

## Levedura killer no biocontrole de fungos filamentosos deteriorantes de alimentos

## Yeast killer in biocontrol of food spoilage filamentous fungi

### RESUMO

**Laura Fernandes Campos**  
[lauracammpos@hotmail.com](mailto:lauracammpos@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**Alexandre Rodrigo Coelho**  
[arcoelho@utfpr.edu.br](mailto:arcoelho@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**Douglas Rangel da Costa**  
[douglas@sementesparana.com.br](mailto:douglas@sementesparana.com.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**Fabiana Fiusa Ferreira**  
[fabianaf@hotmail.com](mailto:fabianaf@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**Marianne Ayumi Shirae**  
[marianneshirai@utfpr.edu.br](mailto:marianneshirai@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**Lyssa Setsuko Sakanaka**  
[lyssa@utfpr.edu.br](mailto:lyssa@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

A aveia (*Avena sativa* L.) é um cereal que possui múltiplas formas de utilização e que, ao longo do processamento industrial, observa-se a geração de resíduos. Tendo em vista o estudo de alternativas para o melhor aproveitamento do resíduo de aveia industrial, o trabalho teve como objetivo desenvolver um revestimento comestível à base de amido extraído de resíduo industrial de aveia adicionado de composto antifúngico natural. O filme comestível foi desenvolvido pelo método *casting*, empregando o AR, e o glicerol como agente plastificante, e as seguintes propriedades foram determinadas: espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e perfuração. Paralelamente, o extrato bruto (EB) contendo composto antifúngico produzido a partir do cultivo de *Hansenula wingei*, e a solução filmogênica elaborada com AR, glicerol e EB (SF<sub>EB</sub>), foram submetidos ao ensaio antifúngico em meio líquido, avaliando-se o efeito inibitório sobre a germinação de esporos e o desenvolvimento micelial de *Penicillium expansum*. O filme desenvolvido à base de amido de aveia residual apresentou espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e perfuração, satisfatórios para utilização como revestimento comestível, com perspectivas de aplicação em frutos in natura. O composto antifúngico foi efetivo contra *P. expansum*, inibindo a germinação dos esporos e o desenvolvimento de hifas em 97,74 e 87,92%, respectivamente. Nos ensaios realizados após tratamento térmico de 90°C por 30 minutos, o EB também foi eficaz na inibição da germinação dos esporos (64,59%) e do desenvolvimento micelial (84,48%) do mesmo fungo. Em relação aos ensaios antifúngicos com solução filmogênica, SF<sub>EB</sub> controlou de forma eficiente e significativa a germinação de esporos (30,52%) e o desenvolvimento de hifas (61,52%) de *P. expansum*, quando comparados com a SF<sub>água</sub>. Os resultados foram satisfatórios para utilização do amido AR em revestimento comestível adicionado de composto antifúngico natural, com perspectivas de aplicação em frutos in natura. A incorporação de composto antifúngico ao filme possibilitará estudar o efeito inibitório de fungos filamentosos deteriorantes, associado ao aumento de vida útil de frutos destinados ao consumo direto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cereal. Polissacarídeo. Levedura. Toxina *killer*. Solução filmogênica.

### ABSTRACT

Oats (*Avena sativa* L.) is a cereal that has multiple forms of use and that, along industrial processing, it is observed the generation of residues. The objective of this work was to develop an edible starch-based coating extracted from industrial oat residue with added natural antifungal compound. The edible film was developed by the *casting* method, using RS, and glycerol as plasticizing agent, and the following properties were determined: thickness, solubility, water vapor permeability and perforation. In parallel, the crude extract (CE) containing antifungal compound produced from the *Hansenula wingei* culture, and the filmogenic solution elaborated with RS, glycerol and CE (FS<sub>CE</sub>), were submitted to the

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



antifungal assay in liquid medium, evaluating the inhibitory effect on the spore germination and the mycelial development of *Penicillium expansum*. The film developed based on residual oat starch presented a thickness, solubility, water vapor permeability and perforation, satisfactory for use as an edible coating, with perspectives of application in fresh fruits. The antifungal compound was effective against *P. expansum*, inhibiting spore germination and development of hyphae in 97.74 and 87.92%, respectively. In the experiments carried out on the crude extract (CE) after 90 °C heat treatment for 30 minutes, it was also effective in inhibiting spore germination (64.59%) and mycelial development (84.48%) against the same mould. About the antifungal assay with filmogenic solution, FS<sub>CE</sub> controlled spore germination (30,52%) and the hyphal growth (61.52%) of *P. expansum* efficiently and significantly, when compared to the FS<sub>water</sub>. The results were satisfactory for the use of the starch (OS) in edible coating added of natural antifungal compound, with perspectives of application in fruits *in natura*. The incorporation of antifungal compound into the film will allow the study of the inhibitory effect of filamentous fungi, associated to the increase in shelf life of fruits destined for direct consumption.

**KEYWORDS:** Cereal. Polysaccharide. Yeast. Killer toxin. Filmogenic solution.

## INTRODUÇÃO

Estudos relacionados à aplicação de amido em formulações de revestimentos comestíveis vêm sendo realizados ao longo dos anos, principalmente por serem transparentes, inodoros, incolores e insípidos, além de biodegradáveis e de baixo custo (JIMÉNEZ et al. 2012; MOLAVI et al., 2015).

A incorporação de agentes antimicrobianos em revestimentos comestíveis parece também ser uma alternativa interessante, no sentido de impedir ou reduzir o crescimento indesejável de fungos filamentosos deteriorantes, possibilitando o aumento de vida útil de frutos frescos (CAMPOS, 2011).

As toxinas *killer* produzidas por leveduras antagonistas, enquadram-se como substâncias naturais, de caráter inócuo à saúde humana, que se mostraram efetivas no controle de cepas selvagens na indústria fermentativa para produção de cerveja, vinho e picles, bem como contra bolores deteriorantes em frutos (VONDREJS; JANDEROVÁ; VALASEK, 1996, SCHMITT; BREINIG, 2002).

Com base no pressuposto, este trabalho teve por objetivo caracterizar um filme comestível à base de amido de resíduo de aveia e adicionado de composto antifúngico natural, por meio da determinação da espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e perfuração, bem como realizar análise antifúngica *in vitro* com solução filmogênica, contra *P. expansum*.

## METODOLOGIA

O amido utilizado para a elaboração do revestimento foi extraído do resíduo de aveia industrial por Costa (2018), cedido pela empresa SL Cereais e Alimentos Ltda, situada em Mauá da Serra, Paraná, Brasil.

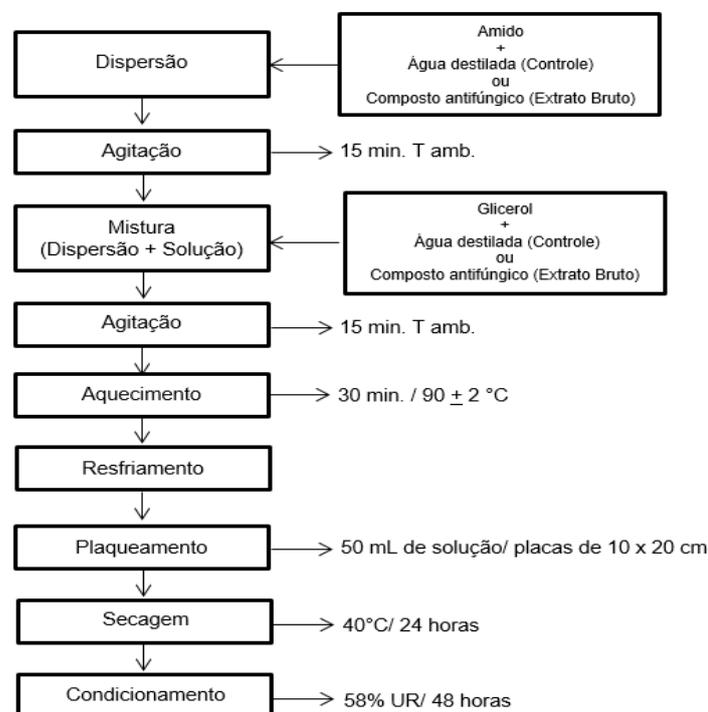
*Hansenula wingei* AM2-2, pertencente à micoteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UTFPR Câmpus Londrina, consistiu de levedura antagonista utilizada neste estudo.

*Penicillium expansum* n. 2, pertencente à micoteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UTFPR Câmpus Londrina, consistiu de fungo utilizado neste estudo.

#### OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO - EB DE LEVEDURA ANTAGONISTA

Após reativação de *H. wingei* AM2-2, um inóculo de aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células (100  $\mu$ L), foi transferido para 60 frascos contendo 50 mL de Caldo MPL. O cultivo estático foi centrifugado e filtrado para remoção das células.

#### PRODUÇÃO DO FILME COM AMIDO EXTRAÍDO DO RESÍDUO INDUSTRIAL DE AVEIA



Fonte: Ramires-Lopes (2016).

#### ANÁLISE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* COM SOLUÇÃO FILMOGÊNICA À BASE DE AMIDO, ADICIONADO DE COMPOSTO ANTIFÚNGICO NATURAL

Para analisar o efeito antifúngico da solução filmogênica, foi utilizada a técnica de antifungigrama em meio líquido (CHEN et al., 1999). Como controle negativo utilizou-se água destilada estéril como substituinte da solução filmogênica, e como controle positivo o EB íntegro.

Em seguida, transferiu-se para os tubos  $10^5$  esporos de *P. expansum*. O volume foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o pellet distribuído em lâminas para análise microscópica, onde foram determinadas a porcentagem de esporos germinados e o comprimento de hifas desenvolvidas. As respostas foram expressas em porcentagem de inibição da germinação de esporos, e porcentagem de inibição do desenvolvimento de hifas (CHEN et al., 1999).

## CARACTERIZAÇÃO DO FILME COMESTÍVEL

Os filmes elaborados foram cortados em formas e tamanhos diferentes, e mantidos em dessecador sob atmosfera com umidade relativa de 58%, para a realização dos testes subsequentes.

### Espessura

A espessura foi determinada através de um micrometro, considerando-se a espessura do filme como média de dez leituras em pontos aleatórios.

### Solubilidade

As amostras do filme utilizadas para o ensaio de solubilidade foram cortadas em quadrados de aproximadamente 20 x 20mm. Os filmes cortados foram imersos em água destilada e mantidos sob agitação em mesa agitadora. Em seguida descartou-se a fase líquida e os filmes foram levados à estufa. O percentual de solubilidade dos filmes foi determinado como porcentagem de matéria seca solubilizada (GONTARD et al., 1992). O teste foi realizado em triplicata.

### Ensaio de perfuração

Quadrados de 25 x 25mm do filme elaborado foram utilizados para o ensaio de perfuração. O ensaio foi realizado conforme descrito por Araujo-Farro et. al. (2010). O ensaio de perfuração ocorreu com o auxílio de texturômetro TA XT Plus da Stable Micro Systems (Surrey, Inglaterra) com probe de ponta de esfera de 5 mm e velocidade de deslocamento de 1 mm.s<sup>-1</sup> (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Os resultados foram apresentados como a média de oito respostas.

### Taxa de permeabilidade ao vapor d'água

A taxa de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes foi realizada, segundo metodologia gravimétrica de permeabilidade (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos para espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e perfuração mostraram-se satisfatórios para utilização da solução filmogênica à base de amido de aveia residual como filme comestível, com perspectivas de aplicação em frutos *in natura*. A incorporação de composto antifúngico ao filme possibilitará estudar o efeito inibitório de fungos filamentosos deteriorantes, associado ao aumento de vida útil de frutos destinados ao consumo direto.

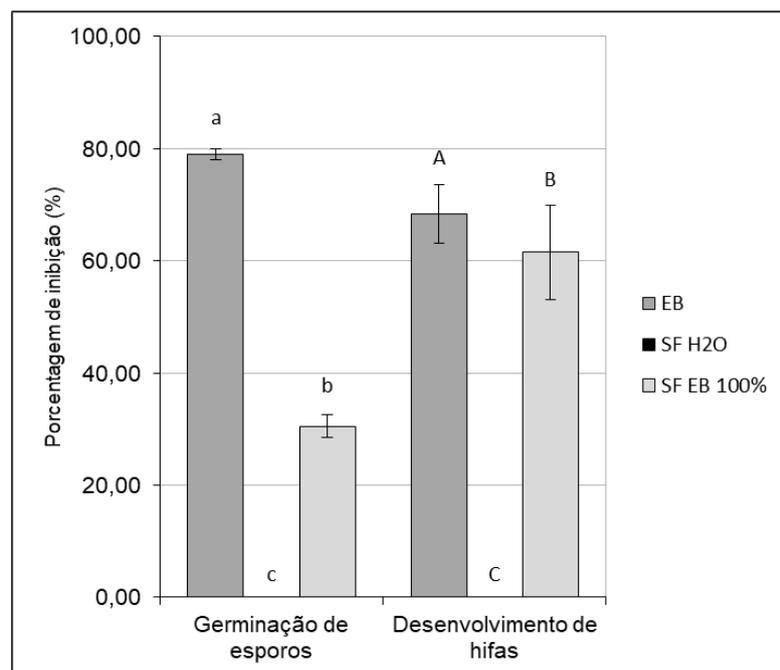
### ENSAIO ANTIFÚNGICO COM SOLUÇÃO FILMOGÊNICA ELABORADA COM EXTRATO BRUTO OBTIDO DO CULTIVO DE LEVEDURA ANTAGONISTA

A solução filmogênica com extrato bruto (SF<sub>EB</sub>) controlou de forma eficiente e significativa a germinação de esporos e o desenvolvimento de hifas de *P.*

*expansum*, quando comparado com a solução filmogênica elaborada com água (SF<sub>água</sub>), figura 1. Por outro lado, o seu efeito inibitório foi estatisticamente menor que o obtido pelo controle positivo (EB)

A diminuição na eficiência de controle do fungo filamentososo pode estar associado à presença de interferentes presentes na composição da solução filmogênica, tais como o glicerol e o amido. Este último, por conseguinte, pode ser utilizado como nutriente pelo fungo, favorecendo a germinação e o desenvolvimento micelial, conforme observado no tratamento com a solução filmogênica elaborada com água (SF<sub>água</sub>). Em ambos os parâmetros analisados (esporos germinados e comprimento de hifas), o valor médio no tratamento com SF<sub>água</sub> foi estatisticamente maior do que no controle negativo, o que poderia reforçar a hipótese mencionada acima.

**Figura 1** - Efeito inibitório da solução filmogênica com composto antifúngico de *Hansenula wingei* sobre a germinação de esporos e desenvolvimento de hifas de *Penicillium expansum*.



Fonte: Autoria própria (2019).

Legenda: EB: extrato bruto, SF H2O: solução filmogênica com água, SF EB 100%: solução filmogênica com 100% de extrato bruto.

## CONCLUSÃO

O filme desenvolvido à base de amido de aveia residual apresentou espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e resistência à perfuração, satisfatórios para utilização como revestimento comestível.

A solução filmogênica com extrato bruto ( $SF_{EB}$ ) controlou de forma eficiente e significativa a germinação de esporos e o desenvolvimento de hifas de *P. expansum*, quando comparado com a solução filmogênica elaborada com água ( $SF_{água}$ ).

Este estudo mostra que os filmes de amido obtido a partir de resíduo industrial gerado no processamento de aveia juntamente como a incorporação de composto antifúngico natural, pode ser empregado na produção de filmes em forma de revestimento de frutos, visando prolongar a sua vida útil.

### AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR – Brasil, pela concessão de bolsa de extensão à L.F.C. Agradecemos a UTFPR pela bolsa de iniciação científica PIBIC e à empresa, docentes e discentes envolvidos.

### REFERÊNCIAS

CAMPOS, C.A.; GERSCHENSON, L.N.; FLORES, S.K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food Bioprocess Technol.** v. 4, p. 849-875, 2011.

CHEN, Z.; BROWN, R.L.; LAX, A.R.; CLEVELAND, T.E. Inhibition of plant-Pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1320-1324, 1999.

COELHO, A.R.; TACHI, M.; PAGNOCCA, F.C.; NÓBREGA, G.M.A.; HOFFMANN, F.L.; HARADA, K. HIROOKA, E.Y. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as active agent against *Penicillium expansum*. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2009.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 57, n. 1, p. 190-195, 1992.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Edible and biodegradable starch films: review. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 6, p. 2058-2076, 2012.

RAMÍREZ-LOPES, S. **Amido e farinha de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*): extração, caracterização e desenvolvimento de filmes biodegradável**. 2016. 116 f. Dissertação (mestrado em engenharia de alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP. São Paulo. 2016.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R.M.V.; GARCIA, E.E.C. **Embalagens plásticas flexíveis, principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002.

VONDREJS, V.; JANDEROVÁ, B.; VALASEK, L. Yeast *killer* K1 and its exploitation in genetic manipulations. **Folia Microbiologica**. v. 41, p. 379-194, 1996.