento Gonçalves, e à Universidade de Caxias do Sul pela concessão de laboratórios para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores e amigos Saulo de Andrade e Alexandre Fuentefria, pela valiosa orientação e coorientação, por toda confiança e liberdade neste trabalho, bem como pelos ensinamentos ao longo de toda minha trajetória.

Em especial ao meu amigo, e sobretudo responsável por grande parcela do meu conhecimento obtido da iniciação científica e graduação, professor Evandro Ficagna, por acreditar no meu potencial como pesquisador, por ter sido um grande mestre e apoiador, e pela valiosa coorientação desta pesquisa.

Aos professores Sérgio Echeverrigaray e Ana Paula Delamare por todo apoio e conhecimento fornecido em vosso laboratório. Ao professor Marcus Almança pelos ensinamentos e suporte no Laboratório de Fitossanidade do IFRS – Campus Bento.

Às colegas do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, Bárbara da Costa, Letícia Fernandes, Luciana Moreira de Souza e Paula Reginatto, por todo suporte e auxílio fornecido no Laboratório de Micologia Aplicada. À Angélica Rocha Joaquim pela disponibilidade em solucionar algumas de minhas dúvidas e pela síntese da molécula estudada.

Aos meus amados pais, Evandro e Simone, e ao meu irmão Augusto que sempre me apoiaram nas mais longas caminhadas. A minha namorada Elisângela, por sempre me acompanhar.

À toda a banca que prontamente aceitou o meu convite.

Aos amigos e colegas de profissão, Cassandro Emer e Bruno Cisilotto, que sempre estiveram presentes nesta minha caminhada.

À Deus por tudo

**EFEITO DO DERIVADO DA 8-HIDROXIQUINOLINA SOBRE *Botrytis cinerea* E
Glomerella cingulata ISOLADOS DE UVA E SOBRE LEVEDURAS
*Saccharomyces cerevisiae***

Autor: Angelo Gava

Orientador(a): Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Co-orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Prof. Dr. Evandro Ficagna

RESUMO

A produção de uvas com qualidade para elaboração de vinhos tem como fator limitante as doenças fúngicas. Um grupo de fungos responsáveis pelo apodrecimento dos cachos, como *Botrytis cinerea* e *Glomerella cingulata*, possuem grande importância neste cenário. A aplicação rotineira de fungicidas é a principal forma de controle destes fitopatógenos, motivo pelo qual há uma busca constante de antifúngicos que sejam eficazes e ao mesmo tempo seguros para a saúde humana e o meio ambiente. Neste contexto, os derivados da 8-hidroxiquinolina (8HQ) podem ser uma alternativa valiosa no controle de podridões da uva, devido ao seu efeito antifúngico e sua baixa toxicidade. Esta pesquisa avaliou a atividade antifúngica do derivado da 8HQ PH151 sobre *B. cinerea* e *G. cingulata* isolados de uva. Além disso, foi estudado o possível efeito do residual de PH151 sobre leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. No que diz respeito aos valores de concentração inibitória mínima (CIM), os achados revelam que PH151 possui atividade antifúngica sobre *B. cinerea* e *G. cingulata*, sendo que os valores de CIM são semelhantes ou inferiores (2 e 4 mg L⁻¹) aos encontrados para os fungicidas convencionais. Pelo contrário, os valores de CIM para *S. cerevisiae* são considerados elevados (32 e 64 mg L⁻¹), o que nos permite concluir que as concentrações residuais em um mosto de uva estariam muito abaixo dos valores de CIM. Os ensaios envolvendo a combinação de fungicidas para inibição do crescimento micelial de *G. cingulata* revelam que existe um efeito sinérgico da associação de PH151 com difenoconazol, de difenoconazol com captana, e na associação tripla destes agentes. Os ensaios de citometria de fluxo, utilizando-se da levedura *S. cerevisiae* como modelo, indicaram que PH151 reduz a integridade da membrana celular, além disso, os resultados indicam que o acúmulo de ROS causado por PH151 desencadeia uma cascata apoptótica dependente da metacaspase. Por fim, a predição da cinética fermentativa do mosto de uvas Chardonnay revelou que PH151 em uma concentração de até 1 mg L⁻¹ não afeta os parâmetros cinéticos estudados. Em conjunto, os resultados deste estudo são altamente relevantes, PH151 possui elevada atividade antifúngica contra fungos causadores de podridão do cacho e em baixas concentrações não afeta a levedura *S. cerevisiae* e sua cinética de fermentação. Desta forma, a utilização de PH151 para controle de podridões da uva é um achado sem precedentes e que, futuramente, poderá ser aplicado na indústria agrícola.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (152 p.) novembro, 2021.

EFFECT OF 8-HYDROXYQUINOLINE DERIVATIVE ON *Botrytis cinerea* AND *Glomerella cingulata* ISOLATED FROM GRAPE AND *Saccharomyces cerevisiae* YEAST

Author: Angelo Gava

Advisor: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Co-Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Prof. Dr. Evandro Ficagna

ABSTRACT

The production of quality grapes for wine elaboration has fungal diseases as a limiting factor. A group of fungi responsible for bunch rot, such as *Botrytis cinerea* and *Glomerella cingulata*, are of great importance in this scenario. The routine application of fungicides is the main way to control these phytopathogens, which is why there is a constant search for antifungals that are effective and at the same time safe for human health and the environment. In this context, 8-hydroxyquinoline (8HQ) derivatives can be a valuable alternative in the control of grape rot, due to its antifungal effect and its low toxicity. This research evaluated the antifungal activity of PH151 8HQ derivative on *B. cinerea* and *G. cingulata* isolated from grapes. In addition, the possible effect of residual PH151 on *Saccharomyces cerevisiae* yeasts was studied. Regarding the minimum inhibitory concentration (MIC) values, the findings reveal that PH151 has antifungal activity on *B. cinerea* and *G. cingulata*, and the MIC values are similar or lower (2 and 4 mg L⁻¹) than those found for conventional fungicides. On the contrary, the MIC values for *S. cerevisiae* are considered high (32 and 64 mg L⁻¹), which allows us to conclude that the residual concentrations in a grape must would be much lower than the MIC values. Tests involving the combination of fungicides to inhibit the mycelial growth of *G. cingulata* reveal that there is a synergistic effect of the association of PH151 with difenoconazole, of difenoconazole with captan, and in the triple association of these agents. Flow cytometry assays, using the yeast *S. cerevisiae* as a model, indicated that PH151 reduces cell membrane integrity, in addition, the results indicate that ROS accumulation caused by PH151 triggers a metacaspase-dependent apoptotic cascade. Finally, the prediction of fermentation kinetics of Chardonnay grape must reveal that PH151 at a concentration of up to 1 mg L⁻¹ does not affect the studied kinetic parameters. Altogether, the results of this study are highly relevant, PH151 has high antifungal activity against bunch rot fungi and at low concentrations it does not affect the yeast *S. cerevisiae* and its fermentation kinetics. Thus, the use of PH151 to control grape rot is an unprecedented finding that, in the future, may be applied in the agricultural industry.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (152 p.) november, 2021.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1.	Objetivo geral	2
2.2.	Objetivos específicos	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1.	Panorama da Viticultura Brasileira	3
3.2.	Principais Doenças Fúngicas da Videira	3
3.2.1.	Podridão Cinzenta	4
3.2.2.	Podridão de Uva Madura.....	6
3.3.	Efeito de podridões do cacho sobre a qualidade dos vinhos.....	9
3.4.	Uso da mistura de fungicidas	13
3.5.	Uso da 8-Hidroxiquinolina como antifúngico.....	14
3.6.	Impacto dos resíduos de fungicidas sobre a fermentação alcoólica na elaboração de vinhos	16
4.	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1.	Locais de realização da pesquisa.....	20
4.2.	Cepas fúngicas selecionadas para a pesquisa.....	20
4.3.	Moléculas selecionadas para a pesquisa	21
4.4.	Meios de cultura	22
4.5.	Testes de atividade antifúngica sobre fungos fitopatogênicos.....	23
4.5.1.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	23
4.5.2.	Avaliação da inibição de crescimento micelial de <i>G. cingulata</i> em placa de Petri	24
4.6.	Ensaio do efeito dos antifúngicos sobre leveduras	27
4.6.1.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de PH151 sobre leveduras <i>S. cerevisiae</i>	27
4.6.2.	Ensaio de crescimento e viabilidade de levedura.....	28
4.6.3.	Integridade da membrana celular, ativação da metacaspase, acúmulo de ROS e potencial de membrana mitocondrial	29
4.6.4.	Ensaio fermentativos em mosto de uva	30
5.	RESULTADOS	33
5.1.	Atividade antifúngica do derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151) sobre	

fungos fitopatogênicos da videira	33
5.1.1. Concentração inibitória mínima (CIM) de PH151 e outros agentes antifúngicos para isolados de <i>G. cingulata</i> e <i>B. cinerea</i>	33
5.1.2. Efeito da combinação de PH151, captana e difenoconazol na inibição de crescimento micelial de <i>G. cingulata</i>	34
5.2. Efeito da molécula derivada da 8-hidroxiquinolina (PH151) sobre leveduras <i>S. cerevisiae</i>	39
5.2.1. Concentração inibitória mínima (CIM) de PH151 para leveduras <i>S. cerevisiae</i>	39
5.2.2. Efeito de PH151 sobre integridade de membrana, acumulação de ROS, potencial de membrana mitocondrial, ativação de metacaspase, crescimento e viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i>	40
5.2.3. Efeito de PH151 e de outros antifúngicos sobre parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica de mosto de uva.....	45
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÃO.....	59
8. REFERÊNCIAS	61
9. APÊNDICES	81
9.1. Artigo 1.....	81
9.1. Artigo 2.....	114
10. ANEXOS.....	134
10.1. Anexo 1.....	134
10.2. Anexo 2.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas depositadas na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do IFRS-BG.....	20
Tabela 2. Fungicidas registrados testados.....	22
Tabela 3. Pseudocomponentes dos pontos experimentais do ensaio de combinação de diferentes agentes antifúngicos para inibição de crescimento micelial de <i>G. cingulata</i>	25
Tabela 4. Concentrações reais da mistura dos antifúngicos testados em <i>G. cingulata</i> IFBG-1405.....	26
Tabela 5. Concentrações reais da mistura dos antifúngicos testados em <i>G. cingulata</i> IFBG-1406.....	26
Tabela 6. Ciclo de prensagem, pressão e tombamento, programado e executado na prensa pneumática.....	30
Tabela 7. Tratamentos experimentais conduzidos no ensaio fermentativo com mosto de uva.	31
Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes antifúngicos sobre isolados de <i>G. cingulata</i> e <i>B. cinerea</i> , em mg L ⁻¹ e µmol L ⁻¹	34
Tabela 9. Modelos, R ² , R ² ajustado e valores de probabilidade para os modelos reduzidos finais (proporção de componentes) para inibição de crescimento micelial (%) de dois isolados de <i>G. cingulata</i>	35
Tabela 10. Coeficientes de regressão dos modelos ajustados para inibição de crescimento micelial (%) dos isolados de <i>G. cingulata</i> IFBG-1405 e IFBG-1406 na presença de uma mistura contendo PH151, captana e difenoconazol.....	38
Tabela 11. Resultados dos parâmetros cinéticos da fermentação de mosto de uva com levedura enológica <i>S. cerevisiae</i> na presença de diferentes agentes antifúngicos...	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da 8-hidroxiquinolina (8HQ).....	15
Figura 2. Síntese dos novos derivados de 8-hidroxiquinolinas.....	21
Figura 3. Estrutura química do derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151).....	22
Figura 4. Esquema do procedimento realizado para acompanhamento do crescimento micelial de <i>G. cingulata</i>	24
Figura 5. Delineamento experimental simplex-centróide expandido para 3 compostos.	27
Figura 6. Gráficos de contorno de mistura e gráficos de dispersão dos valores experimentais e previstos para inibição de crescimento micelial (%) no isolado de <i>G. cingulata</i> IFBG-1405 nos ensaios envolvendo como limites superiores o valor de CIM/2 e CIM.....	36
Figura 7. Gráficos de contorno de mistura e gráficos de dispersão dos valores experimentais e previstos para inibição de crescimento micelial (%) no isolado de <i>G. cingulata</i> IFBG-1406 nos ensaios envolvendo como limites superiores o valor de CIM/2 e CIM.....	37
Figura 8. Curvas da inibição de crescimento (%) de <i>S. cerevisiae</i> em função da concentração de PH151 testada. (A) Mosto sintético (sistema fermentativo, pH 3,5). (B) Meio YEPD (sistema respiratório, pH 6,5).	40
Figura 9. Integridade da membrana celular (fluorescência de PI) e viabilidade (fluorescência de CFDA) de levedura BY4741 de tipo selvagem tratada por 6 h com 0 (A, controle), 16 mg L ⁻¹ (B), 32 mg L ⁻¹ (C), ou 64 mg L ⁻¹ (D) de PH151. Um total de 20.000 células foi analisado e os números dentro das figuras indicam as porcentagens de células em cada quadrante.....	42
Figura 10. Concentração intracelular (intensidade de fluorescência) de ROS em levedura BY4741 não tratada (área cinza) contra células tratadas com 16 mg L ⁻¹ (—), 32 mg L ⁻¹ (—) ou 64 mg L ⁻¹ (—) de PH151 por 6 h. (A) intensidade de fluorescência de DCFH; (B) Intensidade de fluorescência de DHE.....	43
Figura 11. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (fluorescência DioC6) em levedura BY4741 de controle (área cinza) contra células tratadas com 16 mg L ⁻¹ (—), 32 mg L ⁻¹ (—) ou 64 mg L ⁻¹ (—) de PH151 por 6 h.....	44
Figura 12. (A) Atividade da caspase (fluorescência de VAD-FMK-FITC) em levedura BY4741 de controle (área cinza) contra células tratadas com 16 mg L ⁻¹ (—), 32 mg L ⁻¹	

¹ (—) ou 64 mg L⁻¹ (—) de PH151 por 6 h. (B) Viabilidade (% de UFC) de BY4741 (■) de tipo selvagem e mutantes deletados aif1 (■), nuc1 (■) e yca1 (□) expostos a diferentes concentrações de PH151 por 6 h. A barra de erro representa o erro padrão da média de três repetições. O asterisco indica diferenças significativas de acordo com o teste t de Student (*p <0,05).....45

Figura 13. Curvas das cinéticas de fermentação em mosto de uva observadas (experimentais) e previstas para cada agente antifúngico.47

Figura 14. Comportamento fermentativo em mosto de uva dos diferentes tratamentos contendo fungicidas na concentração de 1 mg L⁻¹.49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8HQ	8-hidroxiquinolina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	ágar batata dextrose
CFDA	<i>5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl</i>
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	dióxido de carbono
DCFH	<i>2',7'-dichlorofluorescein diacetate</i>
DHE	Dihidroetídio
DiOC6	<i>3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FRAC	<i>Fungicide Resistance Action Committee</i>
IFRS	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
LMR	limite máximo residual
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PI	<i>propidium iodide</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
t _{Lag}	tempo de fase de latência para produção de CO ₂ (h)
t _{Vmax}	tempo em que ocorre a taxa máxima de produção de CO ₂ (h)
UCS	Universidade de Caxias do Sul
UFC	unidades formadoras de colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
V _{max}	taxa máxima de produção de CO ₂ (g L ⁻¹ h ⁻¹)
YEPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
Y _{max}	produção máxima de CO ₂ (g L ⁻¹)
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
Δψ _m	potencial da membrana mitocondrial

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por fungos estão entre os fatores limitantes para a produção de uvas. Dentre estes fungos, merece destaque um conjunto conhecido por causar podridões na uva e elevada perdas na colheita, tendo como principais agentes causais os fungos *Botrytis cinerea* e *Glomerella cingulata*. No mercado, há uma gama muito grande de fungicidas registrados e utilizados para doenças fúngicas em videira com os mais diversos mecanismos de ação, entretanto para os fungos citados poucos são os produtos com eficácia comprovada, além disso, o surgimento de resistências por parte destes fungos é uma preocupação que vem ganhando destaque.

Derivados da 8-hidroxiquinolina podem desempenhar um papel importante no controle de fungos causadores destas doenças, tendo em vista a sua reconhecida atividade para várias espécies fúngicas e a possibilidade da realização de modificações estruturais para obtenção de novos derivados com potencial fungicida seletivo. Por outro lado, faz-se necessário também conhecer o efeito destas novas moléculas sintetizadas sobre microrganismos não-alvos, como as leveduras. Os resíduos de agentes fungicidas, aplicados no fruto, podem permanecer no mosto e influenciar o processo fermentativo das leveduras, podendo vir a causar danos em bioprocessos industriais e prejudicar a indústria de bebidas.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência *in vitro* de um derivado da 8-hidroxiquinolina, isolado ou combinado com outros fungicidas registrados, no controle de podridões da uva. Além disso, foi avaliado um possível efeito dos resíduos desta molécula sobre a cinética da fermentação alcoólica de diferentes leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar a atividade antifúngica do derivado da 8-hidroxiquinolina PH151 sobre os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea* e *Glomerella cingulata*, seu modo de ação sobre *Saccharomyces cerevisiae* e efeito sobre fermentações alcoólicas de mosto.

2.2. Objetivos específicos

a) Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes PH151 (derivado da 8-Hidroxiquinolina), captana, difenoconazol e iprodiona para um isolado de *B. cinerea* e dois isolados de *G. cingulata*;

b) Avaliar o efeito antifúngico da associação tripla de PH151, captana e difenoconazol sobre o crescimento micelial de *G. cingulata* e analisar se existe efeito sinérgico da combinação destes antifúngicos;

c) Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do agente PH151 (derivado da 8-Hidroxiquinolina) para levedura *S. cerevisiae*;

d) Avaliar o modo de ação do agente PH151 sobre levedura *S. cerevisiae*;

e) Avaliar a influência de diferentes antifúngicos (PH151 e convencionais) sobre os parâmetros cinéticos de levedura comercial *S. cerevisiae* em mosto de uva;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Panorama da Viticultura Brasileira

A cadeia vitivinícola é uma empresa global que gera bilhões de dólares (Brostrom e Brostrom 2008). Isso está relacionado a fatores como aumento do comércio internacional e o surgimento de inovações tecnológicas na produção, armazenamento e logística (Daane et al. 2018). De toda a produção de uvas no mundo, cerca de 71% são destinadas a elaboração de vinhos, 27% consumo *in natura* e elaboração de sucos e 2% produção de passas (Popa e Roşca 2011).

A viticultura no Brasil no ano de 2019 ocupava uma área de 74.866 hectares (IBGE 2019). A maior parte da área plantada com videiras situa-se entre o paralelo 30°S, no Estado do Rio Grande do Sul, e o paralelo 9°S, na Região Nordeste do país. Em função da extensa área, ocorre uma grande diversidade ambiental e climática, existindo polos com viticultura característica de regiões temperadas, subtropicais e tropicais, abrangendo diferentes possibilidades de tratamentos culturais a espécie cultivada.

O estado do Rio Grande do Sul destaca-se no cenário nacional como um dos maiores produtores de uva. A safra de 2021 resultou na colheita de aproximadamente 950 milhões de quilos, dos quais aproximadamente 50% destinam-se à elaboração de vinhos (Feix, Júnior e Borges 2021). No entanto, as condições de temperatura e umidade durante a primavera e verão favorecem a incidência de fungos na região, especialmente míldio, oídio, antracnose, escoriose, podridões e fusariose (Sônego et al. 2005; Cavalcanti e Garrido 2015). Desta forma, um dos fatores limitantes para a produção de uvas são as doenças causadas por fungos, afetando o volume de uvas produzido.

3.2. Principais Doenças Fúngicas da Videira

As doenças fúngicas, como o míldio (*Plasmopara viticola*) e podridões causadas por *B. cinerea*, *Greeneria uvicola*, *G. cingulata* e espécies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Phomopsis*, produzem um impacto sobre a produção e a qualidade das uvas (Kassemeyer e Berkelmann-Löhnertz 2009). As mais frequentes e que causam maior impacto sobre as uvas são a podridão cinzenta (*B. cinerea*) e a podridão da uva madura causada por *G. cingulata* (Garrido e Sônego 2004; Giovannini 2008; Pedrotti et al. 2019).

A ocorrência de doenças fúngicas pode causar efeitos indesejáveis sobre

o perfil aromático das uvas e, conseqüentemente, na qualidade sensorial dos vinhos, sendo um dos fatores com maior influência sobre a escolha do consumidor (Sadoughi et al. 2015; Zapparoli et al. 2018; Schueuermann et al. 2019). Além disso, estes fungos filamentosos podem secretar metabólitos secundários tóxicos chamados micotoxinas, como a ocratoxina A, para a qual diversos países estabeleceram legislação para a concentração máxima em sucos e vinhos (Welke 2019).

Desta forma, as doenças associadas a podridões de uvas são importantes objetos de estudo, pois incentivam o uso de fungicidas próximo ao período da colheita e limitam as opções a um número pequeno de produtos registrados (Pedrotti et al. 2019). Além disso, a ocorrência destas doenças pode ocasionar efeitos negativos sobre as características sensoriais dos produtos derivados destas uvas.

3.2.1. Podridão Cinzenta

A podridão cinzenta, causada por *B. cinerea*, é uma das principais doenças que afetam os vinhedos. O *B. cinerea* é mundialmente conhecido, sendo considerado o mais importante fitopatógeno responsável por podridões em uvas (Molitor et al. 2012), em alguns casos podendo provocar perdas e afetar a qualidade dos vinhos elaborados (Elad e Stewart 2007; Ky et al. 2012), além disso, são conhecidas mais de 200 espécies de plantas que possam ser afetadas por este fungo.

Uma elevada precipitação pluviométrica e umidade são condições adequadas para o desenvolvimento desta doença (Bettiga 2013; Thomidis et al. 2016), entretanto, quando em noites úmidas, manhãs de nevoeiro e dias secos, o fungo infecta de forma lenta e resulta no fenômeno chamado de podridão nobre (Pinar et al. 2017a; Negri et al. 2017). A umidade é um dos fatores de maior necessidade para a ocorrência da infecção, sendo que a temperatura ideal para a germinação dos conídios é de 25°C (Würz et al. 2017). Na maioria dos casos, a contaminação é a partir de cicatrizes naturais ou por outros ferimentos mecânicos (Machota et al. 2016). Um trabalho recente demonstrou que a adubação nitrogenada pode causar suscetibilidade à podridão dos frutos pelo agente *B. cinerea* (Thomidis et al. 2016).

Diferentes formas de infecção de *B. cinerea* são conhecidas e ocorrem em dois estágios do ciclo da videira: após a antese, quando a inflorescência é facilmente visível e quando as bagas são do tamanho de uma ervilha; e no final do ciclo, da virada de cor até as uvas estarem maduras (González-Domínguez et al. 2019). Segundo Elmer e Michailides (2007), no aparecimento das inflorescências, os conídios

provocam a infecção destas e de bagas jovens por diversas vias: infecção do estilete e óvulo, estames ou pétalas ou infecção das bagas pelo pedicelo.

B. cinerea é um fungo filamentosos presente em diversos ambientes e que apresenta característica necrotrófica, sendo capaz de excretar metabólitos como o glicerol, ácido glucônico, β -glucanas, e enzimas, como pectinases, proteases, tirosinases e lacases (Steel, Blackman e Schmidtke 2013). A infecção deste fitopatógeno inicia-se na baga da uva, porém pode permanecer no mosto, provocando a oxidação dos polifenóis e alteração da coloração. O fenômeno de oxidação de polifenóis é induzido pela síntese de lacase (Vignault et al. 2020). Perdas e efeitos sobre a qualidade dos vinhos elaborados são conhecidos (Ky et al. 2012).

Além disso, na maior parte dos casos, os vinhos elaborados com uvas infectadas por *B. cinerea* possuem características sensoriais desfavoráveis, isto deve-se as bagas infectadas resultarem em uma composição alterada e o patógeno secretar compostos tóxicos que afetam a cinética fermentativa das leveduras (Hong et al. 2011; Agudelo-Romero et al. 2015). Diversos estudos relatam alterações sensoriais de vinhos elaborados com uvas atacadas por podridão cinzenta, por exemplo, a produção de compostos voláteis indesejados (Meneguzzo et al. 2006; Barata et al. 2011; Ky et al. 2012; Pinar et al. 2017a, Pinar et al. 2017b). Um efeito positivo da incidência de *B. cinerea* é obtido em condições climáticas específicas, sobretudo em regiões de tempo seco, as quais resultam no fenômeno da Podridão Nobre, com a obtenção de uvas com maiores concentrações de açúcares e elaboração de vinhos com elevado teor de etanol e açúcares residuais (Pinar et al. 2017a; Negri et al. 2017).

O ciclo de vida do agente causal *B. cinerea* é considerado complexo (González-Domínguez et al. 2019), desta forma, na presença de condições ambientais adequadas e aplicação de práticas de manejo incorretas, essa doença pode provocar graves perdas nas colheitas. O controle desse patógeno está diretamente ligado a aplicações quase rotineiras de fungicidas, desta forma, viticultores investem expressivamente em agentes químicos (Brink, Calitz e Fourie 2016). No entanto, estas aplicações são problemáticas dado aos riscos de impactos ambientais e ao surgimento de cepas *Botrytis sp.* resistentes (Leroch, Kretschmer e Hahn 2011; Hu, Cox e Schnabel 2016), bem como a preocupação com possíveis resíduos destes antifúngicos em sucos e vinhos (Edder et al. 2009; González-Rodríguez et al. 2011; Noguerol-Pato et al. 2016; Gava et al. 2021).

A classe de fungicida E3 (dicarboximidas), que inclui clozolinato, dimetacrilona, iprodiona, procimidona e vinclozolin, é frequentemente relatada e tem sido extensivamente aplicada contra *B. cinerea* em todo o mundo. Dos 116 trabalhos publicados envolvendo controle de *B. cinerea* em videira, 69 estudaram esta classe, isolada ou combinada (González-Domínguez et al. 2018). Diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*, relatam a eficácia da molécula iprodiona no controle do fitopatógeno *B. cinerea* (Ampese e Almança 2019; Ebrahimzadeh e Abrinbana 2019; Wang et al. 2019; Candia 2020).

Agentes com ação em amplo espectro, como o captana, também são comumente utilizados para o controle desta doença. Os tratamentos convencionais baseados em calendário consistem em aplicações semanais protetoras destes fungicidas durante todo o ciclo da fruta (Hu, Cox e Schnabel 2016; Zuniga et al. 2020). Estudos relatam a eficiência de captana para o controle de *B. cinerea* em diferentes culturas (Amiri et al. 2019; Ampese e Almança 2019; Prieto et al. 2019; Candia 2020). Além disso, por se tratar de doenças fúngicas de final de ciclo, ou seja, com incidência muito próxima da colheita de uvas, o número de produtos registrados com prazo de carência que permitam sua aplicação é reduzido (Pedrotti et al. 2019), motivo pelo qual a Captana, que apresenta prazo de carência de apenas 1 dia.

A busca de produtos alternativos com menores impactos ambientais e com eficácia comprovada para o controle de podridão cinzenta foi intensificada nas últimas décadas. Estudos recentes focam no potencial dos biofungicidas (Hao et al. 2017; Calvo-Garrido et al. 2018), atualmente existe um amplo uso de produtos à base de *Trichoderma* e *Bacillus subtilis* para o controle de *B. cinerea* (Abbey et al. 2018). No entanto, segundo este autor, a aplicação única desses biofungicidas nem sempre garante o controle. Desta forma, biofungicidas podem ser usados em combinação com fungicidas sintéticos, reduzindo o uso destes e melhorando a inibição do fitopatógeno. Além disso, o uso de nanopartículas de prata (Ag) e cobre (Cu) também vêm mostrando inibição máxima de crescimento de micélio de *A. alternaria* e *B. cinerea*, com doses médias de 15 mg L⁻¹ (Kim et al. 2012; Ouda 2014; Thangadurai, Sangeetha e Prasad 2020).

3.2.2. Podridão de Uva Madura

O aparecimento de podridão no cacho é normalmente associado ao agente causal *B. cinerea*. Entretanto existe um número expressivo de outros fungos e

bactérias que podem ser responsáveis pelo apodrecimento das uvas, e este grupo inclui os fungos do gênero *Colletotrichum* sp., associados a podridão da uva madura (Steel, Blackman e Schmidtke 2013; Echeverrigaray et al., 2020).

A podridão de uva madura é uma doença que ocorre geralmente em vinhedos subtropicais com alta precipitação e temperaturas elevadas (20 a 30 °C) durante os estágios finais do amadurecimento da uva (Steel, Greer e Savocchia 2012). Assim como a maioria das doenças fúngicas, provoca efeitos tanto no volume de uvas produzido quanto na qualidade destas (Pedrotti et al. 2019). Em vinhedos da Serra Gaúcha, segundo Miele e Rizzon (2013), a podridão de uva madura tornou-se uma das doenças fúngicas de maior importância na última década.

O agente causal (patógeno) é a *Glomerella cingulata*, sendo as espécies do gênero *Colletotrichum* sp. seus anamorfos. Uma grande variedade de espécies de *Colletotrichum* responsáveis pela podridão da uva madura na região da Serra Gaúcha foi detectada em um estudo recente, havendo maior presença das espécies *C. viniferum* e *C. fructicola* (Echeverrigaray et al., 2020). Assim como *B. cinerea*, *G. cingulata* comumente não possuem uma espécie específica de hospedeiro (Whitelaw-Weckert et al. 2007), sendo fitopatógenos em uma ampla gama de culturas frutíferas (Steel, Blackman e Schmidtke 2013).

Este patógeno apresenta nas uvas um comportamento hemibiotrófico, caracterizado como uma fase biotrófica que avança para uma fase necrotrófica em condições adequadas (De Silva et al. 2017). Durante o desenvolvimento da doença, *G. cingulata* alcaliniza o tecido hospedeiro pela secreção ativa de amônia (Miyara et al. 2010). A alcalinização favorece a formação de apressório (Drori et al. 2003) e a produção de fatores de patogenicidade, como a pectato-liase (Villa-Rivera et al. 2017), cutinase e peptidases (Cannon et al. 2012).

Na fase necrotrófica, as bagas apodrecem e desenvolvem os sintomas característicos da doença, como manchas circulares e marrom avermelhadas na película (Echeverrigaray et al. 2019). Com o progresso da doença, as bagas são cobertas por conídios de cor salmão, corpos frutíferos (ou acervuli) do fungo que produzem esporos (Oo e Oh 2017). Estes conídios são hialinos, gutulados e com uma expressiva variação no tamanho (12 - 21 x 3,5 - 6 µm) e no formato. Sob condições favoráveis, são secretados, envoltos em uma massa mucilaginosa hidrossolúvel, que é quebrada na presença de precipitação, permitindo a disseminação (Garrido e Gava 2014) e sendo responsáveis pelo espalhamento da doença pelo vinhedo (Oo e Oh

2017).

Estudos recentes indicam que *G. cingulata* produziu uma maior quantidade de sintomas em bagas do que as infectadas por *B. cinerea* na ausência de feridas, isto deve-se ao fato de *C. gloeosporioides* possuir mecanismos específicos de penetração nos tecidos da planta por meio de um apressório (Ludwig et al. 2014; Machota et al. 2016). Além disso, trabalhos levantam a hipótese de que as práticas de manejo para o controle de *B. cinerea* podem ser ineficazes para o controle de *G. cingulata* (Steel, Greer e Savocchia 2007; Greer et al. 2011).

Atualmente, devido as condições climáticas da Serra Gaúcha, esta doença fúngica não é plenamente controlada na região (Pedrotti et al. 2019), e assim como a maioria das doenças fúngicas, provoca efeitos tanto no volume de uvas produzido quanto na qualidade destas (Miele e Rizzon 2013). O vinho elaborado de uvas atacadas por este patógeno possui qualidade sensorial inferior, de gosto amargo e aromas desagradáveis, sendo estas características de difícil remoção nos processos enológicos (Meunier e Steel 2009).

O gênero *Colletotrichum* está entre os 10 mais importantes fungos fitopatogênicos do mundo, tanto do ponto de vista científico bem como do econômico (Dean et al. 2012). Dentre todas as opções de tratamento de doenças em plantas, a principal forma de controle em todo o mundo é a aplicação de fungicidas (Fisher et al. 2012; Wang et al. 2017). Entretanto, mesmo os fungicidas possuindo o poder de conter efetivamente estas infecções, o uso excessivo pode levar à redução da eficácia e até ao desenvolvimento de resistência (Bosch et al. 2014).

Estudos recentes relataram a eficácia de diferentes fungicidas sobre o *Colletotrichum gloeosporioides*, como mancozebe, tebuconazole, zineb e hexaconazole (Satapathy e Beura 2019), entretanto, agentes como azoxistrobina, piraclostrobina e hidróxido de cobre não se mostraram agentes eficientes. Além disso, pesquisas evidenciaram que o *C. gloeosporioides*, agente causal da podridão da uva madura, possui resistência a tiofanato-metilico e dietofencarbe (Chen et al. 2014).

Segundo Wang et al. (2020), difenoconazol e o flusilazol, ambos pertencentes ao grupo triazol, são os agentes indicados para o controle do fungo *C. gloeosporioides*, neste estudo foram avaliados tebuconazole, difenoconazol, flusilazol e carbendazim, sendo que os isolados mostraram maior sensibilidade sobre difenoconazol. Este agente antifúngico possui grande destaque, também sendo eficaz contra *C. acutatum* em pimentão e morango (Gao et al. 2017; Baggio et al. 2018).

Trabalhos realizados *in vitro* indicam um controle adequado de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* por agentes do grupo ftalimida, como captafol e captana (Smith, Wedge e Pace 2013). Além disso, um estudo *in vivo* com bagas de uva examinou 11 diferentes grupos químicos de fungicidas e concluiu que captana, hidróxido de cobre, octanoato de cobre, mancozebe, azoxistrobina e tetraconazol são alternativas para o tratamento de podridão de uva madura (Oliver 2016).

Na última década, têm se intensificado o estudo em produtos alternativos que possam controlar *G. cingulata* e que apresentem baixo risco de resistência por parte deste. Estudos recentes demonstram o potencial de nanopartículas de prata (Kim et al. 2012; Thangadurai, Sangeetha e Prasad 2020), derivados da quitosana (Sanchez-Gonzalez et al. 2011; Santos et al. 2012, De Oliveira et al. 2017) e bactérias produtoras de compostos antifúngicos, como *B. subtilis* (Ashwini e Srividya 2014) e *B. amyloliquefaciens* (Mochizuki et al. 2012).

3.3. Efeito de podridões do cacho sobre a qualidade dos vinhos

As doenças fúngicas associadas a podridões do cacho, em especial podridão cinzenta e podridão da uva madura, podem ser responsáveis pela síntese de compostos capazes de denegrir a qualidade sensorial do vinho. Atualmente, uma parcela destes compostos é conhecida e bem caracterizada, no entanto, um expressivo número permanece ainda sem identificação (Schueuermann et al. 2019).

Diferentes fenômenos podem explicar o efeito negativo das podridões de cacho sobre a qualidade dos vinhos, dentre estes, cabe destacar: A alteração no metabolismo de carboidratos, elevando a concentração de polissacarídeos de alto peso molecular e promovendo inconvenientes durante as etapas de vinificação; a síntese da enzima oxidativa lacase, diretamente relacionada com o escurecimento na coloração dos vinhos elaborados; a formação de compostos responsáveis por transmitir ao vinho aromas indesejáveis; e a redução na quantidade de compostos fenólicos, ácidos orgânicos e aromas varietais (Ky et al. 2012; Steel, Blackman e Schmidtke 2013).

Além disso, as alterações sensoriais oriundas da vinificação de uvas atacadas por podridões de cachos são dependentes do agente fitopatogênico. Meunier e Steel (2009) concluíram que o vinho elaborado com uvas Cabernet Sauvignon atacadas por *C. acutatum* (podridão da uva madura) distinguiu-se sensorialmente do vinho elaborado com uvas atacadas por podridão cinzenta (*B. cinerea*). Determinadas

espécies de *B. cinerea* foram consideradas capazes de passar ao mosto odores de cogumelo e de cânfora (La Guerche et al. 2006), enquanto em vinhos processados a partir de uvas contaminadas por *G. cingulata*, foi observado menor intensidade de sabor de fruta em comparação com vinhos elaborados com uvas sãs (Meunier e Steel 2009).

O número de estudos que relataram alterações na composição e na qualidade sensorial de mostos e vinhos elaborados com uvas infectadas por *B. cinerea* (podridão cinzenta) vem crescendo nos últimos anos. Um número expressivo de trabalhos publicados na última década evidencia esta problemática (Hong et al. 2011; Agudelo-Romero et al. 2015; Ky et al. 2012; Pinar et al. 2016; Pinar et al. 2017a; Pinar et al. 2017b; Zimdars et al. 2017; Schueuermann et al. 2019; Steel et al. 2020). Além disso, duas revisões abordaram este tema (Steel, Blackman e Schmidtke 2013; Garrido 2015).

Diversos estudos, conduzidos na Alemanha com uvas White Riesling, Red Riesling e Gewurztraminer, evidenciaram diferentes inconvenientes na vinificação de uvas atacadas por *B. cinerea* (Pinar et al. 2016; Pinar et al. 2017a; Pinar et al. 2017b). No mosto, Pinar et al. (2016) concluíram que a infecção por *B. cinerea* resultou em um aumento na concentração de sólidos solúveis, na acidez total, que pode ser explicada pelo aumento na acidez volátil, e na concentração de ácido octanoico, substância amplamente conhecida por seu efeito tóxico sobre as leveduras, causando inibição de seu crescimento e inibindo a fermentação alcóolica (Stevens e Hofmeyr 1993). Estes resultados vão ao encontro com os encontrados por Agudelo-Romero et al. (2015), no qual a concentração de diferentes ácidos graxos aumentou em mostos obtidos de uvas atacadas por *B. cinerea*. Além disso, Pinar et al. (2016) relataram um aumento de fenilacetaldeído e metional, os quais, segundo estes autores, são responsáveis por desvios aromáticos em vinhos brancos afetados por deterioração oxidativa. Os autores formularam a hipótese de que este fenômeno pode estar diretamente relacionado com a atividade oxidativa do fungo por meio da lacase.

Quanto ao efeito de *B. cinerea* na composição volátil, Pinar et al. (2017a) relataram a presença de defeitos organolépticos em mostos e vinhos, conferindo notas aromáticas que lembram cogumelo, mofo e cânfora. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Steel et al. (2020), no qual foram detectadas maiores concentrações dos compostos 3-octanona, 1-octen-3-ona e 1-octen-3-ol em mostos atacados por *B. cinerea*, diretamente associados a aromas de terra e mofo. Na

Austrália, um estudo de Schueuermann et al. (2019) objetivou avaliar as diferenças na composição volátil de mostos de uvas Chardonnay, totalmente ou parcialmente (10%) infectadas por *B. cinerea*. Os autores concluíram que uma proporção de 10% de bagas infectadas provoca uma alteração detectável nos mostos obtidos (Schueuermann et al. 2019).

A pesquisa de Ky et al. (2012) confirmou que um vinho tinto vinificado com uma proporção de 5% de uvas infectadas por *B. cinerea* apresenta características organolépticas que comprometem a qualidade sensorial do produto, como um elevado amargor e aromas desagradáveis. Além disso, os autores concluíram que estas características adquiridas são irreversíveis durante as etapas de elaboração do vinho. Uma elevação na concentração de acidez volátil destes produtos também é relatada (Ky et al. 2012), e resultado semelhante foi encontrado por Steel et al. (2020).

O estudo de Ky et al. (2012) foi realizado na região de Bordeaux (França) com uvas da variedade Merlot. No referido estudo, os vinhos tintos elaborados com as uvas atacadas por podridão cinzenta foram percebidos com menor adstringência, fenômeno este explicado pela redução no grau de polimerização médio. Este estudo demonstrou também que uvas acometidas por podridão cinzenta são responsáveis por causar desvios organolépticos e depreciação dos vinhos, ocasionando em notas aromáticas descritas como terra molhada, vegetal, herbáceo e cogumelo, resultados que vão ao encontro dos apresentados por Pinar et al. (2017b).

Além disso, foi evidenciado que a infecção por *B. cinerea* é prejudicial à composição fenólica da película da uva, sendo que todos os compostos fenólicos quantificados foram reduzidos na presença deste fungo, bem como a concentração de antocianinas. A redução na concentração de antocianinas totais foi também detectada nos mostos e vinhos elaborados com uvas infectadas (Ky et al. 2012).

No entanto, estes diferentes artigos citam efeitos positivos da *B. cinerea* sobre a composição volátil dos vinhos obtidos, motivos pelos quais o fenômeno da podridão nobre é altamente valorizado em certas regiões vitivinícolas (Pinar et al. 2017a; Negri et al. 2017). Pinar et al. (2017a) detectaram um aumento na concentração de γ -decalactona, um composto do grupo das lactonas e associados a aromas de pêssego e damasco (Kallitsounakis e Catarino 2020). Além disso, Negri et al. (2017) demonstraram que em condições adequadas a infecção natural por *B. cinerea* influenciou positivamente no caráter das uvas em comparação com as uvas sãs.

Quanto ao efeito da *G. cingulata*, os impactos do patógeno da podridão da uva madura no cultivo da uva são bem conhecidos e documentados, entretanto, existe atualmente um baixo número de trabalhos que avaliaram o impacto desta doença sobre o vinho elaborado. O primeiro trabalho publicado que teve por objetivo avaliar o impacto da podridão da uva madura sobre o vinho foi no ano de 2009 (Meunier e Steel 2009), sendo que posterior a este trabalho outros autores publicaram sobre o tema (Barata et al. 2011; Steel, Blackman e Schmidtke 2013; Miele e Rizzon 2013).

As uvas infectadas por podridão da uva madura possuem um gosto amargo e notas aromáticas negativas. Estes desvios aromáticos ocorrem anteriormente a aparição de sintomas visuais nos cachos, e, conseqüentemente, a qualidade do vinho também é afetada (Meunier e Steel 2009). O primeiro estudo, relatado por Meunier e Steel (2009), ocorreu na Austrália com uvas Cabernet Sauvignon, no qual foi percebido um aumento na concentração de sólidos solúveis e na acidez total do mosto de uvas infectadas por *G. cingulata*, os autores atribuíram este aumento à desidratação causada pela infecção. Quanto a cinética de fermentação, os autores concluíram que não houve diferenças e o mosto fermentado com uvas atacadas concluiu sua fermentação no mesmo momento do tratamento com uvas sãs.

Quanto ao vinho elaborado, os mesmos autores indicaram que este apresentou um maior valor de pH, concentração de etanol, glicerol, ácido glucônico, açúcares residuais e acidez volátil quando fermentado com uvas atacadas por podridão da uva madura (Meunier e Steel 2009). Além disso, constataram que o vinho elaborado com uvas infectadas apresentou uma coloração castanho, ou seja, com maior tom de marrom. Na análise sensorial, os julgadores conseguiram identificar com clareza diferenças no vinho elaborado com uma proporção de 3% de uvas atacadas por podridão da uva madura em comparação ao vinho elaborado na ausência de uvas infectadas. Além disso, o vinho elaborado com 3% de uvas afetadas foi descrito como contendo menor coloração vermelha, maior amargor e aspereza no paladar, e uma menor intensidade de aromas frutados, em comparação ao vinho elaborado com uvas sãs (Meunier e Steel 2009).

No Brasil, o trabalho de Miele e Rizzon (2013) corrobora com os resultados apresentados por Meunier e Steel (2009), da forma que ambos os trabalhos destacaram o impacto negativo sobre a coloração dos vinhos elaborados. Miele e Rizzon (2013) avaliaram o impacto da podridão de uva madura sobre vinhos obtidos da variedade Cabernet Sauvignon. A infecção por *G. cingulata* elevou a quantidade

de sólidos solúveis e o pH dos mostos, além disso, o vinho apresentou um maior valor de pH, concentração de etanol, extrato seco e cinzas, sendo identificada a redução na coloração vermelha, intensidade corante, acidez total e do conteúdo de antocianinas. Os autores destacam o fato de o impacto da infecção ser mais expressivo no vinho elaborado (Miele e Rizzon 2013).

3.4. Uso da mistura de fungicidas

A combinação de dois ou mais agentes para o controle de doenças fúngicas é utilizado há décadas em diversas culturas (Ebrahimzadeh e Abrinbana 2019). O uso de uma mistura de fungicidas, com efeito sinérgico, é uma ferramenta útil para o manejo de doenças, ampliando a ação antifúngica e impedindo o desenvolvimento da resistência a fungicidas (FRAC 2010).

Estudos experimentais recentes demonstraram que o uso desta estratégia é mais adequado que a rotação de fungicidas, obtendo-se resultados superiores e impedindo o desenvolvimento da resistência com melhor garantia (Bosch et al. 2014; Elderfield et al. 2018). Além disso, uma formulação de maior eficácia (combinação sinérgica) para o tratamento dos fitopatógenos pode resultar na redução da quantidade dos agentes químicos aplicados, reduzindo despesas econômicas dos agricultores e possíveis impactos ambientais (Gisi 1996; Ebrahimzadeh e Abrinbana 2019), há também a possibilidade de controlar doenças provocadas por cepas resistentes (Couch e Smith 1991; Gisi 1996).

No entanto, embora o uso de formulações sinérgicas de antifúngicos seja uma ferramenta interessante para o controle do desenvolvimento da resistência de fungos e para a redução dos produtos químicos aplicados, atualmente são poucos os trabalhos publicados e pesquisas disponíveis sobre os efeitos sinérgicos das misturas de fungicidas para o controle de *G. cingulata* e *B. cinerea* (Zhang, Zhang e Zhu 2008; Ebrahimzadeh e Abrinbana 2019). Além disso, é imprescindível destacar que esta estratégia se refere ao uso de uma mistura de fungicidas na formulação do produto comercial, com base em estudos envolvendo otimização, a qual nada se refere com a prática de mistura de agrotóxicos em tanque, a qual é uma prática comum nas propriedades agrícolas mesmo com desvantagens conhecidas e desconhecimento por parte dos agricultores (Gazziero 2015).

3.5. Uso da 8-Hidroxiquinolina como antifúngico

Globalmente, há a necessidade de desenvolver novos compostos antifúngicos com os objetivos de reduzir a dose de aplicação, melhorar a eficiência e a seletividade, obter um modo de ação específico e um menor impacto ambiental (Kim et al. 2010; McCarthy et al. 2017; Zhang et al. 2017; Su, Han e Huang 2018; Cortés et al. 2019). O uso de fungicidas na agricultura é problemático devido ao seu impacto ambiental (Peña et al. 2018), aos riscos que representam para a saúde dos agricultores (Upadhayay et al., 2020), ao surgimento de cepas fúngicas resistentes (Leroch, Kretschmer e Hahn 2011; Hu, Cox e Schnabel 2016) e devido as preocupações sobre a contaminação por fungicidas em produtos alimentares. Nesse contexto, a síntese de novas moléculas com menor toxicidade, como os derivados de 8-hidroxiquinolina (8HQ), pode desempenhar um papel importante no controle de fungos fitopatogênicos.

Os derivados de 8HQ são uma subclasse das quinolinas com alta versatilidade sintética e exibem uma ampla gama de atividades biológicas reconhecidas. Considerando sua alta reatividade e atividade farmacológica, muitos derivados 8HQ foram sintetizados, otimizados e amplamente estudados (Chan et al. 2013; Serrao et al. 2013; Lam et al. 2014; Kos et al. 2015; Oliveri e Vecchio 2016; Rbaa et al. 2019). Seus efeitos incluem neuroprotetor (Suwanjang, Prachayasittikul e Prachayasittikul 2016), antitumoral (Chan-On et al. 2015; Krawczyk et al. 2019), antibacteriano (Musiol et al. 2010; Enquist et al. 2012), antisséptico (Cherdtrakulkiat et al. 2016; Abouelhassan et al. 2017), antioxidante (Chobot et al. 2018), antimalárico (Franchi e Vigni 1967), antiviral (Polanski et al. 2006; Kos et al. 2019) e atividade antifúngica (Musiol et al. 2006; Arafa et al. 2013; Oliveri e Vecchio 2016; Pippi et al. 2017).

A molécula de 8-hidroxiquinolina possui em sua estrutura um anel heterocíclico de seis membros fundido a um anel benzênico, conforme demonstrado na Figura 1 (Sashidhara et al. 2009). Isso permite uma ampla diversidade estrutural no projeto de antifúngicos. Alguns derivados, como o clioquinol, atuam na parede celular de fungos, enquanto outros contendo ácido sulfônico comprometem a integridade da membrana, mostrando que é possível alterar o padrão de substituição do núcleo do 8HQ para obter diferentes modos de ação antifúngica (Pippi et al. 2019). Portanto, esses derivados parecem ser alternativas antifúngicas promissoras no

campo da agronomia, por exemplo, diminuiriam a aplicação de agroquímicos altamente tóxicos em diferentes culturas, minimizando o efeito da resistência antifúngica e os danos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente, e ofereceriam novas perspectivas sobre o controle de fitopatógenos.

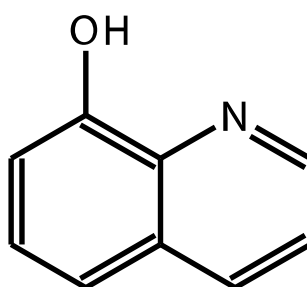


Figura 1. Estrutura química da 8-hidroxiquinolina (8HQ).

A busca de novos agentes antifúngicos tornou-se essencial, porém pesquisas recentes envolvendo moléculas com atividade antimicótica já conhecidas e alterações na estrutura destas, com o objetivo de melhorar a ação, demonstram um meio mais simples para este fim (Ngo, Garneau-Tsodikova e Green 2016). Os derivados da 8-hidroxiquinolina surgem como alternativa antifúngica promissora, em razão de seu amplo espectro antifúngico e seu efeito atóxico, o que diminuiria a aplicação de agrotóxicos de alta toxicidade na cultura da videira, minimizando o efeito de resistência aos mesmos e os danos nocivos aos seres humanos e ao meio ambiente, trazendo novas perspectivas à produção vitícola.

Vários estudos recentes investigaram o potencial agrônomo de derivados de 8HQ para controlar diferentes fitopatógenos de diferentes culturas. Bennamara e Abourriche (2020) avaliaram o crescimento de *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Verticillium albo-atrum* na presença de diferentes derivados 8HQ e concluíram que alguns derivados tinham uma capacidade inibitória maior do que o fungicida anfotericina B. Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo de Yin et al. (2020) em *B. cinerea* isolada de plantas suscetíveis que mostrou que 32 dos 38 derivados de 8HQ estudados exibiram uma atividade antifúngica superior à da azoxistrobina. Além disso, estudos recentes têm mostrado o potencial dos derivados de 8HQ no controle de fungos e bactérias em sementes oleaginosas (Yin et al. 2019) e de fungos associados à doença do pé preto em videiras (Souza et al. 2021).

3.6. Impacto dos resíduos de fungicidas sobre a fermentação alcoólica na elaboração de vinhos

Além dos riscos à saúde humana, os resíduos de agrotóxicos podem ser também uma fonte de inconvenientes para a indústria do vinho (Oliva et al. 2015; Regueiro et al. 2015; Briz-Cid et al. 2018). No campo, muitas práticas com o objetivo de mitigar esses problemas surgem a cada ano, incluindo programas de manejo integrado de pragas, que visam minimizar os impactos ambientais e garantir a saúde dos agricultores (Crump et al. 2018), além de impor limites de segurança pré-colheita (Urkude, Dhurvey e Kochhar 2019). Embora essas ações ajudem a reduzir a quantidade de agrotóxicos utilizados e, conseqüentemente, os riscos à saúde do consumidor, estas práticas não garantem a ausência de resíduos químicos nas uvas e não levam em consideração seus possíveis efeitos sobre os processos microbiológicos da indústria.

A produção de vinho compreende diversas operações e práticas que visam a transformação do mosto de uva em vinho (Berbegal et al. 2017). Diferentes condições no meio podem levar a diferentes rotas biológicas, resultando em produtos com diferentes composições. A transformação de um mosto rico em açúcares em uma bebida alcoólica é um processo bioquímico complexo no qual leveduras, bactérias e outros microrganismos intervêm e interagem (Liu et al. 2017). Dentre eles, as leveduras, principalmente a *S. cerevisiae*, são os principais microrganismos da vinificação responsáveis pela fermentação alcoólica, principal bioprocessos na conversão do mosto em vinho.

Um dos maiores desafios enfrentados na vinificação é a interrupção da fermentação alcoólica (Blateyron e Sablayrolles 2001; Capozzi et al. 2017; Russo et al. 2019), o que pode resultar em vinhos com quantidade elevada de açúcares e, sobretudo, aumentar os riscos microbianos, como a possibilidade de contaminação por bactérias do ácido lático. A redução da atividade metabólica da levedura pode causar a parada espontânea da fermentação, e vários fatores (físicos, biológicos ou químicos) podem ser responsáveis por causar esse fenômeno (Bisson 1999). Embora várias soluções estejam disponíveis e o progresso científico seja constante, a cada ano as interrupções da fermentação geram perdas econômicas para a indústria do vinho (Maisonave et al. 2013; Szopinska et al. 2016; Russo et al. 2019).

Resíduos de fungicidas podem além de resultar na formação de compostos

voláteis indesejáveis (Capece et al. 2018; Briz-Cid et al. 2019), serem tóxicos para as leveduras e impactar na cinética de fermentação, podendo resultar em paradas fermentativas (Russo et al. 2019). Os princípios ativos dos fungicidas à base de enxofre ou cloro têm um efeito negativo na fermentação, como folpete, captana, captafol e tolifluanida (Togores 2018). Togores (2018) também relata que agentes pertencentes à família dos triazóis ou imidazóis, que atuam bloqueando a biossíntese do ergosterol de fungos fitopatogênicos, podem ter o mesmo efeito sobre as leveduras enológicas.

As células de levedura respondem de forma diferente a condições adversas durante o processo de fermentação, e situações de estresse podem ter um efeito inibitório sobre o crescimento celular (Silva et al. 2016). A modificação da estrutura das células de levedura devido à presença de fungicidas, como na permeabilidade da membrana, bem como efeitos adversos nas organelas celulares, podem causar alterações na cinética de fermentação (Regueiro et al. 2015), resultando em uma fermentação alcoólica ineficiente, com consequências organolépticas e econômicas (Urkude, Dhurvey e Kochhar 2019).

A captana (N-(trichloromethylthio)ciclohex-4-ene-1,2-dicarboximida) é um fungicida do grupo Ftalimida. Sua atividade de contato multissítio justifica sua ampla utilização na viticultura para controle de *P. vitícola*, *B. cinerea* e *Elsinoe ampelina*. No entanto, por conta desta característica, sua ação sobre a levedura pode afetar a cinética de fermentação de mostos. Estudos já detectaram a presença de captana acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecido (Martins et al. 2012). Silva et al. (2016) relataram que o mosto contaminado com captana não teve sua fermentação concluída, condição que levaria a expressivos prejuízos financeiros.

Os fungicidas com princípio ativo tebuconazole e difenoconazol são pertencentes ao grupo dos triazóis, sendo que são amplamente utilizados no controle de *Colletotrichum* sp., *Uncinula necator* e *Phakopsora euvitis*. No Brasil, 319 amostras de uva foram analisadas entre 2017 e 2018, sendo o difenoconazol o fungicida mais encontrado, em 70 amostras, enquanto o tebuconazol foi detectado em 42 amostras (ANVISA 2019). Um trabalho investigativo sobre o efeito do tebuconazole sobre os processos de vinificação relata que a presença de 2 mg L⁻¹ afetou a taxa de degradação dos açúcares, além disso, a biomassa formada pelas leveduras foi significativamente menor (González-Rodríguez et al. 2009).

Na última década, diversos estudos quantificaram a concentração de

fungicidas encontrados na uva e em seus derivados (Gava et al. 2021). Além disso, uma série de estudos avaliou o efeito de diferentes resíduos de fungicidas na fermentação do vinho (Gava et al. 2021). Com o objetivo de fornecer novas perspectivas sobre a presença de fungicidas em uvas e seu impacto na produção de vinhos, um artigo de revisão foi elaborado (Apêndice 1) e encontra-se publicado em *Food Additives & Contaminants: Part A* (Gava et al. 2021), o qual descreve os principais agentes fungicidas encontrados em uvas e seus derivados, e fornece uma visão geral de seus impactos na fermentação alcoólica.

A literatura compilada na revisão demonstra que vários compostos antifúngicos podem permanecer em níveis residuais durante o processo de vinificação. A revisão destaca como expressivas as concentrações de resíduos encontradas para alguns compostos em uvas e em seus derivados e que a presença de diferentes fungicidas pode resultar em efeitos negativos no processo de vinificação.

Em geral, todos os fungicidas citados na revisão resultaram em um impacto negativo na produção de vinho e, na maioria dos casos, observou-se um efeito na cinética fermentativa. Além disso, efeitos também foram relatados na produção de acidez volátil (Bizaj et al. 2011; Capece et al. 2018; Briz-Cid et al. 2019) e glicerol (Scariot et al. 2016a; Sieiro-Sampedro et al. 2020), redução do teor de etanol (Sarris et al. 2009; González-Rodríguez et al. 2011; Milanović, Comitini e Ciani 2013; Martins et al. 2014; Noguerol-Pato et al. 2014; Capece et al. 2018; Castro-Sobrinho et al. 2019), formação de biofilme (Russo et al., 2019), redução da diversidade microbiana (Čadež, Zupan e Raspor 2010; Zara et al. 2011; Cordero-Bueso, Arroyo e Valero 2014; Escribano-Viana et al. 2018) e alterações na estrutura celular da levedura (Scariot et al. 2016a; Scariot et al. 2017; Scariot et al. 2018).

Com base nas evidências reunidas e apresentadas, nossa revisão da literatura enfatiza as preocupações levantadas pelo impacto desses agentes antifúngicos no processo de fermentação. Existe um vasto campo de investigação para futuras pesquisas que estudem e elucidem os mecanismos e consequências destas moléculas sobre leveduras e sobre o processo de fermentação, bem como ações preventivas que podem ser adotadas na vinha e na indústria como um todo para mitigar potenciais perdas causadas pelo uso de fungicidas. Na verdade, um pequeno número de estudos está avaliando ativamente o efeito dos fungicidas combinados, bem como as implicações do uso de produtos alternativos para o controle de pragas em vinhedos.

Além disso, têm se intensificado nos últimos anos o uso de leveduras não-*Saccharomyces* na enologia, com o objetivo de obter vinhos com maior complexidade aromática (Morata et al. 2020; Borren e Tian 2021). Entretanto, estudos recentes concluíram que fungicidas utilizados no controle de *B. cinerea*, como iprodiona, pirimetanil, fludioxonil e ciprodinil, interferem na atividade destas leveduras mesmo estando em concentrações abaixo da legislação (Kosel, Raspor e Čadež, 2019), podendo prejudicar a complexidade aromática da bebida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de realização da pesquisa

Os experimentos *in vitro*, envolvendo o efeito dos agentes antifúngicos sobre os fungos, foram conduzidos no laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e no Laboratório de Enologia e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia da UCS (Universidade de Caxias do Sul). Os experimentos envolvendo a fermentação de mosto de uva foram conduzidos na Vinícola-Escola e no laboratório de Enologia do IFRS-BG (Instituto Federal do Rio Grande do Sul - Campus Bento Gonçalves).

4.2. Cepas fúngicas selecionadas para a pesquisa

Os fungos fitopatogênicos, isolados de uvas, foram obtidos da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do IFRS-BG (Número de cadastro SisGen A7F3DBF, Anexo 1) com a localização geográfica 29°09'48,6"S/51°31'19,5"O, conforme tabela 1.

Tabela 1. Cepas depositadas na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do IFRS-BG.

Espécie	ID Coleção IFRS
<i>B. cinerea</i>	IFBG-1402
<i>G. cingulata</i>	IFBG-1405
<i>G. cingulata</i>	IFBG-1406

As leveduras *S. cerevisiae* utilizadas nos ensaios *in vitro* e nos ensaios fermentativos foram cepas comerciais adquiridas pelo IFRS-BG e pela UCS. As leveduras Zymaflore X5, obtida da Laffort (Bordeaux, França), e Mauriform Y904, obtida da AB Biotek (Peterborough, Reino Unido), foram utilizadas nos ensaios fermentativos.

Para os ensaios envolvendo viabilidade celular e citometria de fluxo, a levedura *S. cerevisiae* BY4741 (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) e seus mutantes isogênicos Y0233 (aif1::kanMX4), Y01217 (nuc1::kanMX4), e Y06233 (yca1::kanMX4) com deleções no fator-1 indutor de apoptose, os genes da nuclease mitocondrial e a metacaspase 1, respectivamente, foram obtidos da Euroscarf (Frankfurt, Alemanha).

4.3. Moléculas selecionadas para a pesquisa

O novo análogo da 8-hidroxiquinolina estudado foi obtido a partir de ácidos sulfônicos (**1**) os quais foram convertidos nos cloretos de sulfonila (**2**) por reação com o ácido clorossulfônico. A seguir, os cloretos (**2**) foram transformados nas sulfonamidas (**3**) por reação com as várias aminas comerciais (Figura 2).

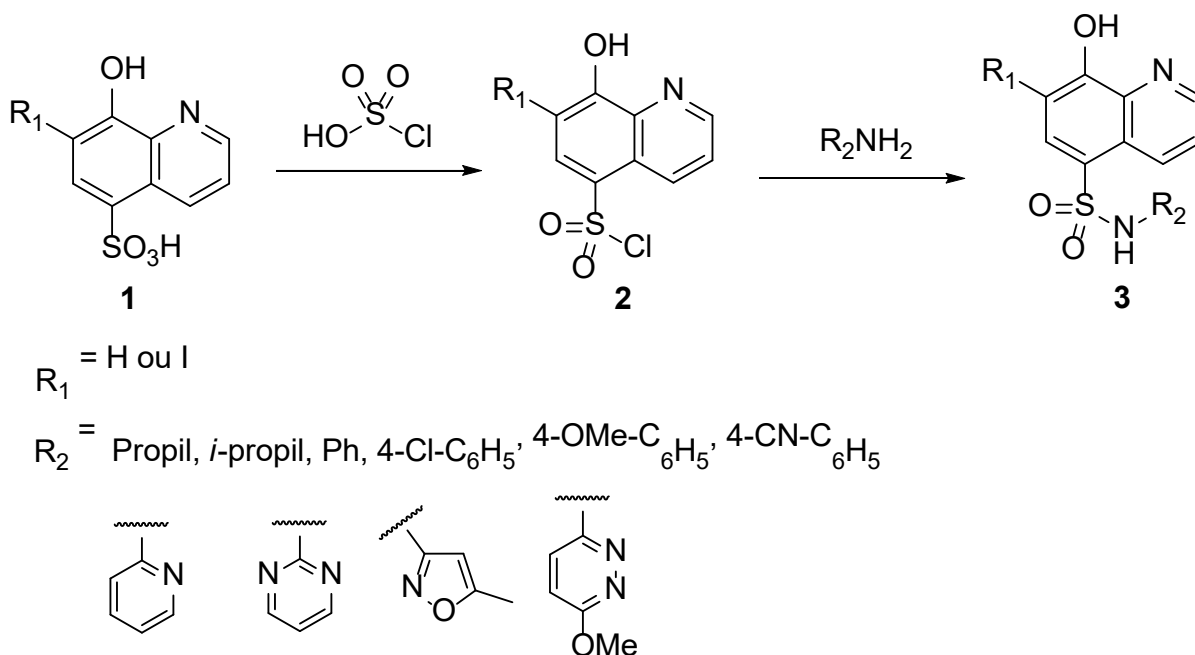


Figura 2. Síntese dos novos derivados de 8-hidroxiquinolinas.

O composto PH151, 8-Hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil)sulfonamida (335 g mol^{-1}) foi sintetizado conforme descrito por Joaquim et al. (2019) e sua estrutura química é mostrada na Figura 3. A metodologia e caracterização de PH151 é descrita por Joaquim et al. (2019). A um balão de fundo redondo foi adicionado ácido clorossulfônico (11 equivalentes) e 8-hidroxiquinolina (0,5 g). A solução foi mantida em agitação por 18 horas. A seguir, a mistura foi vertida cuidadosamente em um funil de separação que continha 100 mL de solução salina, 50 g de gelo e 150 mL de diclorometano. Após extração do intermediário cloreto de sulfonila com o solvente orgânico, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada. Ao intermediário 8-hidroxiquinolina-5-cloreto de sulfonila resultante, foi adicionada uma solução de 4-cloroanilina (4 equivalentes) em acetonitrila e essa solução foi mantida por 3 horas a $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente, a mistura foi concentrada e o PH151 resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (eluente Ciclohexano: acetato de etila 8:2). O grau de pureza obtido foi superior a 95%, usando-se de cromatografia em coluna, que foi confirmada por espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

(Joaquim et al., 2019).

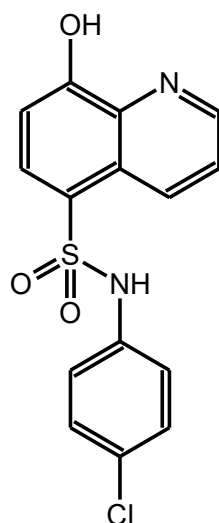


Figura 3. Estrutura química do derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151).

A partir da consulta aos fungicidas registrados no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para as doenças fúngicas estudadas (sistema AGROFIT) e através de revisão bibliográfica, foram estabelecidos para estudo os produtos comerciais registrados com os ingredientes ativos captana, difenoconazol e iprodiona (Tabela 2).

Tabela 2. Fungicidas registrados testados.

Nome Comercial	Empresa	Cidade, País	Princípio Ativo	% Substância Ativa	Referências
Rovral®	FMC QUIMICA	Campinas, Brasil	Iprodiona	50,0	Ampese e Almança, 2019 ^a ; Cáceres Candia, 2020 ^a ; Ebrahimzadeh e Abrinbana, 2019 ^a ; Wang et al., 2019 ^a
Orthocide 500®	UPL	Campinas, Brasil	Captana	50,0	Ampese e Almança, 2019 ^a ; Cáceres Candia, 2020 ^a ; Smith et al., 2013 ^b ; Oliver, 2016 ^b ;
Score®	Syngenta	Basiléia, Suíça	Difenoconazol	25,0	Wang et al., 2020 ^b ; Gao et al., 2017 ^b ; Baggio et al., 2018 ^b ;

^a *B. cinerea*; ^b *G. cingulata*.

4.4. Meios de cultura

Os fungos fitopatogênicos *B. cinerea* e *G. cingulata* foram cultivados a 25 °C em placas de petri contendo meio BDA (ágar batata dextrose, 4 g L⁻¹ de infusão de batatas, 20 g L⁻¹ de Glicose, 1,5 g L⁻¹ agar-agar, pH 5,5) obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os ensaios de concentrações inibitórias mínimas dos fungos

fitopatogênicos foram realizados com meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, Gibco, Nova York, EUA), sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico, Sigma-Aldrich) e ajustado para pH 7,0.

As leveduras foram cultivadas a 28 °C sob agitação constante (150 rpm) em caldo YEPD (2% de extrato de levedura, 1% de peptona, 2% de glicose, pH 6,5) ou em caldo YNB (0,67% de base de nitrogênio de levedura com aminoácidos, 2% de glicose, pH 6,5). Os testes de concentrações inibitórias mínimas para leveduras em sistema fermentativo foram realizados com mostos sintéticos descritos por Rossignol et al. (2003) e Pérez et al. (2021), com algumas modificações: 200 g L⁻¹ de açúcares redutores (100 g L⁻¹ de glicose + 100 g L⁻¹ de frutose); 7 g L⁻¹ de ácido tartárico; 6 g L⁻¹ de ácido málico; 0,6 g L⁻¹ de ácido cítrico; 0,67 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; 0,67 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada; 0,25 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O; 0,25 g L⁻¹ de FeSO₄·7H₂O; 0,15 g L⁻¹ de NaCl; 0,15 g L⁻¹ de CaCl₂·2H₂O; 7,5 mg L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O; 1 mg L⁻¹ de KI; 0,4 mg L⁻¹ de CoCl₂·6H₂O; 1 mg L⁻¹ de H₃BO₃; 1,5 mg L⁻¹ de CuCl₂; 1 mg L⁻¹ de Mo; 20 mg L⁻¹ de mio-inositol; 0,05 mg L⁻¹ de biotina; 0,25 mg L⁻¹ de cloridrato de tiamina; 0,25 mg L⁻¹ de cloridrato de piridoxina; 2 mg L⁻¹ de ácido nicotínico e 1,5 mg L⁻¹ de pantotenato de cálcio. O pH foi ajustado para 3,5 com NaOH (1 M).

4.5. Testes de atividade antifúngica sobre fungos fitopatogênicos

4.5.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fungicidas, a diluição destes seguiu as recomendações do protocolo M38-A2 do CLSI (2008). A molécula derivada da 8-hidroxiquinolina (PH151) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO).

O inóculo fúngico utilizado nos ensaios constituiu-se de uma suspensão de conídios obtidos a partir de culturas de sete dias de idade, cultivadas em meio BDA e ajustadas em câmara de Neubauer para a uma concentração de 2,5 x 10⁵ conídios mL⁻¹ (Spolti et al. 2012). O teste de susceptibilidade, segundo o protocolo M38-A2 da CLSI (2008), foi realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com 96 poços.

A leitura para determinação da CIM foi realizada a partir do método visual, observando-se o desenvolvimento dos microrganismos em relação ao controle

negativo, considerando a formação ou não de crescimento micelial na cavidade da placa e turvação do meio. Foi determinada como CIM a menor concentração do fungicida capaz de produzir inibição total da germinação dos esporos e do crescimento micelial dos fungos. Quatro repetições foram feitas para cada antifúngico. Os resultados dos valores de CIM foram expressos em mg L^{-1} e em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.5.2. Avaliação da inibição de crescimento micelial de *G. cingulata* em placa de Petri

Colônias fúngicas dos isolados de *G. cingulata* testados (IFBG-1405 e IFBG-1406) foram cultivadas em meio BDA por sete dias para a retirada de discos de micélio com 8 mm de diâmetro, os quais foram transferidos para o centro de novas placas de Petri com o meio BDA contendo os antifúngicos testados. As placas foram mantidas a 25 °C em escuro contínuo. O diâmetro da colônia foi medido após 7 dias para o isolado IFBG-1405 e 5 dias para o isolado IFBG-1406, em duas direções perpendiculares. A Figura 4 apresenta esquematicamente como foi realizado o procedimento descrito.

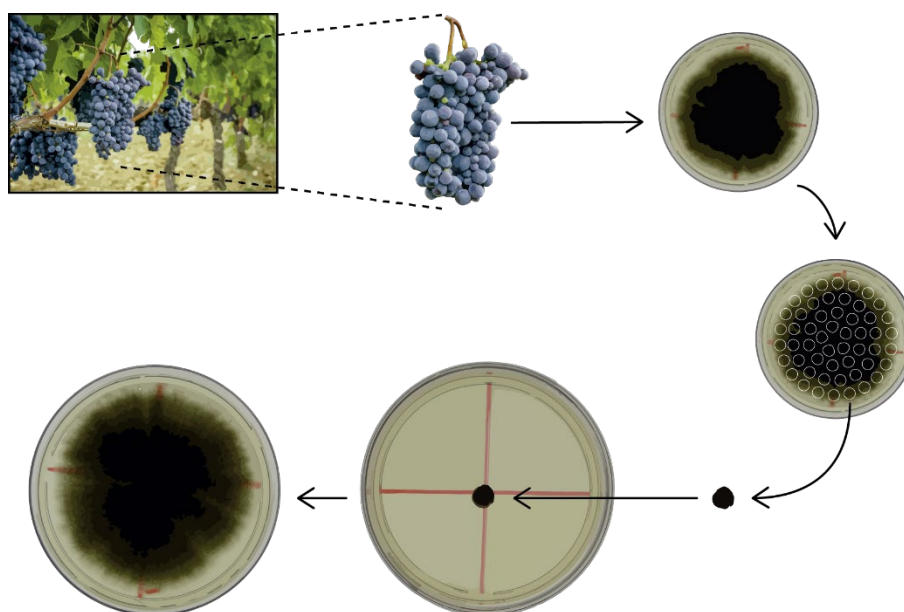


Figura 4. Esquema do procedimento realizado para acompanhamento do crescimento micelial de *G. cingulata*.

O desenvolvimento de uma formulação envolvendo mais de dois componentes requer algumas especificidades experimentais (Cornell 2011). O planejamento experimental específico para misturas, simplex-centróide expandido, foi utilizado neste ensaio a fim de avaliar a existência de sinergismo de três agentes antifúngicos sobre a inibição do crescimento micelial. O delineamento para três

componentes (três antifúngicos) foi composto de 10 ensaios com cinco repetições em cada ponto. Como tratamento controle positivo, foi realizado um ensaio adicional em que os fungos foram inoculados em placas contendo apenas DMSO no meio BDA. As proporções em cada formulação, expressas em pseudocomponentes, estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Pseudocomponentes dos pontos experimentais do ensaio de combinação de diferentes agentes antifúngicos para inibição de crescimento micelial de *G. cingulata*.

Ponto	Ensaio	Pseudocomponentes		
		X ₁ PH151	X ₂ Captana	X ₃ Difenoconazol
Vertice 1	1	1	0	0
Vertice 2	2	0	1	0
Vertice 3	3	0	0	1
Lateral 1	4	1/2	1/2	0
Lateral 2	5	1/2	0	1/2
Lateral 3	6	0	1/2	1/2
Centro	7	1/3	1/3	1/3
Axial 1	8	2/3	1/6	1/6
Axial 2	9	1/6	2/3	1/6
Axial 3	10	1/6	1/6	2/3
DMSO	11	0	0	0
Controle +	12	0	0	0

O derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151), Captana (nome comercial: Orthocide 500®), e Difenoconazol (nome comercial: Score®) foram testados para dois isolados de *G. cingulata*. Os limites superiores, doses máximas para cada antifúngico dentro das misturas, foram estabelecidos através dos resultados obtidos nos ensaios da concentração inibitória mínima (CIM) para cada um dos isolados de *G. cingulata* estudados. O delineamento foi repetido duas vezes, utilizando como limites superiores a sub-CIM (CIM/2) e a CIM dos fungicidas. As concentrações reais testadas em cada ensaio estão apresentadas na Tabela 4 para o isolado IFBG-1405 e na Tabela 5 para o isolado IFBG-1406.

Tabela 4. Concentrações reais da mistura dos antifúngicos testados em *G. cingulata* IFBG-1405.

Ensaio		$\frac{CIM}{2}$			CIM		
Ponto	Ponto	Concentrações Reais (mg L ⁻¹)			Concentrações Reais (mg L ⁻¹)		
		X ₁ PH151	X ₂ Captana	X ₃ Difenoconazol	X ₁ PH151	X ₂ Captana	X ₃ Difenoconazol
Vertice 1	1	1	0	0	2	0	0
Vertice 2	2	0	8	0	0	16	0
Vertice 3	3	0	0	16	0	0	32
Lateral 1	4	0,5	4	0	1	8	0
Lateral 2	5	0,5	0	8	1	0	16
Lateral 3	6	0	4	8	0	8	16
Centro	7	0,33	2,66	5,33	0,66	5,33	10,66
Axial 1	8	0,67	1,33	2,66	1,33	2,66	5,33
Axial 2	9	0,17	5,33	2,66	0,33	10,66	5,33
Axial 3	10	0,17	1,33	10,66	0,33	2,66	21,33
DMSO	11	0	0	0	0	0	0
Controle +	12	0	0	0	0	0	0

Tabela 5. Concentrações reais da mistura dos antifúngicos testados em *G. cingulata* IFBG-1406.

Ensaio		$\frac{CIM}{2}$			CIM		
Ponto	Ponto	Concentrações Reais (mg L ⁻¹)			Concentrações Reais (mg L ⁻¹)		
		X ₁ PH151	X ₂ Captana	X ₃ Difenoconazol	X ₁ PH151	X ₂ Captana	X ₃ Difenoconazol
Vertice 1	1	1	0	0	2	0	0
Vertice 2	2	0	32	0	0	64	0
Vertice 3	3	0	0	2	0	0	4
Lateral 1	4	0,5	16	0	1	32	0
Lateral 2	5	0,5	0	1	1	0	2
Lateral 3	6	0	16	1	0	32	2
Centro	7	0,33	10,66	0,66	0,66	21,33	1,33
Axial 1	8	0,67	5,33	0,33	1,33	10,66	0,66
Axial 2	9	0,17	21,33	0,33	0,33	42,66	0,66
Axial 3	10	0,17	5,33	1,33	0,33	10,66	2,66
DMSO	11	0	0	0	0	0	0
Controle +	12	0	0	0	0	0	0

Neste trabalho, PH151, captana e difenoconazol foram representadas pelas variáveis de entrada, para o sistema em estudo, designado por X₁, X₂ e X₃, respectivamente. A Figura 5 mostra o projeto experimental de 3 componentes do simplex-centróide, em que os dez círculos representam as misturas de PH151/captana/difenoconazol preparadas para obter uma superfície de resposta

apropriada, usando a expressão do modelo cúbico especial (Cornell 2011), mostrado na Eq. (1). Os valores de inibição de crescimento micelial (%) para cada ponto experimental foram utilizados como variável resposta, sendo estes calculados em comparação com o tratamento controle (sem adição de fungicidas).

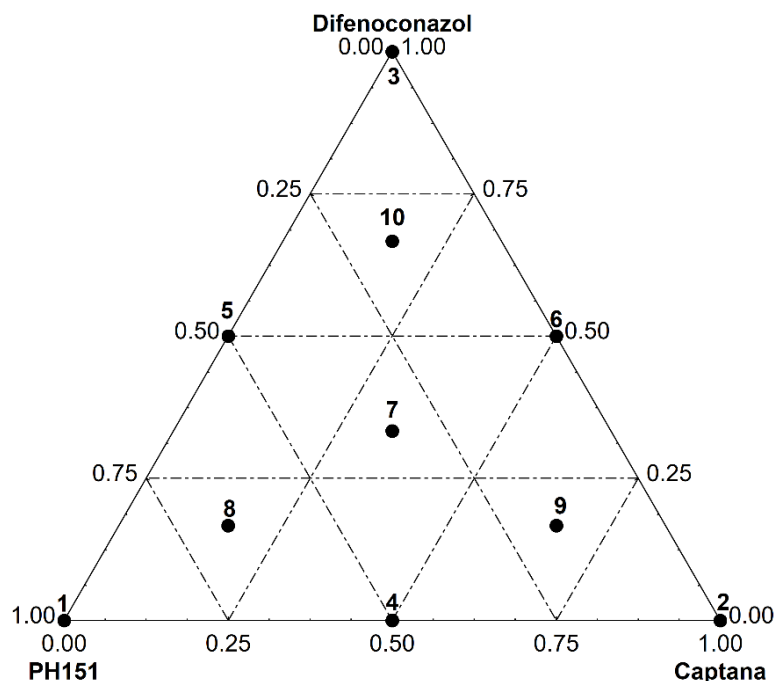


Figura 5. Delineamento experimental simplex-centróide expandido para 3 compostos.

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i < j}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i < j < k} \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad (1)$$

Os modelos matemáticos ajustados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar a significância ($p < 0,05$) e o coeficiente de determinação ajustado (R^2 ajustado). O pacote mixexp (Lawson e Willden 2016) no software R versão 4.0.2 (R Core Team 2021) foi utilizado no planejamento das misturas e na análise dos dados obtidos experimentalmente.

4.6. Ensaios do efeito dos antifúngicos sobre leveduras

4.6.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de PH151 sobre leveduras *S. cerevisiae*

Para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do derivado da

8-hidroxiquinolina (PH151) sobre as leveduras, duas condições de crescimento foram testadas. Em meio YEPD (pH 6,5, sistema respiratório) e em mosto sintético (pH 3,5, sistema fermentativo). A molécula derivada da 8-hidroxiquinolina (PH151) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO). Neste ensaio, as cepas de levedura *S. cerevisiae* BY4741 e Y904 foram utilizadas. O inóculo das leveduras utilizado nos ensaios consistiu-se em uma suspensão de células obtidas a partir de culturas de 24 horas, cultivadas em meio YEPD, com uma concentração ajustada para 1×10^5 células mL⁻¹.

A leitura para determinação da CIM foi procedida a partir da leitura da microplaca no comprimento de onda de 595nm utilizando o leitor de microplacas Asys Expert Plus (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), sendo realizada a leitura visual para confirmação. Foi determinada como CIM, a menor concentração capaz de produzir inibição total do desenvolvimento das leveduras após 24 h de cultivo. Os valores de CIM foram expressos em mg L⁻¹ e em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os dados referentes a inibição do crescimento foram expressos como uma porcentagem da inibição do crescimento (%). Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.6.2. Ensaio de crescimento e viabilidade de levedura

As células de levedura BY4741 e de seus mutantes isogênicos foram cultivadas em meio YEPD, transferidas para um novo frasco e crescidas até fase exponencial de crescimento, após 1×10^7 células mL⁻¹ foram lavadas com 0,9% NaCl e inoculadas em meio YNB contendo 47,8, 95,5, ou 191 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PH151 (16, 32 e 64 mg L⁻¹).

As células tratadas com PH151 em diferentes concentrações e controle (células tratadas apenas com DMSO) foram incubadas por 360 min (6 h) em agitador orbital (150 rpm; 28 °C) e a viabilidade celular foi determinada por ensaio local. As culturas foram diluídas em séries de dez vezes e alíquotas de 10 μL foram colocadas em placas de YEPD. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 h, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado. Os resultados foram expressos como porcentagens de UFC em comparação com os de células não tratadas com PH151 (viabilidade em % UFC).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias de viabilidade dos diferentes mutantes isogênicos comparadas pelo teste de Student (teste t) a 5% de probabilidade.

4.6.3. Integridade da membrana celular, ativação da metacaspase, acúmulo de ROS e potencial de membrana mitocondrial

As células de levedura BY4741 foram cultivadas em meio YEPD, transferidas para um novo frasco e crescidas até fase exponencial de crescimento, após 1×10^7 células mL^{-1} foram lavadas com 0,9% NaCl e inoculadas em meio YNB contendo 47,8, 95,5, ou 191 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PH151 (16, 32 e 64 mg L^{-1}).

Integridade da membrana celular, ativação da metacaspase, acúmulo de ROS e potencial da membrana mitocondrial foram avaliados por citometria de fluxo em citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience, San Jose, EUA) equipado com laser de íon-argônio com emissão de 488 nm. Os dados do citômetro de fluxo de 20.000 células foram adquiridos usando o software CellQuest Pro (BD Bioscience, San Jose, EUA) e a análise de dados foi realizada usando o software FlowJo v.10 (BD Bioscience, San Jose, EUA).

A integridade da membrana celular e a atividade da esterase intracelular foram avaliadas usando o *kit* FungaLight™ Yeast CFDA, AM/Propidium Iodide Vitality Kit (Invitrogen, Carlsbad, EUA), que inclui dois corantes: iodeto de propídio (PI, *propidium iodide*), um corante de ácido nucleico que penetra apenas nas células danificadas da membrana, e diacetato de 5-carboxifluoresceína acetoximetil (CFDA, *5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl*), um substrato esterase permeável às células, que é clivado por esterases não específicas, resultando em um produto verde fluorescente. As análises de coloração e citômetro de fluxo foram realizadas seguindo as instruções do fabricante.

O acúmulo de ROS intracelular foi quantificado utilizando os corantes sensíveis ao diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH, *2',7'-dichlorofluorescein diacetate*, Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) e ao dihidroetídio (DHE, Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). As soluções-estoque de DCFH e DHE foram preparadas em DMSO (5 mg mL^{-1}). As amostras tratadas com PH151 ou de controle foram coradas com uma concentração final de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada corante e incubadas por 30 min em temperatura ambiente. As amostras foram avaliadas por citometria de fluxo usando FL1 (488/533) para DCFH e FL3 (488/670) para DHE.

Para avaliar o potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$), as células foram coradas com 175 nM de iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC6, *3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide*, Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) por 30 min a 30 °C no

escuro. Após a coloração, as células foram analisadas por citometria de fluxo usando filtro FL1.

A ativação da metacaspase foi detectada usando um corante fluorescente, CaspACE FITC-VAD-FMK (Promega, Madison, EUA), que se liga irreversivelmente às caspases ativas. As células tratadas com PH151 e de controle foram incubadas com o corante por 30 min no escuro. Sua fluorescência foi medida por citometria de fluxo usando o filtro FL1.

4.6.4. Ensaio fermentativos em mosto de uva

O mosto utilizado para o experimento (safra 2019) foi obtido de uvas da variedade Chardonnay (*Vitis vinifera*), oriundas da estação experimental do IFRS – Campus Bento Gonçalves (29°03'33,8"S 51°34'40,2"W, 530m), cujos tratamentos fitossanitários são controlados e conhecidos. O processo de obtenção do mosto deu-se a partir da prensagem de um lote de 400 Kg de uvas não desengaçadas em prensa cilíndrica pneumática modelo PPA9 (Enoveneta, Piazzola sul Brenta, Itália) sob ciclos de pressão e giros do tambor controlados (Tabela 6). Optou-se por utilizar esta variedade por ser amplamente difundida, sendo mil hectares ocupados com esta variedade em 2015, a segunda na lista das *Vitis vinifera* cultivadas, representando também parcela expressiva das uvas processadas para espumantes (De Mello e Machado 2017).

Tabela 6. Ciclo de prensagem, pressão e tombamento, programado e executado na prensa pneumática.

Ciclo	Pressão (bar)	Número de tombamentos	Tempo (minutos)
1	0,0	0	-----
2	0,4	3	2,5
3	0,6	3	3,3
4	1,6	3	3,3
5	1,8	3	3,3
6	2,0	6	6,7

Com base nos trabalhos de Zoecklein (1998) e Kemp et al. (2015), a separação das frações do mosto deu-se a partir do controle do volume de mosto extraído, por meio do acompanhamento das porcentagens de mosto extraídas. De acordo com Zoecklein (1998), a primeira fração da prensagem (5%) contém poeira e resíduos, e é frequentemente oxidada como resultado dos impactos durante a colheita e transporte. Neste trabalho, os primeiros 20 L de mosto foram separados e

descartados, e a fração intermediária (mosto flor) foi utilizada nos ensaios fermentativos.

A clarificação do mosto foi realizada após adição de anidrido sulfuroso (30 mg L⁻¹), com o auxílio de enzimas pectolíticas (30 mg L⁻¹), gelatina comercial (0,15 mL L⁻¹) e solução de sol de sílica (1,5 g L⁻¹). Durante o processo, o mosto permaneceu a 8 °C durante um período de 12 h, sendo que a parcela clarificada foi empregada no estudo.

O efeito dos agentes antifúngicos PH151, captana, difenoconazol e iprodiona sobre a cinética fermentativa de uma levedura enológica foi avaliado. A concentração estudada para os produtos registrados foi estabelecida com base na consulta a legislação vigente, ou seja, através do Limite Máximo Residual (LMR) estipulado pelo Programa de Análise de Registro de Agrotóxicos (PARA) da ANVISA. Para a molécula derivada da 8-hidroxiquinolina, a presença no mosto de uva foi estudada nas concentrações de 0,2, 1 e 4 mg L⁻¹ de PH151. Por se tratar de uma molécula não registrada e não utilizada na agricultura até o momento, não existe uma legislação que estabeleça limites máximos residuais para a 8-hidroxiquinolina e seus derivados. Diante disto, 3 concentrações de PH151 foram estudadas e nos permitem comparar o efeito residual de PH151 com as demais moléculas estudadas, além disso, o LMR estabelecido para uma série de fungicidas varia entre 0 e 5 mg L⁻¹, com exceção de Folpete que possui LMR de 15 mg kg⁻¹. A Tabela 7 apresenta os tratamentos experimentais conduzidos.

Tabela 7. Tratamentos experimentais conduzidos no ensaio fermentativo com mosto de uva.

Tratamento Experimental	Agente Antifúngico	Concentração estudada (mg L ⁻¹)	LMR ¹ (mg L ⁻¹)
1	PH151	4	-----
2	PH151	1	-----
3	PH151	0,2	-----
4	Captana	1	2
5	Difenoconazol	1	0,5
6	Iprodiona	1	1
7	Controle	-----	-----

¹Limite máximo residual (LMR) determinado pela ANVISA.

Para o estudo, a levedura comercial enológica Zymaflore X5 (*S. cerevisiae*, Laffort, Bordeaux, França) foi testada e empregada para a inoculação das amostras. A hidratação e aclimatação foi realizada com água destilada a 37 °C por 15 minutos, conforme ficha técnica dos fabricantes. Após aclimatação, a inoculação ao mosto deu-

se utilizando a dose de 20 g hL⁻¹.

As fermentações foram conduzidas em recipientes com volume de 400mL contendo 250 mL de mosto e com temperatura controlada de 15 °C. O curso da fermentação foi mensurado a partir da representação gráfica da produção de dióxido de carbono (CO₂) em função do tempo (horas). A produção de CO₂ foi mensurada de maneira indireta por meio da perda de massa dos fermentadores em balança estática em intervalos de oito horas, ao longo de aproximadamente 8 dias (López et al. 2004; Peltier et al. 2018; Nguela et al. 2019; Gava, Borsato e Ficagna 2020). As fermentações foram consideradas concluídas quando a taxa de produção de CO₂ foi menor que 0,05 g L⁻¹ h⁻¹.

Os dados da cinética fermentativa tiveram ajuste sigmoidal não linear de acordo com a regressão logística de cinco parâmetros (5PL), apresentados na Eq. (2) (Gottschalk e Dunn 2005).

$$y = d + \frac{(a - d)}{\left(1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right)^g} \quad (2)$$

A partir da modelagem matemática, foram determinados diferentes parâmetros cinéticos: tempo da fase de latência (h) para produção de CO₂ (t_{Lag}), taxa máxima de produção [V_{max}] (g L⁻¹ h⁻¹), tempo em que ocorre a V_{max} (t_{Vmax}), em horas, e a produção máxima de CO₂ (Y_{max}), em g L⁻¹ (Albertin et al. 2013; Gava, Borsato e Ficagna 2020). As equações para cada parâmetro foram obtidas de acordo com a metodologia descrita por Zwietering et al. (1990), Longhi et al. (2017) e Gava, Borsato e Ficagna (2020).

O pacote OenoKPM (Gava 2021) no software R versão 4.0.2 (R Core Team 2021) foi utilizado na modelagem matemática das curvas, obtenção dos parâmetros cinéticos e das métricas estatísticas. O teste de Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos analisados. As diferenças foram consideradas significativas com p<0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Atividade antifúngica do derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151) sobre fungos fitopatogênicos da videira

5.1.1. Concentração inibitória mínima (CIM) de PH151 e outros agentes antifúngicos para isolados de *G. cingulata* e *B. cinerea*

A Tabela 8 apresenta os valores encontrados referentes a concentração inibitória mínima (CIM), em mg L⁻¹ e µmol L⁻¹, dos diferentes isolados de fungos fitopatogênicos estudados. Os quatro compostos químicos testados não apresentam diferenças expressivas em sua massa molar, desta forma, como pode ser visto na Tabela 8, a proporção da quantidade molar estudada acompanha aproximadamente a quantidade de massa de cada antifúngico testado.

Para o isolado *B. cinerea* IFBG-1402, a menor concentração capaz de inibir totalmente a germinação dos esporos foi de 4 mg L⁻¹, tanto para PH151 quanto para difenoconazol. Os demais antifúngicos, captana e iprodiona, apresentaram um valor de CIM de 8 mg L⁻¹. Quanto aos valores de CIM para *G. cingulata*, destaca-se que para ambos os isolados estudados as menores concentrações capazes de inibir este fungo foram obtidas quando na presença de PH151, sendo constatada a CIM de 2 mg L⁻¹ de PH151 para ambos os isolados de *G. cingulata*.

Quanto aos demais antifúngicos testados, o comportamento observado de cada antifúngico foi diferente em cada isolado de *G. cingulata* estudado, com exceção do composto iprodiona, que para ambos isolados a CIM estimada foi superior a 64 mg L⁻¹. No isolado IFBG-1405, captana apresentou um valor de CIM duas vezes menor em comparação a difenoconazol, comportamento contrário ao observado no isolado IFBG-1406, no qual captana apresentou um valor de CIM 16 vezes maior que o valor encontrado para difenoconazol.

Os resultados obtidos a partir da CIM demonstram que o derivado da 8-hidroxiquinolina possui um efeito superior, ou similar, em relação aos fungicidas comerciais testados e registrados para o controle de *B. cinerea* e *G. cingulata*.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes antifúngicos sobre isolados de *G. cingulata* e *B. cinerea*, em mg L⁻¹ e µmol L⁻¹.

	mg L ⁻¹ (µg mL ⁻¹)			
	PH151	Captana	Difenoconazol	Iprodiona
<i>B. cinerea</i> IFBG-1402	4	8	4	8
<i>G. cingulata</i> IFBG-1405	2	16	32	>64
<i>G. cingulata</i> IFBG-1406	2	64	4	>64
	µmol L ⁻¹			
<i>B. cinerea</i> IFBG-1402	11,94	26,61	9,85	24,23
<i>G. cingulata</i> IFBG-1405	5,97	53,23	78,77	>193,84
<i>G. cingulata</i> IFBG-1406	5,97	212,91	9,85	>193,84

5.1.2. Efeito da combinação de PH151, captana e difenoconazol na inibição de crescimento micelial de *G. cingulata*

O crescimento do micélio fúngico de dois isolados de *G. cingulata* foi avaliado em placas de petri contendo meio BDA. Com o objetivo de avaliar o comportamento da combinação de três diferentes antifúngicos (PH151, captana e difenoconazol), o delineamento experimental específico para avaliar o comportamento da mistura de componentes, simplex-centróide expandido, foi utilizado. Devido ao fato de os isolados selecionados apresentarem velocidades de crescimento distintas, o diâmetro da colônia foi medido após sete dias para o isolado IFBG-1405 e 5 dias para o isolado IFBG-1406, em duas direções perpendiculares. A variável resposta utilizada para a modelagem e predição foi a porcentagem de inibição de crescimento micelial de cada tratamento em função do tratamento controle (Inibição (%) de crescimento micelial).

As respostas experimentais que foram obtidas com base na variável independente estão registradas na Tabela 9. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e, em quase todos os casos, foi observada uma forte concordância entre as repetições. Todas as variáveis independentes e de resposta foram testadas usando modelos lineares, quadráticos e cúbicos especiais. O coeficiente de determinação, R², o teste *F* (ANOVA) e as plotagens de resíduos foram utilizados para verificar a qualidade dos modelos. O modelo cúbico especial foi identificado como o modelo mais adequado. Os coeficientes altos (R² e R² ajustado) e a distribuição normal (diferença entre o valor de regressão observado e previsto) indicam que os modelos se ajustam bem aos dados experimentais (Dias et al. 2015). Além disso, esses modelos podem ser usados para fins preditivos para variáveis de resposta.

Tabela 9. Modelos, R^2 , R^2 ajustado e valores de probabilidade para os modelos reduzidos finais (proporção de componentes) para inibição de crescimento micelial (%) de dois isolados de *G. cingulata*.

Isolado	Dose do Ensaio	Modelo	F calculado	F tabelado	R^2	R^2 ajustado	p
IFBG-1405	$\frac{CIM}{2}$	Especial Cúbico	174,6	8,0166	0,9807	0,9751	<0,001
IFBG-1405	CIM	Especial Cúbico	95,7	8,0166	0,9696	0,9595	<0,001
IFBG-1406	$\frac{CIM}{2}$	Especial Cúbico	562,3	8,0166	0,9924	0,9907	<0,001
IFBG-1406	CIM	Especial Cúbico	1520	8,0166	0,9976	0,9969	<0,001

$R^2 = (\text{soma dos quadrados da regressão})/(\text{soma total dos quadrados})$; R^2 ajustado = $(\text{quadrado médio total} - \text{quadrado médio do resíduo})/\text{quadrado médio total}$; F calculado = $(\text{quadrado médio da regressão})/(\text{quadrado médio do resíduo})$; F tabulado = valor tabulado considerando os graus de liberdade de regressão e de resíduo a 1% de significância; p = significância do modelo ajustado.

De acordo com a análise de variância, os modelos ajustados para o isolado IFBG-1405 explicam 97% da variação para o ensaio utilizando como limite superior 50% da CIM encontrada e 96% da variação para o ensaio em que se utilizou como limite superior o valor de CIM. Para IFBG-1406, os modelos ajustados explicam 99% da variação para ambos os ensaios conduzidos.

A variação da inibição de crescimento micelial na presença de diferentes misturas de agentes antifúngicos é mostrada em gráficos bidimensionais da área de contorno ternário para os isolados de *G. cingulata* IFBG-1405 (Figura 6) e *G. cingulata* IFBG-1406 (Figura 7). Essas duas figuras também apresentam os gráficos de dispersão que representam os valores experimentais obtidos e previstos pelo modelo. Esta é uma técnica gráfica para avaliar se os dados são normalmente distribuídos. O residual é a diferença entre o valor de regressão observado e previsto. Se os pontos de plotagem estão localizados mais próximos da linha reta, os dados são normalmente distribuídos (Hasan, Srivastava e Talat 2009; Dias et al. 2015). Observou-se que para ambos isolados estudados, os pontos experimentais estavam razoavelmente alinhados e sugerem distribuição normal, e os resíduos também se encontravam dispersos aleatoriamente em torno de zero, indicando que os erros possuem variância constante.

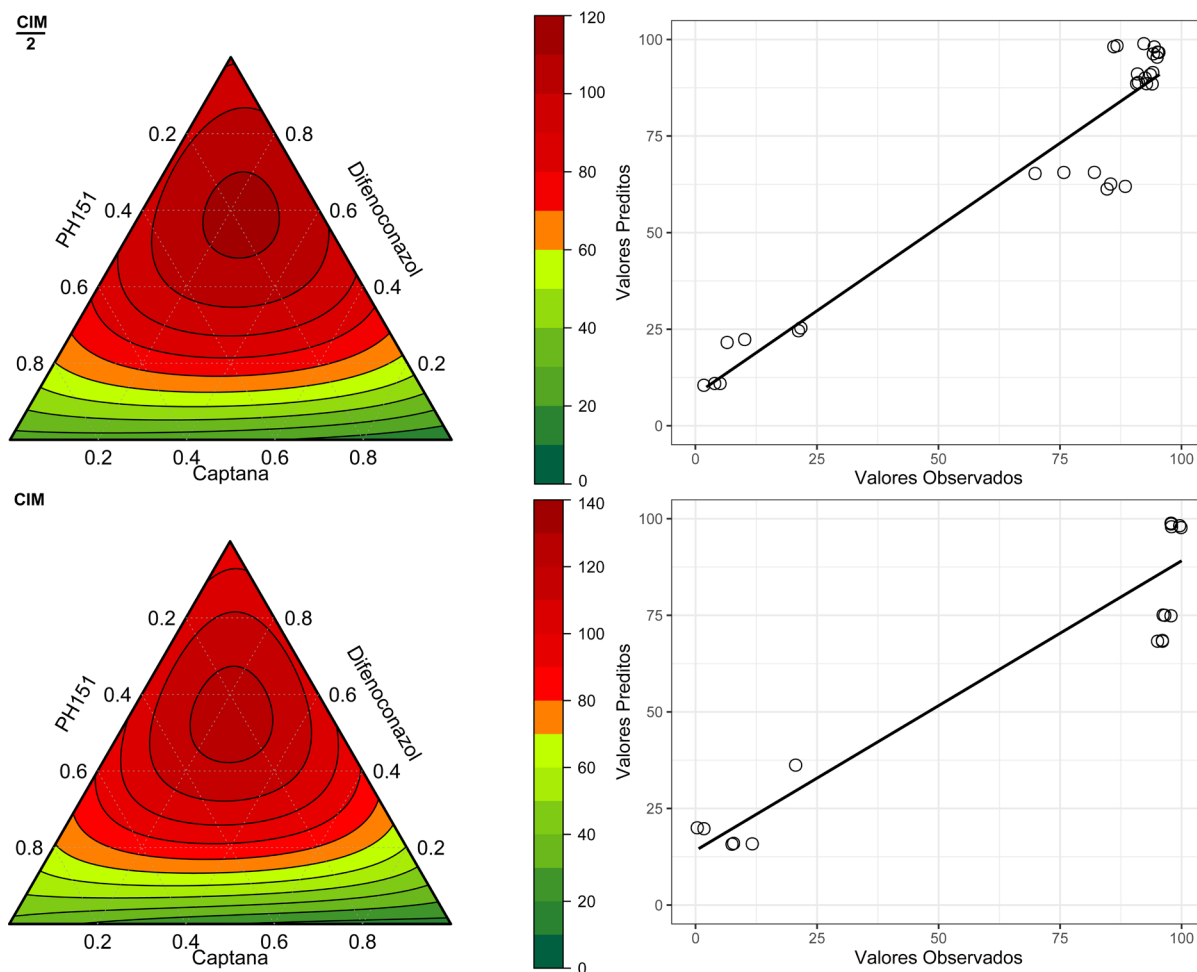


Figura 6. Gráficos de contorno de mistura e gráficos de dispersão dos valores experimentais e previstos para inibição de crescimento micelial (%) no isolado de *G. cingulata* IFBG-1405 nos ensaios envolvendo como limites superiores o valor de CIM/2 e CIM.

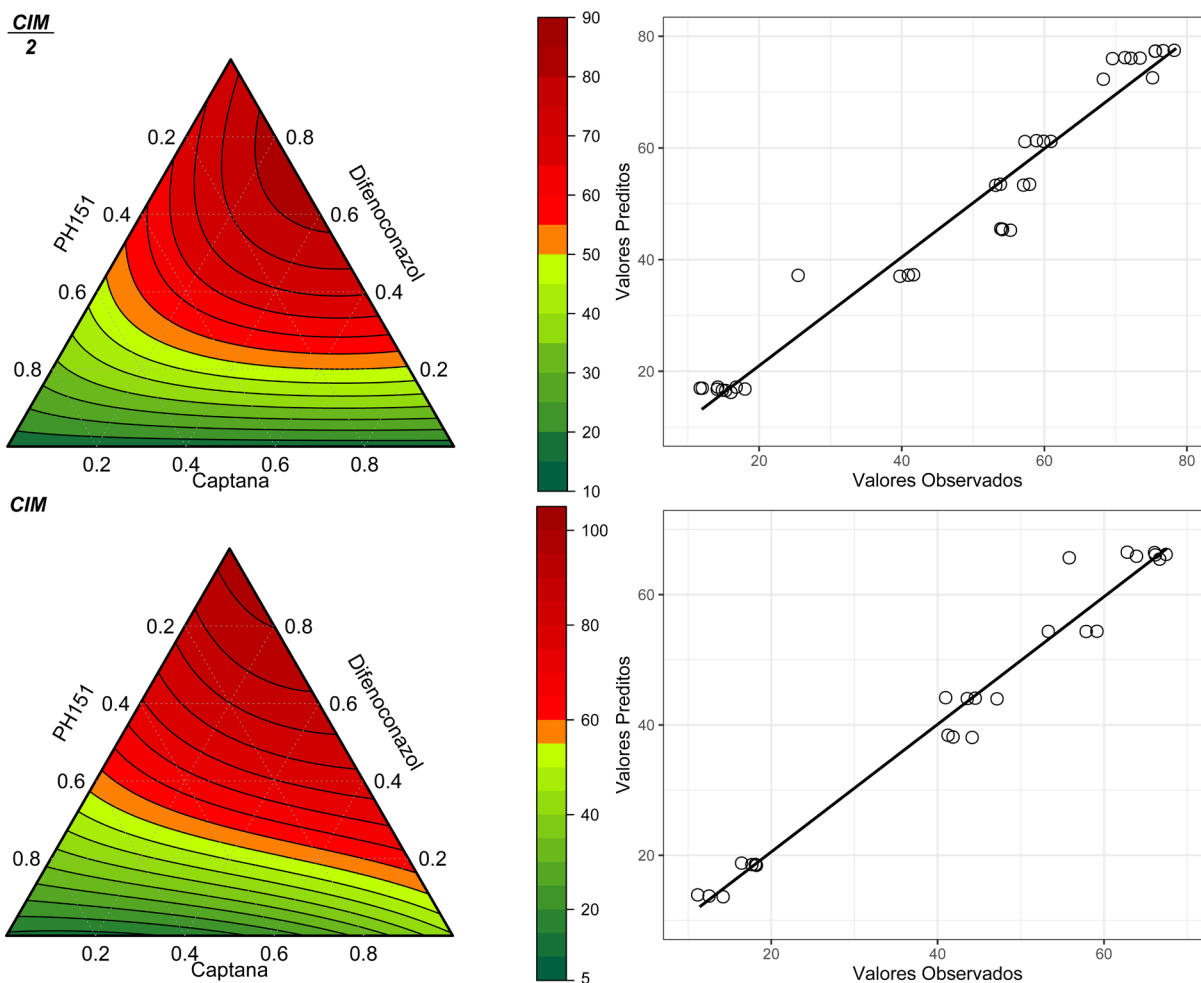


Figura 7. Gráficos de contorno de mistura e gráficos de dispersão dos valores experimentais e previstos para inibição de crescimento micelial (%) no isolado de *G. cingulata* IFBG-1406 nos ensaios envolvendo como limites superiores o valor de CIM/2 e CIM.

O comportamento dos antifúngicos testados é diferente para cada um dos isolados testados, entretanto, o comportamento da mistura em cada isolado é semelhante para ambos os limites superiores testados. Para ambos os isolados, a inibição do crescimento micelial apresenta melhores resultados quando a concentração de difenoconazol é maior, independente de qual outro antifúngico estiver combinado. Como pode ser visto na Figura 6, o aumento da concentração de captana possui o maior efeito negativo sobre a inibição de *G. cingulata* IFBG-1405. Nesta figura, é possível visualizar de forma clara que a combinação dos agentes antifúngicos resulta em uma maior inibição de crescimento em comparação com difenoconazol isolado.

Quanto ao isolado de *G. cingulata* IFBG-1406, a inibição de seu crescimento é impactada pelo aumento da concentração de PH151, contudo é possível notar que a mistura com 50% de PH151 resulta em uma inibição de

aproximadamente 80% quando utilizada a CIM. Cabe destacar que estes achados demonstram que a combinação de PH151 possui potencial de reduzir a quantidade de outros agentes antifúngicos de maior toxicidade, além disso, a concentração de PH151 testada é inferior às dos demais fungicidas.

Conforme mostrado na Tabela 10, os coeficientes (β) das equações de regressão previstas representam os modelos com fatores significativos (modelo final reduzido) para a inibição de crescimento micelial (%) em IFBG-1405 e IFBG-1406, respectivamente.

Tabela 10. Coeficientes de regressão dos modelos ajustados para inibição de crescimento micelial (%) dos isolados de *G. cingulata* IFBG-1405 e IFBG-1406 na presença de uma mistura contendo PH151, captana e difenoconazol.

Isolado	IFBG-1405		IFBG-1406		
	Dose do Ensaio	CIM	CIM	CIM	
β_1 (PH151)	$\frac{CIM}{2}$	$25,30^{**} \pm 2,90$	$36,21^* \pm 3,99$	$16,66^{**} \pm 3,06$	$13,47^{**} \pm 1,58$
β_2 (Captana)		$10,47 \pm 2,64$	$15,96 \pm 3,13$	$15,77^{**} \pm 2,22$	$44,12^{**} \pm 1,37$
β_3 (Difenoconazol)		$88,20^{**} \pm 2,48$	$93,50^{**} \pm 3,14$	$72,41^{**} \pm 2,52$	$97,18^{**} \pm 1,92$
β_{12}		$15,78 \pm 6,44$	$-24,17 \pm 7,96$	$7,11 \pm 6,83$	$-42,03^{**} \pm 7,04$
β_{13}		$135,81^{**} \pm 5,75$	$132,43^* \pm 7,54$	$38,42^{**} \pm 7,01$	$42,59^{**} \pm 7,24$
β_{23}		$187,63^{**} \pm 5,60$	$175,79^{**} \pm 6,73$	$130,57^{**} \pm 6,50$	$52,10^{**} \pm 7,71$
β_{123}		$525,73^* \pm 29,44$	$848,53^* \pm 35,23$	$186,98^* \pm 41,72$	$281,77^{**} \pm 53,79$

$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$; *Coeficientes significativos ($p < 0,05$). ** Coeficientes significativos ($p < 0,01$). \pm = Erro padrão.

Para todos os ensaios realizados, o termo cúbico (ponto central) resultou no maior coeficiente positivo (sinérgico), ou seja, a combinação dos três agentes antifúngicos resulta em uma maior inibição de crescimento micelial (%) dos dois isolados de *G. cingulata* estudados. Para o isolado IFBG-1405, as combinações de PH151 com difenoconazol e de captana com difenoconazol também resultam em um efeito sinérgico sobre a inibição de crescimento. O menor termo significativo é a variável independente X_3 (captana).

Para o ensaio do isolado IFBG-1406 com doses de CIM, todos os termos foram significativos, e com exceção da mistura de PH151 com captana, os demais termos são positivos (efeito sinérgico) em relação à porcentagem de inibição de crescimento. Especificamente, a combinação de PH151 com captana reduz o potencial de inibição. Diferente do resultado encontrado para IFBG-1405, o menor termo significativo é a variável independente X_1 (PH151) para CIM/2 e o termo da combinação de PH151 e captana para o ensaio utilizando-se da CIM. Neste isolado,

o efeito sinérgico de PH151 é menor que comparado ao seu efeito em IFBG-1405.

5.2. Efeito da molécula derivada da 8-hidroxiquinolina (PH151) sobre leveduras *S. cerevisiae*

5.2.1. Concentração inibitória mínima (CIM) de PH151 para leveduras *S. cerevisiae*

Em um primeiro experimento, a concentração inibitória mínima (CIM) do derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151) sobre duas cepas de leveduras foi determinado. Duas cepas de leveduras foram testadas neste ensaio, uma levedura referência (BY4741) e uma cepa comumente utilizada na elaboração de vinhos (Y904). A levedura de laboratório BY4741 apresenta baixa tolerância ao etanol, desta forma, no mosto sintético somente a levedura Y904 foi testada, sendo constatada uma CIM superior a 32 mg L^{-1} ($>95,5 \text{ } \mu\text{M}$), nesta concentração a inibição média foi de 30%. No meio YEPD foram testadas as leveduras Y904 e BY4741, na qual que para ambas as leveduras a concentração mínima inibitória mensurada é de 32 mg L^{-1} PH151 ($95,5 \text{ } \mu\text{M}$).

A Figura 8 apresenta as curvas de inibição de crescimento (%) em função das concentrações de PH151 (mg L^{-1}) testadas. A Figura 8A representa o comportamento da levedura Y904 em mosto sintético (sistema fermentativo, pH 3,5) e a Figura 8B apresenta os dados de inibição de crescimento para as leveduras Y904 e BY4741 em meio YEPD (sistema respiratório, pH 6,5). Como pode ser visto na Figura 8, o comportamento observado da molécula PH151 é dependente da condição estudada. No mosto sintético, sob atividade fermentativa, a maior concentração de PH151 estudada (32 mg L^{-1}) resultou em uma inibição inferior a 30%, enquanto no meio YEPD (pH 6,5), sob atividade respiratória, esta concentração de PH151 resultou em uma inibição de 100% para ambas as leveduras estudadas.

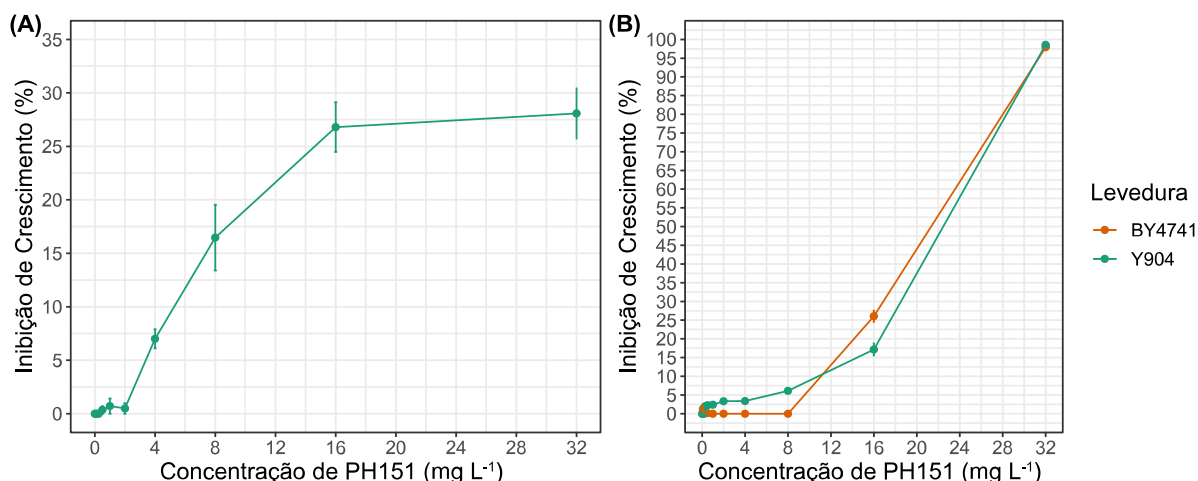


Figura 8. Curvas da inibição de crescimento (%) de *S. cerevisiae* em função da concentração de PH151 testada. (A) Mosto sintético (sistema fermentativo, pH 3,5). (B) Meio YEPD (sistema respiratório, pH 6,5).

5.2.2. Efeito de PH151 sobre integridade de membrana, acumulação de ROS, potencial de membrana mitocondrial, ativação de metacaspase, crescimento e viabilidade celular de *S. cerevisiae*

A utilização de *S. cerevisiae* como modelo permite a identificação de biomarcadores moleculares, mecanismos de ação desconhecidos e novos alvos potenciais de moléculas (Braconi, Bernardini e Santucci, 2016). Além disso, de acordo com estes autores, a levedura *S. cerevisiae* é um ótimo modelo para testar os efeitos dos agrotóxicos. Nesse contexto, para melhor compreender o modo de ação antifúngico do derivado da 8HQ (PH151), usamos células exponenciais aeróbicas de *S. cerevisiae* e avaliamos a resposta celular individual usando várias análises de citometria de fluxo e mutantes deletados. Além disso, a maior parte dos fungos fitopatogênicos possuem atividade aeróbica, motivo pelo qual utilizamos células de *S. cerevisiae* em atividade respiratória para o estudo do modo de ação antifúngico de PH151.

Os resultados obtidos no ensaio envolvendo a concentração inibitória mínima de PH151 sobre leveduras permitiram selecionar uma concentração subletal (CIM/2) de 16 mg L⁻¹ (47,8 μmol L⁻¹), e concentrações letais (CIM) de 32 e 64 mg L⁻¹. Estas concentrações foram estudadas nos experimentos envolvendo viabilidade celular, crescimento e análises de citometria. A levedura referência BY4741 foi utilizada com o objetivo de estudar o modo de ação de PH151 sobre *S. cerevisiae*, a escolha desta levedura foi baseada na existência de seus mutantes isogênicos, os quais permitiram realizar o ensaio de viabilidade celular para confirmar a hipótese do

modo de ação de PH151 em *S. cerevisiae*. Os achados destes ensaios resultaram em um artigo científico que se encontra submetido em *Journal of Applied Microbiology* (Apêndice 2).

A análise de citometria de fluxo da vitalidade celular e integridade da membrana mostrou que PH151 reduziu a integridade da membrana celular (Figura 9). Os dados mostraram que 96,2% das células tratadas com PH151 na dose de 64 mg L⁻¹ perderam integridade de membrana (PI-positivo). As células de levedura tratadas com concentrações de 16 e 32 mg L⁻¹ de PH151 exibiram aumento nas populações de células com alta fluorescência de PI sem perda de fluorescência de CFDA, indicando que nessas concentrações, PH151 induz danos à membrana celular e aumento de aproximadamente três vezes na atividade da esterase. Porém, na concentração mais elevada, PH151 apresentou maior porcentagem de células PI-positivas com baixa atividade esterase (11,8% das células). Além disso, no mesmo experimento, a viabilidade da levedura avaliada pela contagem de colônias apresentou redução de 95,7% no tratamento com 64 mg L⁻¹ de PH151.

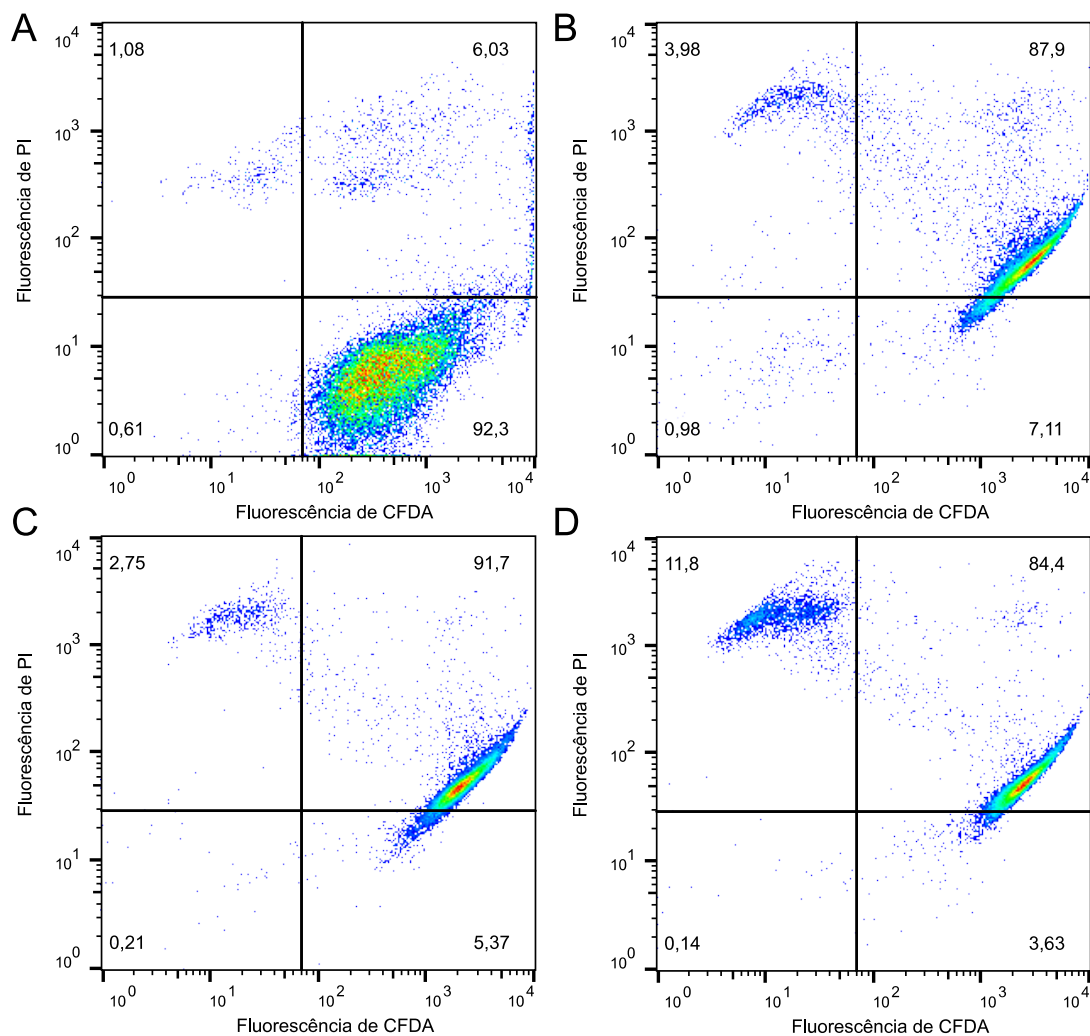


Figura 9. Integridade da membrana celular (fluorescência de PI) e viabilidade (fluorescência de CFDA) de levedura BY4741 de tipo selvagem tratada por 6 h com 0 (A, controle), 16 mg L⁻¹ (B), 32 mg L⁻¹ (C), ou 64 mg L⁻¹ (D) de PH151. Um total de 20.000 células foi analisado e os números dentro das figuras indicam as porcentagens de células em cada quadrante.

O acúmulo de ROS está entre os principais desencadeadores de morte celular programada de diferentes organismos, incluindo leveduras (Perrone, Tan e Dawes 2008; Farrugia e Balzan 2012). O acúmulo de ROS em células tratadas com diferentes concentrações de PH151 e o controle usando duas sondas sensíveis a redox, DCFH e DHE, foi avaliado. Os dados (Figura 10) mostraram um aumento expressivo na fluorescência de DCFH e DHE em células tratadas com PH151, indicando acúmulo intracelular de ROS. Na concentração de PH151 de 32 mg L⁻¹, o aumento médio na fluorescência de DCFH (Figura 10A) foi de oito vezes, enquanto nas concentrações de 16 e 64 mg L⁻¹, o aumento foi de cinco vezes. Para DHE (Figura 10B), o aumento médio na fluorescência foi de 10 vezes na concentração mais elevada, e na concentração de 16 mg L⁻¹, o aumento foi de aproximadamente cinco

vezes. Como o DHE detecta O_2^- , esses resultados indicam que o PH151 é responsável por um aumento de ROS, provavelmente geradas pela mitocôndria (De Nobel et al. 1989).

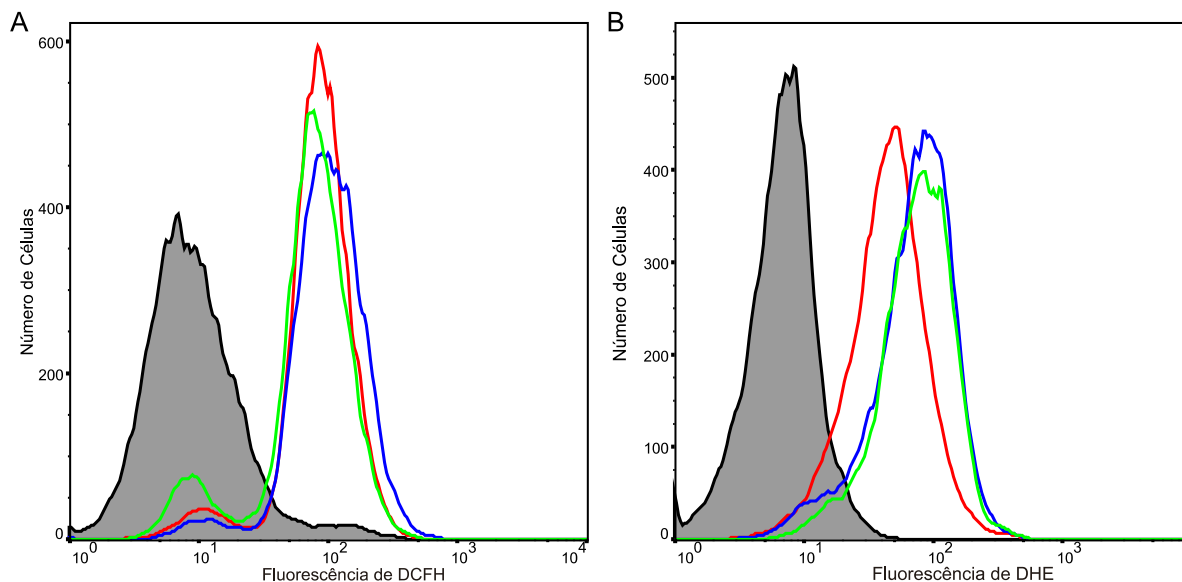


Figura 10. Concentração intracelular (intensidade de fluorescência) de ROS em levedura BY4741 não tratada (área cinza) contra células tratadas com 16 mg L^{-1} (—), 32 mg L^{-1} (—) ou 64 mg L^{-1} (—) de PH151 por 6 h. (A) intensidade de fluorescência de DCFH; (B) Intensidade de fluorescência de DHE.

Alterações na atividade mitocondrial podem ser responsáveis por um aumento nas concentrações de espécies reativas ao oxigênio (ROS intracelulares). Portanto, o potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) usando DiOC6 foi avaliado. Conforme mostrado na Figura 11, PH151 causou uma redução do $\Delta\psi_m$, confirmando a disfunção mitocondrial. As células de levedura tratadas com o derivado da 8HQ mostraram uma redução dependente da dose no $\Delta\psi_m$.

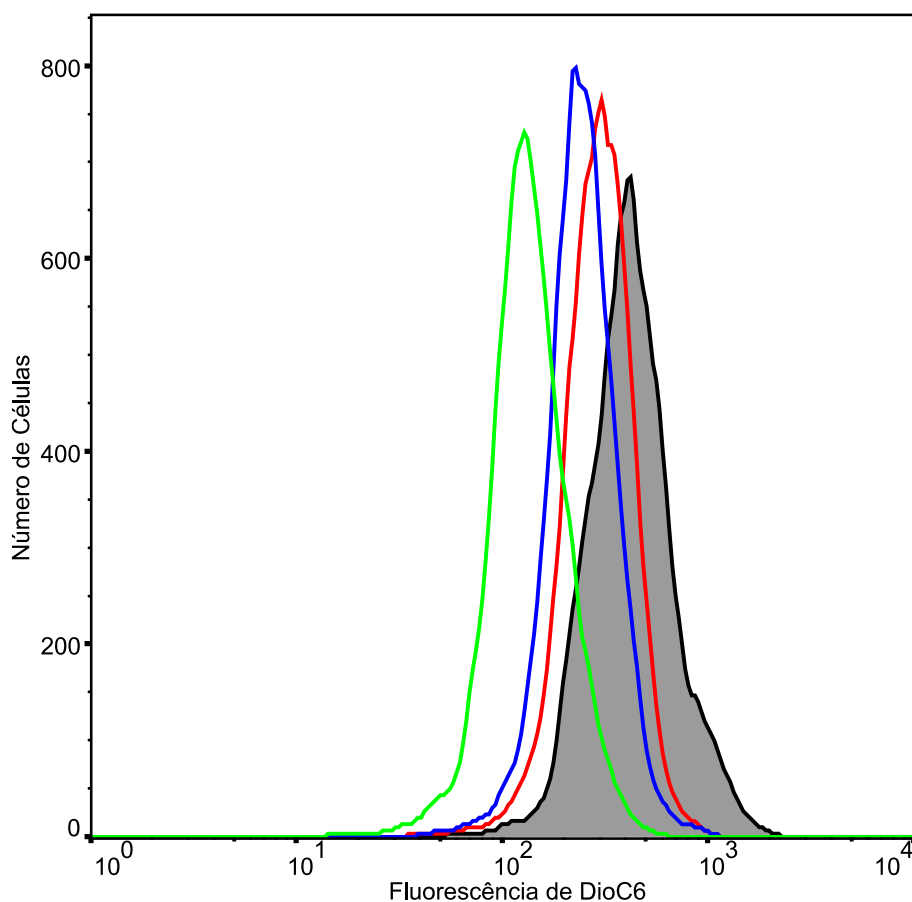


Figura 11. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (fluorescência DioC6) em levedura BY4741 de controle (área cinza) contra células tratadas com 16 mg L^{-1} (—), 32 mg L^{-1} (—) ou 64 mg L^{-1} (—) de PH151 por 6 h.

A morte celular programada ou apoptótica em leveduras pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos: vias dependentes de metacaspase e independentes de metacaspase. A atividade da metacaspase usando CaspACE FITC-VAD-FMK, que se liga irreversivelmente às metacaspases ativas, foi avaliada. Os resultados mostraram que o PH151 ativou metacaspases em *S. cerevisiae* (Figura 12A). Estes dados indicam que o PH151 tem o potencial de induzir a morte celular por apoptose por meio de uma via dependente de metacaspase.

Para confirmar esta hipótese, o efeito do PH151 no tipo selvagem (BY4741) e em três cepas isogênicas de *S. cerevisiae* com deleção em genes-chave das vias apoptóticas foi avaliado. Como pode ser observado na Figura 12B, o mutante de deleção *YCA1* mostrou viabilidade significativamente maior em comparação com a cepa de tipo selvagem e aos outros mutantes, confirmando que a apoptose induzida por PH151 é dependente da metacaspase, e que as demais rotas não são responsáveis por PH151 induzir a morte por apoptose. Na concentração mais alta (64 mg L^{-1}), o mutante *YCA1* exibiu viabilidade de aproximadamente 50%, enquanto a

cepa de tipo selvagem e outros mutantes (*AIF1* e *NUC1*) mostraram uma morte de células superior a 95%. Além disso, a viabilidade do mutante $\Delta yca1$ não foi afetada pelo PH151 na concentração de 16 mg L⁻¹. Estes resultados indicam que o estresse de ROS causado por PH151 é responsável por desencadear a morte celular dependente de metacaspase em células de *S. cerevisiae* em crescimento aeróbio.

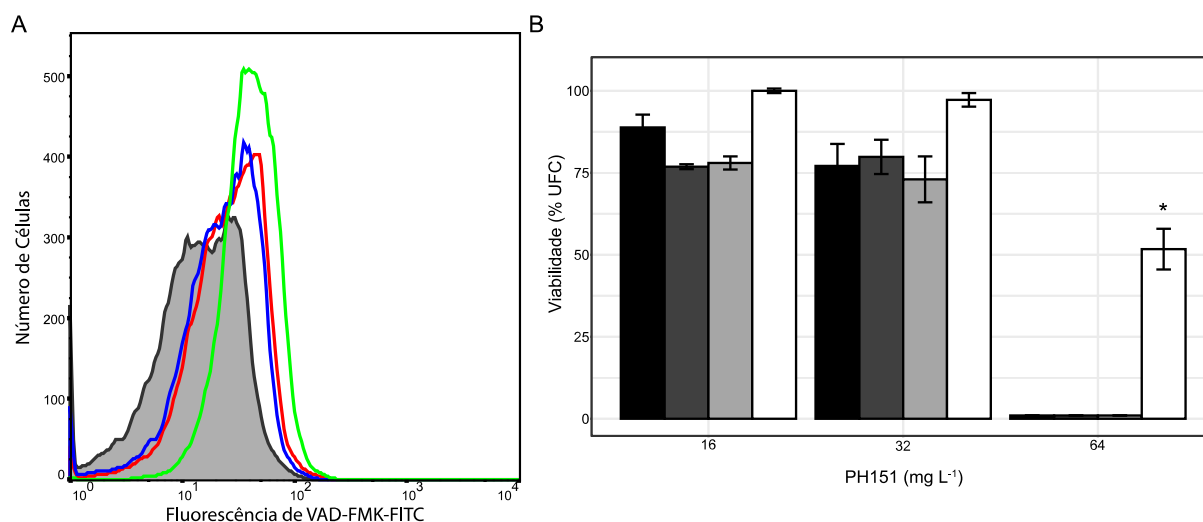


Figura 12. (A) Atividade da caspase (fluorescência de VAD-FMK-FITC) em levedura BY4741 de controle (área cinza) contra células tratadas com 16 mg L⁻¹ (—), 32 mg L⁻¹ (—) ou 64 mg L⁻¹ (—) de PH151 por 6 h. (B) Viabilidade (% de UFC) de BY4741 (■) de tipo selvagem e mutantes deletados *aif1* (■), *nuc1* (■) e *yca1* (□) expostos a diferentes concentrações de PH151 por 6 h. A barra de erro representa o erro padrão da média de três repetições. O asterisco indica diferenças significativas de acordo com o teste *t* de Student (**p* < 0,05).

5.2.3. Efeito de PH151 e de outros antifúngicos sobre parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica de mosto de uva

Com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos de PH151 sobre a cinética de fermentação de um mosto de uva, realizou-se o acompanhamento da fermentação de levedura comercial enológica *S. cerevisiae* Zymaflore X5 sob mosto de uva com diferentes condições, sendo comparado o tratamento controle com tratamentos contendo PH151, difenoconazol, captana e iprodiona. A cinética fermentativa foi modelada e diferentes parâmetros cinéticos foram preditos, os quais são relevantes para a modelagem, previsão e otimização da fermentação alcoólica (Gava, Borsato e Ficagna 2020).

O processo fermentativo foi concluído em aproximadamente 180 h, e a Figura 13 apresenta as curvas da cinética de fermentação experimental e prevista para cada agente fungicida testado. Os parâmetros cinéticos mensurados estão

apresentados na Tabela 11. O teste de Tukey foi usado para determinar quaisquer diferenças significativas entre os grupos analisados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,01$. Cabe destacar também que os resultados encontrados são inerentes às características físico-químicas da fração de mosto utilizada no experimento, e os fungicidas podem se comportar de forma diferente em condições distintas.

Tabela 11. Resultados dos parâmetros cinéticos da fermentação de mosto de uva com levedura enológica *S. cerevisiae* na presença de diferentes agentes antifúngicos.

Tratamento/ Resposta	t_{Lag} (h)	V_{max} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	t_{Vmax} (h)	Y_{max} (g L ⁻¹)
4 mg L ⁻¹ PH151	11,86 ±0,98 bc	1,04 ±0,06 bc	36,31 ±0,92 b	89,17 ±0,41 a
1 mg L ⁻¹ PH151	10,59 ±0,42 bc	1,12 ±0,05 ab	35,77 ±2,20 b	89,11±0,72 a
0,2 mg L ⁻¹ PH151	9,78 ±0,46 c	1,25 ±0,10 ab	35,08 ±1,42 b	91,84 ±0,14 a
1 mg L ⁻¹ Captana	25,54 ±0,62 a	1,23 ±0,07 ab	50,26 ±1,06 a	90,40 ±0,54 a
1 mg L ⁻¹ Difenconazol	13,11 ±0,76 b	0,85 ±0,05 c	40,78 ±0,41 ab	84,40 ±2,09 b
1 mg L ⁻¹ Iprodiona	10,32 ±1,71 bc	1,08 ±0,10 bc	36,06 ±3,37 b	89,59 ±0,65 a
Controle	9,66 ±0,87 c	1,35 ±0,07 a	31,45 ±1,58 b	91,75 ±0,65 a

Os resultados são apresentados com a média (n = 3). ± = Desvio Padrão. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes nas colunas, de acordo com o teste de Tukey, com $p < 0,01$.

Os resultados demonstram que os demais parâmetros cinéticos são afetados por, pelo menos, um tratamento contendo fungicida. Além disso, cabe destacar que os tratamentos contendo 0,2 e 1 mg L⁻¹ de PH151 não impactaram sobre qualquer um dos parâmetros cinéticos estudados, não apresentando diferenças significativas do tratamento controle. Quanto a concentração mais elevada de PH151 (4 mg L⁻¹), apenas a taxa máxima de produção de CO₂ (V_{max}) foi afetada por este tratamento, reduzindo-a em relação ao tratamento controle.

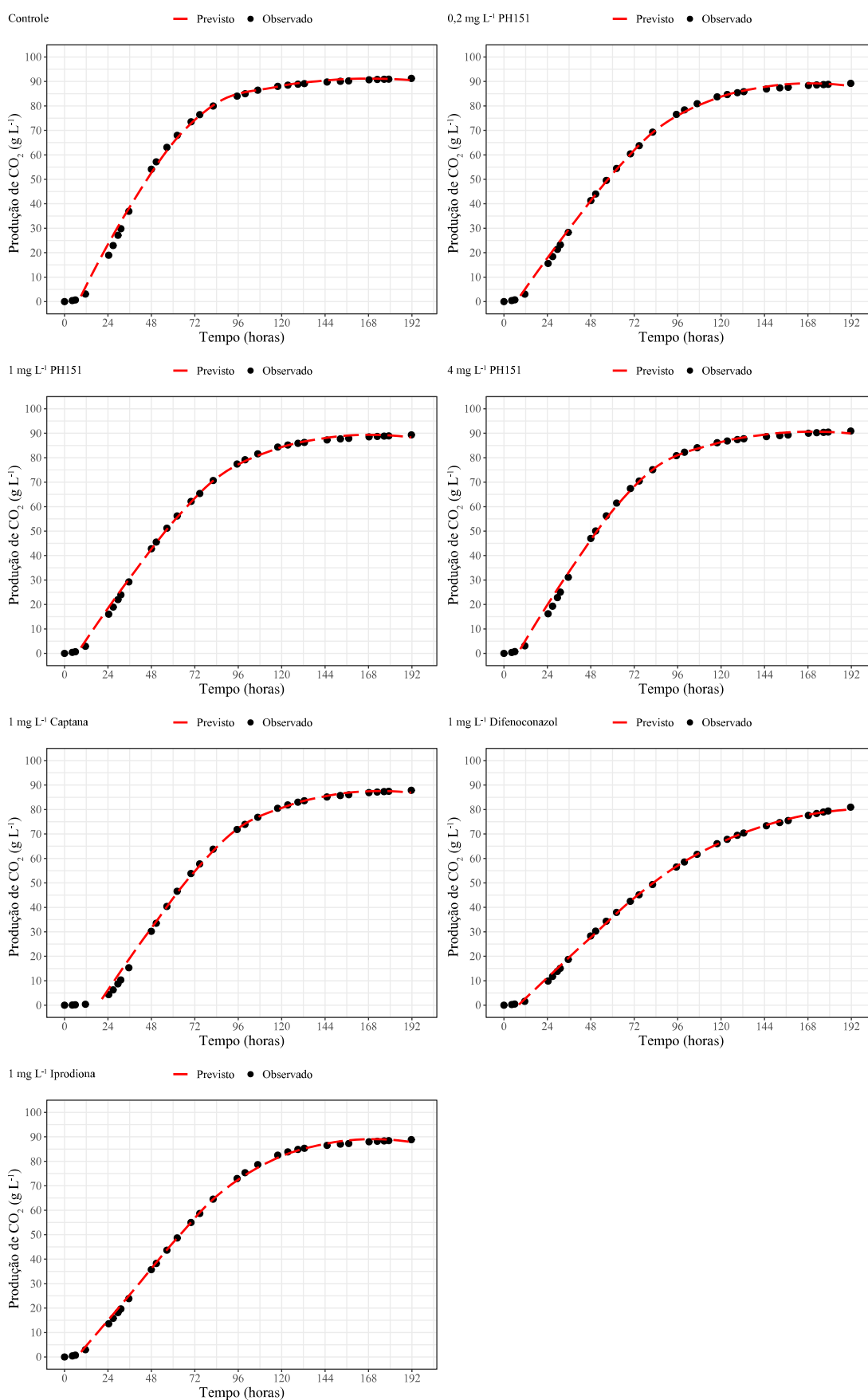


Figura 13. Curvas das cinéticas de fermentação em mosto de uva observadas (experimentais) e previstas para cada agente antifúngico.

No que se refere ao efeito dos demais fungicidas estudados sobre a cinética de fermentação, estes afetaram negativamente pelo menos um dos parâmetros cinéticos estudados. O ingrediente ativo captana eleva em mais de duas vezes o tempo de fase de latência para produção de CO₂ (t_{Lag}) e eleva em 50% o tempo em que ocorre a V_{max} (t_{Vmax}). Os tratamentos de difenoconazol e iprodiona reduzem a taxa máxima fermentativa (t_{Vmax}), um dos principais parâmetros de estudo, já que indicam a velocidade de transformação de açúcares em etanol pelas leveduras. Além disso, o tratamento contendo difenoconazol apresenta diferença estatística dos demais tratamentos com relação a máxima produção de CO₂ (Y_{max}), reduzindo este valor significativamente.

Os resultados revelam que a concentração de 1 mg L⁻¹ de PH151 não afetou a cinética de fermentação do mosto de uvas Chardonnay conduzida com levedura *S. cerevisiae* Zymaflore X5, este comportamento foi observado também no tratamento contendo 0,2 mg L⁻¹ de PH151. Além disso, nesta mesma concentração (1 mg L⁻¹) todos os demais ingredientes ativos testados impactaram sobre a cinética de fermentação do mosto. A Figura 14 apresenta as curvas de fermentação do tratamento controle e de todos os antifúngicos na concentração de 1 mg L⁻¹ plotadas em um único gráfico. Conforme pode ser observado, a curva de fermentação do tratamento contendo 1 mg L⁻¹ de PH151 é a que apresenta maior semelhança comparada a curva do tratamento controle. O comportamento das curvas de fermentação colabora com os parâmetros cinéticos preditos, no qual fica evidente que captana provoca um atraso na atividade fermentativa das leveduras e que difenoconazol impacta a produção máxima de CO₂, sendo que a fermentação não é concluída.

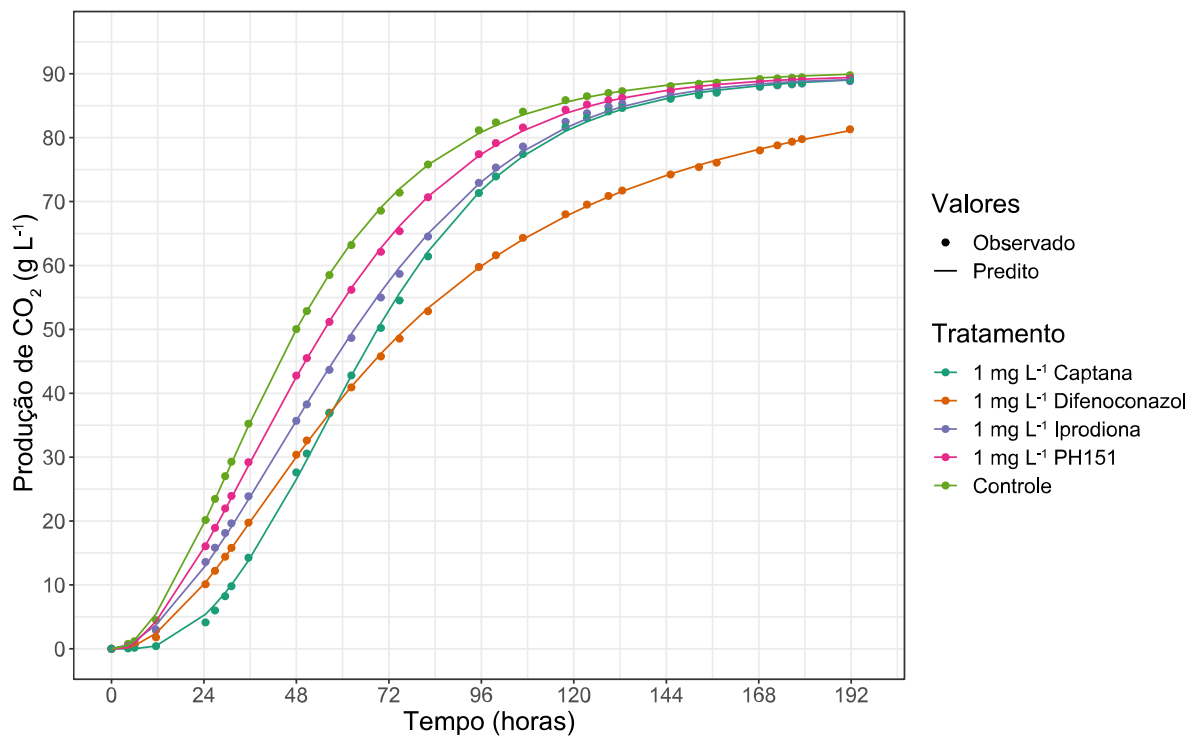


Figura 14. Comportamento fermentativo em mosto de uva dos diferentes tratamentos contendo fungicidas na concentração de 1 mg L⁻¹.

6. DISCUSSÃO

A 8-hidroxiquinolina (8HQ), que foi sintetizada pela primeira vez por Skraup em 1953 (Manske e Kulka 2004), possui uma estrutura heterocíclica bicíclica que contém um anel fenol fundido com um anel piridina em dois átomos de carbono adjacentes. Sua afinidade de ligação versátil, capacidade quelante para vários íons de metais de transição e suas propriedades semelhantes a outras drogas fazem com que a 8HQ seja uma estrutura de privilégio na química heterocíclica (Gupta, Luxami e Paul 2021). De acordo com Gupta, Luxami e Paul (2021), sucesso clínico, caráter versátil, menor impacto ao meio ambiente e seu amplo espectro são alguns dos motivos que justificam a atenção dos pesquisadores para construir novos agentes derivados de 8HQ. Além disso, Oliveri e Vecchio (2016) destacam o crescimento exponencial do interesse por derivados desta molécula.

Conforme já relatado, devido a sua alta versatilidade sintética, alta reatividade e atividade farmacológica, existe atualmente uma biblioteca expressiva de derivados da 8HQ sintetizados, otimizados e amplamente estudados. Desta forma, uma ampla gama de atividades biológicas é reconhecida. Uma revisão recente compilou dados de estudos dos últimos anos que comprovam sua atividade antitumoral, antiviral, antibacteriana, antimicobacteriana, antifúngica, antiprotozoária e antineurodegenerativa (Gupta, Luxami e Paul 2021). Além disso, 8HQ e seus derivados têm sido utilizados como fungicida na agricultura e conservante nas indústrias têxtil, madeireira e papelaria (Oliveri e Vecchio 2016; Gupta, Luxami e Paul 2021).

Este trabalho teve por um dos objetivos investigar o potencial antifúngico de um derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151), sintetizado por nosso grupo de pesquisa, sobre dois fungos fitopatogênicos da videira (*B. cinerea* e *G. cingulata*). Até a presente data, o número de trabalhos que investigaram o efeito de derivados da 8HQ sobre estes dois fungos fitopatogênicos é reduzido.

Devido ao fato de ser um teste relativamente simples e facilmente adotado por laboratórios, a concentração inibitória mínima (CIM) tem sido adotada como um dos principais parâmetros para verificar a suscetibilidade de microrganismos a agentes antimicrobianos (Nielsen e Friberg 2013). Para os isolados testados em nosso estudo, o derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151) apresentou-se eficiente. Em comparação com os fungicidas convencionais testados, o composto PH151

apresentou valores de CIM semelhantes ou inferiores para *B. cinerea* e *G. cingulata*. De uma maneira geral, os valores de CIM variaram de 2 a 4 mg L⁻¹ de PH151, enquanto para captana de 8 a 64 mg L⁻¹, difenoconazol de 4 a 32 mg L⁻¹ e iprodiona de 8 a >64 mg L⁻¹.

Os valores de CIM encontrados para os isolados testados corroboram com valores de CIM encontrados por outros trabalhos envolvendo derivados da 8HQ e isolados fúngicos. Pippi et al. (2021) avaliaram o efeito de PH151 sobre *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, sendo que os valores de CIM variaram de 1 a 4 mg L⁻¹ (Pippi et al. 2021).

De fato, Joaquim et al. (2019) já demonstraram que a conversão do ácido sulfônico em uma sulfonamida tem apresentado benefícios muito interessantes, sobretudo no aumento da atividade antifúngica, com destaque para a 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil)sulfonamida (PH151) e a 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-metoxifenil)sulfonamida (PH153). Além disso, Yin et al. (2019) concluíram que a presença de amina terciária ou secundária no composto sintetizado foi essencial para a atividade antifúngica dos compostos testados contra *B. cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Estes achados são similares aos encontrados em nosso trabalho, que investigou o potencial de um derivado da 8HQ sintetizado a partir da reação com amina.

No que diz respeito a fungos fitopatogênicos, Souza et al. (2020) encontraram valores de CIM de 6,25 mg L⁻¹ de PH151 para duas cepas de *Ilyonectria liriodendri* isoladas de videira. Um estudo recente que teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica de diferentes derivados da 8HQ sobre *B. cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* identificou que uma concentração de 25 mg L⁻¹ do composto mais potente era necessária para inibir em 100% *B. cinerea* (Yin et al. 2019). Yin et al. (2019) concluíram também que a maioria dos derivados investigados possuía uma melhor atividade antifúngica em comparação a azoxistrobina. Os achados vão ao encontro com nosso estudo que encontrou valores de CIM menores para PH151 em comparação com outros fungicidas. Além disso, Yin et al. (2019) destacam que o composto escolhido apresentou atividade antifúngica adequada contra *Rhizoctonia solani*, *Mycosphaerlla melonis*, *Phyllosticta zaeae*, *C. gossypii*, *Phytophthora capsici* e *Pythium aphanidermatum*.

Determinados modos de ação dos derivados da 8HQ já foram estabelecidos e permitem explicar a atividade antifúngica desta molécula observada sobre *B. cinerea* e *G. cingulata*. Pippi et al. (2019) destacam que o composto PH151 apresentou efeito fungistático para todos os isolados testados, os autores demonstraram que este composto atua sobre a parede celular dos fungos. Em um estudo mais recente foram observadas paredes celulares irregulares e com corrosões e lesões (Pippi et al. 2021). Contudo, para outros derivados estudados também foi observado um aumento na permeabilidade celular de *Candida* sp. e dermatófitos, sugerindo danos irreversíveis a membrana (Pippi et al. 2019; Pippi et al. 2020). Além disso, Yin et al. (2020) e Yin et al. (2019) estudaram o efeito de derivados da 8-hidroquinolina sobre *B. cinerea*, os resultados sugeriram que os derivados impactaram sobre a integridade da membrana celular, provocando aumento na permeabilidade da membrana celular e levando à morte de hifas.

Utilizando de delineamento experimental específico para misturas o presente trabalho demonstrou que existe um efeito sinérgico entre os diferentes agentes antifúngicos testados, comprovado pelos coeficientes significativos e positivos da regressão. Estes achados indicam que as combinações de PH151 com difenoconazol, captana com difenoconazol e de PH151, captana e difenoconazol resultam em uma inibição de crescimento micelial de *G. cingulata* superior a inibição provocada por cada ingrediente ativo isolado. Cabe destacar que o termo da equação com maior valor significativo refere-se à associação tripla dos agentes testados, o que revela que a presença dos três compostos químicos em uma formulação comercial resultaria em benefícios para controle destes fitopatógenos.

Quanto ao efeito sinérgico da combinação de derivados da 8HQ com outros fungicidas disponíveis, estudos recentes já observaram esta sinergia, sobretudo usando o clioquinol como derivado da 8HQ. Chaves et al. (2020) demonstraram que a associação de clioquinol com outras drogas clínicas provoca uma ação sinérgica, reduzindo a formação de biofilmes por isolados de *Fusarium*. Além disso, Da Costa et al. (2020) observaram uma ação sinérgica de clioquinol com terbinafina, ciclopirox e na associação tripla destes três ingredientes ativos. Os autores destacam que clioquinol em combinação com antifúngicos no tratamento da dermatofitose pode ser uma estratégia terapêutica interessante para mitigar problemas relacionados à resistência, espectro de ação e toxicidade dos antifúngicos utilizados na clínica médica (Da Costa et al. 2020). Até o presente momento, não há estudos publicados

que avaliaram o efeito sinérgico da combinação de derivados da 8HQ com fungicidas disponíveis no mercado, o que torna nossos achados de ainda maior importância.

Com o objetivo de avaliar se PH151 possui atividade antifúngica sobre leveduras *S. cerevisiae* a concentração inibitória mínima (CIM) foi mensurada. Os resultados permitem concluir que PH151 possui atividade antifúngica sobre *S. cerevisiae*. Valores de CIM semelhantes foram encontrados por Cherdtrakulkiat et al. (2016) que estudaram o efeito antimicrobiano da 8HQ e derivados, no qual para *S. cerevisiae* ATCC 2601 encontraram CIM de 35,71 e 37,37 mg L⁻¹ para dois derivados estudados. Além disso, um estudo recente encontrou valores semelhantes (32 e 64 mg L⁻¹) para três compostos derivados da 8-hidroxiquinolina para diferentes espécies de levedura *Candida* sp. (Pippi et al. 2019). Contudo, no que se refere os possíveis residuais de PH151 em mostos de uva, cabe destacar que os valores de CIM encontrados (32 e >32 mg L⁻¹) são considerados elevados, o que nos permite concluir que somente uma presença em elevadas concentrações de PH151 no mosto resultaria em impactos sobre as células de levedura.

Diante disto, o derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151) pode ser uma alternativa viável para controle de fitopatógenos da videira, sendo que em concentrações residuais moderadas, a presença de PH151 não resultaria em efeitos sobre a fermentação alcoólica. De fato, nos ensaios de CIM não foram observadas inibições de crescimento de leveduras em concentrações de até 4 mg L⁻¹ (Figura 8). Além disso, é interessante destacar que o limite máximo residual (MRL) de grande parte dos fungicidas permitidos nas uvas encontra-se neste intervalo situado entre 0 e 3 mg L⁻¹ pelas diferentes legislações, tanto nacionais quanto internacionais (Caboni e Cabras 2010; ANVISA 2015; EFSA 2015).

Os resultados também indicam que no mosto sintético, com pH 3,5 e atividade fermentativa, o efeito antifúngico de PH151 foi consideravelmente reduzido em comparação ao apresentado no meio YEPD, com pH 6,5 e atividade respiratória. Na maior concentração testada (32 mg L⁻¹), foi observada uma inibição de 100% das células de leveduras em meio YEPD e uma inibição inferior a 30% em mosto sintético.

Braconi, Bernardini e Santucci (2016) destacam que o uso de *S. cerevisiae* como modelo possibilita identificar biomarcadores moleculares, mecanismos de ação desconhecidos e novos alvos potenciais, além disso, concluíram que esta levedura é um ótimo modelo para testar os efeitos dos agrotóxicos. Considerando a grande diversidade de derivados de 8HQ e o número limitado de estudos visando determinar

seus mecanismos de ação, usamos o organismo industrial e modelo *S. cerevisiae* (Karathia et al. 2011; Braconi, Bernardini e Santucci 2016) para elucidar os mecanismos celulares envolvidos na atividade antifúngica de um derivado da 8HQ. Neste contexto, os ensaios envolvendo viabilidade celular e citometria de fluxo foram conduzidos para melhor compreender o modo de ação do derivado da 8HQ (PH151) em células exponenciais aeróbias de *S. cerevisiae* avaliando a resposta celular individual usando várias análises de citometria de fluxo e mutantes deletados.

Com base na determinação de concentração inibitória mínima de PH151 sobre duas cepas de leveduras nós selecionamos as concentrações de 16, 32 e 64 mg L⁻¹ para avaliar o efeito de PH151 sobre as células de levedura BY4741 em um tempo de 6 h. Nossos dados, obtidos por análise de citometria de fluxo, mostraram que PH151 induz uma perda da integridade da membrana celular, evidenciada pela alta fluorescência do PI. Pippi et al. (2019) demonstraram que os ácidos 8-hidroxiquinolina-sulfônicos comprometem a integridade da membrana celular de *C. albicans*, e atribuíram esse dano ao principal mecanismo antifúngico relacionado à membrana celular dos derivados estudados.

As concentrações intracelulares de ROS podem aumentar drasticamente sob várias condições de estresse que afetam o metabolismo e a viabilidade celular (Farrugia e Balzan 2012). Em nossos experimentos, os dados mostraram um aumento importante no acúmulo de ROS intracelulares após a exposição ao PH151, indicando um processo de morte celular programada. Revisões recentes da literatura destacaram que 5-Nitro-8-quinolinol atua aumentando o acúmulo de ROS nas células (Oliveri e Vecchio 2016), e que esta produção de ROS é o mecanismo que explica a atividade antitumoral da nitroxolina (Gupta, Luxami e Paul 2021).

O acúmulo intracelular de ROS na mitocôndria induz uma sequência de eventos que incluem hiperpolarização da membrana mitocondrial, explosão oxidativa, quebra do potencial de membrana e fragmentação mitocondrial (Perrone, Tan e Dawes 2008; Ždravlević et al. 2012). Em nosso estudo, células de levedura BY4741 tratadas com PH151 mostraram uma redução no potencial de membrana, que era dependente da dose. Esses resultados indicam que o acúmulo intracelular de ROS causado pelo PH151 é responsável pela disfunção mitocondrial em células de levedura.

Os resultados obtidos quanto a disfunção mitocondrial e produção de ROS causada por PH151 corroboram com outros estudos envolvendo derivados da 8HQ.

Yang et al. (2018) sintetizaram um composto derivado da 8HQ, em seus ensaios de citometria foi observada uma disfunção mitocondrial em células cancerígenas, após 24 h as células tratadas com o complexo estudado apresentaram uma redução do $\Delta\psi_m$, sendo este comportamento maior com o aumento da concentração do composto estudado. Ruiz et al. (2019) sintetizaram complexos à base de platina contendo 8-hidroxiquinolina, o mecanismo de ação de um composto sobre células cancerígenas foi a produção de ROS e apoptose induzida por via de disfunção mitocondrial (Ruiz et al. 2019). Zhang et al. (2016) estudaram dois complexos de ródio compostos por 8-hidroxiquinolina e 5-bromo-8-hidroxiquinolina, as observações de apoptose celular indicaram o mecanismo da via de disfunção mitocondrial, devido à geração de ROS.

As caspases, que pertencem ao grupo da cisteína protease (Mazzoni e Falcone 2008), desempenham um papel fundamental na ativação de uma cascata de sinalização proteolítica durante a apoptose em mamíferos. As proteases semelhantes às caspases são chamadas de metacaspases, que desempenham papéis importantes em *S. cerevisiae* (Kavakçioğlu e Tarhan 2018). Além disso, eventos apoptóticos em *S. cerevisiae* causados por estímulos externos e internos podem estar associados à atividade da metacaspase *Yca1p* de *S. cerevisiae*, que é semelhante às caspases de mamíferos (Du et al. 2007). A análise de citometria de fluxo revelou um aumento nos níveis de metacaspase ativa em células de *S. cerevisiae* tratadas com o derivado 8HQ, indicando que PH151 pode induzir a morte celular por apoptose por meio de uma via dependente de metacaspase. Estes resultados vão ao encontro aos encontrados por Yang et al. (2018), que observaram um notável aumento de caspases ativadas, e concluíram que o complexo de cobre derivado da 8HQ pode induzir a apoptose celular ao desencadear a atividade da caspase-3/9/8 em células cancerígenas.

A morte celular programada em *S. cerevisiae* foi observada em diferentes condições de estresse, como níveis de etanol e ácido acético, idade celular e altas concentrações de sal, além de outras condições, como presença de drogas, peróxido de hidrogênio e fungicidas (Carmona-Gutierrez et al. 2010; Scariot et al. 2016b). Para elucidar o mecanismo responsável pela morte apoptótica induzida por PH151, avaliamos o efeito de PH151 no tipo selvagem (BY4741) e em três cepas isogênicas de *S. cerevisiae* com genes-chave da via apoptótica deletados.

Uma comparação da morte celular induzida por PH151 na cepa de tipo selvagem e mutantes mostrou que apenas o mutante $\Delta yca1$ exibiu viabilidade significativamente maior. Estes resultados demonstram uma clara resistência de

mutantes *Δyca1* ao derivado estudado, indicando que PH151 induz apoptose dependente de metacaspase em *S. cerevisiae*. De acordo com Oliveri e Vecchio (2016), clioquinol e análogos de piperazina sulfonila HQ são responsáveis por desencadear a via apoptótica dependente da caspase. Além disso, como a apoptose por metacaspases está relacionada ao acúmulo de ROS, o acúmulo de ROS intracelular observado em células de *S. cerevisiae* tratadas com PH151 pode explicar o efeito fungicida desse derivado. Neste estudo, o composto PH151 induziu a ativação de metacaspases em *S. cerevisiae*, o que pode estar intimamente relacionado com a produção de ROS e disfunção mitocondrial.

Os resultados obtidos mostram que o composto PH151 possui atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*, colaborando com os resultados encontrados no ensaio de CIM. Essa atividade está associada à perda da integridade da membrana celular, acúmulo intracelular de ROS, redução do potencial de membrana mitocondrial e ativação de metacaspases, elementos que induzem a morte celular por apoptose. Embora estes achados sejam inéditos em *S. cerevisiae* envolvendo este derivado, os resultados corroboram com a literatura sobre outros derivados, no qual já foi determinado que clioquinol induz apoptose em células cancerosas por meio de uma via apoptótica dependente de caspase (Ding et al. 2005).

No que se refere a uma concentração residual de PH151 em mostos de uva e o possível efeito sobre células de levedura *S. cerevisiae*, os resultados encontrados são positivos, uma vez que em concentrações de até 1 mg L⁻¹ não foram observadas alterações nos parâmetros cinéticos da fermentação, além disso, na concentração de 4 mg L⁻¹, o impacto sobre a cinética de fermentação é inferior ao provocado por alguns fungicidas convencionais testados na concentração de 1 mg L⁻¹. Togores (2018) relata que alguns fungicidas modernos como pirimetanil, ciprodinil, fludioxonil, quinoxifen e azoxistrobina e kresoxim-metil não afetam o desenvolvimento da fermentação alcoólica dos mostos e que podem ser eliminados pelas próprias leveduras de forma rápida. Os achados neste ensaio fermentativo vão ao encontro com esta literatura citada, uma vez que quinoxifen se trata de uma quinolina com ação antifúngica (Togores 2019).

Até o momento, não há estudos publicados que avaliaram o efeito de derivados da 8-hidroxiquinolina sobre a fermentação de mostos de uva, outro motivo que torna este trabalho de grande importância para elucidar e avaliar o potencial do uso de derivados da 8HQ na vitivinicultura. Por outro lado, muitos trabalhos

investigaram o efeito de concentrações residuais de diferentes fungicidas convencionais sobre fermentação de mostos, como destacado em Gava et al. (2021).

Um tempo de latência curto das leveduras é de grande valia para a elaboração de vinhos, a forma como a levedura é conduzida nas fases iniciais da fermentação possui uma influência na capacidade da levedura de conduzir uma fermentação sem problemas e na qualidade do vinho resultante (Specht 2010). A fase de latência para produção de CO₂ não foi afetada por PH151, no entanto, no tratamento contendo 1 mg L⁻¹ de captana foi observado um significativo atraso para início da atividade fermentativa pelas leveduras. Efeito semelhante de captana foi observado por um estudo no Japão, no qual foi observado um atraso no início da fermentação de até 48 h na presença de 5 mg L⁻¹ de captana e de 24 h na presença de 1 mg L⁻¹, sendo que os autores atentam para a possibilidade de severos danos a fermentação na presença desta substância (Goto-Yamamoto et al. 2007). Além disso, Scariot et al. (2016a) observaram um retardo no início da fermentação.

Da mesma forma, taxas máximas fermentativas mais elevadas são favoráveis, o que significa uma mais rápida degradação de açúcares, desta forma, assegurando a inibição de outros microrganismos presentes no meio, estes que podem resultar em características indesejáveis ao produto (Marsit e Dequin 2015). Nossos resultados demonstram que iprodiona, difenoconazol e a concentração de 4 mg L⁻¹ de PH151 reduziram significativamente a taxa máxima de produção de CO₂, sendo este efeito maior no tratamento contendo difenoconazol. Estes achados colaboram com estudos que envolveram outros compostos do grupo químico dos triazóis. Sieiro-Sampedro et al. (2020) observaram uma menor taxa de produção de etanol na fase exponencial quando na presença de 1 e 4 mg L⁻¹ de tetraconazol e González-Rodríguez et al. (2009) relataram uma taxa de fermentação reduzida na presença de 2 mg L⁻¹ de tebuconazole. Ambos os trabalhos atentam também para um atraso na conclusão das fermentações na presença destes triazóis, estes achados permitem explicar o aumento observado nos tempos de latência e para ocorrência da taxa máxima na presença de difenoconazol.

Por fim, Castro-Sobrino et al. (2019) observaram redução de 10% no teor de etanol dos vinhos produzidos com mostos na presença de 0,5 e 1 mg L⁻¹ de tetraconazol. O comportamento deste triazol pode justificar uma redução de aproximadamente 10% observada sobre a produção máxima de CO₂.

Este trabalho não teve por objetivo avaliar parâmetros toxicológicos deste derivado. No entanto, é importante destacar que o estudo de Pippi et al. (2021) demonstrou que o composto PH151 apresenta baixa toxicidade em *Drosophila melanogaster* e em embriões de galinha, e mortalidade dependente da dose no modelo do peixe-zebra. Além disso, Joaquim et al. (2019) verificaram baixa citotoxicidade *in vitro* de compostos derivados da 8HQ, incluindo PH151. Estas evidências revelam que PH151 é um composto com importante potencial para uso na agricultura, sendo a sua baixa toxicidade uma característica promissora. Além disso, uma revisão recente de Zubrod et al. (2019) demonstrou que muitos dos fungicidas disponíveis podem ser altamente tóxicos para uma ampla gama de organismos e podem representar um risco também para a biota aquática.

Finalmente, em conjunto, os resultados encontrados nesta pesquisa permitem inferir que o derivado da 8HQ (PH151) possui expressivo potencial para ser utilizado na agricultura, seja como alternativa a outros fungicidas ou como estratégia para redução das doses aplicadas dos agrotóxicos convencionais. Os resultados encontrados demonstram que PH151 possui importante atividade antifúngica sobre *B. cinerea* e *G. cingulata*. Somado aos resultados da fermentação de mosto de uva, pode-se concluir que em concentrações residuais o impacto de PH151 sobre leveduras enológicas é menor do que os fungicidas convencionais já aplicados, sendo que em algumas concentrações mais baixas, não foram percebidas alterações nos parâmetros cinéticos.

A utilização da levedura *S. cerevisiae* como modelo revelou mais detalhes sobre o modo de ação antifúngico do composto PH151, cuja atividade está associada à perda da integridade da membrana celular, acúmulo intracelular de ROS, redução do potencial de membrana mitocondrial e ativação de metacaspases, elementos que induzem a morte celular por apoptose.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos por este trabalho, podemos concluir que:

1) O derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151) apresentou atividade antifúngica nos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* para *B. cinerea* e *G. cingulata*, sendo que valores de CIM inferiores aos fungicidas convencionais foram encontrados;

2) Nos ensaios envolvendo a combinação de PH151, captana e difenoconazol, as combinações de PH151 com difenoconazol, captana com difenoconazol e a associação tripla resultam em um efeito sinérgico sobre a inibição de crescimento micelial de *G. cingulata*. Além disso, o termo cúbico (associação tripla) apresentou o maior valor positivo e significativo;

3) A inclusão do derivado da 8-hidroxiquinolina (PH151) em combinação com demais fungicidas para controle de podridões da uva pode ser uma importante estratégia para superar problemas relacionados à resistência, espectro de ação e toxicidade dos fungicidas atualmente utilizados na viticultura;

4) Utilizamos a levedura *S. cerevisiae* em aerobiose como modelo para avaliar o modo de ação antifúngico de PH151. Os resultados obtidos demonstram que o composto PH151 possui atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*. Essa atividade está associada à perda da integridade da membrana celular, acúmulo intracelular de ROS, redução do potencial de membrana mitocondrial e ativação de metacaspases, elementos que induzem a morte celular por apoptose.

5) A modelagem da cinética fermentativa do mosto de uvas Chardonnay e predição de parâmetros cinéticos revelou que concentrações de 0,2 e 1 mg L⁻¹ de PH151 presentes no mosto não afetam qualquer parâmetro cinético estudado. Além disso, os antifúngicos convencionais afetaram pelo menos um dos parâmetros cinéticos estudados.

6) Em conjunto, os resultados encontrados nesta pesquisa permitem inferir que o derivado da 8HQ (PH151) possui potencial para ser utilizado na agricultura, com importante atividade antifúngica sobre *B. cinerea* e *G. cingulata*. Além disso, embora PH151 tenha atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*, os resultados demonstram que em baixas concentrações o impacto de PH151 residual sobre leveduras é menor que comparado aos fungicidas convencionais já aplicados, além disso, na

concentração de 1 mg L⁻¹ não foram percebidas alterações nos parâmetros cinéticos.

8. REFERÊNCIAS

- Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, Lord, Asiedu, S. K., Prithiviraj, B., & Schilder, A. (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) – prospects and challenges. *Biocontrol Science and Technology*, 29(3), 207–228. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574>
- Abouelhassan, Y., Yang, Q., Yousaf, H., Nguyen, M. T., Rolfe, M., Schultz, G. S., & Huigens, R. W. (2017). Nitroxoline: A broad-spectrum biofilm-eradicating agent against pathogenic bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(2), 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.017>
- Agudelo-Romero, P., Erban, A., Rego, C., Carbonell-Bejerano, P., Nascimento, T., Sousa, L., Martínez-Zapater, J. M., Kopka, J., & Fortes, A. M. (2015). Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1769–1785. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru517>
- Albertin, W., da Silva, T., Rigoulet, M., Salin, B., Masneuf-Pomarede, I., de Vienne, D., Sicard, D., Bely, M., & Marullo, P. (2013). The Mitochondrial Genome Impacts Respiration but Not Fermentation in Interspecific *Saccharomyces* Hybrids. *PLoS ONE*, 8(9), e75121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075121>
- Amiri, A., Zuniga, A. I., Cordova, L. G., & Peres, N. A. (2019). The Importance of Selecting Appropriate Rotation and Tank-Mix Partners for Novel SDHIs to Enhance Botrytis Fruit Rot Control in Strawberry. *Plant Disease*, 103(4), 729–736. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1276-RE>
- Ampese, M & Almança, M. A. K. (2019). Efeito de fungicidas no controle de *Botrytis cinerea* in vitro e em bagas de uva com fermento. *Revista Brasileira de Viticultura e Enologia*, 11, 28-36.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2021). *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos*. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>
- Arafa, R. K., Hegazy, G. H., Piazza, G. A., & Abadi, A. H. (2013). Synthesis and in vitro antiproliferative effect of novel quinoline-based potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63, 826–832. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.008>
- Ashwini, N., & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4(2), 127–136. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0134-4>
- Baggio, J. S., Wang, N.-Y., Peres, N. A., & Amorim, L. (2018). Baseline sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from Brazilian strawberry fields to azoxystrobin,

- difenoconazole, and thiophanate-methyl. *Tropical Plant Pathology*, 43(6), 533–542. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0232-2>
- Barata, A., Campo, E., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., Cacho, J., & Ferreira, V. (2011). Analytical and Sensorial Characterization of the Aroma of Wines Produced with Sour Rotten Grapes Using GC-O and GC-MS: Identification of Key Aroma Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2543–2553. <https://doi.org/10.1021/jf104141f>
- Bennamara, A., & Abourriche, A. (2020). Alkaloids 8-Hydroxyquinoline derivatives: Synthesis and biological activities. *Journal of Analytical Sciences and Applied Biotechnology*, Vol 2, J. Anal. Sci. Appl. Biotechnol., Vol 2(1), 2020, p. 57-62 Pages. <https://doi.org/10.48402/IMIST.PRSM/JASAB-V2I1.21491>
- Berbegal, C., Spano, G., Tristezza, M., Grieco, F., & Capozzi, V. (2017). Microbial Resources and Innovation in the Wine Production Sector. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 38(2). <https://doi.org/10.21548/38-2-1333>
- Bettiga, L. J. (2013). *Grape pest management* (Vol. 3343). UCANR Publications.
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107-119.
- Bizaj, E., Cus, F., & Raspor, P. (2011). Removal of pyrimethanil and fenhexamid from *saccharomyces cerevisiae* liquid cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 49(4), 474-480.
- Blateyron, L., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stuck and Slow Fermentations in Enology: Statistical Study of Causes and Effectiveness of Combined Additions of Oxygen and Diammonium Phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2), 184-189. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80063-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80063-3)
- Borren, E., & Tian, B. (2020). The Important Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to the Aroma Complexity of Wine: A Review. *Foods*, 10(1), 13. <https://doi.org/10.3390/foods10010013>
- Bosch, F. V. D., Paveley, N., van den Berg, F., Hobbelen, P., & Oliver, R. (2014). Mixtures as a Fungicide Resistance Management Tactic. *Phytopathology*®, 104(12), 1264–1273. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-14-0121-RVW>
- Braconi, D., Bernardini, G., & Santucci, A. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. *Journal of Proteomics*, 137, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.001>
- Brink, J. C., Calitz, F. J., & Fourie, P. H. (2016). Spray Deposition and Control of *Botrytis cinerea* on Grape Leaves and Bunches: Part 2 (Wine Grapes). *South African Journal of Enology and Viticulture*, 37(2). <https://doi.org/10.21548/37-2-1061>
- Briz-Cid, N., Castro-Sobrino, L., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2018). Fungicide residues affect the sensory properties and flavonoid composition of red wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.021>

- Briz-Cid, N., Rial-Otero, R., Cámara, M. A., Oliva, J., & Simal-Gandara, J. (2019). Dissipation of three fungicides and their effects on anthocyanins and color of monastrell red wines. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1447. <https://doi.org/10.20944/preprints201812.0169.v1>
- Brostrom, G., & Brostrom, J. (Orgs.). (2009). *The business of wine: An encyclopedia*. Greenwood Press.
- Caboni, P., & Cabras, P. (2010). Pesticides' Influence on Wine Fermentation. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 59, p. 43–62). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)59002-8](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)59002-8)
- Čadež, N., Zupan, J., & Raspor, P. (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries: Yeasts on grapes treated with fungicides. *FEMS Yeast Research*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00635.x>
- Calvo-Garrido, C., Haidar, R., Roudet, J., Gautier, T., & Fermaud, M. (2018). Pre-selection in laboratory tests of survival and competition before field screening of antagonistic bacterial strains against Botrytis bunch rot of grapes. *Biological Control*, 124, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.006>
- Candia, D. P. C. 2020. **Control de *Botrytis cinerea* Pers. en mandarina Satsuma var. Okitsu mediante fungicidas biológicos y químicos en Huaura**. Tese de Doutorado. p. 97.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). Colletotrichum – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181–213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Capece, A., Romaniello, R., Scrano, L., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Yeast Starter as a Biotechnological Tool for Reducing Copper Content in Wine. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2632. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02632>
- Capozzi, V., Fragasso, M., Romaniello, R., Berbegal, C., Russo, P., & Spano, G. (2017). Spontaneous Food Fermentations and Potential Risks for Human Health. *Fermentation*, 3(4), 49. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040049>
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., & Madeo, F. (2010). Apoptosis in yeast: Triggers, pathways, subroutines. *Cell Death & Differentiation*, 17(5), 763–773. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.219>
- Castro-Sobrinho, L., Briz-Cid, N., Figueiredo-González, M., Sieiro-Sampedro, T., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2019). Impact of fungicides mepanipyrim and tetraconazole on phenolic profile and colour of Mencía red wines. *Food Control*, 98, 412–423. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.035>
- CAVALCANTI, FR, GARRIDO, LR. 2015. Controle de doenças. Embrapa Uva e Vinho. Capítulo em livro científico (ALICE).
- Chan, S. H., Chui, C. H., Chan, S. W., Kok, S. H. L., Chan, D., Tsoi, M. Y. T., Leung, P. H. M., Lam, A. K. Y., Chan, A. S. C., Lam, K. H., & Tang, J. C. O. (2013). Synthesis of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Novel Antitumor Agents. *ACS Medicinal Chemistry*

Letters, 4(2), 170–174. <https://doi.org/10.1021/ml300238z>

- Chaves, M. A., Ferreira do Amaral, T., Monteiro da Silva Rodrigues Coutinh, N., Fernanda Andrzejewski Kaminski, T., Teixeira, M. L., Flavio Souza de Oliveira, L., Andrade, S. F., & Fuentefria, A. M. (2020). Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates. *Mycoses*, 63(10), 1069–1082. <https://doi.org/10.1111/myc.13142>
- Chen, H., Liu, X., Wang, C., Wang, Q., Jiang, Y., Yin, P., & Zhu, L. (2014). Simultaneous Determination of Thiophanate-Methyl and Its Metabolite Carbendazim in Tea Using Isotope Dilution Ultra Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 52(10), 1157–1164. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt165>
- Cherdtrakulkiat, R., Boonpangrak, S., Sinthupoom, N., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V. (2016). Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 6, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.03.014>
- Chobot, V., Hadacek, F., Bachmann, G., Weckwerth, W., & Kubicova, L. (2018). Antioxidant Properties and the Formation of Iron Coordination Complexes of 8-Hydroxyquinoline. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3917. <https://doi.org/10.3390/ijms19123917>
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. (2008). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., & Valero, E. (2014). A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.013>
- Cornell, J. A. (2011). *A Primer on Experiments with Mixtures: Cornell/A Primer on Mixtures*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470907443>
- Cortés, J. C. G., Curto, M.-Á., Carvalho, V. S. D., Pérez, P., & Ribas, J. C. (2019). The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107352. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.008>
- Couch, H. B., & Smith, B. D. (1991). Synergistic and antagonistic interactions of fungicides against *Pythium aphanidermatum* on perennial ryegrass. *Crop Protection*, 10(5), 386–390. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(06\)80029-3](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(06)80029-3)
- Crump, A., Farrar, J., Fournier, A. J., & Ellsworth, P. C. (2018). Employing California Pesticide Use Data for Evaluating Integrated Pest Management Programs and Informing Pesticide Policy and Regulation. In M. Zhang, S. Jackson, M. A. Robertson, & M. R. Zeiss (Orgs.), *ACS Symposium Series* (Vol. 1283, p. 225–237). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2018-1283.ch011>
- da Costa, B., Pippi, B., Andrzejewski Kaminski, T. F., Andrade, S. F., & Fuentefria, A. M.

- (2020). In vitro antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. *Mycoses*, 63(9), 993–1001. <https://doi.org/10.1111/myc.13127>
- Daane, K. M., Vincent, C., Isaacs, R., & Ioriatti, C. (2018). Entomological Opportunities and Challenges for Sustainable Viticulture in a Global Market. *Annual Review of Entomology*, 63(1), 193–214. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023547>
- de MELLO, L. M. R., & MACHADO, C. A. E. (2017). *Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul: 2013 a 2015. Embrapa Uva e Vinho-Livro científico (ALICE)*.
- De Nobel, J. G., Dijkers, C., Hooijberg, E., & Klis, F. M. (1989). Increased Cell Wall Porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after Treatment with Dithiothreitol or EDTA. *Microbiology*, 135(7), 2077–2084. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-7-2077>
- de Oliveira, K. Á. R., Berger, L. R. R., de Araújo, S. A., Câmara, M. P. S., & de Souza, E. L. (2017). Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiology*, 66, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.012>
- De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. J. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dias, F. F. G., de Castro, R. J. S., Ohara, A., Nishide, T. G., Bagagli, M. P., & Sato, H. H. (2015). Simplex centroid mixture design to improve L-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 528–534. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.011>
- Ding, W.-Q., Liu, B., Vaught, J. L., Yamauchi, H., & Lind, S. E. (2005). Anticancer Activity of the Antibiotic Clioquinol. *Cancer Research*, 65(8), 3389–3395. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3577>
- dos Santos, N. S. T., Athayde Aguiar, A. J. A., de Oliveira, C. E. V., Veríssimo de Sales, C., de Melo e Silva, S., Sousa da Silva, R., Stamford, T. C. M., & de Souza, E. L. (2012). Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32(2), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.014>
- Drori, N., Kramer-Haimovich, H., Rollins, J., Dinoor, A., Okon, Y., Pines, O., & Prusky, D. (2003). External pH and Nitrogen Source Affect Secretion of Pectate Lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3258–3262. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3258-3262.2003>
- Du, L., Yu, Y., Chen, J., Liu, Y., Xia, Y., Chen, Q., & Liu, X. (2007). Arsenic induces caspase- and mitochondria-mediated apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS*

Yeast Research, 7(6), 860–865. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00274.x>

- Ebrahimzadeh, F., & Abrinbana, M. (2019). Activity of fungicide mixtures against *Botrytis cinerea* isolates resistant to benzimidazoles, strobilurins and dicarboximides. *Annals of Applied Biology*, 174(3), 301–312. <https://doi.org/10.1111/aab.12497>
- Echeverrigaray, S., Delamare, A. P. L., Fontanella, G., Favaron, F., Stella, L., & Scariot, and F. J. (2019). *Colletotrichum* species associated to ripe rot disease of grapes in the “Serra Gaucha” region of Southern Brazil. *BIO Web of Conferences*, 12, 01008. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191201008>
- Echeverrigaray, S., Scariot, F. J., Fontanella, G., Favaron, F., Sella, L., Santos, M. C., Schwambach, J., Pedrotti, C., & Delamare, A. P. L. (2020). *Colletotrichum* species causing grape ripe rot disease in *Vitis labrusca* and *V. Vinifera* varieties in the highlands of southern Brazil. *Plant Pathology*, 69(8), 1504–1512. <https://doi.org/10.1111/ppa.13240>
- Edder, P., Ortelli, D., Viret, O., Cognard, E., Montmollin, A. D., & Zali, O. (2009). Control strategies against grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr) and corresponding fungicide residues in grapes and wines. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26(5), 719–725. <https://doi.org/10.1080/02652030802668578>
- EFSA, European Food Safety Authority (2015). *Maximum residue levels (MRL)*. <http://www.efsa.europa.eu/en/mrls/mrlteam.html>
- Elad, Y., & Stewart, A. (2007). Microbial Control of Botrytis sp. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Orgs.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (p. 223–241). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_13
- Elderfield, J. A. D., Lopez-Ruiz, F. J., van den Bosch, F., & Cunniffe, N. J. (2018). Using Epidemiological Principles to Explain Fungicide Resistance Management Tactics: Why do Mixtures Outperform Alternations? *Phytopathology*®, 108(7), 803–817. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-17-0277-R>
- Elmer, P. A. G., & Michailides, T. J. (2007). Epidemiology of Botrytis cinerea in Orchard and Vine Crops. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Orgs.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (p. 243–272). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_14
- Enquist, P.-A., Gylfe, Å., Hägglund, U., Lindström, P., Norberg-Scherman, H., Sundin, C., & Elofsson, M. (2012). Derivatives of 8-hydroxyquinoline—Antibacterial agents that target intra- and extracellular Gram-negative pathogens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(10), 3550–3553. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.096>
- Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., Gutiérrez, A. R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., López, R., & González-Arenzana, L. (2018). Evaluating a preventive biological control agent applied on grapevines against *Botrytis cinerea* and its influence on winemaking: Biofungicide influence on wine elaboration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), 4517–4526. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8977>
- Farrugia, G., & Balzan, R. (2012). Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. *Frontiers in Oncology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00064>

- FEIX, R. D., JÚNIOR, S. L., BORGES, B. K. Painel do agronegócio do Rio Grande do Sul — 2021. Porto Alegre: Secretaria de Planejamento, Orçamento e Gestão, 2021. Disponível em: <https://estado.rs.gov.br/upload/arquivos//painel-do-agronegoo-do-rio-grande-do-sul-2021.pdf>
- Fisher, M. C., Henk, Daniel. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Franchi, G., & Vigni, P. (1967). New fluoridated quinoline compounds with antibacterial action. *Il Farmaco; edizione scientifica*, 22(11), 923–929.
- FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. (2010). FRAC recommendations for fungicide mixtures designed to delay resistance evolution. *Croplife International, Brussels, Belgium*.
- Gao, Y.-Y., He, L.-F., Li, B.-X., Mu, W., Lin, J., & Liu, F. (2017). Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to six fungicides and reduction in incidence and severity of chili anthracnose using pyraclostrobin. *Australasian Plant Pathology*, 46(6), 521–528. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0518-8>
- Garrido, C. C. (2015). La podredumbre gris (*Botrytis cinerea*): Influencia en el vino y avances en las estrategias para su control. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (274), 17.
- GARRIDO, L. da R., & Gava, R. (2014). *Manual de doenças fúngicas da videira*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014.
- GARRIDO, L. da R., & Sônego, O. (2004). Podridão da uva madura ou podridão de *Glomerella*: Biologia, epidemiologia e controle. *Embrapa Uva e Vinho-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- GARRIDO, L. da R., SÔNEGO, O., & GRIGOLETTI JÚNIOR, A. (2005). Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. *Embrapa Uva e Vinho-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- Gava, A. (2021). *OenoKPM: Modeling the Kinetics of CO2 Production in Alcoholic Fermentation*. <https://CRAN.R-project.org/package=OenoKPM>
- Gava, A., Borsato, D., & Ficagna, E. (2020). Effect of mixture of fining agents on the fermentation kinetics of base wine for sparkling wine production: Use of methodology for modeling. *LWT*, 131, 109660. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109660>
- Gava, A., Emer, C. D., Ficagna, E., Fernandes de Andrade, S., & Fuentefria, A. M. (2021). Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine production— A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(6), 943–961. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1894357>
- Gazziero, D. L. P. (2015). Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. *Planta Daninha*, 33(1), 83–92. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582015000100010>

- Giovannini, E. (2008). *Produção de uvas para vinho, suco e mesa*. Porto Alegre: Renascença.
- Gisi, U. (1996). Synergistic Interaction of Fungicides in Mixtures. *Phytopathology*, 86(11), 1273-1279.
- González-Domínguez, E., Fedele, G., Caffi, T., Delière, L., Sauris, P., Gramaje, D., Ramos-Saez de Ojer, J. L., Díaz-Losada, E., Díez-Navajas, A. M., Bengoa, P., & Rossi, V. (2019). A network meta-analysis provides new insight into fungicide scheduling for the control of *Botrytis cinerea* in vineyards: Meta-analysis Botrytis bunch rot control. *Pest Management Science*, 75(2), 324–332. <https://doi.org/10.1002/ps.5116>
- González-Domínguez, E., Fedele, G., Languasco, L., & Rossi, V. (2019). Interactions among fungicides applied at different timings for the control of Botrytis bunch rot in grapevine. *Crop Protection*, 120, 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.02.009>
- González-Rodríguez, R. M., Cancho-Grande, B., Torrado-Agrasar, A., Simal-Gándara, J., & Mazaira-Pérez, J. (2009). Evolution of tebuconazole residues through the winemaking process of Mencía grapes. *Food Chemistry*, 117(3), 529–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.030>
- González-Rodríguez, R. M., González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Regueiro, J., Torrado-Agrasar, A., Martínez-Carballo, E., & Cancho-Grande, B. (2011). Influence of new fungicides – metiram and pyraclostrobin – on *Saccharomyces cerevisiae* yeast growth and alcoholic fermentation course for wine production Influencia de los nuevos fungicidas – metiram y piraclostrobín – en el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y en el curso de la fermentación alcohólica para la elaboración de vino. *CyTA - Journal of Food*, 9(4), 329–334. <https://doi.org/10.1080/19476337.2011.604135>
- Goto-Yamamoto, N., Yamashita, H., Hashiguchi, T., & Numata, M. (2007). Application of Pesticide Captan in Viticulture and Its Inhibitory Effect on Fermentation. *Journal of ASEV Japan*, 18(2), 79–84.
- Gottschalk, P. G., & Dunn, J. R. (2005). The five-parameter logistic: A characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Analytical Biochemistry*, 343(1), 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.035>
- Greer, L. A., Harper, J. D. I., Savocchia, S., Samuelian, S. K., & Steel, C. C. (2011). Ripe rot of south-eastern Australian wine grapes is caused by two species of Colletotrichum: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* with differences in infection and fungicide sensitivity: Ripe rot of grapes caused by Colletotrichum sp. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), 123–128. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00143.x>
- Guerrero Prieto, V. M., Jacobo Cuéllar, J. L., Parra Quezada, R. Á., Linares Marrufo, M. I., Ojeda Barrios, D. L., Hernández Rodríguez, O. A., Robles Hernández, L., Berlanga Reyes, D. I., & Cabanillas Mata, I. J. (2019). Botrytis cinerea Pers. In postharvest apple fruit, control with *Candida oleophila* Montrocher strains and/or synthetic fungicides. *Nova Scientia*, 11(22), 69–84. <https://doi.org/10.21640/ns.v11i22.1645>
- Gupta, R., Luxami, V., & Paul, K. (2021). Insights of 8-hydroxyquinolines: A novel target in

- medicinal chemistry. *Bioorganic Chemistry*, 108, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104633>
- Hao, Z., Van Tuinen, D., Wipf, D., Fayolle, L., Chataignier, O., Li, X., Chen, B., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., & Adrian, M. (2017). Biocontrol of grapevine aerial and root pathogens by *Paenibacillus* sp. Strain B2 and paenimyxin in vitro and in planta. *Biological Control*, 109, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.004>
- Hasan, S. H., Srivastava, P., & Talat, M. (2009). Biosorption of Pb(II) from water using biomass of *Aeromonas hydrophila*: Central composite design for optimization of process variables. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2–3), 1155–1162. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.142>
- Hong, Y.-S., Cilindre, C., Liger-Belair, G., Jeandet, P., Hertkorn, N., & Schmitt-Kopplin, P. (2011). Metabolic Influence of *Botrytis cinerea* Infection in Champagne Base Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7237–7245. <https://doi.org/10.1021/jf200664t>
- Hu, M.-J., Cox, K. D., & Schnabel, G. (2016). Resistance to Increasing Chemical Classes of Fungicides by Virtue of “Selection by Association” in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*®, 106(12), 1513–1520. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-16-0161-R>
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2019). *Censo Agropecuário*. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html?edicao=21858&t=sobre>
- Joaquim, A. R., Pippi, B., de Cesare, M. A., Rocha, D. A., Boff, R. T., Staudt, K. J., Ruaro, T. C., Zimmer, A. R., de Araújo, B. V., Silveira, G. P., Martins, A. F., Teixeira, M. L., dos Santos, F. P., Fuentefria, A. M., & de Andrade, S. F. (2019). Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(6), 1186–1196. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13435>
- Kallitsounakis, G., & Catarino, S. (2020). An overview on botrytized wines. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 35(2), 76–106. <https://doi.org/10.1051/ctv/20203502076>
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE*, 6(2), 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>
- Kassemeyer, H.-H., & Berkelmann-Löhnertz, B. (2009). Fungi of Grapes. In H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Orgs.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (p. 61–87). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_4
- Kavakçioğlu, B., & Tarhan, L. (2018). Yeast caspase-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 induced by antifungal and potential antitumor agent clotrimazole. *Archives of Microbiology*, 200(1), 97–106. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1425-7>
- Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., & Marchal, R. (2015). Effect of Production Phase on Bottle-Fermented Sparkling Wine Quality. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 63(1), 19–38. <https://doi.org/10.1021/jf504268u>
- Kim, S. W., Jung, J. H., Lamsal, K., Kim, Y. S., Min, J. S., & Lee, Y. S. (2012). Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology*, 40(1), 53–58. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.053>
- Kim, Y. C., Lee, J. H., Bae, Y.-S., Sohn, B.-K., & Park, S. K. (2010). Development of effective environmentally-friendly approaches to control *Alternaria* blight and anthracnose diseases of Korean ginseng. *European Journal of Plant Pathology*, 127(4), 443–450. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9610-4>
- Kos, J., Ku, C. F., Kapustikova, I., Oravec, M., Zhang, H., & Jampilek, J. (2019). 8-Hydroxyquinoline-2-Carboxanilides as Antiviral Agents Against Avian Influenza Virus. *ChemistrySelect*, 4(15), 4582–4587. <https://doi.org/10.1002/slct.201900873>
- Kos, J., Zadrazilova, I., Nevin, E., Soral, M., Gonec, T., Kollar, P., Oravec, M., Coffey, A., O'Mahony, J., Liptaj, T., Kralova, K., & Jampilek, J. (2015). Ring-substituted 8-hydroxyquinoline-2-carboxanilides as potential antimycobacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(15), 4188–4196. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.047>
- Krawczyk, M., Pastuch-Gawolek, G., Mrozek-Wilczkiewicz, A., Kuczak, M., Skonieczna, M., & Musiol, R. (2019). Synthesis of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates and preliminary assay of their β 1,4-GalT inhibitory and anti-cancer properties. *Bioorganic Chemistry*, 84, 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.11.047>
- Ky, I., Lorrain, B., Jourdes, M., Pasquier, G., Fermaud, M., Gény, L., Rey, P., Doneche, B., & Teissedre, P.-L. (2012). Assessment of grey mould (*Botrytis cinerea*) impact on phenolic and sensory quality of Bordeaux grapes, musts and wines for two consecutive vintages: *Botrytis cinerea* effect on grape and wine quality. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(2), 215–226. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00191.x>
- La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., & Darriet, P. (2006). Characterization of Some Mushroom and Earthy Off-Odors Microbially Induced by the Development of Rot on Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9193–9200. <https://doi.org/10.1021/jf0615294>
- Lam, K.-H., Gambari, R., Lee, K. K.-H., Chen, Y.-X., Kok, S. H.-L., Wong, R. S.-M., Lau, F.-Y., Cheng, C.-H., Wong, W.-Y., Bian, Z.-X., Chan, A. S.-C., Tang, J. C.-O., & Chui, C.-H. (2014). Preparation of 8-hydroxyquinoline derivatives as potential antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), 367–370. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.072>
- Lawson, J., & Willden, C. (2016). Mixture Experiments in *R* Using **mixexp**. *Journal of Statistical Software*, 72(Code Snippet 2). <https://doi.org/10.18637/jss.v072.c02>
- Leroch, M., Kretschmer, M., & Hahn, M. (2011). Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany: Fungicide Resistance of *B. cinerea* Isolates from Vineyards. *Journal of Phytopathology*, 159(1), 63–65. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01719.x>
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin,

- P., & Alexandre, H. (2017). Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 856–873. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591>
- Longhi, D. A., Dalcanton, F., Aragão, G. M. F. de, Carciofi, B. A. M., & Laurindo, J. B. (2017). Microbial growth models: A general mathematical approach to obtain μ_{max} and λ parameters from sigmoidal empirical primary models. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(2), 369–375. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150533>
- Pinar, A. L., Rauhut, D., Ruehl, E., & Buettner, A. (2016). Effects of *Botrytis cinerea* and *Erysiphe necator* fungi on the aroma character of grape must: A comparative approach. *Food Chemistry*, 207, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.110>
- Pinar, A. L., Rauhut, D., Ruehl, E., & Buettner, A. (2017b). Effects of Bunch Rot (*Botrytis cinerea*) and Powdery Mildew (*Erysiphe necator*) Fungal Diseases on Wine Aroma. *Frontiers in Chemistry*, 5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00020>
- Pinar, A. L., Rauhut, D., Ruehl, E., & Buettner, A. (2017a). Quantification of the Changes in Potent Wine Odorants as Induced by Bunch Rot (*Botrytis cinerea*) and Powdery Mildew (*Erysiphe necator*). *Frontiers in Chemistry*, 5, 57. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00057>
- Ludwig, N., Löhner, M., Hempel, M., Mathea, S., Schliebner, I., Menzel, M., Kiesow, A., Schaffrath, U., Deising, H. B., & Horbach, R. (2014). Melanin Is Not Required for Turgor Generation but Enhances Cell-Wall Rigidity in Appressoria of the Corn Pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 27(4), 315–327. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0267-R>
- Machota, R., Bortoli, L. C., Cavalcanti, F. R., Botton, M., & Grützmacher, A. D. (2016). Assessment of Injuries Caused by *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) on the Incidence of Bunch Rot Diseases in Table Grape. *Neotropical Entomology*, 45(4), 361–368. <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0377-y>
- Maisonave, P., Sanchez, I., Moine, V., Dequin, S., & Galeote, V. (2013). Stuck fermentation: Development of a synthetic stuck wine and study of a restart procedure. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2–3), 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.004>
- Manske, R. H. F., & Kulka, M. (2011). The Skraup Synthesis of Quinolines. In John Wiley & Sons, Inc. (Org.), *Organic Reactions* (p. 59–98). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471264180.or007.02>
- Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: A review. *FEMS Yeast Research*, 15(7), fov067. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov067>
- Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., & Masneuf-Pomarède, I. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 21–28.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.002>

- Martins, J., Esteves, C., Limpo-Faria, A., Barros, P., Ribeiro, N., Simões, T., Correia, M., & Delerue-Matos, C. (2012). Analysis of six fungicides and one acaricide in still and fortified wines using solid-phase microextraction-gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 132(1), 630–636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.102>
- Mazzoni, C., & Falcone, C. (2008). Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(7), 1320–1327. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.02.015>
- McCarthy, M. W., Kontoyiannis, D. P., Cornely, O. A., Perfect, J. R., & Walsh, T. J. (2017). Novel Agents and Drug Targets to Meet the Challenges of Resistant Fungi. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_3), S474–S483. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix130>
- Nguela, J. M., Vernhet, A., Julien-Ortiz, A., Sieczkowski, N., & Mouret, J.-R. (2019). Effect of grape must polyphenols on yeast metabolism during alcoholic fermentation. *Food Research International*, 121, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.038>
- Meneguzzo, J., Rizzon, L. A., Miele, A., & Ayub, M. A. Z. (2006). Efeito de *Botrytis cinerea* na composição do vinho Gewürztraminer. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(3), 527–532. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000300007>
- Meunier, M., & Steel, C. C. (2009). Effect of *Colletotrichum acutatum* ripe rot on the composition and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(3), 223–227. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00048.x>
- Miele, A., & Rizzon, L. A. (2013). Physicochemical composition of Cabernet-Sauvignon wine made from grapes affected by grape ripe rot. *OENO One*, 47(3), 195. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2013.47.3.1551>
- Milanović, V., Comitini, F., & Ciani, M. (2013). Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.019>
- Miyara, I., Shafran, H., Davidzon, M., Sherman, A., & Prusky, D. (2010). PH Regulation of Ammonia Secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* and Its Effect on Appressorium Formation and Pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 23(3), 304–316. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-3-0304>
- Mochizuki, M., Yamamoto, S., Aoki, Y., & Suzuki, S. (2012). Isolation and characterisation of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biocontrol Science and Technology*, 22(6), 697–709. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.679644>
- Molitor, D., Behr, M., Hoffmann, L., & Evers, D. (2012). Impact of Grape Cluster Division on Cluster Morphology and Bunch Rot Epidemic. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(4), 508–514. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12041>

- Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M., Loira, I., del Fresno, J., González, C., & Suárez-Lepe, J. (2019). Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine Freshness. A Review. *Biomolecules*, *10*(1), 34. <https://doi.org/10.3390/biom10010034>
- Musiol, R., Jampilek, J., Buchta, V., Silva, L., Niedbala, H., Podeszwa, B., Palka, A., Majerz-Maniecka, K., Oleksyn, B., & Polanski, J. (2006). Antifungal properties of new series of quinoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *14*(10), 3592–3598. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.016>
- Musiol, R., Jampilek, J., Nycz, J., Pesko, M., Carroll, J., Kralova, K., Vejsova, M., O'Mahony, J., Coffey, A., Mrozek, A., & Polanski, J. (2010). Investigating the Activity Spectrum for Ring-Substituted 8-Hydroxyquinolines. *Molecules*, *15*(1), 288–304. <https://doi.org/10.3390/molecules15010288>
- Negri, S., Lovato, A., Boscaini, F., Salvetti, E., Torriani, S., Commisso, M., Danzi, R., Ugliano, M., Polverari, A., Torielli, G. B., & Guzzo, F. (2017). The Induction of Noble Rot (*Botrytis cinerea*) Infection during Postharvest Withering Changes the Metabolome of Grapevine Berries (*Vitis vinifera* L., cv. Garganega). *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1002. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01002>
- Ngo, H. X., Garneau-Tsodikova, S., & Green, K. D. (2016). A complex game of hide and seek: The search for new antifungals. *MedChemComm*, *7*(7), 1285–1306. <https://doi.org/10.1039/C6MD00222F>
- Nielsen, E. I., & Friberg, L. E. (2013). Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Antibacterial Drugs. *Pharmacological Reviews*, *65*(3), 1053–1090. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005769>
- Noguerol-Pato, R., Fernández-Cruz, T., Sieiro-Sampedro, T., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Cilla-García, D.-A., García-Pastor, M., Martínez-Soria, M.-T., Sanz-Asensio, J., & Simal-Gándara, J. (2016). Dissipation of Fungicide Residues during Winemaking and Their Effects on Fermentation and the Volatile Composition of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05187>
- Noguerol-Pato, R., Sieiro-Sampedro, T., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2014). Effect on the Aroma Profile of Graciano and Tempranillo Red Wines of the Application of Two Antifungal Treatments onto Vines. *Molecules*, *19*(8), 12173–12193. <https://doi.org/10.3390/molecules190812173>
- Oliva, J., Martínez-Gil, A. M., Lorenzo, C., Cámara, M. A., Salinas, M. R., Barba, A., & Garde-Cerdán, T. (2015). Influence of the use of fungicides on the volatile composition of Monastrell red wines obtained from inoculated fermentation. *Food Chemistry*, *170*, 401–406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.056>
- Oliver, C. (2016). *Investigation of Wine Grape Cultivar and Cluster Developmental Stage Susceptibility to Grape Ripe Rot Caused by Two Fungal Species Complexes, Colletotrichum gloeosporioides, and C. acutatum, and the Evaluation of Potential Controls*. Virginia Tech.
- Oliveri, V., & Vecchio, G. (2016). 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *120*, 252–274.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.007>

- Oo, M. M., & Oh, S.-K. (2017). Identification and Characterization of New Record of Grape Ripe Rot Disease Caused by *Colletotrichum viniferum* in Korea. *Mycobiology*, 45(4), 421–425. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.421>
- Ouda, S. M. (2014). Antifungal Activity of Silver and Copper Nanoparticles on Two Plant Pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology*, 9(1), 34–42. <https://doi.org/10.3923/jm.2014.34.42>
- PARA, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. (2015). *Lista de Referência de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para as culturas do PARA*. <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>.
- Pedrotti, C., Marcon, Â. R., Delamare, A. P. L., Echeverrigaray, S., Silva Ribeiro, R. T., & Schwambach, J. (2019). Alternative control of grape rots by essential oils of two Eucalyptus species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6552–6561. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9936>
- Peltier, E., Bernard, M., Trujillo, M., Prodhomme, D., Barbe, J.-C., Gibon, Y., & Marullo, P. (2018). Wine yeast phenomics: A standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions. *PLOS ONE*, 13(1), e0190094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190094>
- Peña, N., Antón, A., Kamilaris, A., & Fantke, P. (2018). Modeling ecotoxicity impacts in vineyard production: Addressing spatial differentiation for copper fungicides. *Science of The Total Environment*, 616–617, 796–804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.243>
- Pérez, D., Jaehde, I., Guillamón, J. M., Heras, J. M., & Querol, A. (2021). Screening of *Saccharomyces* strains for the capacity to produce desirable fermentative compounds under the influence of different nitrogen sources in synthetic wine fermentations. *Food Microbiology*, 97, 103763. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103763>
- Perrone, G. G., Tan, S.-X., & Dawes, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(7), 1354–1368. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.023>
- Pippi, B., Joaquim, A. R., Lopes, W., Machado, G. R. M., Bergamo, V. Z., Giuliani, L. M., Abegg, M. A., Cruz, L., Vainstein, M. H., Fuentesfria, A. M., & Andrade, S. F. (2020). 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonamides are promising antifungal candidates for the topical treatment of dermatomycosis. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 1038–1049. <https://doi.org/10.1111/jam.14545>
- Pippi, B., Joaquim, A. R., Merkel, S., Zanette, R. A., Nunes, M. E. M., da Costa Silva, D. G., Schimith, L. E., Teixeira, M. L., Franco, J. L., Fernandes de Andrade, S., & Fuentesfria, A. M. (2021). Antifungal activity and toxicological parameters of 8-hydroxyquinoline-5-sulfonamides using alternative animal models. *Journal of Applied Microbiology*, 130(6), 1925–1934. <https://doi.org/10.1111/jam.14915>
- Pippi, B., Lopes, W., Reginatto, P., Silva, F. É. K., Joaquim, A. R., Alves, R. J., Silveira, G. P., Vainstein, M. H., Andrade, S. F., & Fuentesfria, A. M. (2019). New insights into the

- mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.017>
- Pippi, B., Reginatto, P., Machado, G. da R. M., Bergamo, V. Z., Lana, D. F. D., Teixeira, M. L., Franco, L. L., Alves, R. J., Andrade, S. F., & Fuentefria, A. M. (2017). Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. *Medical Mycology*, 55(7), 763–773. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx003>
- Polanski, J., Niedbala, H., Musiol, R., Podeszwa, B., Tabak, D., Palka, A., Mencil, A., Finster, J., Mouscadet, J., & Bret, M. (2006). 5-Hydroxy-6-Quinaldic Acid as a Novel Molecular Scaffold for HIV-1 Integrase Inhibitors. *Letters in Drug Design & Discovery*, 3(3), 175–178. <https://doi.org/10.2174/157018006776286934>
- Popa, E. O., & Roşca, I. (2011). Main trends of the pests management in agroecosystems of grapevine plantations. *Scientific Papers Series : Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, 11, 146-50.
- Prachayasittikul, V., Chan-On, W., Nguyen Thi Bich, H., Songtawee, N., Suwanjang, W., & Prachayasittikul, S. (2015). Quinoline-based clioquinol and nitroxoline exhibit anticancer activity inducing FoxM1 inhibition in cholangiocarcinoma cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 2033. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S79313>
- R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>
- Rbaa, M., Benhiba, F., Obot, I. B., Oudda, H., Warad, I., Lakhrissi, B., & Zarrouk, A. (2019). Two new 8-hydroxyquinoline derivatives as an efficient corrosion inhibitors for mild steel in hydrochloric acid: Synthesis, electrochemical, surface morphological, UV-visible and theoretical studies. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.104>
- Regueiro, J., López-Fernández, O., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015). 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*, 55(6), 839–863. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.677872>
- Rosignol, T., Dulau, L., Julien, A., & Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, 20(16), 1369–1385. <https://doi.org/10.1002/yea.1046>
- Ruiz, M. C., Resasco, A., Di Virgilio, A. L., Ayala, M., Cavaco, I., Cabrera, S., Aleman, J., & León, I. E. (2019). In vitro and in vivo anticancer effects of two quinoline–platinum(II) complexes on human osteosarcoma models. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 83(4), 681–692. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03773-x>
- Russo, P., Berbegal, C., De Ceglie, C., Grieco, F., Spano, G., & Capozzi, V. (2019). Pesticide Residues and Stuck Fermentation in Wine: New Evidences Indicate the Urgent Need of Tailored Regulations. *Fermentation*, 5(1), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010023>
- Sadoughi, N., Schmidtke, L. M., Antalick, G., Blackman, J. W., & Steel, C. C. (2015). Gas

- Chromatography–Mass Spectrometry Method Optimized Using Response Surface Modeling for the Quantitation of Fungal Off-Flavors in Grapes and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(11), 2877–2885. <https://doi.org/10.1021/jf505444r>
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9031-3>
- Sarris, D., Kotseridis, Y., Linga, M., Galiotou-Panayotou, M., & Papanikolaou, S. (2009). Enhanced ethanol production, volatile compound biosynthesis and fungicide removal during growth of a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* strain on enriched pasteurized grape musts. *Engineering in Life Sciences*, 9(1), 29–37. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800059>
- Sashidhara, K. V., Kumar, A., Bhatia, G., Khan, M. M., Khanna, A. K., & Saxena, J. K. (2009). Antidyslipidemic and antioxidative activities of 8-hydroxyquinoline derived novel keto-enamine Schiffs bases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(4), 1813–1818. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.08.004>
- Satapathy, R., & Beura, S. (2019). Fungicidal management of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) causing cashew anthracnose. *International Journal of Chemical Studies*, 7(3), 1219-1221.
- Scariot, F. J., Jahn, L. M., Delamare, A. P. L., & Echeverrigaray, S. (2016a). The effect of the fungicide captan on *Saccharomyces cerevisiae* and wine fermentation. *BIO Web of Conferences*, 7, 02027. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20160702027>
- Scariot, F. J., Jahn, L. M., Maianti, J. P., Delamare, A. P. L., & Echeverrigaray, S. (2016b). The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. *Apoptosis*, 21(7), 866–872. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1251-4>
- Scariot, F. J., Jahn, L., Delamare, A. P. L., & Echeverrigaray, S. (2017). Necrotic and apoptotic cell death induced by Captan on *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(8), 159. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2325-3>
- Schueuermann, C., Steel, C. C., Blackman, J. W., Clark, A. C., Schwarz, L. J., Moraga, J., Collado, I. G., & Schmidtke, L. M. (2019). A GC–MS untargeted metabolomics approach for the classification of chemical differences in grape juices based on fungal pathogen. *Food Chemistry*, 270, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.057>
- Serrao, E., Debnath, B., Otake, H., Kuang, Y., Christ, F., Debyser, Z., & Neamati, N. (2013). Fragment-Based Discovery of 8-Hydroxyquinoline Inhibitors of the HIV-1 Integrase–Lens Epithelium-Derived Growth Factor/p75 (IN–LEDGF/p75) Interaction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(6), 2311–2322. <https://doi.org/10.1021/jm301632e>
- Sieiro-Sampedro, T., Alonso-del-Real, J., Briz-Cid, N., Rial-Otero, R., Querol, A., & Simal-Gandara, J. (2020). The effect of two antifungal commercial formulations on the metabolism of a commercial *Saccharomyces cerevisiae* strain and their repercussion

- on fermentation evolution and phenylalanine catabolism. *Food Microbiology*, 92, 103554. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103554>
- Silva, G. A. da, Bernardi, T. L., Schaker, P. D. C., Agustini, B. C., Mello, L. M. de, & Valente, P. (2016). Impact of Fungicide Residues on Polymerase Chain Reaction and on Yeast Metabolism. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59(0). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160241>
- Smith, B. J., Wedge, D. E., & Pace, P. F. (2013). A Microtiter Assay Shows Effectiveness of Fungicides for Control of *Colletotrichum* sp. From Strawberry. *International Journal of Fruit Science*, 13(1–2), 205–216. <https://doi.org/10.1080/15538362.2012.698171>
- Souza, L. M., Chaves, M. A., Joaquim, A. R., Gionbelli, M. P., Gava, A., Fiorentin, J., Ficagna, E., Almança, M. A. K., Teixeira, M. L., Andrade, S. F., & Fuentefria, A. M. (2021). The efficacy of 8-hydroxyquinoline derivatives in controlling the fungus *Ilyonectria liriodendri*, the causative agent of black foot disease in grapevines. *Journal of Applied Microbiology*, 131(3), 1440–1451. <https://doi.org/10.1111/jam.15035>
- Specht, G. (2010). Yeast fermentation management for improved wine quality. In *Managing Wine Quality* (p. 3–33). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845699987.1.3>
- Spolti, P., Jorge, B. C. de, & Del Ponte, E. M. (2012). Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides. *Tropical Plant Pathology*, 37(6), 419–423. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000600007>
- Steel, C. C., Blackman, J. W., & Schmidtke, L. M. (2013). Grapevine Bunch Rots: Impacts on Wine Composition, Quality, and Potential Procedures for the Removal of Wine Faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5189–5206. <https://doi.org/10.1021/jf400641r>
- Steel, C. C., Greer, L. A., & Savocchia, S. (2007). Studies on *Colletotrichum acutatum* and *Greeneria uvicola*: Two fungi associated with bunch rot of grapes in sub-tropical Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(1), 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2007.tb00068.x>
- Steel, C. C., Greer, L. A., & Savocchia, S. (2012). Grapevine inflorescences are susceptible to the bunch rot pathogens, *Greeneria uvicola* (bitter rot) and *Colletotrichum acutatum* (ripe rot). *European Journal of Plant Pathology*, 133(3), 773–778. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9957-9>
- Steel, C. C., Schwarz, L. J., Qiu, Y., Schueuermann, C., Blackman, J. W., Clark, A. C., & Schmidtke, L. M. (2020). Thresholds for *Botrytis* bunch rot contamination of Chardonnay grapes based on the measurement of the fungal sterol, ergosterol. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 26(1), 79–89. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12417>
- Stevens, S., & Hofmeyr, J.-H. (1993). Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx of protons through the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(5). <https://doi.org/10.1007/BF00182806>

- Su, H., Han, L., & Huang, X. (2018). Potential targets for the development of new antifungal drugs. *The Journal of Antibiotics*, 71(12), 978–991. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0100-9>
- Suwanjang, W., Prachayasittikul, S., & Prachayasittikul, V. (2016). Effect of 8-hydroxyquinoline and derivatives on human neuroblastoma SH-SY5Y cells under high glucose. *PeerJ*, 4, e2389. <https://doi.org/10.7717/peerj.2389>
- Szopinska, A., Christ, E., Planchon, S., König, H., Evers, D., & Renaut, J. (2016). Stuck at work? Quantitative proteomics of environmental wine yeast strains reveals the natural mechanism of overcoming stuck fermentation. *Proteomics*, 16(4), 593–608. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500225>
- Thangadurai, D., Sangeetha, J., & Prasad, R. (Orgs.). (2020). *Nanotechnology for Food, Agriculture, and Environment*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-31938-0>
- Thomidis, T., Zioziou, E., Koundouras, S., Karagiannidis, C., Navrozidis, I., & Nikolaou, N. (2016). Effects of nitrogen and irrigation on the quality of grapes and the susceptibility to Botrytis bunch rot. *Scientia Horticulturae*, 212, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.036>
- Togores, J. H. (2018). *Tratado de enología*. Mundi-Prensa Libros.
- Upadhayay, J., Rana, M., Juyal, V., Bisht, S. S., & Joshi, R. (2020). Impact of Pesticide Exposure and Associated Health Effects. In P. K. Srivastava, V. P. Singh, A. Singh, D. K. Tripathi, S. Singh, S. M. Prasad, & D. K. Chauhan (Orgs.), *Pesticides in Crop Production* (1^o ed, p. 69–88). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119432241.ch5>
- Urkude, R., Dhurvey, V., & Kochhar, S. (2019). Pesticide Residues in Beverages. In *Quality Control in the Beverage Industry* (p. 529–560). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816681-9.00015-1>
- Vignault, A., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Fermaud, M., Roudet, J., Zamora, F., & Teissedre, P.-L. (2020). Oenological tannins to prevent Botrytis cinerea damage in grapes and musts: Kinetics and electrophoresis characterization of laccase. *Food Chemistry*, 316, 126334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126334>
- Villa-Rivera, M. G., Conejo-Saucedo, U., Lara-Marquez, A., Cano-Camacho, H., Lopez-Romero, E., & Zavala-Paramo, M. G. (2017). The role of virulence factors in the pathogenicity of *Colletotrichum* sp. *Current Protein and Peptide Science*, 18(10), 1005–1018.
- Völgyi, G., Ruiz, R., Box, K., Comer, J., Bosch, E., & Takács-Novák, K. (2007). Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system. *Analytica Chimica Acta*, 583(2), 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.10.015>
- Wang, Q.-H., Fan, K., Li, D.-W., Han, C.-M., Qu, Y.-Y., Qi, Y.-K., & Wu, X.-Q. (2020). Identification, Virulence and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* s.s. Responsible for Walnut Anthracnose Disease in China. *Plant Disease*, 104(5), 1358–1368. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2569-RE>

- Wang, X., Zhao, Z., Chen, Q., & Hongbo, S. (2019). Identification of control agents against melon wilt disease in laboratory and field in NE China. *Pakistan Journal of Botany*, 51(2). [https://doi.org/10.30848/PJB2019-2\(42\)](https://doi.org/10.30848/PJB2019-2(42))
- Wang, Y., Li, P., Zhen, H., & Li, B. (2017). The promotion of thiophanate-methyl and tebuconazole for the continuous control of *Glomerella* leaf spot in apple leaves by adding pellouxite as a synergistic reagent. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(6), 631–639. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0102-z>
- Welke, J. E. (2019). Fungal and mycotoxin problems in grape juice and wine industries. *Current Opinion in Food Science*, 29, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.009>
- Whitelaw-Weckert, M. A., Curtin, S. J., Huang, R., Steel, C. C., Blanchard, C. L., & Roffey, P. E. (2007). Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia: Phylogeny of *C. acutatum* isolates from Australian grapes. *Plant Pathology*, 56(3), 448–463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01569.x>
- Würz, D. A., Brighenti, A. F., Allebrandt, R., Marcon Filho, J. L., Bem, B. P. de, Araújo Filho, J. V., Rufato, L., & Kretzschmar, A. A. (2017). Desfolha precoce como estratégia de controle da podridão de *Botrytis cinerea* na videira Cabernet Sauvignon em regiões de altitude. *Summa Phytopathologica*, 43(2), 111–117. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/169870>
- Yang, Q.-Y., Cao, Q.-Q., Qin, Q.-P., Deng, C.-X., Liang, H., & Chen, Z.-F. (2018). Syntheses, Crystal Structures, and Antitumor Activities of Copper(II) and Nickel(II) Complexes with 2-((2-(Pyridin-2-yl)hydrazono)methyl)quinolin-8-ol. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1874. <https://doi.org/10.3390/ijms19071874>
- Yin, X.-D., Ma, K.-Y., Wang, Y.-L., Sun, Y., Shang, X.-F., Zhao, Z.-M., Wang, R.-X., Chen, Y.-J., Zhu, J.-K., & Liu, Y.-Q. (2020). Design, Synthesis, and Antifungal Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Metal Complexes against Phytopathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(40), 11096–11104. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01322>
- Yin, X.-D., Sun, Y., Lawoe, R. K., Yang, G.-Z., Liu, Y.-Q., Shang, X.-F., Liu, H., Yang, Y.-D., Zhu, J.-K., & Huang, X.-L. (2019). Synthesis and anti-phytopathogenic activity of 8-hydroxyquinoline derivatives. *RSC Advances*, 9(52), 30087–30099. <https://doi.org/10.1039/C9RA05712A>
- Zapparoli, G., Lorenzini, M., Tosi, E., Azzolini, M., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Simonato, B. (2018). Changes in chemical and sensory properties of Amarone wine produced by *Penicillium* infected grapes. *Food Chemistry*, 263, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.110>
- Zara, S., Caboni, P., Orro, D., Farris, G. A., & Angioni, A. (2011). Influence of fenamidone, indoxacarb, pyraclostrobin, and deltamethrin on the population of natural yeast microflora during winemaking of two sardinian grape cultivars. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46(6), 491-497. <https://doi.org/10.1080/03601234.2011.583869>
- Ždralević, M., Guaragnella, N., Antonacci, L., Marra, E., & Giannattasio, S. (2012). Yeast

- as a Tool to Study Signaling Pathways in Mitochondrial Stress Response and Cytoprotection. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1100/2012/912147>
- Zhang, C.-Q., Zhang, Y., & Zhu, G. N. (2008). The mixture of kresoxim-methyl and boscalid, an excellent alternative controlling grey mould caused by *Botrytis cinerea*. *Annals of Applied Biology*, 153(2), 205-213. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00248.x>
- Zhang, H.-R., Liu, Y.-C., Chen, Z.-F., Meng, T., Zou, B.-Q., Liu, Y.-N., & Liang, H. (2016). Studies on the structures, cytotoxicity and apoptosis mechanism of 8-hydroxylquinoline rhodium(III) complexes in T-24 cells. *New Journal of Chemistry*, 40(7), 6005–6014. <https://doi.org/10.1039/C6NJ00182C>
- Zhang, S., Li, D., Song, Z., Zang, C., Zhang, L., Song, X., & Li, S. (2017). “Carbon Assimilation” Inspired Design and Divergent Synthesis of Drimane Meroterpenoid Mimics as Novel Fungicidal Leads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(41), 9013–9021. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03126>
- Zimdars, S., Hitschler, J., Schieber, A., & Weber, F. (2017). Oxidation of Wine Polyphenols by Secretomes of Wild *Botrytis cinerea* Strains from White and Red Grape Varieties and Determination of Their Specific Laccase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10582–10590. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04375>
- Zoecklein, B. (1998). *MÉTHODE CHAMPENOISE PRODUCTION*. p. 30.
- Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J. J., Rohr, J., Scharmüller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schulz, R., & Schäfer, R. B. (2019). Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science & Technology*, 53(7), 3347–3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>
- Zuniga, A. I., Oliveira, M. S., Rebello, C. S., & Peres, N. A. (2020). Baseline Sensitivity of *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry to Isofetamid Compared to other SDHIs. *Plant Disease*, 104(4), 1224–1230. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1140-RE>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>

9. APÊNDICES

9.1. Artigo 1

O artigo intitulado “Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine production– A review” foi aceito e encontra-se publicado em Food Additives & Contaminants: Part A na qualidade de “Artigo de Revisão”. O seu uso nesta dissertação foi autorizado e está sob os termos contidos no Anexo 2.

Este é o manuscrito original do autor de um artigo publicado pelo grupo Taylor & Francis em Food Additives & Contaminants: Part A disponível online em <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1894357>.

This is an Author’s Original Manuscript of an article published by Taylor & Francis Group in Food Additives & Contaminants: Part A available online at <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1894357>.

**Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine
production – a review**

Angelo Gava^{a,*}, Cassandro Davi Emer^b, Evandro Ficagna^c Saulo Fernandes de
Andrade^{a,d}, Alexandre Meneghello Fuentefria^{a,d}

^a*Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

^b*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brazil.*

^c*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS, Brazil.*

^d*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

*** Corresponding author:** Laboratório de Microbiologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 2752, Porto Alegre, 90160-093, RS, Brazil. Email: angelo.gava@ufrgs.br.

Review of the effect of fungicide residues on the fermentation of wine

ABSTRACT

Continuous fungicide spraying is required to rid grapes fungal pathogens. However, this practice is associated with several risks, including contamination and environmental imbalance, as well as toxicity to operators and the induction of resistance in pathogens. In addition, a strong correlation between the presence of fungicides and the occurrence of issues during alcoholic fermentation has been reported, resulting in negative impacts to the sensory quality of the final products. Numerous studies have evaluated the residual concentrations of phytosanitary products in grapes, juices, and wines, and a significant number of studies have assessed the impact of different agrochemicals on bioprocesses. However, a review compiling the key results of these studies is currently lacking. This review incorporates the results obtained by research in the last decade on the residual presence of a wide range of fungicides and their impact on fermentation kinetics. Practical solutions to mitigate these problems, both in vineyards and industry, are also presented and discussed. Our review highlights the fact that the concentrations of fungicidal agents remain high throughout the winemaking process, with their residual impacts being of particular concern, especially with regards to their effect on yeast activity and the fermentation process. Thus, the adoption of methodologies that allow winemakers to control and trace these residuals is an important step in avoiding or reducing fermentation problems throughout the winemaking process.

Keywords: fermentation kinetics; agrochemical residuals; grape juice; wine; yeast.

1. Introduction

Wine production is a global activity that generates billions of dollars each year (Brostrom 2008). This industry has gained in economic value in recent years thanks to a rise in international trade and the emergence of technological innovations in the production, storage, and logistics of winemaking (Daane *et al.* 2018). However, due to the high geographical density of wine production, grape production is significantly susceptible to the detrimental effects of fungi and insects (Ciliberti *et al.* 2015). Phytopathogens, such as downy mildew (*Plasmopara viticola*) and rotting caused by *Botrytis cinerea*, *Greeneria uvicola*, and *Glomerella cingulata*, have a significant impact on the production and quality of grapes (De Simone *et al.* 2020). In the Serra Gaúcha (Brazil), the most frequent and harmful agents are gray mold (*Botrytis cinerea*) and ripe grape rot caused by *Glomerella cingulata* (Pedrotti *et al.* 2019).

Among the technologies and methodologies available for the treatment of phytopathogenies, the main form of control is through the use of agrochemicals (Fisher *et al.* 2012; Wang *et al.* 2017). The control of fungal attacks is directly linked to the routine application of fungicides; thus, grape growers invest significantly in these agents (Brink *et al.* 2016). However, these use of fungicides is problematic because of their environmental impacts (Peña *et al.* 2018), the risks they pose on the health of grape growers (Upadhayay *et al.* 2020), and the emergence of resistant fungal strains (Leroch *et al.* 2011; Hu *et al.* 2016), as well as concerns about fungicide residues finding their way into the final products, including juices and wines (Edder *et al.* 2009; González-Rodríguez *et al.* 2011b; Noguerol-Pato *et al.* 2016).

In addition to the risks posed to human health by agrochemical residuals, they can also be a source of inconvenience to the wine industry (Oliva *et al.* 2015; Regueiro *et al.* 2015; Briz-Cid *et al.* 2018). The presence of fungicides can lead to problems during the fermentation of grape must (Noguerol-Pato *et al.* 2016). This is one of the main challenges in wine production (Freire *et al.* 2017; Vargas *et al.* 2018) and causes economic losses and a reduced sensory

quality of the products (González-Rodríguez *et al.* 2011b; Russo *et al.* 2019). In rural environments, a large number of practices mitigating these issues emerge each year, including integrated pest management programs, which aim to minimize the health and environmental impacts of fungicides (Crump *et al.* 2018), as well as imposing pre-harvest safety limits (Urkude *et al.* 2019). Although these actions help to reduce the amounts of agrochemicals used and thereby the risks posed to consumer health, they do not guarantee the absence of chemical residues in grapes and do not take into consideration their possible effects on the microbiological processes of the industry.

The search for alternatives with lower impacts on the industrial processes and the environment has intensified in recent decades (Fravel 2005; Jensen *et al.* 2016). Recent studies have focused on the potential of biofungicides, promoting the wide use of products based on *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* for the control of rotting in grapes (Hao *et al.* 2017; Calvo-Garrido *et al.* 2018; Abbey *et al.* 2019). Furthermore, the development of strategies for the removal of anti-fungic agents from must and wine in wineries has been evaluated by several studies (Noguerol-Pato *et al.* 2016; Doulia *et al.* 2017, 2018).

In the last decade, various studies quantified the concentration of fungicides found in grapes and their derivatives. In addition, a series of studies have evaluated the effect of different fungicide residues on wine fermentation.

In order to provide new perspectives on the presence of fungicides in grapes and their impact on the production and quality of juices and wines, this review describes the main fungicide agents found in grapes and their derivatives, and provides an overview of their impacts on alcoholic fermentation. In addition, strategies that are currently being implemented by producers to mitigate this problem in the wine production chain are also presented.

2. Methods

2.1. Data source

The search for articles related to fungicides in grapes, juices, musts, and wines was based on a term search in the database using both original and review articles. Using the combination of binary operators, the terms “grape” and “fungicide” were required in the title, abstract, or the keywords, in addition to the presence of one of the terms referring to grape derivatives (“juice”, “must”, or “wine”) in the keywords. Articles were also required to have a year of publication after 2009.

The search resulted in a total of 143 articles. The references of the selected articles were analyzed to identify any other relevant publications.

2.2. Selection Criteria

Subsequently, based on the papers found, studies that presented the concentrations of antifungal residues in grapes, juices (must), and wines and/or to evaluate the impact of residues of different fungicidal agents on alcoholic fermentation or yeast activity were adopted as selection criteria.

Ultimately, 53 research articles were selected based on the criterion adopted, namely those presenting concentrations of the agents in grapes and derivatives and/or observations on the impact on fermentation.

2.3. Data analysis

Statistical analysis was performed using R (version 3.6.3) (R Core Team 2019). Graphics were created using the ggplot2 package (Wickham 2016).

3. Presence of fungicides in grapes and their derivatives

The problems associated with rotting grapes has encouraged the use of fungicides near the harvest period and limits the options to a small number of registered products (Pedrotti *et al.* 2019). The E3 fungicide class (dicarboximides), which includes clozolate,

dimethacrylone, iprodione, procymidone, and vinclozolin, is often reported and has been extensively applied against *B. cinerea* globally (González-Domínguez *et al.* 2019). According to Wang *et al.* (2020), difenoconazole and flusilazole, both of which belong to the triazole group (G1), are effective and widely used for the control of the fungi responsible for ripe rot. In Brazil, 319 grape samples were analyzed between 2017 and 2018, and difenoconazole was the most frequently found fungicide in 70 samples, while tebuconazole was detected in 42 samples (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2019).

Based on the selection, 32 articles presented results about the residual concentration of at least one fungicide (Cadež *et al.* 2010; Carpinteiro *et al.* 2010; Bordagaray *et al.* 2011,2013; González-Rodríguez *et al.* 2011b; Hjorth *et al.* 2011; Martins *et al.* 2011,2012; González Álvarez *et al.* 2012; Lagunas-Allué *et al.* 2012; López-Fernández *et al.* 2012; Eissa *et al.* 2013; Schmidt *et al.* 2013; Vaquero-Fernández *et al.* 2013; Alves *et al.* 2014; Celeiro *et al.* 2014; Kundu *et al.* 2014; Sabale *et al.* 2014; Baša Cesnik *et al.* 2015, 2016; Mulero *et al.* 2015; Uclés *et al.* 2015; Esteve-Turrillas *et al.* 2016; Lu *et al.* 2016; Castro *et al.* 2018; Oliva *et al.* 2018; Vargas *et al.* 2018; Briz-Cid *et al.* 2019; Hummes *et al.* 2019; Vallejo *et al.* 2019; Hou *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2020), while the other selected articles evaluated the effects on fermentation kinetics. The frequencies of articles that investigated the presence of each compound in the last 10 years are presented in Figure 1. Only the compounds that were reported in more than 2 articles are shown. Boscalid, cyprodinil, fenhexamid, tebuconazole, and azoxystrobin compounds were reported in 9 or more papers, followed by fludioxonil in 8, while the concentrations of myclobutanil, mandipropamid, iprovalicarb, dimethomorph, and carbendazim were presented in 6 papers.

Based on the selected literature, the amounts of residual fungicides found in grapes ranged from 0.01 to 38 mg kg⁻¹, whereas in grape juice or must they ranged from 0.0038 to 34.56 mg L⁻¹, while in wine they ranged from 0.00043 to 5.99 mg L⁻¹. Figures 2 and 3 show the

kernel density estimation curves for the maximum concentrations of fungicides quantified in grapes, which represent the probability density function. For better visualization, the compounds found were grouped according to their respective FRAC Mode of Action, determined by FRAC (2018).

Most of the fungicides listed had a maximum residual concentration between 0.25 and 0.75 mg kg⁻¹ (Figure 2), with boscalid and difenoconazole compounds being the most frequent. In addition, a higher frequency of the iprodione compound was found to be close to 1 mg kg⁻¹.

As shown in Figure 3, six compounds were found with maximum concentrations between 1 and 10 mg kg⁻¹, where the compounds dithiocarbamate, boscalid and pyraclostrobin were the most frequent. The compound that appears in the highest concentrations was folpet, which was quantified in a residual concentration of up to 6 mg kg⁻¹ by Baša Cesnik *et al.* (2015).

Two studies identified fungicides in grapes at residual concentrations above 10 mg kg⁻¹. In these studies, R-(-)-benalaxyl and S-(+)-benalaxyl compounds ranged from 5 to 38 mg kg⁻¹ (Lu *et al.* 2016), tebuconazole from 15.9 to 37.2 mg kg⁻¹ (Bordagaray *et al.* 2013), and myclobutanil from 8.7 to 23.9 mg kg⁻¹ (Bordagaray *et al.* 2013). In addition, Briz-Cid *et al.* (2019) quantified levels of 10 mg kg⁻¹ for iprovalicarb and mepanipyrim.

Regarding the presence of fungicides in grape juice or must, the articles selected reported the presence of 8 different active principles with concentrations higher than 2 mg L⁻¹. Figure 4 shows the concentration ranges for these compounds. Quintozene was the active ingredient found at the highest concentration, with levels higher than 30 mg L⁻¹, followed by tebuconazole with an interval between 10 and 20 mg L⁻¹. Of the remaining compounds, famoxadone was present at the lowest concentration. The maximum concentrations of copper, pyrimethanil, and dithianon were approximately 10 to 15 mg L⁻¹, while dithiocarbamate and iprovalicarb were close to 5 mg L⁻¹.

In wines, the ranges of concentrations determined by the literature are illustrated in Figure 5, where only compounds with a maximum concentration exceeding 0.5 mg L^{-1} are represented. Our survey found 17 agents reported with a concentration superior to 0.5 mg L^{-1} . However, unlike juices, a smaller concentration range was observed, except for iprovalicarb, which Briz-Cid *et al.* (2019) quantified at 5.99 mg L^{-1} . Pyrimethanil was identified at a maximum concentration of 2.4 mg L^{-1} by Vaquero-Fernández *et al.* (2013). In addition, 7 other compounds (carbendazim, zinc, dimethomorph, copper, metalaxyl-M, azoxystrobin, and ametoctradin) were present at concentrations higher than 1.0 mg L^{-1} in wines. This value is, in most cases, the maximum limit for the presence of these compounds in food under several legislations (Caboni and Cabras 2010; Brasil 2015; European Food Safety Authority 2015).

Our selection of articles on fungicide residues shows that there is a higher concentration of these compounds in grapes than in juices and grape must, and that these have higher concentrations compared to wines. Recent studies have confirmed the dissipation of phytosanitary products throughout the winemaking process (Sabale *et al.* 2014; Noguerol-Pato *et al.* 2016; Briz-Cid *et al.* 2019), and several studies in the literature have highlighted the importance of must and wine clarification for the removal or reduction of residues in the products (Sen *et al.* 2012; Urkude *et al.* 2019). These studies explain why our review found a reduction in the residual rate of grapes compared to must and juices, since the clarification process is widely adopted.

Several studies have also reported on the high absorption power of yeasts, which are responsible for the high removal of fungicides from the must (Bizaj *et al.* 2014; Capece *et al.* 2018; Urkude *et al.* 2019). These investigations explain the results presented here, which show lower concentrations of fungicides in bioprocessed products. In addition, alcoholic fermentation may explain the considerable decrease in agents present in the must and not found, or found in lower amounts, in wines.

4. Effect of fungicide residues on the alcoholic fermentation of wine

The elaboration of wines is composed of several operations and practices that aim to transform the grape must into wine (Berbegal *et al.* 2017). Different conditions in the environment can lead to different biological routes, resulting in a variety of products with different composition. The transformation of sugar-rich must into an alcoholic beverage is a complex biochemical process in which yeasts, bacteria and other microorganisms intervene and interact (Liu *et al.* 2017). Among them, yeasts, especially *Saccharomyces cerevisiae*, are the main microorganisms in winemaking as they are responsible for alcoholic fermentation, the main bioprocess in the conversion of must into wine.

One of the biggest problems faced in winemaking is the interruption of alcoholic fermentation (Blateyron and Sablayrolles 2001; Capozzi *et al.* 2017; Russo *et al.* 2019), which can result in wines with more than the adequate amount of sugars, and above all, significantly increase microbial risks, such as the possibility of contamination by lactic acid bacteria on the residual sugars in the medium. The reduction of metabolic activity of yeasts can cause a spontaneous cessation of fermentation and several factors (physical, biological, or chemical) can be responsible for causing this phenomenon (Bisson 1999). Although there are several solutions available and a constant scientific progress, each year the fermentation interruptions generate economic losses for the wine industry (Maisonnave *et al.* 2013; Szopinska *et al.* 2016; Russo *et al.* 2019).

Fungicide residues can result in the formation of undesirable volatile compounds (Capece *et al.* 2018; Briz-Cid *et al.* 2019), as well as being toxic to yeast and impacting the fermentation kinetics, even causing stuck fermentation (Russo *et al.* 2019). The active principles of sulfur- or chlorine-based fungicides have a significant negative effect on fermentation, such as folpet, captan, captafol, and tolifluanida (Togores 2018). Togores (2018) also reported that agents belonging to the family of triazoles or imidazoles, which act by

blocking the biosynthesis of ergosterol from phytopathogenic fungi, can have the same effect on enological yeasts.

Table 1 presents the research results of studies from the last decade that assessed the effect of fungicides on fermentation. The objective was to relate each antifungal compound to the behavior of enological yeasts, evaluated both in controlled environments and in synthetic or natural media.

Yeast cells respond differently to adverse conditions during the fermentation process, and stress situations can have an adverse effect on cell growth (Silva *et al.* 2016). The modification of the structure of yeast cells due to the presence of fungicides, such as membrane permeability, as well as adverse effects on cell organelles, may cause changes in the fermentation kinetics (Regueiro *et al.* 2015), resulting in an inefficient alcoholic fermentation process, with organoleptic and economic consequences (Urkude *et al.* 2019).

In general, all the fungicides investigated by the studies mentioned had a negative impact on the elaboration of wines, and in most cases, an effect on the fermentative kinetics was perceived. In addition, effects on the production of volatile acidity (Capece *et al.* 2018; Briz-Cid *et al.* 2019), reduction of ethanol content (Noguerol-Pato *et al.* 2014a; Capece *et al.* 2018; Castro-Sobrino *et al.* 2019), biofilm formation (Russo *et al.* 2019), reduction of microbial diversity (Cordero-Bueso *et al.* 2014; Escribano-Viana *et al.* 2018b), and changes in the cell structure of yeast (Scariot *et al.* 2018) have also been reported.

With the exception of fluopyram and triflumizole, all other compounds listed in the table as depreciators of fermentative kinetics were detected in the studies reported in this article. Most of these agents were quantified in high doses ($>1 \text{ mg L}^{-1}$) in wines, which demonstrates the capacity of these agents to last throughout the winemaking process.

Our research highlights that the presence of different fungicides can result in negative effects in the winemaking process. Although both control practices and legislation exist to limit

the amount of fungicide residues in food and beverages (maximum residual limits (MRLs)), these MRLs are based on studies regarding human toxicity (Caboni and Cabras 2010), and potential effects on bioprocesses are not considered. Thus, it would be interesting to reflect on the design of parameters that address this problem in the wine production chain, since recent studies have highlighted the need for regulations involving the effect of residuals on food bioprocessing (Russo *et al.* 2019).

On the other hand, although the potential of yeasts to absorb a significant portion of these compounds is well known (Bizaj *et al.* 2014; Capece *et al.* 2018; Urkude *et al.* 2019), the issues involving residuals should not be neglected and should be addressed by quality controls in the industry, since negative consequences have been evidenced. In addition, there are a number of unfermented products in winemaking, such as grape juices, in which there are no processes that promote this dissipation.

5. Alternatives to chemical fungicides

In recent decades, the search for fungicide alternatives with low environmental impacts and a proven efficacy in the control of the phytopathogens that damage grapes at the time of harvest has intensified. Recent studies have highlighted the potential of Biological Control Agents (BCAs) (Galvez *et al.* 2010; Nally *et al.* 2015; Hao *et al.* 2017; Leyva Salas *et al.* 2017; Calvo-Garrido *et al.* 2018, Pretscher *et al.* 2018; López-Seijas *et al.* 2020; Raveau *et al.* 2020), proven by the wide use of products based on *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp. for the control of *Botrytis cinerea* (Kasfi *et al.* 2018; Abbey *et al.* 2019; Chen *et al.* 2019; Zhou *et al.* 2020), which produces gray mold in grapes at harvest time, and studies of several yeast species (Nally *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2012; Parafati *et al.* 2015; Qin *et al.* 2015; Lemos Junior *et al.* 2016; Cordero-Bueso *et al.* 2017; Kasfi *et al.* 2018; Mewa-Ngongang *et al.* 2019). Additional biological agents are also actively being tested and studied, such as *Lachancea thermotolerans* (Nally *et al.* 2018).

Recent studies have assessed the impact of these biofungicides on the fermentation compared to conventional treatments. Nally *et al.* (2018) studied the effect of strains of *Lachancea thermotolerans* on the fermentation of wines, and concluded that the effect is dependent on the yeast strain, and may or may not affect the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* or the ethanol content in wines. Similarly, Escribano-Viana *et al.* (2018b) compared *B. subtilis* with fenhexamid, concluding that the biofungicide did not affect the fermentation rate, while only being slightly affected by the chemical agent. In addition, another recent study found that the presence of *B. subtilis* did not affect microbial diversity during the entire fermentation process (Escribano-Viana *et al.* 2018a).

6. Industrial processes: Strategies for fungicide removal from grape derivatives

In modern winemaking, the use of appropriate practices to mitigate problems during the process of transforming must into wine, such as the use of fining agents and technologies such as filtration, has intensified. In fact, a field of research is currently dedicated to the food safety of wines, with the aim of reducing of the concentration of pesticide residues, such as fungicides and insecticides, in the final products. Taken together, these studies have found that different fining agents can be used to remove a variety of undesirable compounds (Sen *et al.* 2012; Nicolini *et al.* 2016a,2016b, 2017; Doulia *et al.* 2017, 2018).

A recent study added 13 different fungicides (boscalid, cyprodinil, fludioxonil, fenhexamid, pyrimethanil, cyazofamid, dimethomorph, fluopicolide, iprovalicarb, metrafenone, penconazole, spiroxamine, and trifloxystrobin) to grape must with the aim of evaluating the potential of activated charcoal to remove these compounds. The results showed an average reduction of 30% in the contents in the must, and for most compounds, the reduction was significantly higher compared to the treatment without charcoal (Nicolini *et al.* 2016a).

González-Rodríguez *et al.* (2011a) concluded that fining with Bentonite promoted the elimination of approximately 93% of cyprodinil and 73% of famoxadone. Due to its ability to

absorb fermentation-inhibiting compounds, a significant role is attributed to this agent (Togores 2018). Furthermore, a recent study on white wine found that this additive is responsible for reducing the content of 10 pesticides by an average of approximately 8% (Doulia *et al.* 2017).

PVPP is a high-molecular weight vinylpyrrolidone polymer. Doulia *et al.* (2017) demonstrated the detoxifying action of this agent in a variety of pesticides, resulting in the removal of 17.3% of the studied phytosanitary products. One study previously demonstrated its potential to remove fungicides, including famoxadone, fluquinconazole, and trifloxystrobin, demonstrating a performance similar to charcoal (Oliva *et al.* 2007).

Other fining agents have been studied for the removal of various molecules in wines (Doulia *et al.* 2017, 2018). For example, egg albumin and isinglass were found to significantly reduced the content of pyrethroid (>50%) and procymidone (about 30%) compounds, while casein showed a 35% reduction in the concentration of hexaconazole in wines.

The application of these fining agents can also improve the fermentation kinetics. A faster fermentation process has already been reported in the presence of bentonite in must (Pocock *et al.* 2011), with some studies reporting on the beneficial effects of charcoal (Nicolini *et al.* 2016a, 2017; Gava *et al.*, 2020). In fact, when applied at a low dosage (50 mg L⁻¹), activated charcoal did not negatively affect the sensory quality of wines (Nicolini *et al.* 2017). In addition, recent research has shown that the combination of charcoal, bentonite, and PVPP results in an improvement in the maximum fermentation rate (Gava *et al.* 2020).

Several studies have highlighted the importance of wine filtration for fungicide removal. González-Rodríguez *et al.* (2011a) concluded that filtration was determining factor for the removal of boscalid, cyazofamid, cyprodinil, fludioxonil, mandipropamid, and valifenalate residues. Noguero-Pato *et al.* (2014b) found that no negative effect was observed on the fermentative activity when the filtration process was performed on musts treated with fungicides. These authors hypothesize that these residues are adsorbed together with the solid

particles of the must. However, one study reported that the removal of boscalid was not very efficient with the use of filtration, only decreasing the residual concentration of the compound in the wine by 7% (Lagunas-Allué *et al.* 2012).

7. Discussion

The present literature shows that several antifungal compounds remain along the entire wine industry chain. In fact, the residual concentrations found of some compounds, in grapes and their derivatives, are significant, and as this review shows, would have consequences in the processing of grapes, especially in alcoholic fermentation. In addition, a concern with the food safety of the wines produced must also be considered.

Although wine growers are highly dependent on the use of fungicides to protect the quality of grapes (Gianessi and Williams 2011; Gary *et al.* 2017), the excessive use of these phytosanitary products is the main reason for high concentrations of these chemical substances being present in grapes, musts, and wines. Some factors may be related to the use of these molecules in excess, among them we can highlight the very habit of the wine grower to believe that higher dosages are necessary, the ignorance of the available alternatives, impacts of chemicals and concepts of sustainability (Dhananjayan *et al.* 2020). In addition, we can cite the lack of control by the wine industries that acquire the grapes, as well as the legislation in some countries that have less strict rules regulating the use of pesticides and their maximum residual limits (MRLs). In fact, although there is a worldwide trend towards the search for food and beverage safety, reflected in the reduction of defensives and the use of alternative methodologies at the field level, some countries are moving in the opposite direction, making their regulations more flexible.

Our review presents available alternatives to mitigate the problem of fungicide residues, both in the field and in industry. However, the excessive use of fungicides in the vineyards

cannot be ignored just because there are tools in the industry capable of eliminating these molecules. Therefore, different factors must be taken into account for the adoption of measures to reduce fungicide spraying in the field, such as environmental impacts and the health of the operator, the emergence of resistance by fungi and the worldwide trend towards sustainable and organic products. Mitigation practices of the industry should be seen as a last available resource, and do not represent the best option to solve the existing problem throughout the chain. The solution to the problem must still be carried out at its origin.

Moreover, most of the products quantified in grapes were not found in must and wine, however, few studies reveal the route of degradation or biodegradation of these molecules, and the products formed are often unknown (Cabras *et al.* 1983; Jiménez *et al.* 2007; González-Rodríguez *et al.* 2011a), as well as their impacts on consumer health.

As for the available biofungicides and other alternative antifungal products, although in some cases it is evident that conventional fungicides have a superior efficacy for the control of fungal diseases in vines, a new perspective regarding the application of these traditional products should be addressed. Our review demonstrates that conventional fungicides impact on yeast activity during alcoholic fermentation, although it was not the objective of this review, several studies also highlight the negative effect of these residuals on the volatile composition of wines (Noguerol-Pato *et al.* 2014a, 2014b, 2016; Briz-Cid *et al.* 2018; Castro-Sobrino *et al.* 2019; Sieiro-Sampedro *et al.* 2020). Thus, the wine producers should consider the best alternative for wine production: working with musts with fungicide residues, and obtaining wines possibly impacted by these molecules; or vinification of grapes slightly affected by fungal diseases, having for a product free or with lower values of residues of phytosanitary products.

8. Conclusions

The articles discussed in this review outline the problems posed by fungicide residues found in grapes and their derivatives. High concentrations of several agrochemical agents used in vineyards, such as fungicides, are maintained in grapes, juices, and wines at high concentrations throughout the industrial wine chain.

Based on the evidence gathered and presented in this article, our review of the literature places an emphasis on the concerns raised by the impacts of these agents on the fermentation process. There is a vast field of research for future investigations to investigate and elucidate the mechanisms and consequences of these molecules on yeasts and the fermentation process, as well as preventive actions that can be adopted in vineyards and the industry as a whole to mitigate the potential losses caused by the use of fungicides. In fact, a small number of studies are actively evaluating the effect of combined fungicides, as well as the implications of using alternative products for pest control in vineyards.

Concerning consumer health and safety, most of the residues studied are suitable under the legislation currently enforced in Brazil and several other countries. However, the importance of these residues cannot be ignored, since their presence may cause important problems and losses in the wine industry. Therefore, it will be interesting for wineries to identify and implement alternative methods for the control of fungal attacks and traceability while avoiding or reducing the risks related to fermentation.

Acknowledgements

The authors would like to thank the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Abbey JA, Percival D, Abbey, Lord, Asiedu SK, Prithiviraj B, Schilder A. 2019. Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol science and technology*. 29(3):207–228.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019. Programa de análise de resíduos de

agrotóxicos em alimentos (PARA). Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasília.

Alves AAR, Rodrigues AS, Barros EBP, Uekane TM, Bizzo HR, Rezende CM. 2014. Determination of Pesticides Residues in Brazilian Grape Juices Using GC-MS-SIM. *Food Analytical Methods*. 7(9):1834–1839.

Baša Česnik H, Velikonja Bolta Š, Bavčar D, Radeka S, Lisjak K. 2016. Plant protection product residues in white grapes and wines of “Malvasia Istriana” produced in Istria. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 9(4):256–260.

Baša Česnik H, Velikonja Bolta Š, Lisjak K. 2015. Plant protection product residues in red grapes and Teran PTP wine. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*. 8(2):113–122.

Berbegal C, Spano G, Tristezza M, Grieco F, Capozzi V. 2017. Microbial resources and innovation in the wine production sector. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 38(2):156-166.

Bisson LF. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1):107-119.

Bizaj E, Curtin C, Cadež N, Raspor P. 2014. Interactions between industrial yeasts and chemical contaminants in grape juice affect wine composition profile. *Food Technology and Biotechnology*. 52(2):222–231.

Blateyron L, Sablayrolles JM. 2001. Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of bioscience and bioengineering*, 91(2):184-189.

Bordagaray A, Garcia-Arrona R, Millán E. 2011. Optimization of Solid-Phase Microextraction Procedure Coupled to GC-ECD for Triazole Fungicides Determination in Juice Samples. *Food Analytical Methods*. 4(3):293–299.

Bordagaray A, García-Arrona R, Millán E. 2013. Development and application of a screening method for triazole fungicide determination in liquid and fruit samples using solid-phase microextraction and HPLC-DAD. *Analytical methods*. 5(10):2565–2571.

BRASIL ANVISA. 2015. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): Lista de Referência de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para as culturas do PARA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Internet]. <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>

Brink J, Calitz F, Fourie P. 2016. Spray deposition and control of *Botrytis cinerea* on grape leaves and bunches: part 2 (Wine Grapes). *South African Journal of Enology and Viticulture*. 37(2):157–168.

Briz-Cid N, Castro-Sobrino L, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. 2018. Fungicide residues affect the sensory properties and flavonoid composition of red wine. *Journal of Food Composition and Analysis*. 66:185–192.

Briz-Cid N, Rial-Otero R, Cámara MA, Oliva J, Simal-Gandara J. 2019. Dissipation of three fungicides and their effects on anthocyanins and color of monastrell red wines. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(6).

- Brostrom GG, Brostrom J. 2008. *The Business of Wine: An Encyclopedia: An Encyclopedia*. [place unknown]: ABC-CLIO.
- Caboni P, Cabras P. 2010. Pesticides' influence on wine fermentation. *Advances in Food and Nutrition Research*. 59:43–62.
- Cabras P, Diana P, Meloni M, Pirisi FM, Pirisi R. 1983. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of pesticides: VII. Analysis of Vinclozolin, Iprodione, Procymidone, Dichlozolate and their degradation product 3, 5-dichloroaniline on white must and wine extracts. *Journal of Chromatography A*, 256:176-181.
- Cadež N, Zupan J, Raspor P. 2010. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research*. 10(5):619–630.
- Calvo-Garrido C, Haidar R, Roudet J, Gautier T, Fermaud M. 2018. Pre-selection in laboratory tests of survival and competition before field screening of antagonistic bacterial strains against *Botrytis* bunch rot of grapes. *Biological control*. 124:100–111.
- Capece A, Romaniello R, Scrano L, Siesto G, Romano P. 2018. Yeast starter as a biotechnological tool for reducing copper content in wine. *Frontiers in microbiology*. 8:2632.
- Capozzi V, Fragasso M, Romaniello R, Berbegal C, Russo P, Spano G. 2017. Spontaneous food fermentations and potential risks for human health. *Fermentation*, 3(4):49.
- Carpinteiro I, Ramil M, Rodríguez I, Cela R. 2010. Determination of fungicides in wine by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1217(48):7484–7492.
- Castro G, Pérez-Mayán L, Rodríguez-Cabo T, Rodríguez I, Ramil M, Cela R. 2018. Multianalyte, high-throughput liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the sensitive determination of fungicides and insecticides in wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410(3):1139–1150.
- Castro-Sobrinho L, Briz-Cid N, Figueiredo-González M, Sieiro-Sampedro T, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. 2019. Impact of fungicides mepanipyrin and tetraconazole on phenolic profile and colour of Mencía red wines. *Food control*. 98:412–423
- Celeiro M, Llompарт M, Lamas JP, Lores M, Garcia-Jares C, Dagnac T. 2014. Determination of fungicides in white grape bagasse by pressurized liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1343:18–25.
- Chen X, Wang Y, Gao Y, Gao T, Zhang D. 2019. Inhibitory abilities of *Bacillus* isolates and their culture filtrates against the gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest fruit. *The Plant Pathology Journal*, 35(5):425.
- Ciliberti N, Fermaud M, Roudet J, Rossi V. 2015. Environmental conditions affect *Botrytis cinerea* infection of mature grape berries more than the strain or transposon genotype. *Phytopathology*. 105(8):1090–1096.
- Cordero-Bueso G, Arroyo T, Valero E. 2014. A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International Journal of Food Microbiology*. 189:189–194.

Cordero-Bueso G, Mangieri N, Maghradze D, Foschino R, Valdetara F, Cantoral JM., Vigentini I. 2017. Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 2025.

Crump A, Farrar J, Fournier AJ, Ellsworth PC. 2018. Employing California Pesticide Use Data for Evaluating Integrated Pest Management Programs and Informing Pesticide Policy and Regulation. In: *Managing and Analyzing Pesticide Use Data for Pest Management, Environmental Monitoring, Public Health, and Public Policy*. [place unknown]: ACS Publications; p. 225–237.

Daane KM, Vincent C, Isaacs R, Ioriatti C. 2018. Entomological opportunities and challenges for sustainable viticulture in a global market. *Annual review of entomology*. 63.

De Simone N, Pace B, Grieco F, Chimienti M, Tyibilika V, Santoro V, ... Russo P. 2020. *Botrytis cinerea* and table grapes: a review of the main physical, chemical, and bio-based control treatments in post-harvest. *Foods*, 9(9):1138.

Dhananjayan V., Jayakumar S., Ravichandran B. (2020) Conventional Methods of Pesticide Application in Agricultural Field and Fate of the Pesticides in the Environment and Human Health. In: K. R. R., Thomas S., Volova T., K. J. (eds) *Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23396-9_1

Douliou DS, Anagnos EK, Liapis KS, Klimentzos DA. 2017. Effect of clarification process on the removal of pesticide residues in white wine. *Food control*. 72:134–144.

Douliou DS, Anagnos EK, Liapis KS, Klimentzos DA. 2018. Effect of clarification process on the removal of pesticide residues in red wine and comparison with white wine. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 53(8):534–545.

Edder P, Ortelli D, Viret O, Cognard E, Montmollin AD, Zali O. 2009. Control strategies against grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr) and corresponding fungicide residues in grapes and wines. *Food Additives and Contaminants*. 26(5):719–725.

Eissa F, Helalia A, Khorshed M, El-Sisi M. 2013. Monitoring of multi-class pesticide residues in green grape and their potential risk for Egyptian consumer. *Nat Sci*. 11(11):p110–115.

Escribano-Viana R, López-Alfaro I, López R, Santamaría P, Gutiérrez AR, González-Arenzana L. 2018. Impact of chemical and biological fungicides applied to grapevine on grape biofilm, must, and wine microbial diversity. *Frontiers in Microbiology*. 9(FEB).

Escribano-Viana R, Portu J, Garijo P, Gutiérrez AR, Santamaría P, López-Alfaro I, López R, González-Arenzana L. 2018. Evaluating a preventive biological control agent applied on grapevines against *Botrytis cinerea* and its influence on winemaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98(12):4517–4526.

Esteve-Turrillas FA, Agulló C, Abad-Somovilla A, Mercader JV, Abad-Fuentes A. 2016. Fungicide multiresidue monitoring in international wines by immunoassays. *Food Chemistry*. 196:1279–1286.

European Food Safety Authority E. 2015. Maximum residue levels (MRL). European Food Safety Authority [Internet]. <http://www.efsa.europa.eu/en/mrls/mrlteam.htm>

Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. 2012.

- Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*. 484(7393):186–194.
- FRAC FRAC. 2018. Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). [place unknown]: Retrieved.
- Fravel D. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol*. 43:337–359.
- Freire L, Passamani FRF, Thomas AB, Nassur R de CMR, Silva LM, Paschoal FN, Pereira GE, Prado G, Batista LR. 2017. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. *International journal of food microbiology*. 241:181–190.
- Galvez A, Abriouel H, Benomar N, Lucas R. 2010. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current opinion in biotechnology*, 21(2):142-148.
- Gary C, Metral R, Metay A, Garcia L, Mérot A, Smits N, Wéry J (2017) Towards an agroecological viticulture: advances and challenges. In: *Proceedings of the 20th GiESCO International Meeting*. Mendoza, Argentina, pp 1122–1127.
- Gava A, Borsato D, Ficagna E. 2020. Effect of mixture of fining agents on the fermentation kinetics of base wine for sparkling wine production: Use of methodology for modeling. *LWT*. 131:109660.
- Gianessi L, Williams A (2011) Fungicides have protected European wine grapes for 150 years. *International pesticide benefits case study N°*. 19
- González Álvarez M, Noguerol-Pato R, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. 2012. Changes of the sensorial attributes of white wines with the application of new anti-mildew fungicides under critical agricultural practices. *Food Chemistry*. 130(1):139–146.
- González-Domínguez E, Fedele G, Languasco L, Rossi V. 2019. Interactions among fungicides applied at different timings for the control of *Botrytis* bunch rot in grapevine. *Crop Protection*. 120:30–33.
- González-Rodríguez R, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. 2011a. Decay of fungicide residues during vinification of white grapes harvested after the application of some new active substances against downy mildew. *Food Chemistry*. 125(2):549–560
- González-Rodríguez R, Noguerol-Pato R, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. 2011b. Application of new fungicides under good agricultural practices and their effects on the volatile profile of white wines. *Food Research International*. 44(1):397–403.
- Hao Z, Van Tuinen D, Wipf D, Fayolle L, Chataignier O, Li X, Chen B, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Adrian M. 2017. Biocontrol of grapevine aerial and root pathogens by *Paenibacillus* sp. strain B2 and paenimyxin in vitro and in planta. *Biological control*. 109:42–50.
- Hjorth K, Johansen K, Holen B, Andersson A, Christensen HB, Siivinen K, Toome M. 2011. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America—A Nordic project. *Food Control*. 22(11):1701–1706.

- Hou X, Xu Z, Zhao Y, Liu D. 2020. Rapid analysis and residue evaluation of six fungicides in grape wine-making and drying. *Journal of Food Composition and Analysis*. 89.
- Hu M-J, Cox KD, Schnabel G. 2016. Resistance to increasing chemical classes of fungicides by virtue of “selection by association” in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 106(12):1513–1520.
- Hummes AP, Bortoluzzi EC, Tonini V, da Silva LP, Petry C. 2019. Transfer of Copper and Zinc from Soil to Grapevine-Derived Products in Young and Centenarian Vineyards. *Water, Air, and Soil Pollution*. 230(7).
- Jensen DF, Karlsson M, Sarrocco S, Vannacci G. 2016. Biological control using microorganisms as an alternative to disease resistance. *Plant pathogen resistance biotechnology*.:341–363.
- Jiménez JJ, Bernal JL, del Nozal MJ, Bernal J, Toribio L. 2007. Persistence and degradation of metalaxyl, lindane, fenvalerate and deltamethrin during the wine making process. *Food chemistry*, 104(1):216-223.
- Kasfi K, Taheri P, Jafarpour B, Tarighi S. 2018. 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*, 16(1):23.
- Kundu C, Goon A, Bhattacharyya A. 2014. Persistence behaviour of fungicide tebuconazole in a viticulture application. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 92(4):415–419.
- Lagunas-Allué L, Sanz-Asensio J, Martínez-Soria M-T. 2012. Optimization and validation of a simple and fast method for the determination of fungicides in must and wine samples by SPE and GC/MS. *Journal of AOAC International*. 95(5):1511–1519.
- Lemos Junior WJF, Bovo B, Nadai C, Crosato G, Carlot M, Favaron F, ... Corich V. 2016. Biocontrol ability and action mechanism of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) isolated from wine musts against gray mold disease agent *Botrytis cinerea* on grape and their effects on alcoholic fermentation. *Frontiers in microbiology*, 7:1249.
- Leroch M, Kretschmer M, Hahn M. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology*. 159(1):63–65.
- Leyva Salas M, Mounier J, Valence F, Coton M, Thierry A, Coton E. 2017. Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. *Microorganisms*, 5(3):37.
- Liu Y, Rousseaux S, Tourdot-Maréchal R, Sadoudi M, Gougeon R, Schmitt-Kopplin P, Alexandre H. 2017. Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(4):856-873.
- López-Fernández O, Rial-Otero R, González-Barreiro C, Simal-Gándara J. 2012. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 134(1):366–374.

- López-Seijas J, García-Fraga B, da Silva AF, Sieiro C. 2020. Wine Lactic Acid Bacteria with Antimicrobial Activity as Potential Biocontrol Agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Agronomy*, 10(1):31.
- Lu Y, Shao Y, Dai S, Diao J, Chen X. 2016. Stereoselective Behavior of the Fungicide Benalaxyl During Grape Growth and the Wine-Making Process. *Chirality*. 28(5):394–398.
- Maisonnave P, Sanchez I, Moine V, Dequin S, Galeote V. 2013. Stuck fermentation: development of a synthetic stuck wine and study of a restart procedure. *International journal of food microbiology*, 163(2-3):239-247.
- Martins J, Esteves C, Limpo-Faria A, Barros P, Ribeiro N, Simões T, Correia M, Delerue-Matos C. 2012. Analysis of six fungicides and one acaricide in still and fortified wines using solid-phase microextraction-gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 132(1):630–636.
- Martins J, Esteves C, Simões T, Correia M, Delerue-Matos C. 2011. Determination of 24 pesticide residues in fortified wines by solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(13):6847–6855.
- Martins V, Teixeira A, Gerós H. 2015. Changes in the volatile composition of wine from grapes treated with Bordeaux mixture: A laboratory-scale study. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 21(3):425–429.
- Mewa-Ngongang M, du Plessis HW, Ntwampe SKO, Chidi BS, Hutchinson UF, Mekuto L, Jolly NP. 2019. The Use of *Candida pyralidae* and *Pichia kluyveri* to Control Spoilage Microorganisms of Raw Fruits Used for Beverage Production. *Foods*, 8(10):454.
- Mulero J, Martínez G, Oliva J, Cermeño S, Cayuela J, Zafrilla P, Martínez-Cachá A, Barba A. 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. *Food chemistry*. 180:25–31.
- Nally MC, Pesce VM, Maturano YP, Assaf LR, Toro ME, de Figueroa LC, Vazquez F. 2015. Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *International journal of food microbiology*, 204:91-100.
- Nally MC, Pesce VM, Maturano YP, Muñoz CJ, Combina M, Toro ME, ... Vazquez F. 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*, 64(1):40-48.
- Nally MC, Ponsone ML, Pesce VM, Toro ME, Vazquez F, Chulze S. 2018. Evaluation of behaviour of *Lachancea thermotolerans* biocontrol agents on grape fermentations. *Letters in Applied Microbiology*. 67(1):89–96.
- Nicolini G, Román T, Larcher R, Moser S, Tonidandel L. 2016a. Vini bianchi da viticoltura convenzionale più sani con un poco di carbone in fermentazione. *L'Enologo*. 123(10).
- Nicolini G, Román Villegas T, Tonidandel L, Moser S, Larcher R. 2016b. Small amounts of charcoal during fermentation reduce fungicide residues without penalising white wine aroma compounds and colour. *Australian journal of grape and wine research*. 22(3):376–383.
- Nicolini G, Roman T, Tonidandel L, Sboner M, Volpini A, Manara M. 2017. Abbattimento di insetticidi e fungicidi durante la fermentazione in bianco da parte di coadiuvanti enologici.

L'Enologo. 124(8).

Noguerol-Pato R, FernándeZ-Cruz T, Sieiro-Sampedro T, Gonza'lez-Barreiro C, Cancho-Grande B, Cilla-García D-A, García-Pastor M, Martínez-Soria M-T, Sanz-Asensio J, Simal-Gándara J. 2016. Dissipation of fungicide residues during winemaking and their effects on fermentation and the volatile composition of wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 64(6):1344–1354.

Noguerol-Pato R, Sieiro-Sampedro T, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. 2014a. Effect on the aroma profile of graciano and tempranillo red wines of the application of two antifungal treatments onto vines. *Molecules*. 19(8):12173–12193.

Noguerol-Pato R, Torrado-Agrasar A, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. 2014b. Influence of new generation fungicides on *Saccharomyces cerevisiae* growth, grape must fermentation and aroma biosynthesis. *Food Chemistry*. 146:234–241.

Oliva J, Martínez G, Cermeño S, Motas M, Barba A, Cámara MA. 2018. Influence of matrix on the bioavailability of nine fungicides in wine grape and red wine. *European Food Research and Technology*. 244(6):1083–1090.

Oliva J, Martínez-Gil A, Lorenzo C, Cámara M, Salinas MR, Barba A, Garde-Cerdán T. 2015. Influence of the use of fungicides on the volatile composition of Monastrell red wines obtained from inoculated fermentation. *Food chemistry*. 170:401–406.

Oliva J, Payá P, Cámara MÁ, Barba A. 2007. Removal of famoxadone, fluquinconazole and trifloxystrobin residues in red wines: Effects of clarification and filtration processes. *Journal of Environmental Science and Health*. 42(7):775–781.

Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food microbiology*, 47:85-92.

Pedrotti C, Marcon ÂR, Delamare APL, Echeverrigaray S, da Silva Ribeiro RT, Schwambach J. 2019. Alternative control of grape rots by essential oils of two *Eucalyptus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99(14):6552–6561.

Peña N, Antón A, Kamilaris A, Fantke P. 2018. Modeling ecotoxicity impacts in vineyard production: Addressing spatial differentiation for copper fungicides. *Science of the Total Environment*. 616:796–804.

Pocock K, Salazar F, Waters EJ. 2011. The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 17(2):280–284.

Pretscher J, Fischkal T, Branscheidt S, Jäger L, Kahl S, Schlander M, ... Claus H. 2018. Yeasts from different habitats and their potential as biocontrol agents. *Fermentation*, 4(2):31.

Qin X, Xiao H, Xue C, Yu Z, Yang R, Cai Z, Si L. 2015. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 100:160-167.

R Core Team. 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>

Raveau R, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2020. Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods*, 9(3):365.

Regueiro J, Lopez-Fernandez O, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gandara J. 2015. 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*. 55(6):839–863.

Russo P, Berbegal C, De Ceglie C, Grieco F, Spano G, Capozzi V. 2019. Pesticide Residues and Stuck Fermentation in Wine: New Evidences Indicate the Urgent Need of Tailored Regulations. *Fermentation*. 5(1):23.

Sabale R, Shabeer TA, Utture SC, Banerjee K, Jadhav MR, Oulkar DP, Adsule PG, Deshmukh MB. 2014. Dissipation kinetics, safety evaluation, and assessment of pre-harvest interval (PHI) and processing factor for kresoxim methyl residues in grape. *Environmental monitoring and assessment*. 186(4):2369–2374.

Scariot FJ, Jahn L, Delamare APL, Echeverrigaray S. 2018. Necrotic cell death induced by dithianon on *Saccharomyces cerevisiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 149:137–142.

Schmidt B, Christensen HB, Petersen A, Sloth JJ, Poulsen ME. 2013. Method validation and analysis of nine dithiocarbamates in fruits and vegetables by LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 30(7):1287–1298.

Sen K, Cabaroglu T, Yilmaz H. 2012. The influence of fining agents on the removal of some pesticides from white wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir. *Food and chemical toxicology*. 50(11):3990–3995.

Sieiro-Sampedro T, Briz-Cid N, Pose-Juan E, Figueiredo-González M, González-Barreiro C, Simal-Gándara J, Cancho-Grande B, Rial-Otero R. 2020. Tetraconazole alters the methionine and ergosterol biosynthesis pathways in *Saccharomyces* yeasts promoting changes on volatile derived compounds. *Food Research International*. 130:108930.

Silva GA da, Bernardi TL, Schaker PDC, Agustini BC, Mello LM de, Valente P. 2016. Impact of Fungicide Residues on Polymerase Chain Reaction and on Yeast Metabolism. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 59.

Szopinska A, Christ E, Planchon S, König H, Evers D, Renaut J. 2016. Stuck at work? Quantitative proteomics of environmental wine yeast strains reveals the natural mechanism of overcoming stuck fermentation. *Proteomics*, 16(4):593-608.

TOGORES, J. (2018). *Tratado de Enología. Volumen I y II*. Mundi-Prensa.

Uclés A, García AV, Gil García MD, Aguilera Del Real AM, Fernández-Alba AR. 2015. Benzimidazole and imidazole fungicide analysis in grape and wine samples using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical Methods*. 7(21):9158–9165.

Upadhyay J, Rana M, Juyal V, Bisht SS, Joshi R. 2020. Impact of Pesticide Exposure and Associated Health Effects. *Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action*.:69–88.

- Urkude, R., Dhurvey, V., & Kochhar, S. (2019). *Pesticide Residues in Beverages*.
- Vallejo A, Millán L, Abrego Z, Sampedro MC, Sánchez-Ortega A, Unceta N, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Diez-Navajas AM, Barrio RJ. 2019. Fungicide distribution in vitiviniculture ecosystems according to different application strategies to reduce environmental impact. *Science of the Total Environment*. 687:319–329.
- Vaquero-Fernández L, Sanz-Asensio J, Fernández-Zurbano P, López-Alonso M, Martínez-Soria M-T. 2013. Determination of fungicide pyrimethanil in grapes, must, fermenting must and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(8):1960–1966.
- Vargas TS, Salustriano NA, Klein B, Romão W, da Silva SRC, Wagner R, Scherer R. 2018. Fungicides in red wines produced in south america. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 35(11):2135–2144.
- Vargas, T., Salustriano, N., Klein, B., Romão, W., da Silva, S., Wagner, R., & Scherer, R. (2018). Fungicides in red wines produced in south america. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 35, 2135–2144.
- Wang Q-H, Fan K, Li D-W, Han C-M, Qu Y-Y, Qi Y-K, Wu X-Q. 2020. Identification, Virulence and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* ss Responsible for Walnut Anthracnose Disease in China. *Plant Disease*. 104(5):1358–1368.
- Wang X, Glawe DA, Kramer E, Weller D, Okubara PA. 2018. Biological control of *Botrytis cinerea*: interactions with native vineyard yeasts from Washington State. *Phytopathology*. 108(6):691–701.
- Wang Y, Li P, Zhen H, Li B. 2017. The promotion of thiophanate-methyl and tebuconazole for the continuous control of *Glomerella* leaf spot in apple leaves by adding pellouxite as a synergistic reagent. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 124(6):631–639.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer Verlag New York. URL: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Zhang Z-H, Zhao H-Y, Shen Q, Qi P-P, Wang X-Q, Xu H, Di S-S, Wang Z-W. 2020. High-throughput determination of fungicides in grapes using thin-film microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 43(8):1558–1565.
- Zhou Q, Fu M, Xu M, Chen X, Qiu J, Wang F, ... Chen L. 2020. Application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 against *Botrytis cinerea* in postharvest Red Globe grapes. *Food Science & Nutrition*, 8(3):1499-1508.

Figure Captions

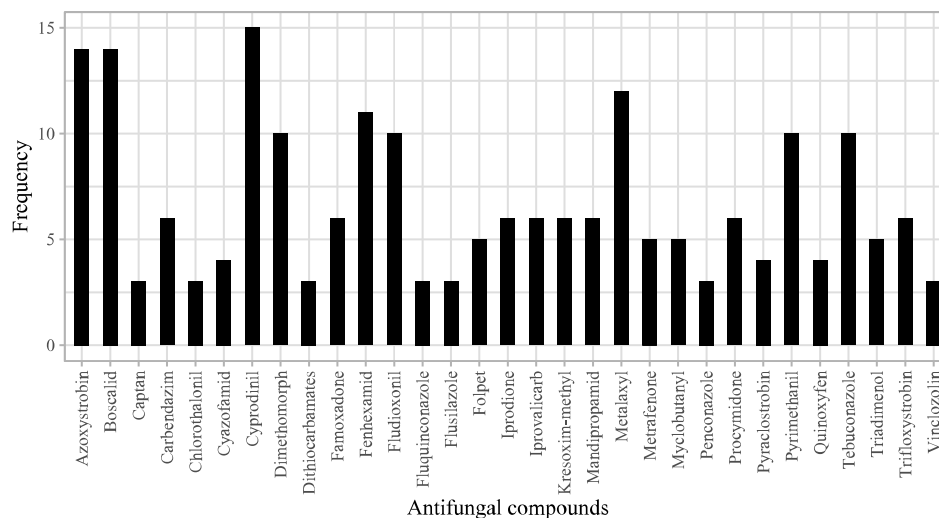


Figure 1. Frequency of fungicides ($f > 2$) with residues found in grapes, juices, and wines in the literature.

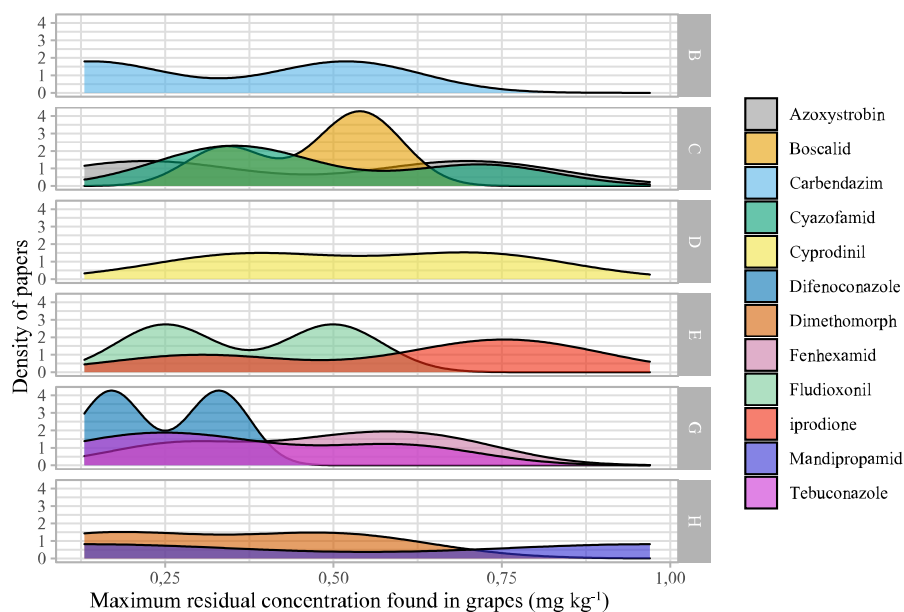


Figure 2. Distribution of maximum concentrations (0.1 to 1.0 mg kg^{-1}) found in the literature. The letters represent the groups according to their respective FRAC Mode of Action, determined by FRAC (2018).

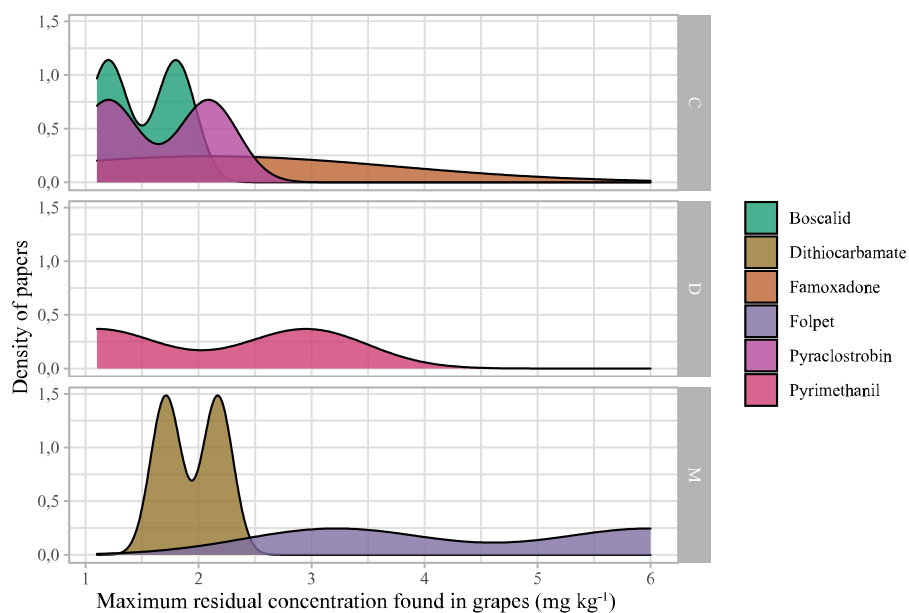


Figure 3. Distribution of maximum concentrations (1 to 10 mg kg^{-1}) found in the literature. The letters represent the groups according to their respective FRAC Mode of Action, determined by FRAC (2018).

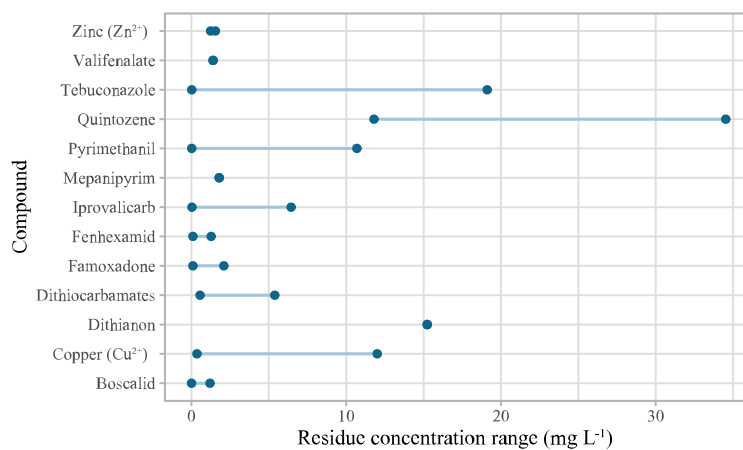


Figure 4. Range of observed concentrations (mg L^{-1}) of various fungicides in grape juice and must.

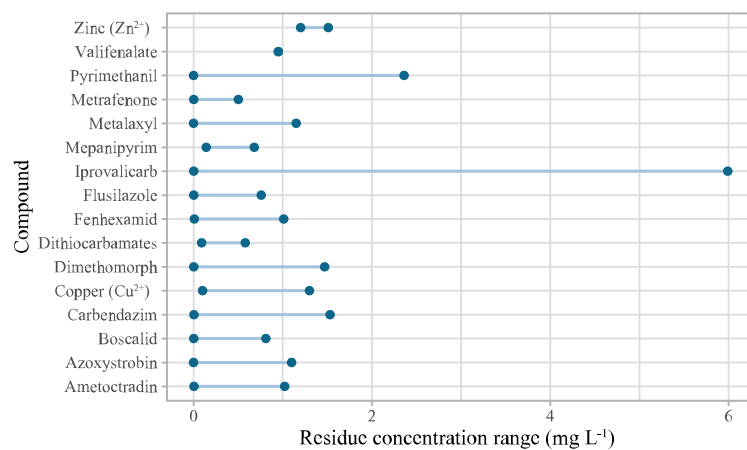


Figure 5. Range of observed concentrations (mg L⁻¹) of various fungicides in wines.

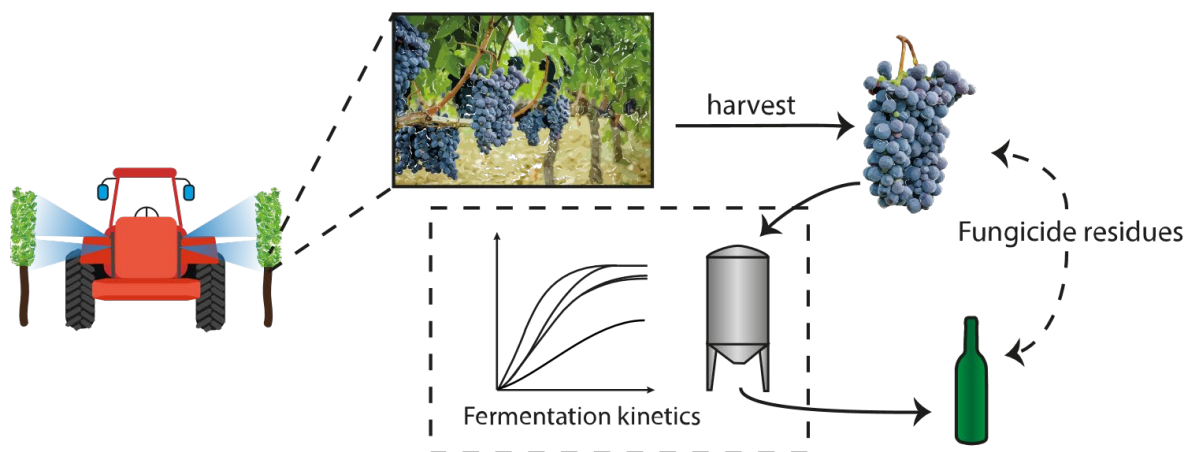


Table 1. List of studies that evaluated the effect of fungicides on fermentative kinetics.

Compound	Conclusions on the effect of compounds on fermentation kinetics or yeasts	References
Ametoctradin	Reduction of the maximum specific growth rate by 9%.	Noguerol-Pato et al. (2014b)
Ametoctradin, dimethomorph, mepanipyrim	In the stationary phase, the conversion rate of sugars into ethanol was changed. The authors evaluated pasteurized grape must treated with these compounds in concentrations corresponding to the maximum residual limit.	Noguerol-Pato et al. (2014b)
Boscalid	Reduction of 4% of the sugar consumption rate and 30% of the ethanol/biomass ratio.	Noguerol-Pato et al. (2014b)
Bordeaux mixture	The conversion of sugars was significantly slower in grape must treated with the mixture.	Martins et al. (2015)
Bordeaux mixture	The results indicated that excess copper slowed the progress of fermentation.	Martins et al. (2015)
Copper (Cu ²⁺)	A low fermentation activity was observed in the musts to which copper has been added, with a reduction of 23 to 35%. Consequently, high residual sugars in the final wines were detected in the fermentation with CuSO ₄ .	Capece et al. (2018)
Copper (Cu ²⁺)	The ethanol content was significantly higher in wines obtained by fermentation without the presence of CuSO ₄ .	Capece et al. (2018)
Copper (Cu ²⁺)	In wines obtained from two sensitive yeast strains, the addition of copper significantly increased volatile acidity.	Capece et al. (2018)
Cyazofamid	Reduction of 13% in the sugar consumption rate.	Noguerol-Pato et al. (2014b)
Dimethomorph	Reductions in the sugar consumption rate (14%), in the ethanol/sugar ratio (13%) and in the ethanol content of produced wines (8%) were observed.	Noguerol-Pato et al. (2014b)
Dithianon	A reduction in cell viability was observed, resulting in a decrease of 84 and 98% in yeast colony-forming units in treatments with 2 and 4 μM, respectively.	Scariot et al. (2018)
Dithianon	A significant decline in the percentage of yeast colony-forming units was observed.	Scariot et al. (2018)

Dithianon	The results showed that 87.8% of the cells treated with dithianon lost their cell membrane integrity.	Scariot et al. (2018)
Dithianon	Yeast cells treated with dithianon showed a higher sensitivity to the activity of V-1,3-glucanase, indicating that the fungicide is responsible for changes in the cell wall structure.	Scariot et al. (2018)
Fenhexamid	The fermentation rate was slower in wines whose grapes were treated with fenhexamid.	Escribano-Viana et al. (2018b)
Fenhexamid	Regarding the counting of viable yeast cells, significant differences were found in the first 48 h of fermentative activity.	Escribano-Viana et al. (2018b)
Fenhexamid	In spontaneous alcoholic fermentation, a decrease in the diversity of <i>S. cerevisiae</i> species was observed after application of fenhexamid.	Escribano-Viana et al. (2018a)
Fenhexamid	A reduction in the variety and amount of the microbiota was observed.	Escribano-Viana et al. (2018a)
Fluopyram	Reductions in colony size were observed for most yeasts.	Wang et al. (2018)
Folpet	A significant inhibition of fermentation was observed. The authors concluded that residues of this molecule could be a serious concern during winemaking.	Russo et al. (2019)
Mepanipyrim	A significant increase in the volatile acidity of wines produced in the presence of mepanipyrim (295 to 765%) was observed.	Briz-Cid et al. (2019)
Mepanipyrim	A reduction of 13% in the sugar consumption rate, 19% in the ethanol/biomass ratio and up to 42% in the ethanol/sugar ratio were quantified, with a reduction of 10% in the ethanol content of wines.	Noguerol-Pato et al. (2014b)
Metalaxyl-M + Folpet	The growth of <i>S. cerevisiae</i> was always lower in the environments treated with these fungicides when compared to the control.	Russo et al. (2019)
Metalaxyl-M + Folpet	The non- <i>Saccharomyces</i> strains showed a variable reduction in their growth rate in presence of the fungicide.	Russo et al. (2019)
Metalaxyl-M + Folpet	The growth of <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>H. guillermondii</i> , <i>Issatchenkia terricola</i> , <i>I. orientalis</i> , and some strains of <i>Metschnikowia pulcherrima</i> was completely inhibited.	Russo et al. (2019)

Metalaxyl-M + Folpet	When the must was supplemented with the commercial formulation, a slower and incomplete fermentation occurred in all trials, and after 2 weeks, the observed weight loss was only 3% for all the strains investigated.	Russo et al. (2019)
Metalaxyl-M + Folpet	After 2 weeks of fermentation, a thick gelatinous film appeared on the surface of the treated must, while in the control must this biofilm was not observed.	Russo et al. (2019)
Metalaxyl-M + Folpet	A sluggish fermentation was always observed when the must was supplemented with this preparation.	Russo et al. (2019)
Metrafenone	Reductions of 12% in the sugar consumption rate and 16% in the ethanol/biomass ratio were reported.	Noguerol-Pato et al. (2014b)
Micronized sulfur and penconazole	The results indicated a smaller variety of species in the fungicide treated blocks. Higher doses resulted in greater differences in the effect of both fungicides, with penconazole having the greatest effect on yeast populations in the vineyard.	Cordero-Bueso et al. (2014)
Pyraclostrobin + Boscalid	A reduction in colony size was observed for most yeasts.	Wang et al. (2018)
Pyrimethanil, Fenhexamid	All yeast strains showed significantly slower fermentation rates in the presence of these compounds.	Bizaj et al. (2014)
Pyrimethanil	After the third day of fermentation, a decrease in the fermentation rate was observed.	Bizaj et al. (2014)
Pyrimethanil	In presence of pyrimethanil, the fermentations tended to be slower, producing less CO ₂ compared to the control fermentations. The authors comment on its negative effect on all studied wine yeast strains.	Bizaj et al. (2014)
Tetraconazol	An 87% increase in the amount of residual sugars in the final wine was observed.	Sieiro-Sampedro et al. (2020)
Tetraconazol	A reduction of about 10% in the ethanol content of wines produced was observed.	Castro-Sobrino et al. (2019)

Tetraconazol	A rise in the volatile acidity of the wines produced was quantified from 57 to 162%.	Briz-Cid et al. (2019)
Triflumizole	The growth of <i>Metschnikowia chrysoperlae</i> , <i>M. pulcherrima</i> , and <i>Aureobasidium pullulans</i> was compromised, and was completely inhibited at a dose of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.	Wang et al. (2018)

9.1. Artigo 2

O artigo intitulado “Mode of action of an 8-hydroxyquinoline derivative on the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*” encontra-se submetido no *Journal of Applied Microbiology* para consideração de publicação na qualidade de “Artigo Original”.

Mode of action of an 8-hydroxyquinoline derivative on the model yeast

Saccharomyces cerevisiae

Angelo Gava^{a,*}, Fernando Joel Scariot^b, Evandro Ficagna^c, Sergio Echeverrigaray^b, Ana Paula Longaray Delamare^b, Alexandre Meneghello Fuentesfria^{a,d}, Saulo Fernandes de Andrade^{a,d}

^aPrograma de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^bLaboratório de Enologia e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil.

^cInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS, Brazil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

* **Corresponding author:** Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Ipiranga, Porto Alegre, 90160-093, RS, Brazil. Email: angelo.gava@ufrgs.br.

Mode of action of an 8-hydroxyquinoline derivative on the model yeast

Saccharomyces cerevisiae

ABSTRACT

The search for new formulations with antifungal potential is constantly increasing, especially non-toxic molecules that do not present risks to the environment and consumer health. Derivatives of 8-hydroxyquinoline are valuable alternatives for the control of pathogenic fungi, both clinical and phytopathogenic. This study aimed to determine the mode of action of a derivative of 8-hydroxyquinoline (PH151) on a model microorganism, *Saccharomyces cerevisiae*. Exponentially growing yeast cells were treated with different concentrations of PH151 for 6 h and evaluated for membrane integrity, accumulation of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential, and metacaspase activity. The results indicated that PH151 reduced the integrity of the cell membrane; 96.2% of the cells treated with PH151 at a dose of 191 μ M exhibited this behavior. In addition, there was a significant increase in ROS levels associated with changes in mitochondrial membrane potential in cells treated with PH151. These results, as well as the greater viability of the *YCA1* deletion mutant, indicated that ROS accumulation caused by PH151 triggered a metacaspase-dependent apoptotic cascade.

Keywords: Fungicide; Yeast; Mitochondrial membrane potential; Membrane integrity; ROS.

1. Introduction

Globally, there is a need to develop new antifungal compounds with the objectives of a reduced dose of application, greater efficiency and selectivity, specific mode of action, and less environmental impact (Kim *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2018; Cortés *et al.*, 2019). The use of fungicides in agriculture is problematic because of their environmental impact (Peña *et al.*, 2018), the risks they pose to the health of farmers (Upadhayay *et al.*, 2020), the emergence of resistant fungal strains (Leroch *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016), and concerns about fungicidal contamination into food products. In this context, the synthesis of new molecules with lower toxicity, such as 8-hydroxyquinoline (8HQ) derivatives, can play an important role in the control of both clinical and phytopathogenic fungi.

Derivatives of 8HQ are a subclass of quinolines and exhibit a wide range of recognized biological activities. Considering their high reactivity and pharmacological activity, many 8HQ derivatives have been synthesized, optimized, and widely studied (Chan *et al.*, 2013; Serrao *et al.*, 2013; Lam *et al.*, 2014; Kos *et al.*, 2015; Oliveri and Vecchio, 2016; Rbaa *et al.*, 2019). Their effects include neuroprotective (Suwanjang *et al.*, 2016), anticancer (Chan-On *et al.*, 2015; Krawczyk *et al.*, 2019), antibacterial (Musiol *et al.*, 2010; Enquist *et al.*, 2012), antiseptic (Cherdtrakulkiat *et al.*, 2016; Abouelhassan *et al.*, 2017), antioxidant (Chobot *et al.*, 2018), antimalarial, antituberculosis, antiviral (Polanski *et al.*, 2006; Kos *et al.*, 2019), and antifungal activity (Musiol *et al.*, 2006; Arafa *et al.*, 2013; Oliveri and Vecchio, 2016; Pippi *et al.*, 2017).

The structure of 8HQ contains a six-membered heterocyclic ring fused to a benzene ring (Figure 1) (Sashidhara *et al.*, 2009). This allows for a wide structural diversity in the design of antifungals. Some derivatives, such as clioquinol, act on the cell wall of fungi, whereas others containing sulfonic acid compromise the integrity of the membrane, showing that it is possible to change the pattern of substitution of the nucleus of 8HQ to obtain different modes of antifungal action (Pippi *et al.*, 2019). Therefore, these derivatives appear to be promising antifungal

alternatives in the field of agronomy; for example, they would decrease the application of highly toxic agrochemicals in different cultures, minimizing the effect of antifungal resistance and the harmful damage to humans and the environment, and would offer new insights into the control of phytopathogens.

Several recent studies have investigated the agronomic potential of 8HQ derivatives to control different phytopathogens from different cultures. Bennamara and Abourriche (2020) evaluated the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, and *Verticillium albo-atrum* in the presence of different 8HQ derivatives, and concluded that some derivatives had a higher inhibitory capacity than the fungicide amphotericin B. Similar results were obtained in a study by Yin *et al.* (2020) on *B. cinerea* isolated from susceptible plants that showed that 32 out of 38 8HQ derivatives studied exhibited an antifungal activity superior to that of azoxystrobin. In addition, recent studies have shown the potential of 8HQ derivatives in the control of oilseed (rapeseed) fungi and bacteria (Yin *et al.*, 2019), and fungi associated with black foot disease in vines (Souza *et al.*, 2021).

Considering the wide diversity of 8HQ derivatives and the limited number of studies aimed to determine their mechanisms of action, we used this industrial, spoilage, and model organism *Saccharomyces cerevisiae* (Karathia *et al.* 2011) to elucidate the cellular mechanisms involved in the antifungal activity of a 8HQ derivative. In this context, the present study was conducted to better understand the mode of action of an 8HQ derivative (PH151) in aerobic exponential cells of *S. cerevisiae* by evaluating the individual cell response using various flow cytometry analyses and deleted mutants.

2. Methods

2.1. Yeast strains and media

Saccharomyces cerevisiae yeast BY4741 (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) and its isogenic mutants, Y0233 (*aif1::kanMX4*), Y01217 (*nuc1::kanMX4*), and Y06233 (*yca1::kanMX4*) with deletions in apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial nuclease genes, and

metacaspase 1, respectively, were obtained from Euroscarf (Frankfurt, Germany). Yeast was grown at 28 °C with constant agitation (150 rpm) in YEPD broth (2% yeast extract, 1% peptone, and 2% glucose, pH 6.5) or YNB medium (0.67% Yeast Nitrogen Base with amino acids and 1% glucose, pH 6.5).

2.2. Synthesis of derivative

8-Hydroxyquinoline-5-(N-4-chlorophenyl)sulfonamide (compound PH151, 335 g mol⁻¹) was synthesized as described by Joaquim *et al.* (2019); its chemical structure is shown in Figure 2.

2.3. Minimal inhibitory concentration (MIC) of 8HQ derivative

To evaluate the MIC of the molecule derived from 8HQ (PH151), it was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO). The yeast inoculum used in the tests consisted of a suspension of cells obtained from 24 h cultures grown in YEPD medium (pH 6.5), with a concentration adjusted to 1×10^5 cells mL⁻¹. Antifungal activity was evaluated in 96-well microplates by serial microdilution, as described in CLSI M27-A3 (2008), at concentrations ranging from 0.19 to 95.5 μM of PH151 (0.0625 to 32 mg L⁻¹).

The MIC was determined by reading the microplate at a wavelength of 595 nm using an Asys Expert Plus microplate reader (Biochrom, Cambridge, UK), and visual reading was performed for confirmation. The MIC was the lowest concentration capable of producing total inhibition of yeast development after 24 h of cultivation. Data were expressed as percentages of growth inhibition (%) compared with the control one. The experiments were performed in triplicates.

2.4. Yeast growth and viability assay

Yeast cells were grown in YEPD medium and transferred to a new flask for growth to an exponential stage, after which 1×10^7 cells mL⁻¹ were washed with 0.9% NaCl and inoculated in YNB medium containing 47.8, 95.5, or 191 μ M of PH151.

The cells treated with PH151 at different concentrations and the control (cells treated with DMSO alone) were incubated for 360 min (6 h) in an orbital shaker (150 rpm, 28 °C), and cell viability was determined by local testing. Cultures were diluted at tenfold series, and 10 μ L aliquots were placed on YEPD plates. The plates were incubated at 28 °C for 24 h, the number of colony-forming units (CFUs) was determined, and the results were expressed as percentages of CFUs compared with those of untreated cells (viability in % CFU).

2.5. Cell membrane integrity, ROS accumulation, mitochondrial membrane potential, and metacaspase activation

Cell membrane integrity, ROS accumulation, mitochondrial membrane potential, and metacaspase activation were evaluated by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, USA) equipped with an argon-ion laser emitting at 488 nm. Flow cytometry data of 20,000 cells were acquired using CellQuest Pro software (BD Bioscience, San Jose, USA), and data analysis was carried out using FlowJo v.10 software (BD Bioscience, San Jose, USA).

Cell membrane integrity and intracellular esterase activity were evaluated using the FungaLight™ Yeast CFDA, AM/Propidium Iodide Vitality Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA), which includes two dyes: propidium iodide (PI), a nucleic acid dye that penetrates only membrane-damaged cells, and 5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl (CFDA), a cell-permeable esterase substrate that is cleaved by nonspecific esterases, resulting in a green fluorescent product. Staining and flow cytometry analyses were performed according to the manufacturer's instructions.

The accumulation of intracellular ROS was detected using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH, Sigma-Aldrich, San Luis, USA) and dihydroethidium (DHE, Sigma-Aldrich, San Luis, USA). DCFH and DHE stock solutions were prepared in DMSO (5 mg mL⁻¹). The samples were treated with PH151 or the control (DMSO alone), stained with each dye at a final concentration of 5 µg mL⁻¹, and incubated for 30 min at room temperature. The samples were evaluated by flow cytometry using the FL1 (488/533) filter for DCFH and FL3 (488/670) filter for DHE.

To assess the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), cells were stained with 175 nM 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6, Sigma-Aldrich, San Luis, USA) for 30 min at 30 °C in the dark. After staining, the cells were analyzed by flow cytometry using the FL1 filter.

Metacaspase activation was detected using a fluorescent dye, CaspACE FITC-VAD-FMK (Promega, Madison, USA), which irreversibly binds to active caspases. PH151-treated and control cells were incubated with the dye for 30 min in the dark. Fluorescence was measured by flow cytometry using the FL1 filter.

3. Results

Initially, we determined the MIC of the 8HQ derivative PH151 on *S. cerevisiae* BY4741. The MIC was 95.5 µM (32 mg L⁻¹). Based on these results, we selected a sub-lethal concentration (MIC/2) of 47.8 µM, and lethal concentrations of 95.5 (MIC) and 191 µM (2×MIC), for subsequent experiments.

The flow cytometric analysis of cell vitality and membrane integrity showed that PH151 reduced the integrity of the cell membrane (Figure 3). The data showed that 96.2% of cells treated with PH151 at a dose of 191 µM lost membrane integrity (PI-positive). Yeast treated with concentrations of 47.8 and 95.5 µM PH151 exhibited an increase in cell populations with high PI fluorescence without loss of CFDA fluorescence, indicating that at these concentrations, PH151 induces cell membrane damage and approximately 3-fold increase in esterase activity. However,

at the highest concentration (191 μM), PH151 showed a higher percentage of PI-positive cells with low esterase activity (11.8% of cells). In addition, in the same experiment, yeast viability evaluated by colony count showed a reduction of 95.7% in the treatment with 191 μM PH151.

ROS are among the main triggers of programmed cell death in different organisms, including yeast (Perrone *et al.*, 2008; Farrugia and Balzan, 2012). We evaluated the accumulation of ROS in cells treated with different concentrations of PH151 and the control using two redox-sensitive probes: DCFH and DHE. The data (Figure 4) showed a significant increase in DCFH and DHE fluorescence in cells treated with PH151, indicating intracellular accumulation of ROS. At the PH151 concentration of 95.5 μM , the average increase in DCFH fluorescence (Figure 4A) was 8-fold, whereas at concentrations of 47.8 and 191 μM , the increase was 5-fold. For DHE (Figure 4B), the average increase in fluorescence was 10-fold at the highest dose, whereas, at the concentration of 47.8 μM , the increase was approximately 5-fold. As DHE detects O_2^- , these results indicate that PH151 is responsible for an increase in ROS, probably generated by mitochondria (De Nobel *et al.*, 1989).

Changes in mitochondrial activity may be responsible for an increase in intracellular ROS concentrations. Therefore, we evaluated the $\Delta\psi\text{m}$ using DiOC6. As shown in Figure 5, PH151 caused a significant modification of $\Delta\psi\text{m}$, confirming mitochondrial dysfunction. Yeast cells treated with the 8HQ derivative showed a dose dependent reduction in $\Delta\psi\text{m}$.

Programmed or apoptotic cell death in yeast can occur via different mechanisms: metacaspase-dependent and metacaspase-independent pathways. We assessed metacaspase activity using CaspACE FITC-VAD-FMK, which binds irreversibly to active metacaspases. The results showed that PH151 activated metacaspases in *S. cerevisiae* (Figure 6A). These data indicate that PH151 has the potential to induce cell death by apoptosis via a metacaspase-dependent pathway.

To confirm this hypothesis we evaluated the effect of PH151 in wild-type (BY4741) and three isogenic strains of *S. cerevisiae* with deletion on key genes of the apoptotic pathways. As

can be observed in Figure 6B the *YCA1* deletion mutant showed significantly higher viability compared with the wild-type strain and the other mutants, confirming that yeast apoptosis induced by PH151 is metacaspase-dependent, and other routes were not responsible for PH151-induced apoptotic death. At the highest concentration (191 μM) *YCA1* mutant exhibited viability of approximately 50%, whereas the wild-type strain and other mutants (*AIF1* and *NUC1*) showed >95% death. In addition, the viability of the $\Delta yca1$ mutant was not affected by PH151 at a concentration of 47.8 μM . These results indicate that the ROS stress caused by PH151 is responsible for triggering metacaspase-dependent cell death in aerobically growing *S. cerevisiae* cells.

4. Discussion

Based on the MIC of PH151 for *S. cerevisiae* BY4741, we selected the concentrations of 47.8 (MIC/2), 95.5 (MIC), and 191 μM (2 \times MIC) to evaluate the effect of PH151 on BY4741 yeast cells in a 6 h period (16, 32, and 64 mg L⁻¹). Similar MIC values were obtained by Cherdtrakulkiat *et al.* (2016), who studied the antimicrobial effect of 8HQ and its derivatives; for *S. cerevisiae* ATCC 2601, they determined that the MICs of two 8HQ derivatives studied were 35.71 and 37.37 mg L⁻¹. In another recent study, similar values (32 and 64 mg L⁻¹) were obtained for three compounds derived from 8HQ for different *Candida* sp. (Pippi *et al.*, 2019).

Our data, obtained by flow cytometry analysis, showed that PH151 induces a loss of cell membrane integrity, as evidenced by the high fluorescence of PI. Pippi *et al.* (2019) demonstrated that 8-hydroxyquinoline-sulfonic acids compromise the integrity of the cell membrane of *C. albicans*, and attributed this damage to the cell membrane-related main antifungal mechanism of the studied derivatives.

The intracellular concentrations of ROS can drastically increase under various stress conditions that affect metabolism and cell viability (Farrugia and Balzan, 2012). In our

experiments, the data showed an important increase in the accumulation of intracellular ROS after exposure to PH151, indicating a programmed cell death process.

Intracellular accumulation of ROS in mitochondria induces a sequence of events that include hyperpolarization of the mitochondrial membrane, oxidative explosion, breakdown of the membrane potential, and mitochondrial fragmentation (Perrone *et al.*, 2008; Zdravlevic *et al.*, 2012). In our study, BY4741 yeast cells treated with PH151 showed a reduction in membrane potential, which was dependent on the dose. These results indicate that the intracellular accumulation of ROS caused by PH151 is responsible for mitochondrial dysfunction in yeast cells.

Caspases, which belong to the cysteine protease group (Mazzoni and Falcone, 2008), play a key role in the activation of a cascade of proteolytic signaling during apoptosis in mammals. Caspase-like proteases are called metacaspases, which play important roles in *S. cerevisiae* (Kavakçioğlu and Tarhan, 2018). In addition, apoptotic events in *S. cerevisiae* caused by external and internal stimuli may be associated with the activity of the *S. cerevisiae* metacaspase Yca1p, which is similar to mammalian caspases (Du *et al.*, 2007). Flow cytometry analysis revealed a significant increase in active metacaspase levels in *S. cerevisiae* cells treated with the 8HQ derivative, indicating that PH151 can induce cell death by apoptosis through a metacaspase-dependent pathway.

Programmed cell death in *S. cerevisiae* was observed under different stress conditions, such as ethanol and acetic acid levels, cell age, and high salt concentrations, as well as other conditions, such as the presence of drugs, hydrogen peroxide, and fungicides (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010; Scariot *et al.*, 2016). To elucidate the mechanism responsible for PH151-induced apoptotic death, we evaluated the effect of PH151 on wild-type (BY4741) and three isogenic strains of *S. cerevisiae* with key genes of the apoptotic pathway deleted.

A comparison of PH151-induced cell death in the wild-type strain and mutants showed that only the $\Delta yca1$ mutant exhibited significantly higher viability. These results demonstrate a clear resistance of $\Delta yca1$ mutants to the studied derivative, indicating that PH151 induces metacaspase-

dependent apoptosis in *S. cerevisiae*. Furthermore, as apoptosis by metacaspases is related to the accumulation of ROS, the significant accumulation of intracellular ROS observed in *S. cerevisiae* cells treated with PH151 can be explained by the fungicidal effect of this derivative. In this study, PH151 induced the activation of metacaspases in *S. cerevisiae*, which could be closely related to ROS production and mitochondrial dysfunction.

5. Conclusions

The results obtained in this study show that the compound PH151 has antifungal activity against *S. cerevisiae*. This activity is associated with a loss of cell membrane integrity, intracellular accumulation of ROS, reduced mitochondrial membrane potential, and activation of metacaspases, elements that induce cell death by apoptosis.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Universidade de Caxias do Sul (UCS), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Abouelhassan, Y., Yang, Q., Yousaf, H., Nguyen, M. T., Rolfe, M., Schultz, G. S., & Huigens, R. W. (2017). Nitroxoline: A broad-spectrum biofilm-eradicating agent against pathogenic bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(2), 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.017>
- Arafa, R. K., Hegazy, G. H., Piazza, G. A., & Abadi, A. H. (2013). Synthesis and in vitro antiproliferative effect of novel quinoline-based potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63, 826–832. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.008>
- Bennamara, A., & Abourriche, A. (2020). Alkaloids 8-Hydroxyquinoline derivatives: Synthesis and biological activities. *Journal of Analytical Sciences and Applied Biotechnology, Vol 2, J. Anal. Sci. Appl. Biotechnol.*, Vol 2(1), 2020, pp. 57-62 Pages. <https://doi.org/10.48402/IMIST.PRSM/JASAB-V2I1.21491>
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., & Madeo, F. (2010). Apoptosis in yeast: Triggers, pathways, subroutines. *Cell Death & Differentiation*, 17(5), 763–773. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.219>

Chan, S. H., Chui, C. H., Chan, S. W., Kok, S. H. L., Chan, D., Tsoi, M. Y. T., Leung, P. H. M., Lam, A. K. Y., Chan, A. S. C., Lam, K. H., & Tang, J. C. O. (2013). Synthesis of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Novel Antitumor Agents. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(2), 170–174. <https://doi.org/10.1021/ml300238z>

Cherdtrakulkiat, R., Boonpangrak, S., Sinthupoom, N., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V. (2016). Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 6, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.03.014>

Chobot, V., Hadacek, F., Bachmann, G., Weckwerth, W., & Kubicova, L. (2018). Antioxidant Properties and the Formation of Iron Coordination Complexes of 8-Hydroxyquinoline. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3917. <https://doi.org/10.3390/ijms19123917>

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA CLSI document M27-A3.

Cortés, J. C. G., Curto, M.-Á., Carvalho, V. S. D., Pérez, P., & Ribas, J. C. (2019). The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107352. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.008>

De Nobel, J. G., Dijkers, C., Hooijberg, E., & Klis, F. M. (1989). Increased Cell Wall Porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after Treatment with Dithiothreitol or EDTA. *Microbiology*, 135(7), 2077–2084. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-7-2077>

Du, L., Yu, Y., Chen, J., Liu, Y., Xia, Y., Chen, Q., & Liu, X. (2007). Arsenic induces caspase- and mitochondria-mediated apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 7(6), 860–865. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00274.x>

Enquist, P.-A., Gylfe, Å., Hägglund, U., Lindström, P., Norberg-Scherman, H., Sundin, C., & Elofsson, M. (2012). Derivatives of 8-hydroxyquinoline—Antibacterial agents that target intra- and extracellular Gram-negative pathogens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(10), 3550–3553. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.096>

Farrugia, G., & Balzan, R. (2012). Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. *Frontiers in Oncology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00064>

Hu, M.-J., Cox, K. D., & Schnabel, G. (2016). Resistance to Increasing Chemical Classes of Fungicides by Virtue of “Selection by Association” in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*®, 106(12), 1513–1520. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-16-0161-R>

Joaquim, A. R., Pippi, B., de Cesare, M. A., Rocha, D. A., Boff, R. T., Staudt, K. J., Ruaro, T. C., Zimmer, A. R., de Araújo, B. V., Silveira, G. P., Martins, A. F., Teixeira, M. L., dos Santos, F. P., Fuentefria, A. M., & de Andrade, S. F. (2019). Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(6), 1186–1196. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13435>

Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE*, 6(2), e16015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>

Kavakçioğlu, B., & Tarhan, L. (2018). Yeast caspase-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 induced by antifungal and potential antitumor agent clotrimazole. *Archives of microbiology*, 200(1), 97-106. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1425-7>

Kim, Y. C., Lee, J. H., Bae, Y.-S., Sohn, B.-K., & Park, S. K. (2010). Development of effective

environmentally-friendly approaches to control *Alternaria* blight and anthracnose diseases of Korean ginseng. *European Journal of Plant Pathology*, 127(4), 443–450. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9610-4>

Kos, J., Ku, C. F., Kapustikova, I., Oravec, M., Zhang, H., & Jampilek, J. (2019). 8-Hydroxyquinoline-2-Carboxanilides as Antiviral Agents Against Avian Influenza Virus. *ChemistrySelect*, 4(15), 4582–4587. <https://doi.org/10.1002/slct.201900873>

Kos, J., Zadrazilova, I., Nevin, E., Soral, M., Gonec, T., Kollar, P., Oravec, M., Coffey, A., O'Mahony, J., Liptaj, T., Kralova, K., & Jampilek, J. (2015). Ring-substituted 8-hydroxyquinoline-2-carboxanilides as potential antimycobacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(15), 4188–4196. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.047>

Krawczyk, M., Pastuch-Gawolek, G., Mrozek-Wilczkiewicz, A., Kuczak, M., Skonieczna, M., & Musiol, R. (2019). Synthesis of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates and preliminary assay of their β 1,4-GalT inhibitory and anti-cancer properties. *Bioorganic Chemistry*, 84, 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.11.047>

Lam, K.-H., Gambari, R., Lee, K. K.-H., Chen, Y.-X., Kok, S. H.-L., Wong, R. S.-M., Lau, F.-Y., Cheng, C.-H., Wong, W.-Y., Bian, Z.-X., Chan, A. S.-C., Tang, J. C.-O., & Chui, C.-H. (2014). Preparation of 8-hydroxyquinoline derivatives as potential antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), 367–370. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.072>

Leroch, M., Kretschmer, M., & Hahn, M. (2011). Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany: Fungicide Resistance of *B. cinerea* Isolates from Vineyards. *Journal of Phytopathology*, 159(1), 63–65. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01719.x>

Mazzoni, C., & Falcone, C. (2008). Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(7), 1320–1327. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.02.015>

McCarthy, M. W., Kontoyiannis, D. P., Cornely, O. A., Perfect, J. R., & Walsh, T. J. (2017). Novel Agents and Drug Targets to Meet the Challenges of Resistant Fungi. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_3), S474–S483. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix130>

Musiol, R., Jampilek, J., Buchta, V., Silva, L., Niedbala, H., Podeszwa, B., Palka, A., Majerz-Maniecka, K., Oleksyn, B., & Polanski, J. (2006). Antifungal properties of new series of quinoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(10), 3592–3598. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.016>

Musiol, R., Jampilek, J., Nycz, J., Pesko, M., Carroll, J., Kralova, K., Vejsova, M., O'Mahony, J., Coffey, A., Mrozek, A., & Polanski, J. (2010). Investigating the Activity Spectrum for Ring-Substituted 8-Hydroxyquinolines. *Molecules*, 15(1), 288–304. <https://doi.org/10.3390/molecules15010288>

Oliveri, V., & Vecchio, G. (2016). 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 120, 252–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.007>

Peña, N., Antón, A., Kamilaris, A., & Fantke, P. (2018). Modeling ecotoxicity impacts in vineyard production: Addressing spatial differentiation for copper fungicides. *Science of The Total Environment*, 616–617, 796–804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.243>

Perrone, G. G., Tan, S.-X., & Dawes, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1783(7), 1354–1368.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.023>

Pippi, B., Lopes, W., Reginatto, P., Silva, F. É. K., Joaquim, A. R., Alves, R. J., Silveira, G. P., Vainstein, M. H., Andrade, S. F., & Fuentefria, A. M. (2019). New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(1), 41–48.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.017>

Pippi, B., Reginatto, P., Machado, G. da R. M., Bergamo, V. Z., Lana, D. F. D., Teixeira, M. L., Franco, L. L., Alves, R. J., Andrade, S. F., & Fuentefria, A. M. (2017). Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. *Medical Mycology*, 55(7), 763–773. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx003>

Polanski, J., Niedbala, H., Musiol, R., Podeszwa, B., Tabak, D., Palka, A., Mencil, A., Finster, J., Mouscadet, J.-, & Bret, M. (2006). 5-Hydroxy-6-Quinaldic Acid as a Novel Molecular Scaffold for HIV-1 Integrase Inhibitors. *Letters in Drug Design & Discovery*, 3(3), 175–178.
<https://doi.org/10.2174/157018006776286934>

Chan-On, W., Huyen, N. T. B., Songtawee, N., Suwanjang, W., Prachayasittikul, S., & Prachayasittikul, V. (2015). Quinoline-based clioquinol and nitroxoline exhibit anticancer activity inducing FoxM1 inhibition in cholangiocarcinoma cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 2033. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S79313>

Rbaa, M., Benhiba, F., Obot, I. B., Oudda, H., Warad, I., Lakhrissi, B., & Zarrouk, A. (2019). Two new 8-hydroxyquinoline derivatives as an efficient corrosion inhibitors for mild steel in hydrochloric acid: Synthesis, electrochemical, surface morphological, UV–visible and theoretical studies. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 120–133.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.104>

Sashidhara, K. V., Kumar, A., Bhatia, G., Khan, M. M., Khanna, A. K., & Saxena, J. K. (2009). Antidyslipidemic and antioxidative activities of 8-hydroxyquinoline derived novel keto-enamine Schiff's bases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(4), 1813–1818.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.08.004>

Scariot, F. J., Jahn, L. M., Maianti, J. P., Delamare, A. P. L., & Echeverrigaray, S. (2016). The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. *Apoptosis*, 21(7), 866–872. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1251-4>

Serrao, E., Debnath, B., Otake, H., Kuang, Y., Christ, F., Debyser, Z., & Neamati, N. (2013). Fragment-Based Discovery of 8-Hydroxyquinoline Inhibitors of the HIV-1 Integrase–Lens Epithelium-Derived Growth Factor/p75 (IN–LEDGF/p75) Interaction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(6), 2311–2322. <https://doi.org/10.1021/jm301632e>

Souza, L. M., Chaves, M. A., Joaquim, A. R., Gionbelli, M. P., Gava, A., Fiorentin, J., Ficagna, E., Almança, M. A. K., Teixeira, M. L., Andrade, S. F., & Fuentefria, A. M. (2021). The efficacy of 8-hydroxyquinoline derivatives in controlling the fungus *Ilyonectria liriiodendri*, the causative agent of black foot disease in grapevines. *Journal of Applied Microbiology*, jam.15035. <https://doi.org/10.1111/jam.15035>

Su, H., Han, L., & Huang, X. (2018). Potential targets for the development of new antifungal drugs. *The Journal of Antibiotics*, 71(12), 978–991. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0100-9>

Suwanjang, W., Prachayasittikul, S., & Prachayasittikul, V. (2016). Effect of 8-hydroxyquinoline and derivatives on human neuroblastoma SH-SY5Y cells under high glucose. *PeerJ*, 4, e2389. <https://doi.org/10.7717/peerj.2389>

Tian, J., Lu, Z., Wang, Y., Zhang, M., Wang, X., Tang, X., Peng, X., & Zeng, H. (2017). Nerol triggers mitochondrial dysfunction and disruption via elevation of Ca²⁺ and ROS in *Candida albicans*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 85, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.02.006>

Upadhayay J, Rana M, Juyal V, Bisht SS, Joshi R. 2020. Impact of Pesticide Exposure and Associated Health Effects. *Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action*.:69–88. <https://doi.org/10.1002/9781119432241.ch5>

Yin, X.-D., Ma, K.-Y., Wang, Y.-L., Sun, Y., Shang, X.-F., Zhao, Z.-M., Wang, R.-X., Chen, Y.-J., Zhu, J.-K., & Liu, Y.-Q. (2020). Design, Synthesis, and Antifungal Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Metal Complexes against Phytopathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(40), 11096–11104. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01322>

Yin, X.-D., Sun, Y., Lawoe, R. K., Yang, G.-Z., Liu, Y.-Q., Shang, X.-F., Liu, H., Yang, Y.-D., Zhu, J.-K., & Huang, X.-L. (2019). Synthesis and anti-phytopathogenic activity of 8-hydroxyquinoline derivatives. *RSC Advances*, 9(52), 30087–30099. <https://doi.org/10.1039/C9RA05712A>

Ždralović, M., Guaragnella, N., Antonacci, L., Marra, E., & Giannattasio, S. (2012). Yeast as a Tool to Study Signaling Pathways in Mitochondrial Stress Response and Cytoprotection. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1100/2012/912147>

Zhang, S., Li, D., Song, Z., Zang, C., Zhang, L., Song, X., & Li, S. (2017). “Carbon Assimilation” Inspired Design and Divergent Synthesis of Drimane Meroterpenoid Mimics as Novel Fungicidal Leads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(41), 9013–9021. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03126>

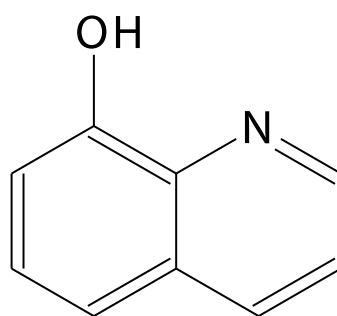
Figure Captions

Figure 1. Chemical structure of 8-hydroxyquinoline.

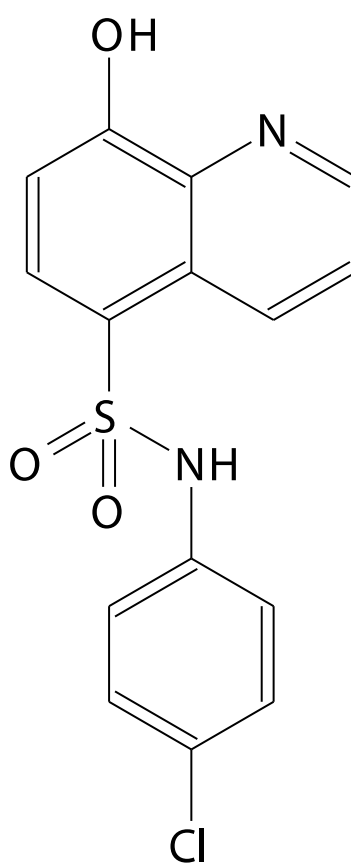


Figure 2. Chemical structure of 8-hydroxyquinoline derivative PH151.

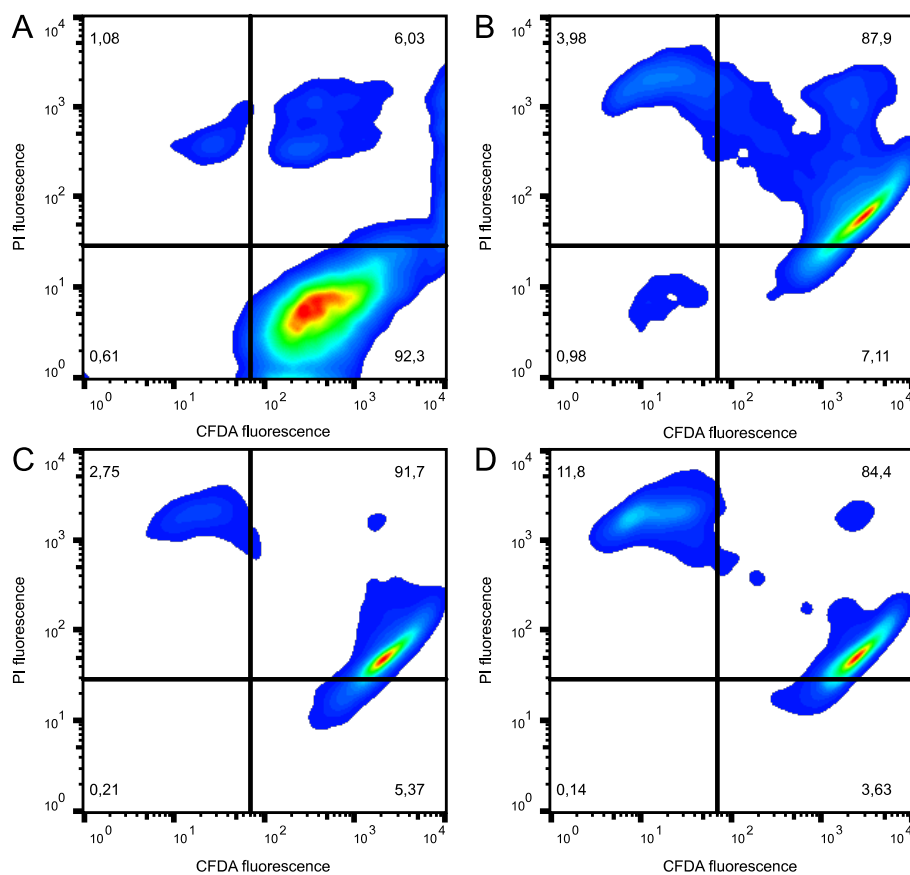


Figure 3. Cell membrane integrity (PI fluorescence) and viability (CFDA fluorescence) of wild-type BY4741 yeast treated for 6 h with 0 (A, control), 47.8 μ M (B), 95.5 μ M (C), or 191 μ M (D) of PH151. A total of 20,000 cells were analyzed, and numbers within figures indicate the percentages of cells within each quadrant.

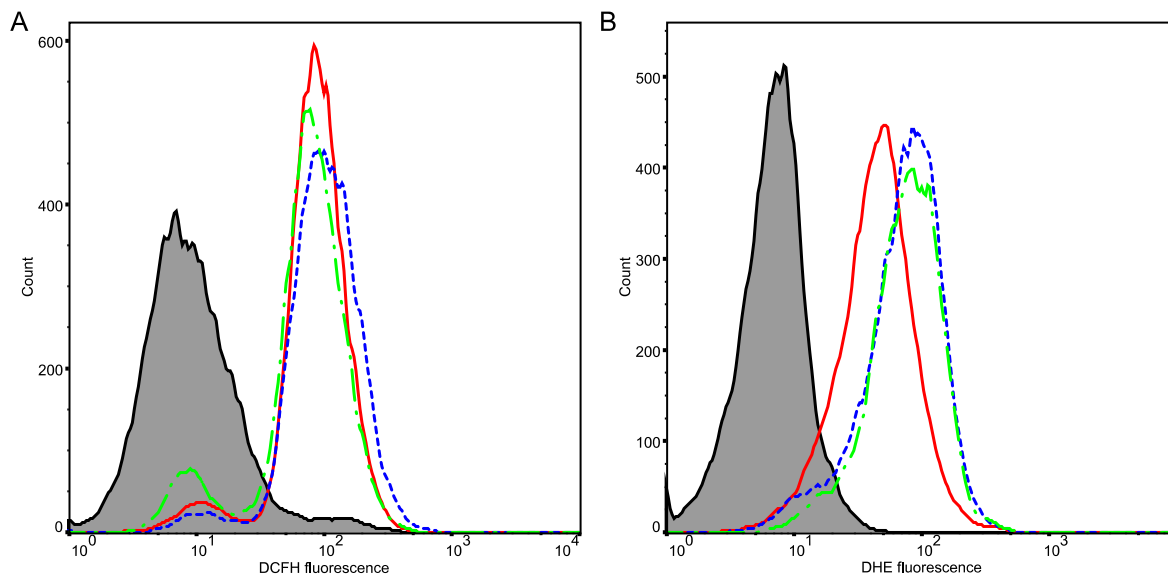


Figure 4. Intracellular concentration (fluorescence intensity) of ROS in untreated yeast (grey area) versus cells treated with 47.8 μ M (—), 95.5 μ M (.....), or 191 μ M (-.-.-) of PH151 for 6 h. (A) DCFH fluorescence intensity; (B) DHE fluorescence intensity.

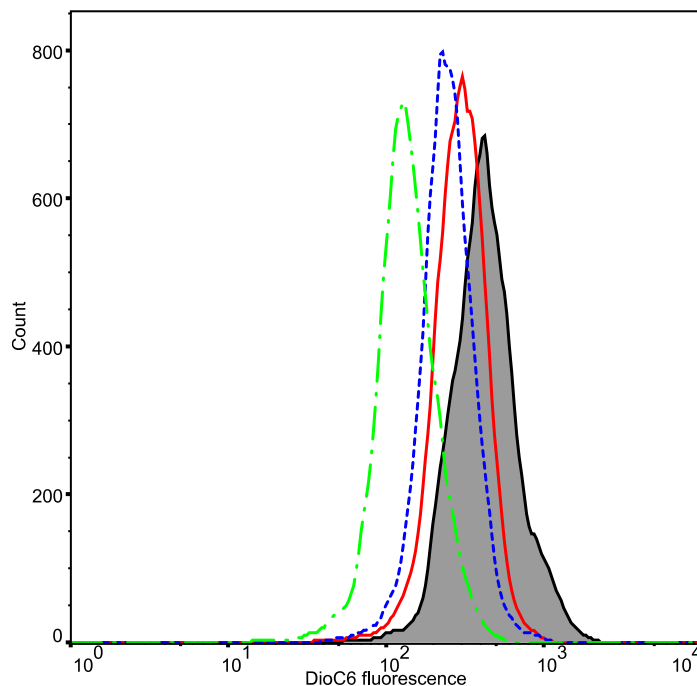


Figure 5. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) (DiOC6 fluorescence) in control yeast (grey area) versus cells treated with 47.8 μM (—), 95.5 μM (.....), or 191 μM (-.-.-) of PH151 for 6 h.

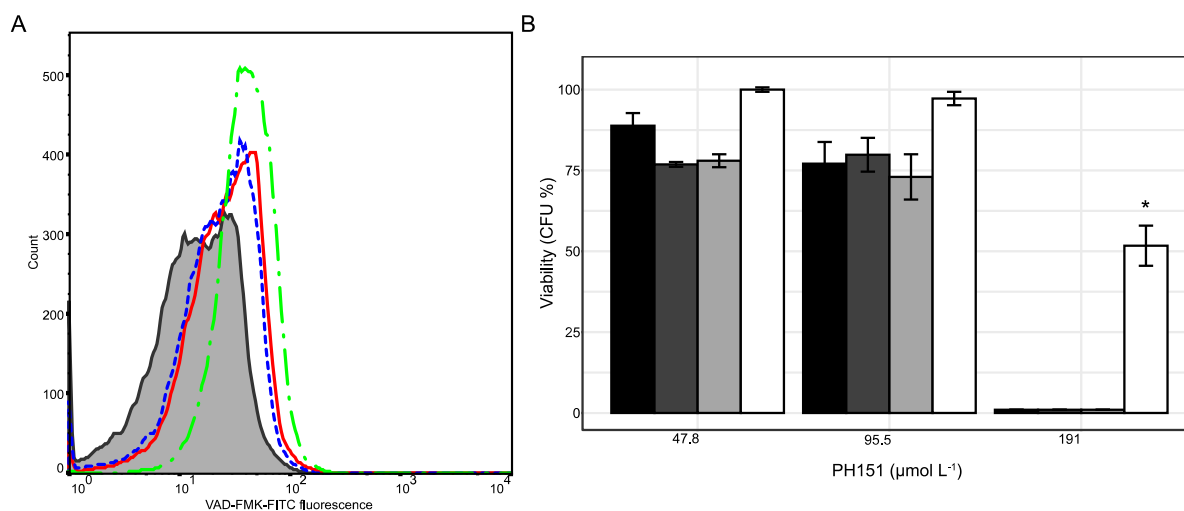
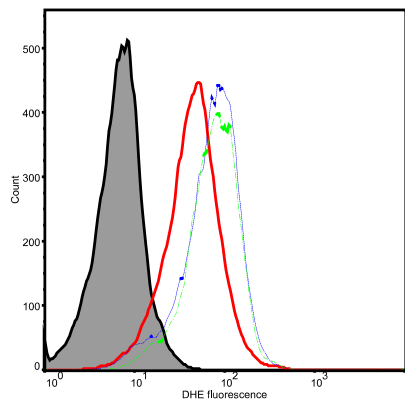
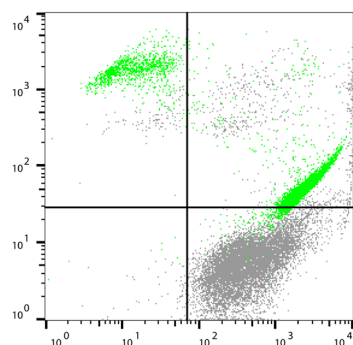


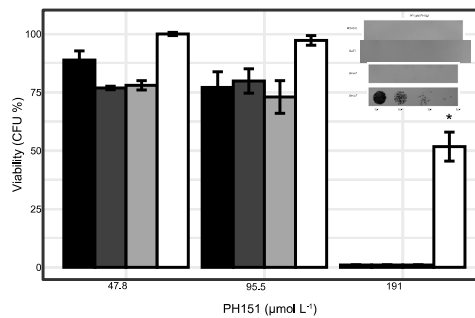
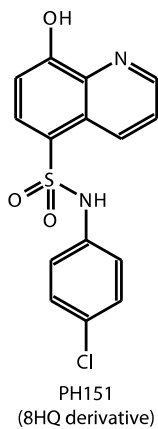
Figure 6. (A) Caspase activity (VAD-FMK-FITC fluorescence) in control yeasts (grey area) versus cells treated with 47.8 μM (—), 95.5 μM (.....), or 191 μM (-.-.-) of PH151 for 6 h. (B) Viability (CFU %) of wild-type BY4741 (■) and deleted mutants *aif1* (■), *nucl* (■), and *yca1* (□) exposed to different concentrations of PH151 for 6 h. Error bar represent the standard error of mean of three replicates. The asterisk indicates significant differences according to Student's t test (* $P < 0.05$).



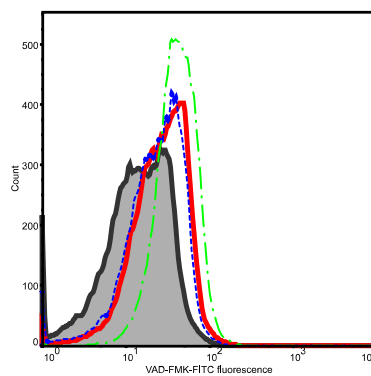
ROS increase



Membrane damage



Viability of wild-type BY4741 and deleted mutants



Metacaspase

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1

Comprovante de Cadastro de Acesso ao Patrimônio Genético no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A7F3DBF

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A7F3DBF**
Usuário: **IFRS**
CPF/CNPJ: **10.637.926/0001-46**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Glomerella cingulata

Botrytis cinerea

Título da Atividade: **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos a partir de plantas**

Equipe

Marcus André Kurtz Almança	IFRS
Angelo Gava	IFRS/Campus Bento Gonçalves
Evandro Ficagna	IFRS/Campus Bento Gonçalves

Data do Cadastro: **16/12/2019 19:39:33**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **19:40** de **16/12/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

10.2. Anexo 2

Permissão para publicação do Artigo de Revisão intitulado “Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine production– A review” como parte da presente dissertação no repositório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (<https://lume.ufrgs.br/>).

RE: tfac20:Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine production– A review

1 mensagem

Academic UK Non Rightslink <permissionrequest@tandf.co.uk>
Para: Angelo Gava <gava.angelogava@gmail.com>

6 de outubro de 2021 06:41

Dear Angelo Gava,

Material Requested: 'Angelo Gava, Cassandro Davi Emer, Evandro Ficagna, Saulo Fernandes de Andrade & Alexandre Meneghello Fuentefria (2021) Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine production– A review, Food Additives & Contaminants: Part A, 38:6, 943-961, DOI: 10.1080/19440049.2021.1894357'.

Thank you for your correspondence requesting permission to reproduce the above content from our Journal in your online thesis and to be posted in the university's repository – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) <https://lume.ufrgs.br/>

We will be pleased to grant permission to reproduce your '**Author's Original Manuscript**' on the sole condition that you acknowledge the original source of publication.

"This is an **Author's Original Manuscript** of an article published by Taylor & Francis Group in **Food Additives & Contaminants: Part A** available online at <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1894357>".

You will also need to obtain permission from any co-author's of this article.

Please note we are unable to grant you permission to include the **final accepted version** within the **12 month embargo period**.

Please note: This **does not allow** the use of the **VoR** (Version of Record the PDF on the publisher's website) to be posted online, however you may include the VoR as an appendix to the printed version of your thesis.

Using a DOI to link to the VoR on Taylor & Francis Online means that downloads, Altmetric data, and citations can be tracked and collated – data you can use to assess the impact of your work.

This permission does not cover any third party copyrighted work which may appear in the material requested.

Please see below links you may find helpful.

Sharing your work - <https://authorservices.taylorandfrancis.com/sharing-your-work/>

Accessing your authored works on Taylor & Francis online - <https://authorservices.taylorandfrancis.com/my-authored-works/>

Author services - <https://authorservices.taylorandfrancis.com/>

Please do not hesitate to let me know if I can be of any additional assistance.

With best wishes,

Annabel

Annabel Flude | Permissions Administrator

Journals, Taylor & Francis Group

Permissions e-mail: permissionrequest@tandf.co.uk

Web: www.tandfonline.com

📍 4 Park Square, Milton Park, Abingdon, OX14 4RN

☎ +44 (0)20 8052 0659



Taylor & Francis is a trading name of Informa UK Limited,

registered in England under no. 1072954



🌲 Before printing, think about the environment.

[Information Classification: General](#)

From: Angelo Gava <gava.angelogava@gmail.com>

Sent: 25 September 2021 19:27

To: Academic UK Non Rightslink <permissionrequest@tandf.co.uk>

Subject: tfac20:Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine production– A review

Permissions Request

Type of use: Academic

Article title: Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine production– A review

Article DOI: 10.1080/19440049.2021.1894357

Author name: Angelo Gava, Cassandro Davi Emer, Evandro Ficagna, Saulo Fernandes de Andrade & Alexandre Meneghello Fuentesfria

Journal title: Food Additives & Contaminants: Part A