

## **BIOCONTROLE IN VITRO DE BOLORES DETERIORANTES POR TOXINA KILLER DE LEVEDURA ANTAGONISTA**

*Rafaela Alves Martins  
Douglas Rangel da Costa  
Fabiana Fiusa Ferreira  
Lyssa Setsuko Sakanaka  
Marianne Ayumi Shirai  
Alexandre Rodrigo Coelho*

### **1. INTRODUÇÃO**

A sociedade tem buscado uma rotina alimentar que se associe a hábitos mais saudáveis, o que reflete no aumento da comercialização de frutas e hortaliças frescas (VANDEKINDEREN et al., 2008). As frutas são compostas por vitaminas, minerais, carboidratos, proteínas, fibras e, principalmente, água. Portanto, são imprescindíveis para uma boa manutenção do funcionamento do organismo (ABREU; SPINELLI, 2014).

A alta atividade de água é um fator importante na vida útil das frutas, onde a  $A_w$  (atividade de água) se encontra em torno de 0,98, enquanto bolores e leveduras requerem um mínimo de  $A_w$  de 0,80 e 0,88, respectivamente, tornando as frutas altamente suscetíveis a deterioração por micro-organismos (HOFFMANN, 2001).

Dentre eles, os fungos filamentosos merecem especial atenção, pois além de deteriorarem o fruto, podem produzir micotoxinas, metabólitos secundários de caráter tóxico para homens e animais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001;

RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002). *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. estão entre os fungos filamentosos de importância na deterioração de alimentos, incluindo frutos frescos e grãos (FARIAS et al. 2000).

A contenção da infecção fúngica se baseia no emprego de fungicidas sintéticos, que podem aumentar os níveis de compostos químicos nos frutos pós-colheita (WILSON; WISNIEWSKI, 1994). No contexto, o controle biológico vem ganhando importância, uma vez que a aplicação de compostos bioativos pode apresentar uma alternativa viável e inócua na prevenção de doenças pós-colheita (COELHO, HOFFMANN, HIROOKA, 2003).

Uma opção é o emprego de leveduras antagonistas produtoras de toxinas *killer*, proteínas extracelulares capazes de inibir o desenvolvimento de outros micro-organismos sensíveis (LIMA et al., 2013).

Vários gêneros de leveduras produtoras de toxina *killer* foram descritos, tais como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Hansenula*, embora a produção da toxina não seja característica da espécie e pode variar entre as diferentes cepas (PLATANIA et al., 2012; COELHO et al., 2011).

A capacidade antagonista de *Hansenula wingei* foi relatada por Gasperini (2011), cujo estudo mostrou ação efetiva da toxina *killer* sobre *Fusarium verticillioides*. Simer (2013) obteve altos índices de inibição no desenvolvimento de *P. expansum* e *A. ochraceus*. Fieira et al. (2013) obtiveram resultados satisfatórios no controle de *P. expansum* *in vivo*, com inibição de mais de 72% do desenvolvimento do fungo, quando utilizada uma combinação de células íntegras de *H. wingei* com tiabendazol (dosagem reduzida em 90%).

Considerando esse cenário, o estudo do efeito antifúngico *in vitro* de *H. wingei* sobre a germinação de esporos e o desenvolvimento micelial de *P. expansum* e *A. ochraceus* possibilitará fortalecer o controle biológico como estratégia racional no controle de fungos deteriorantes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica da toxina de *Hansenula wingei* sobre a germinação de esporos e o desenvolvimento micelial de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*.

## 2. PERDAS PÓS-COLHEITA E MEDIDAS DE CONTROLE

Dentre os segmentos existentes no cenário do agronegócio brasileiro, a fruticultura é um dos mais importantes, se estendendo por todo o território nacional em polos de produção que totalizam mais de 2 milhões de hectares de plantações

e geram mais de 5 milhões de empregos (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL - CNA, 2017).

A fruticultura brasileira também tem forte participação no mercado internacional, tendo exportado mais de 861.063 toneladas de frutas frescas em 2017, sendo o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas da China e Índia, respectivamente (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES EXPORTADORES DE FRUTAS E DERIVADOS - ABRAFRUTAS, 2018; SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, 2017). Uva, banana, laranja e cacau estiveram entre os frutos mais produzidos em 2017 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2018), ao passo que manga, melão, uva, limão/lima, maçã e mamão lideraram as exportações em 2017 (ABRAFRUTAS, 2018).

Com a grande produção também existe o problema de perdas pós-colheita, que podem chegar até 40% por motivos variados, como a colheita do produto em maturidade inadequada, danos mecânicos e falhas durante o transporte e armazenamento, deixando os frutos passíveis de deterioração (FACHINELLO; NATCHIGAL, 2009; GUSTAVSSON et al., 2011). Tais danos mecânicos causam injúrias às frutas que, em combinação com sua natureza suculenta, tornam-nas altamente suscetíveis à deterioração por micro-organismos, principalmente fungos filamentosos (FELIZIANI et al., 2013).

Dentre as doenças causadas por bolores em frutas pós-colheita, exemplificam-se a podridão em manga e citros por *Aspergillus* spp. (JOHNSON; COATES, 1993; WHITESIDE; GARNSEY; TRIMMER, 1988) e a podridão em maracujá e maçã por *Penicillium expansum* (FISCHER et al., 2007; COELHO et al., 2007).

## 2.1 BIOCONTROLE

A disponibilidade de produtos metabólicos de origem microbiológica em contrapartida ao atual uso de fungicidas de origem sintética, fornece um contexto para que o biocontrole seja o método a nortear as medidas a serem adotadas (CASTORIA et al., 2001).

O controle biológico tem se mostrado promissor por meio do uso de toxinas *killer* de leveduras para a contenção do desenvolvimento fúngico em frutas (COELHO et al., 2011). O estudo realizado por Oliveira et al. (2011) mostrou que diversas leveduras *killer* apresentaram antagonismo contra *Botrytis cinerea*,

causador de podridão cinzenta em morangos, por meio de competição por nutrientes e, em alguns casos, por antibiose.

Estudos também mostraram que o uso de um isolado de *Rhodotorula* sp. resultou em uma redução de 100% na incidência de podridão mole em pimentões (MELO et al., 1995) e redução de 21% da severidade da mesma doença em tomates (GOMES; SILVEIRA; MARIANO, 2005).

O estudo realizado por Moura (2017) mostrou efeito antagonico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* sobre o fungo *Penicillium digitatum*, responsável pela incidência de bolor verde em frutos cítricos.

Ferraz (2018) conduziu um estudo com *Sporobolomyces koalae* e encontrou atividade *killer* da mesma sobre células sensíveis de *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo potencial antagonista para uma levedura nova.

## 2.2 LEVEDURAS ANTAGONISTAS E CARACTERÍSTICA *KILLER*

Leveduras são micro-organismos encontrados amplamente na natureza, especialmente em frutas e hortaliças. São fungos unicelulares de alto interesse tecnológico para aplicação na indústria alimentícia, mais especificamente no emprego em fermentações (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

O que confere a característica *killer* em leveduras é a sua capacidade de matar células vulneráveis de uma mesma espécie ou gênero por meio de exotoxinas de baixo peso molecular, de constituição proteica ou glicoproteica, sendo a levedura imune à sua própria toxina (MAGLIANI et al., 1997; SCHMITT; BREINIG, 2002).

O primeiro fenômeno *killer* foi reportado em 1963, por Bevan e Makower, que conduziram um estudo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e apresentaram a proposta de que o efeito *killer* poderia ser dividido em fenótipos, sendo estes: *killer*, sensível e neutro. O fenótipo *killer* com a capacidade de matar o fenótipo sensível e o fenótipo neutro sem exercer nenhuma influência sobre os outros.

Não tardou a ser descoberto que outros gêneros, tais como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Sporidiobolus*, *Tilletiopsis* e *Zygosaccharomyces*, também apresentavam característica *killer* (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002).

Em 1978, Young e Yagi realizaram um estudo que consistiu na interação de 20 leveduras *killer* de vários gêneros e espécies, que resultou em uma

classificação em 10 categorias, denominadas K1 a K10, de acordo com a atividade de *killer* que possuíam, como mostra o Quadro 1 abaixo:

Quadro 1 - Classificação do fenótipo *killer*

<b>Classes killer</b>	<b>Levedura</b>	<b>Classe sensível</b>
K1	<i>S. uvarum</i> NCYC 190 <i>S. cerevisiae</i> A8209B, NCYC 232, 235, 631 e 663	K2, K3, K4
K2	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 e 1001 <i>S. diastaticus</i> NCYC 713	K1, K4
K3	<i>S. capensis</i> NCYC 761	K1, K4
K4	<i>Torulopsis glabrata</i> NCYC 388	K1
K5	<i>Debaromyces vanriji</i> NCYC 577 <i>Hansenula anomala</i> NCYC 434 <i>H. subpelliculosa</i> NCYC 16	K1, K3, K4
K6	<i>Kluyveromyces fragilis</i> NCYC 587	K1, K2, K3, K4
K7	<i>Candida valida</i> NCYC 327 <i>Pichia membranaefaciens</i> NCYC 333	K1, K3, K4, K6
K8	<i>H. anomala</i> NCYC 435	K1, K2, K3, K4, K6
K9	<i>H. mrakii</i> NCYC 500	K1, K2, K3, K4, K5, K8
K10	<i>K. drosophilarum</i> NCYC 575	K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8

Fonte: Young e Yagiu (1978).

Apesar das diferenças existentes entre si, estudos comparativos entre a toxina K1 e as demais permitiu observar que o mecanismo de ação das mesmas é semelhante. Todas as *killers* estudadas mostraram-se sensíveis à protease e ao calor (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002).

O tamanho das moléculas de toxina *killer* variam entre os gêneros e espécies, encontrando-se entre 18 e 300 kDa (SOARES; SATO, 2000). Estima-se que o peso molecular da toxina *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* encontra-se em 16 kDa (PFEIFFER; RADLER, 1982), enquanto as toxinas de *Hanseniaspora*

*uvarum* e *Hansenula anomala* foram estimadas em 18 e 300 kDa, respectivamente (RADLER; SCHMITT; MEYER, 1990; KAGIYAMA et al., 1988). Já a toxina de *Kluyveromyces lactis* foi relatada como sendo composta por duas subunidades de massa molecular de 27 kDa e acima de 80 kDa (SUGISAKI et al., 1984).

## 2.3 MECANISMOS DE AÇÃO DA TOXINA KILLER

Em 1972, Bussey descobriu que a exposição de células sensíveis de *Saccharomyces cerevisiae* à glucanase antes do tratamento com uma toxina *killer*, resultava em uma morte mais lenta das mesmas, dando início a uma série de estudos da relação da toxina com a parede celular da levedura.

Composta por polissacarídeos e proteínas, a parede celular constitui uma rígida estrutura de recobrimento para a membrana plasmática e, para a *S. cerevisiae*, sua constituição se baseia em três principais componentes: 48-60% de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanas, seguido de 20-30% de manose-proteínas e por fim 0,6-2,7% de quitina (FLEET, 1985).

A ação da toxina se dá em função da ligação inicial a um sítio ativo ( $\beta$ -[1,6] D-glucana) causando desestabilização na membrana por meio da abertura de um canal iônico, fazendo com que íons  $K^+$  e ATPs sejam conduzidos para o exterior das células, posteriormente inibindo o processo de síntese de macromoléculas e causando a morte da célula sensível (HUTCHINS; BUSSEY, 1983). Entretanto, nem todas as leveduras farão ligação com o mesmo sítio ativo, como no caso de *S. cerevisiae* KT28, cujo receptor é uma manoproteína, na *Kluyveromyces lactis*, que aparentemente liga-se a quitina e na *Hansenula mrakii*, que interage com a  $\beta$ -1,3 glucana (SCHMITT; PFEIFFER, 1990; BUTLER; WHITE; STARK, 1991; TAKITA; CASTILHO-VALAVICIUS, 1993; KASAHARA et al., 1994).

## 2.4 APLICAÇÕES

Consideráveis esforços vêm sendo aplicados nos últimos anos para a inserção de novos processos biológicos na cadeia de produção da indústria alimentícia, de modo que se possa obter produtos provenientes de etapas fermentativas, tais como vinhos, sucos de uva e cervejas, com qualidade elevada. Para isso, leveduras de caráter *killer* já estão sendo visadas como cultura starter

em processos de fermentação, algumas já inseridas na produção e outras em fase experimental. Inclusive, o aparecimento de leveduras *killer* na fermentação espontânea de uvas em vinícolas é extremamente comum e, buscando um padrão de qualidade mais padronizado, algumas empresas já adotaram o uso de tais leveduras (MAGLIANI et al., 1997). Por exemplo, a utilização de *Tetrapisispora phaffi* na fabricação de vinhos concluiu que a levedura mostrou ação inibitória contra *Hanseniaspora uvarum*, dominante em uvas e suco de uva e que pode surgir nas etapas de fermentação e pós-fermentação de vinhos, causando redução da qualidade sensorial pelo desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, além de produzir uma toxina *killer* letal à *Saccharomyces cerevisiae*, principal levedura usada na fermentação de vinhos (CIANI; FATICHENTI, 2001; WEDRAL; SHEWFELT; FRANK, 2010). Sugere-se que a aplicação dessa levedura pode substituir o uso de SO<sub>2</sub>, comumente aplicado, e prevenir a presença de resíduos nocivos ou indesejados no produto final (CIANI; FATICHENTI, 2001; COMITINI et al., 2004).

Já o estudo realizado por Liu e Tsao (2009) mostrou uma atuação eficiente da levedura *killer* *Willopsis saturnus* sobre as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyvomyces marxianus*, precursoras de deterioração em queijos.

Outras aplicações incluem o campo da medicina, com grande potencial para desenvolvimento de produtos antimicóticos para tratamento de infecções (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002), a taxonomia, onde culturas padrão de sensibilidade *killer* são utilizadas como indicativo de parentesco filogenético, bem como em tecnologias de DNA recombinante (SCHMITT; BREINIG, 2002).

### 3. METODOLOGIA

O trabalho desenvolvido foi de caráter científico e experimental, e consistiu em um ensaio antifúngico utilizando toxina *killer* obtida do cultivo estático de levedura antagonista. Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina.

*Hansenula wingei* AM2<sub>2</sub> foi utilizada como cultura antagonista, para produção de toxina *killer*. *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* consistiram de fungos filamentosos testes, para os ensaios antifúngicos. Os micro-organismos foram gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Alexandre Rodrigo Coelho e mantidos em Ágar Batata Dextrose, sob refrigeração.

## 3.1 MÉTODOS

O trabalho abordou o cultivo de levedura antagonista para obtenção de extrato bruto, etapas de purificação parcial do composto antifúngico por ultrafiltração e ensaio antifúngico contra fungos filamentosos, por meio de análise microscópica (porcentagem de esporos germinados e medição de comprimento de hifas).

### Cultivo de *Hansenula wingei* para obtenção de extrato bruto

Baseando-se na metodologia utilizada por Simer (2013), para obtenção do extrato bruto, a levedura previamente isolada e mantida em tubos com ágar Meio Para Levedura – MPL (constituído de 2% glicose, 0,5% extrato de levedura, 1% cloreto de sódio, 0,5% sulfato de amônio, 1,8% ágar, não acidificado) foi reativada em Caldo MPL (de mesma formulação, com exceção do ágar), por meio da transferência de uma alçada do tubo para um Erlenmeyer com 25 mL de caldo. O Erlenmeyer foi incubado a 25 °C por 24 horas.

Após incubação, foi realizada a padronização do inóculo de aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células, utilizando a Escala de MacFarland (número 1). O inóculo foi transferido para 20 Erlenmeyers com 50 mL de Caldo MPL cada (almejando obtenção de 1 Litro de cultivo) e incubado por 96 horas a 25 °C. Em seguida, o cultivo foi submetido a remoção de células por meio de centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos e filtração, utilizando membranas de 0,20  $\mu\text{m}$ . Um volume de 200 mL do extrato bruto foi reservado para o antifungograma e o restante (800 mL) seguiu para ultrafiltração.

### Purificação parcial

A purificação parcial foi realizada por meio da utilização de membranas de exclusão molecular de 30, 10, 5, 3 e 1 kDa, que retiveram moléculas de massa superior e possibilitou separar o extrato bruto em cinco frações, denominadas de acordo com a retenção de moléculas, sendo: Fração 10-30 kDa, Fração 5-10 kDa, Fração 3-5 kDa, Fração 1-3 kDa, Fração < 1 kDa. Após cada etapa de ultrafiltração, as frações foram suspensas em 50 mL de água destilada estéril, e armazenadas a - 20 °C em frascos âmbar identificados.



## Ensaio antifúngico in vitro

Para o ensaio antifúngico, primeiramente foi realizada a padronização dos esporos dos fungos filamentosos (previamente cultivados em Ágar Batata Dextrose - BDA), por meio de uma alçada em um tubo contendo 3,0 mL de Tween 80 a 0,1%, seguida de contagem em câmara de Neubauer. A padronização do inóculo foi determinada em  $10^5$  esporos/mL.

O inóculo foi transferido para tubos de ensaio contendo 1 mL de Caldo MPL e 1 mL das frações produzidas. Como controles positivo e negativo, o volume das frações foi substituído pelo mesmo volume (1,0 mL) de extrato bruto e água destilada estéril, respectivamente. Os tubos foram incubados por 12 horas a 25 °C, seguido de centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi transferido para lâminas, para análise microscópica.

Esta análise consistiu da contagem aleatória de hifas e esporos até completar 100, a fim de determinar a porcentagem de esporos germinados. Além disso, um total de 60 hifas foi medido com auxílio do programa computadorizado (Software Motic®) acoplado ao microscópio, utilizando-se objetiva de 40 x. Os esporos germinados foram expressos em porcentagem e o comprimento de hifas foi expresso em  $\mu\text{m}$ . O ensaio foi repetido três vezes, sendo que em cada repetição determinou-se 3 resultados para a porcentagem de esporos germinados e 60 resultados para o comprimento de hifas.

O efeito inibitório sobre a germinação dos esporos e sobre o desenvolvimento de hifas foi expresso em porcentagem, calculado da seguinte forma:

% Inibição na germinação de esporos =  $C_e - T_e / C \times 100$ , onde:

$C_e$ : média de esporos germinados no controle

$T_e$ : média de esporos germinados no tratamento

% Inibição no desenvolvimento de hifas =  $C_h - T_h / C \times 100$ , onde:

$C_h$ : média do comprimento de hifas no controle

$T_h$ : média do comprimento de hifas no tratamento

## Estabilidade térmica

Um volume de 10 mL do extrato bruto obtido do cultivo de *Hansenula wingei* foi depositado em um tubo de ensaio e mantido em banho-maria a 90° C por 30 minutos. O binômio tempo/temperatura utilizado foi escolhido com base na simulação do preparo de solução filmogênica para aplicação em frutos frescos. A estabilidade do composto foi avaliada por meio do ensaio antifúngico, conforme descrito no item anterior.

## Tratamento dos dados

Os dados obtidos para a porcentagem de esporos germinados e para o comprimento de hifas foram submetidos à análise de variância e teste t ( $p < 0,05$ ) ou Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados do ensaio antifúngico empregando o extrato bruto obtido do cultivo da levedura antagonista, contra a germinação de esporos e o desenvolvimento de hifas de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*.

Tabela 1 - Atividade antifúngica do Extrato Bruto obtido do cultivo de *Hansenula wingei* sobre a germinação de esporos e desenvolvimento de hifas de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*

	Germinação de esporos (%)		Desenvolvimento de hifas ( $\mu\text{m}$ )	
	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. expansum</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. expansum</i>
Controle (água)	92,11 $\pm$ 5,90 <sup>b</sup>	94,89 $\pm$ 3,22 <sup>b</sup>	86,37 $\pm$ 19,21 <sup>b</sup>	108,19 $\pm$ 37,46 <sup>b</sup>
Extrato Bruto	1,00 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 2,69 <sup>a</sup>	18,87 $\pm$ 5,30 <sup>a</sup>	23,43 $\pm$ 8,46 <sup>a</sup>

Quanto menor o valor, maior a atividade antifúngica. Cada valor corresponde à média  $\pm$  desvio padrão dos valores de 9 dados (sendo três respostas para cada repetição) para a germinação de esporos, e 180 dados (sendo sessenta respostas para cada repetição) para o desenvolvimento de hifas. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t, ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autoria própria.

De maneira geral, pôde-se observar que houve diferença significativa para ambos os fungos, onde o extrato bruto apresentou alta capacidade de inibição, tanto na germinação de esporos, quanto no desenvolvimento de hifas, quando comparado com o controle.

O extrato bruto da levedura antagonista inibiu mais de 95% da germinação dos esporos e mais de 75% do desenvolvimento de hifas de *A. ochraceus* e *P. expansum*. A alta capacidade de inibição para ambos os fungos filamentosos também mostra que a toxina apresenta um maior espectro de atuação. Estudo realizado por Gasperini (2011) mostrou ótima inibição de *Fusarium verticillioides in vitro*, quando submetido ao extrato bruto obtido do cultivo de *H. wingei*.

A atuação de toxinas *killer* sobre *P. expansum* também foi relatada por Coelho et al. (2009), que mostrou excelentes taxas de inibição do fungo com cultivos de *Pichia ohmeri* e *Candida guilliermondii* (91,12% e 90,93%, respectivamente), enquanto Iacumin et al. (2017) observaram atividade inibitória sobre *A. ochraceus* e *P. nordicum* pelas leveduras *Debaromyces hansenii* e *Saccharomyces fibuligera*.

Apesar da literatura acerca do antagonismo de *H. wingei* sobre fungos filamentosos ser escassa, ambos os estudos suportam a funcionalidade das toxinas *killer* no biocontrole e indicam a sensibilidade dos fungos a diversos gêneros de leveduras *killer*.

A satisfatoriedade dos resultados atendeu as expectativas de capacidade antagonista da levedura e possibilitou prosseguir o estudo com a purificação parcial da toxina *killer* de *H. wingei* por meio de ultrafiltração.

A Tabela 2 apresenta os resultados do ensaio antifúngico realizado com as frações obtidas ao longo das etapas de ultrafiltração, contra a germinação dos esporos e do desenvolvimento de hifas dos fungos testes.

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

Tratamento	Germinação de esporos (%)		Desenvolvimento de hifas ( $\mu\text{m}$ )	
	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. expansum</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. expansum</i>
Controle negativo (água)	97,33 $\pm$ 1,15 <sup>cd</sup>	98,56 $\pm$ 0,88 <sup>de</sup>	52,32 $\pm$ 11,83 <sup>cd</sup>	103,81 $\pm$ 40,48 <sup>d</sup>
Controle positivo (EB)	1,0 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	17,78 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>	18,87 $\pm$ 5,29 <sup>b</sup>	21,02 $\pm$ 7,32 <sup>a</sup>
Fração 10-30 kDa	96,33 $\pm$ 1,53 <sup>d</sup>	81,78 $\pm$ 3,15 <sup>c</sup>	52,54 $\pm$ 6,89 <sup>c</sup>	99,34 $\pm$ 35,65 <sup>d</sup>
Fração 5-10 kDa	98,00 $\pm$ 1,00 <sup>d</sup>	97,44 $\pm$ 1,51 <sup>d</sup>	55,44 $\pm$ 9,96 <sup>d</sup>	104,86 $\pm$ 35,57 <sup>d</sup>
Fração 3-5 kDa	95,33 $\pm$ 1,15 <sup>c</sup>	99,33 $\pm$ 0,50 <sup>c</sup>	54,66 $\pm$ 10,69 <sup>d</sup>	105,63 $\pm$ 37,09 <sup>d</sup>
Fração 1-3 kDa	96,00 $\pm$ 2,00 <sup>d</sup>	96,78 $\pm$ 1,92 <sup>d</sup>	52,54 $\pm$ 10,83 <sup>c</sup>	85,93 $\pm$ 33,46 <sup>c</sup>
Fração < 1 kDa	70,00 $\pm$ 2,00 <sup>b</sup>	39,00 $\pm$ 2,60 <sup>b</sup>	12,25 $\pm$ 3,02 <sup>a</sup>	26,22 $\pm$ 8,85 <sup>b</sup>

Quanto menor o valor, maior a atividade antifúngica. Cada valor corresponde à média  $\pm$  desvio padrão dos valores de 9 dados (sendo três respostas para cada repetição) para a germinação de esporos, e 180 dados (sendo sessenta respostas para cada repetição) para o desenvolvimento de hifas. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados mostraram que a toxina *killer* possui tamanho inferior a 1 kDa. A diferença significativa exibida entre o extrato bruto (controle positivo) e a fração < 1 kDa sugere a possibilidade de uma perda do composto ao longo das etapas de ultrafiltração. Além disso, o processo não foi considerado eficiente na purificação parcial da toxina *killer*, haja vista que o composto não foi retido em nenhuma membrana de exclusão molecular utilizada no estudo. Outra hipótese seria a presença de mais de uma toxina *killer* envolvida na atividade antagonista, e que as etapas de ultrafiltração promoveram a separação dos compostos, resultando em uma distribuição de poucas eficiências nas frações 10-30 e 1-3 kDa.

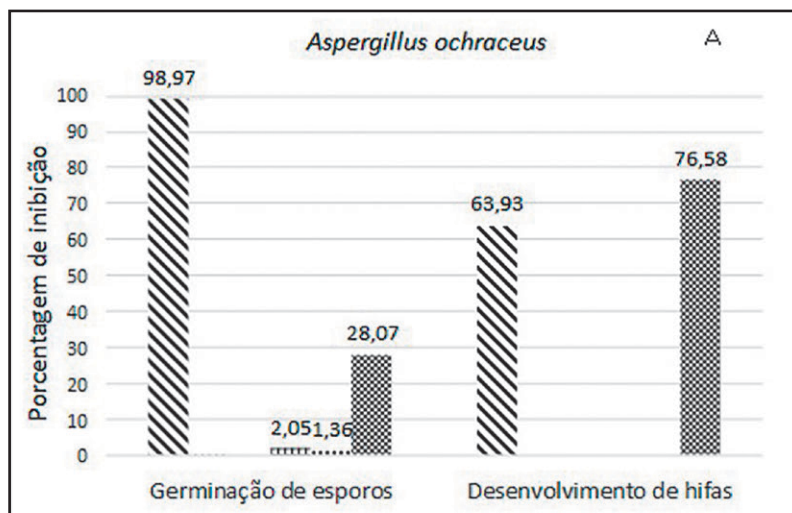
O Extrato Bruto mostrou maior eficiência contra a germinação dos esporos dos fungos testados, sugerindo a possibilidade de utilização da toxina *killer* em forma de EB, evitando desperdício de tempo e material no processo de ultrafiltração.

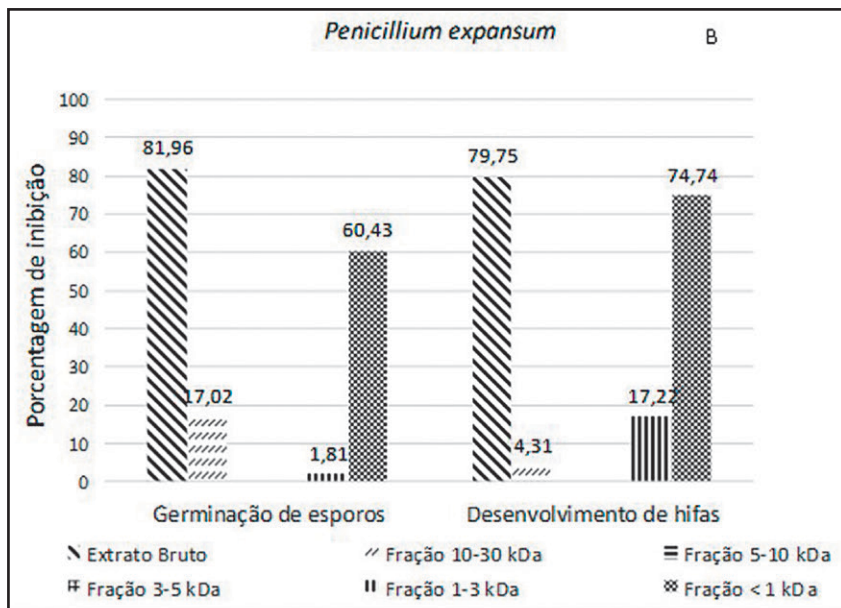
A Figura 2 apresenta o efeito inibitório da toxina *killer* sobre a germinação de esporos e desenvolvimento micelial de *A. ochraceus* e *P. expansum*. Em relação à germinação dos esporos para ambos os fungos testados, o controle positivo (Extrato Bruto) se mostrou bastante eficaz, com inibição superior a 80%. Ao analisar a eficácia das frações obtidas por ultrafiltração, apenas a fração < 1 kDa apresentou atividade antagônica relevante, principalmente contra *P. expansum*, cuja porcentagem de inibição foi 60,43% (Figura 2B). As demais frações mostraram uma variação de inibição entre 0 e 17,22%.

De acordo com a Figura 2A, o EB teve maior atuação na germinação de esporos de *A. ochraceus*, enquanto a fração < 1 kDa atuou melhor sobre o desenvolvimento de hifas. Em relação ao *P. expansum*, o EB mostrou as maiores taxas de inibição, tanto na germinação de esporos quanto no desenvolvimento de hifas, alcançando valores maiores que 80% e 70%, respectivamente (Figura 2B). Em seguida, a toxina ultrafiltrada (fração < 1 kDa) inibiu pouco mais de 60% a germinação de esporos e 70% o desenvolvimento de hifas.

Nota-se também que a capacidade de inibição difere entre a germinação de esporos e o desenvolvimento de hifas. Tal fenômeno pode ser justificado pela diferença de constituição das paredes celulares do esporo e da hifa, levando a resultados diferentes quanto à ação da toxina.

Figura 2. Efeito inibitório do composto antifúngico de *Hansenula wingei* sobre a germinação de esporos e desenvolvimento de hifas de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*.





Fonte: Autoria própria.

Por fim, o teste de estabilidade térmica mostrou que a toxina *killer* é termo-tolerante, uma vez que a atividade antifúngica permaneceu eficaz contra o fungo testado (Tabela 3). A inibição dos esporos de *P. expansum* manteve-se maior que 60%, ao passo que do desenvolvimento micelial permaneceu maior que 75%.

Tabela 3 - Atividade antifúngica realizada com o extrato bruto após tratamento térmico, sobre a germinação de esporos de *Penicillium expansum*.

Tratamento	Germinação de esporos (%)	Desenvolvimento de hifas ( $\mu\text{m}$ )
Controle negativo (água)	98,67 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	106,85 $\pm$ 49,94 <sup>a</sup>
Extrato Bruto	31,56 $\pm$ 7,89 <sup>b</sup>	22,91 $\pm$ 9,16 <sup>b</sup>
Tratamento Térmico	37,56 $\pm$ 5,48 <sup>b</sup>	26,61 $\pm$ 10,52 <sup>c</sup>

Quanto menor o valor, maior a atividade antifúngica. Cada valor corresponde à média  $\pm$  desvio padrão dos valores de 9 dados, sendo três respostas para cada repetição. Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t, ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autoria própria.

Estes resultados reforçam a possibilidade de aplicação da toxina *killer* de *H. wingei* na forma de EB (extrato livre de células, sem purificação) em revestimentos comestíveis, como por exemplo, em frutos pós-colheita. Um estudo realizado por Aloui et al. (2015) consistiu em aplicar um revestimento desenvolvido com células de *Wickerhamomyces anomalus* na superfície de *Citrus sinensis* (laranja 'Valencia'), comumente acometida por *Penicillium digitatum* (bolor verde), e mostrou uma taxa de inibição de 100% do fungo durante um período de armazenamento de 10 dias.

Por fim, a partir do cultivo da levedura antagonista estudada, é possível obter um composto natural com propriedade antifúngica de amplo espectro, visando aplicação em produtos voltados à conservação de alimentos, tais como revestimentos comestíveis aplicáveis em frutos pós-colheita.

## 5. CONCLUSÃO

É possível obter toxina *killer* com propriedade antifúngica de *H. wingei* na forma de extrato bruto. Os ensaios *in vitro* mostraram elevada capacidade de inibição da germinação de esporos para *A. ochraceus* e *P. expansum* (98,91% e 96,49%, respectivamente), assim como um controle eficaz na inibição do desenvolvimento de hifas (78,15% e 78,34%, respectivamente).

O efeito antifúngico sobre os esporos foi reduzido após as etapas de ultrafiltração, tornando-as desnecessárias e mostrando que é possível obter um composto de alta eficácia, em menor tempo e com poucos recursos.

A toxina ultrafiltrada continuou inibindo o desenvolvimento micelial dos dois fungos testados em mais de 70%, mostrando amplo espectro de ação, e encorajando ensaios com outros bolores deteriorantes.

A toxina *killer* (< 1 kDa) é termo resistente, o que possibilitaria a sua aplicação em revestimentos comestíveis, com o intuito de prolongar a vida útil de frutos frescos pós-colheita, destinados ao consumo direto.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Araucária, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica, ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos-PPGTAL pelos recursos financeiros e ao LabMulti-LD, pelos equipamentos disponibilizados.

## REFERÊNCIAS

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

ALOUI, H. et al. Physical properties and antifungal activity of bioactivefilms containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 22-30, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES EXPORTADORES DE FRUTAS E DERIVADOS – ABRAFRUTAS. **Estatística de exportações de frutas 2017**. 04 ago. 2018. Disponível em: <http://abrafrutas.org/2018/08/04/estatisticas-de-exportacoes-de-frutas-2017/>. Acesso em: 18 out. 2018.

BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer-character in yeast. **Proceeding of XI<sup>th</sup> International Congress in Genetic**. v. 1, p 202-203, 1963.

BUSSEY, H. Effects of yeast killer factor on sensitive cells. **Nature New Biology**, v. 235, n. 55, p. 73-75, 1972.

BUTLER, A. R.; WHITE, J. H.; STARK, M. J. R. Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. **Journal of General Microbiology**. v. 137, n. 7, p. 1749-1757, 1991.

CASTORIA, R. et al. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on it's modes of action. **Postharvest Biology and Technology**. n. 22, p. 7-17, 2001.

CIANI, M.; FATICHENTI, F. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**. n. 67, p. 3058–3063, 2001.



COELHO, A. R. et al. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts with perspectives of application in biocontrol and patulin degradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 50, n. 4, p. 725-733, 2007.

\_\_\_\_\_. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v.26, p. 73-81, 2009.

\_\_\_\_\_. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.32, n.1, p. 1879-1892, 2011.

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.

COMITINI, F. et al. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. **Microbiology**, n. 150, p. 2535-2541, 2004.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. **FRUTICULTURA: Balanço 2016/ Perspectivas 2017**. Disponível em: [http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/10\\_fruticultura.pdf](http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/10_fruticultura.pdf)> Acesso em: 12 maio 2017.

FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C. Situação da fruticultura no Brasil. In: FACHINELLO, J. C. **Fruticultura: fundamentos e práticas**. Embrapa Clima Temperado, 2009.

FARIAS, A. X. et al. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, n. 3, p. 617-621, 2000.

FELIZIANI, E. et al. Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. **Postharvest Biology and Technology**. v. 78, p. 133-138, 2013.

FERRAZ, L. P. **Detecção, caracterização e purificação parcial de toxina killer produzida por *Sporobolomyces koalae***. 2018. 83 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

FIEIRA et al. Inibidores naturais no controle *in vitro* e *in vivo* de *Penicillium expansum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 33, n. 1, 2013.

FISCHER, I. H. et al. Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro-oeste paulista. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 254-259, 2007.

FLEET, G. H. Composition and structure of yeast cell walls. **Current Topics in Medical Mycology**. v. 1, p. 24-56, 1985.

GASPERINI, A. M. **Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho**. 2011. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2011.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Nobel, 2009.

GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Tratamento pós-colheita com cálcio e micro-organismos para controle da podridão mole em tomates. **Horticultura Brasileira**. v. 23, n.1, 2005.

GUSTAVSSON, J. et al. **Global food losses and food waste: extent, causes and prevention**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 1-38, 2011.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de micro-organismos em alimentos. **Brasil Alimentos**. n. 9, 2001.

HUTCHINS, K.; BUSSEY, H. Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1-6)- $\beta$ -D-glucan. **Journal of Bacteriology**. v. 154, n. 1, p. 161-169, 1983.

IACUMIN, L. et al. Biocontrol of ochratoxigenic moulds (*Aspergillus ochraceus* and *Penicillium nordicum*) by *Derbaryomyces hansenii* and *Saccharomyces fibuliger* during speck production. **Food Microbiology**. v. 62, p. 188-195, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA**. set. 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados>. Acesso em: 18 out. 2018.

JOHNSON, G. I.; COATES, L. M. Postharvest diseases of mango. **Postharvest News and Information**. v. 4, n.1, 1993.

KAGIYAMA, S. et al. New killer toxins of halophilic *Hansenula anomala*. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 52, p. 1-7, 1988.

KASAHARA, S. et al. Involvement of cell wall  $\beta$ -glucan in the action of HM-1 killer toxin. **FEBS Letters**. v. 348, n.1, p. 27-32, jul. 1994.

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.

LIU, S. Q.; TSAO, M. Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. **International Journal of Food Microbiology**. n. 131, p. 280-282, 2009.

MAGLIANI, W. et al. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 10, n. 3, p. 369-400, 1997.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M. Biology of killer yeasts. **International Microbiology**, v. 5, p. 65-71, 2002.

MELO, R. A. G. et al. Controle biológico da podridão mole do pimentão (*Capsicum annuum*) causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Summa Phytopathologica**. v. 21, n.3/4, p. 206-212, 1995.

MOURA, V. S. **Caracterização bioquímica e funcional de toxina killer produzida por *Saccharomyces cerevisiae***. 2017. 49 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

OLIVEIRA, A. V. et al. Biocontrole in vitro de *Botrytis cinerea* por leveduras killer visando aplicação em morangos pós-colheita. **RECEN- Revista Ciências Exatas e Naturais**. v.13, n.3, p. 353-364, 2011.

PFEIFFER, P.; RADLER, F. Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. **Journal of General Microbiology**. v. 128, p. 2699-2706, 1982.

PLATANIA, C. et al. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food Microbiology**. v. 30, n. 1, p. 219-225, 2012.

RADLER, F.; SCHMITT, M. J.; MEYER, B. Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. **Archives of Microbiology**. v.154, p. 175-178, 1990.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A., 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Pesquisa em micotoxinas no Brasil: a última década em foco. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 33, n. 1, p.1-11, 2002.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 26, p. 257-276, 2002.

SCHMITT, M. J.; PFEIFFER, P. C. Immunochemical analysis of the carbohydrate moiety of killer yeast toxin K28. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.58, p. 277-282, 1990.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **Análise da conjuntura agropecuária: safra 2016/2017**. mar. 2017. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura\\_2016\\_17.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura_2016_17.pdf). Acesso em: 18 out. 2018.

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.

SOARES, G. A. M.; SATO, H. H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 31, n. 4, 2000.

SUGISAKI, Y. et al. Characterization of a novel killer toxin encoded by a double-stranded linear DNA plasmid of *Kluyveromyces lactis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 141, p. 241-245, 1984.

TAKITA, M. A.; CASTILHO-VALAVICIUS, B. Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. **Yeast**. v. 9, n.6, p. 589-598, 1993.

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

WEDRAL, D.; SHEWFELT, R.; FRANK, J. The challenge of *Brettanomyces* in wine. **LWT-Food Science and Technology**. n. 43, p. 1474-1479, 2010.

WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TRIMMER, L. W. **Compendium of citrus diseases**. 1988.

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

YOUNG, T. W.; YAGIU, M. A. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 44, p. 59-77, 1978.