



Biocontrole in vitro de bolores deteriorantes por toxina killer de levedura antagonista

RESUMO

Rafaela Alves Martins
rafaela_alves15@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Alexandre Rodrigo Coelho
arcoelho@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

O trabalho desenvolvido teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica da levedura *Hansenula wingei* sobre os fungos filamentosos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*. A levedura foi reativada e cultivada para obtenção de metabólitos na forma de extrato bruto, purificada parcialmente por ultrafiltração, formando as frações 1 e 2, de moléculas maiores e menores que 30 kDa, respectivamente, seguido de ensaio antifúngico, contagem de esporos germinados e medição de comprimento de hifas. As menores porcentagens de germinação ocorreram no Extrato Bruto e na fração 2, para ambos os fungos, enquanto a Fração 1 teve porcentagens de germinação muito próximas aos do controle. No desenvolvimento de hifas os menores valores também foram encontrados no Extrato Bruto e na Fração 2, enquanto a Fração 1 teve o maior desenvolvimento, sugerindo que o(s) composto(s) de interesse se encontram entre as moléculas de massa menor que 30 kDa. Foi observada a presença de toxina *killer* no cultivo de *Hansenula wingei* e os testes mostraram que essa toxina é eficiente não só na inibição da germinação de esporos, mas também retarda o desenvolvimento de hifas nos esporos já germinados.

PALAVRAS-CHAVE: Biocontrole. Antifungograma. Inibição.

INTRODUÇÃO

A sociedade tem buscado uma rotina alimentar que se associe à hábitos mais saudáveis, o que reflete no aumento da comercialização de frutas e hortaliças (VANDEKIDEREN et al., 2008). As frutas são compostas por vitaminas, minerais, carboidratos, proteínas, fibras (ABREU; SPINELLI, 2014) e principalmente água, que fornece condições ideais para a proliferação de micro-organismos, especialmente de origem fúngica, que deterioram o alimento e/ou contamina-o com micotoxinas.

A contenção de contaminação baseia-se no emprego de fungicidas, que pode aumentar os níveis de compostos químicos nos frutos pós colheita (WILSON; WISNIEWSKI, 1994). No contexto de saúde e segurança dos alimentos, a aplicação de compostos bioativos em produtos biotecnológicos podem apresentar uma alternativa viável e não nociva de prevenção de deterioração (COELHO, 2003).

Uma opção é o emprego de leveduras antagonistas, cujas características denominadas *killer*, tem a habilidade de inibir o crescimento de certos micro-organismos sensíveis (LIMA et al., 2012).

Baseando-se nesse antagonismo, o trabalho desenvolvido teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica da levedura *Hansenula wingei* sobre os fungos filamentosos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*.

MÉTODOS

Os métodos foram aplicados para obtenção do cultivo de levedura na forma de extrato bruto, purificação parcial por ultrafiltração, ensaio antifúngico, contagem de esporos germinados e medição de comprimento de hifas.

OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Baseando-se na metodologia utilizada por Simer (2013), a levedura previamente isolada foi reativada em Caldo MPL, por meio da transferência de uma alçada para um Erlenmeyer com 25 mL de caldo, que foi incubado a 25°C por 24 horas.

Após incubação, foi realizada a padronização de um inóculo de aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células, utilizando a Escala de MacFarland (número 1). O inóculo foi transferido para Erlenmeyers com Caldo MPL e incubado por 96 horas a 25°C. Em seguida, o cultivo foi submetido a centrifugação e filtração (COELHO, 2005). Uma parte do extrato bruto foi reservada para o antifungigrama e o restante seguiu para ultrafiltração.

PURIFICAÇÃO PARCIAL

De acordo com a metodologia adotada por Coelho (2005), a purificação parcial se deu por meio da utilização de membrana de exclusão celular de 30 kDa, que possibilitou separar o extrato bruto em duas frações, denominadas frações 1 e 2. Na Fração 1 ficaram agrupadas as moléculas maiores que 30 kDa, ao passo que as moléculas menores que 30 kDa constituíram a Fração 2.

ENSAIO ANTIFÚNGICO

Primeiramente foi realizada a padronização dos esporos dos fungos, adicionando uma alçada a um tubo contendo solução de Tween 80, seguida de contagem em câmara de Neubauer, determinando um inóculo de 10^5 esporos.

Estes esporos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 1 mL de Caldo MPL e 1 mL das frações, utilizando extrato bruto e água destilada para os controles positivo e negativo, respectivamente. Os tubos foram incubados por 12 horas a 25°C e centrifugados. O sobrenadante foi descartado e a contagem de esporos e medição de comprimento de hifas foi realizada em microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados quanto a germinação de esporos e desenvolvimento de hifas foram expressos nas tabelas 1 e 2, enquanto as porcentagens de inibição para ambos estão expressas nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

De acordo com a tabela 1, vê-se que as menores porcentagens de germinação ocorreram no Extrato Bruto e na Fração 2, para ambos os fungos, enquanto a fração 1 teve porcentagens de germinação muito próximas aos do controle.

Tabela 1 - Atividade antifúngica realizada com as frações obtidas após a ultrafiltração do extrato bruto, sobre a germinação dos esporos de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*.

Tratamento	Germinação de esporos (%)	
	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. expansum</i>
Controle negativo (água)	93,25 ± 5,90b	94,63 ± 3,22b
Extrato Bruto	1,0 ± 0,87 ^a	4,25 ± 4,37a
1 (> 30 kDa)	98,25 ± 0,83c	87,00 ± 10,89b
2 (< 30 kDa)	1,0 ± 1,0a	4,75 ± 5,17a

Quanto menor o valor, maior a atividade antifúngica. Cada valor corresponde à média + desvio padrão dos valores de 9 dados, sendo três respostas para cada repetição. Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Autoria própria (2017)

A tabela 2 mostra o desenvolvimento de hifas em micrômetros (μm), onde, para ambos os fungos, os menores desenvolvimentos foram no Extrato Bruto e na Fração 2, enquanto a Fração 1 teve o maior desenvolvimento.

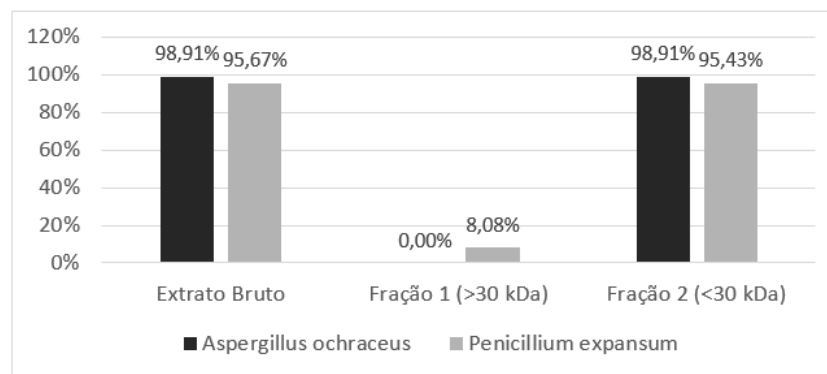
Tabela 2 - Atividade antifúngica realizada com as frações obtidas após a ultrafiltração do extrato bruto, sobre o desenvolvimento de hifas de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*.

Tratamento	Desenvolvimento de hifas (μm)	
	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. expansum</i>
Controle negativo (água)	86,37 ± 19,21c	108,19 ± 37,46b
Extrato Bruto	18,87 ± 5,29a	23,43 ± 8,46a
1 (> 30 kDa)	88,59 ± 7,28c	107,80 ± 41,79b
2 (< 30 kDa)	23,67 ± 18,14b	25,05 ± 11,66a

Quanto menor o valor, maior a atividade antifúngica. Cada valor corresponde à média + desvio padrão dos valores de 270 dados, sendo noventa respostas para cada repetição. Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Autoria própria (2017)

Enquanto as tabelas mostram as porcentagens de germinação e desenvolvimento, os gráficos apresentados abaixo mostram o oposto, ou seja, as porcentagens de inibição para ambos, respectivamente.

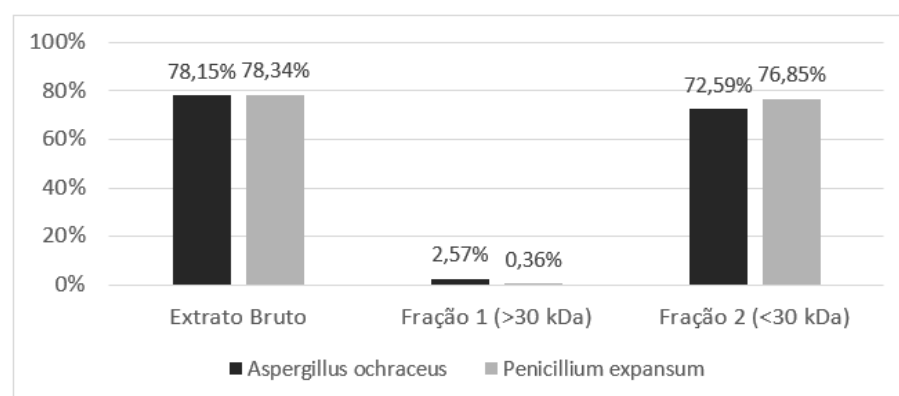
Gráfico 1 – Porcentagem de inibição, do extrato bruto e frações obtidas da ultrafiltração, sobre a germinação de esporos.



Fonte: Autoria própria (2017)

De acordo com gráfico 1, o *Aspergillus ochraceus* apresentou melhores resultados, embora a diferença para o *Penicillium expansum* seja pequena, ambos apresentando acima de 95% de inibição no Extrato bruto e Fração 2, contrastando com a Fração 1, que não mostrou inibição significativa em nenhum dos fungos testados, sugerindo que o(s) metabólito(s) de interesse se encontra(m) entre as moléculas de massa menor que 30 kDa.

Gráfico 2 – Porcentagem de inibição, do extrato bruto e frações obtidas da ultrafiltração, sobre o desenvolvimento de hifas.



Fonte: Autoria própria (2017)

Em relação ao desenvolvimento de hifas, a maior inibição ocorreu no *Penicillium expansum*, tanto no Extrato Bruto quanto na Fração 2, enquanto na Fração 1 a maior inibição ocorreu no *Aspergillus ochraceus*, embora a fração não apresente inibição significativa.

Os resultados obtidos em ambos os gráficos condizem com os dados mostrados nas tabelas e mostram que a maior eficiência ocorreu no Extrato Bruto.

CONCLUSÃO

Foi observada a presença de toxina *killer* no cultivo de *Hansenula wingei* e os testes mostraram que essa toxina é eficiente não só na inibição da germinação de esporos, mas também retarda o desenvolvimento de hifas nos esporos já germinados.

***In vitro* biocontrol of deteriorating molds by antagonist yeast killer toxin**

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of *Hansenula wingei* yeast on the filamentous fungi *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium expansum*. The yeast was reactivated and cultured to obtain metabolites in the form of crude extract, partially purified by ultrafiltration, forming fractions 1 and 2, of molecules larger and smaller than 30 kDa, respectively, followed by antifungal assay, germinated spore count and measurement of hyphae length. The lowest percentages of germination occurred in the crude extract and fraction 2, for both fungi, while the fraction 1 had percentages of germination very close to those of the control. In the development of hyphae, the lowest values were also found in the crude extract and fraction 2, while fraction 1 had the greatest development, suggesting that the metabolite(s) of interest is among molecules with mass less than 30 kDa. The presence of killer toxin was observed in *Hansenula wingei* cultivation and the tests showed that this toxin is efficient not only in the inhibition of spore germination, but also slows down the development of hyphae in spores already germinated.

KEYWORDS: Biocontrol. Antifungal susceptibility. Inhibition.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CNPq pelo auxílio financeiro e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná por possibilitar o desenvolvimento das atividades em suas dependências.

REFERÊNCIAS

ABREU, E. S.; SPINELLI, M. G. N. **Seleção e Preparo de Alimentos: gastronomia e nutrição**. São Paulo: Metha, 2014.

COELHO, A. R. **Controle de *Penicillium expansum*/biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de levedura killer visando aplicação pós-colheita**. 2005. 122 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 24, n. 2, p. 337-358, 2003.

LIMA, J. R. et al. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**. v. 83, p. 58-64, 2013.

SIMER, P. **Efeito de frações ultrafiltradas do cultivo de *Hansenula wingei* no controle de *Penicillium expansum* e *Apergillus ochraceus***. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2013.

VANDEKINDEREN, I. et al. Effect of decontamination agents on the microbial population, sensorial quality and nutrient content of grated carrots (*Daucus carota* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.56, n.14, p. 5723-5731, 2008.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. **Biological control of postharvest diseases**. CRC Press, 1994.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

MARTINS, R. A.; COELHO, A. R. Biocontrole *in vitro* de bolores deteriorantes por toxina *killer* de levedura antagonista. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Rafaela Alves Martins
rafaela_alves15@yahoo.com.br.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

