

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS  
CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

CIRO DA SILVA PORTES

**CONTROLE DE FUNGOS DETERIORANTES / MICOTOXIGÊNICOS  
POR LEVEDURAS *KILLER* ANTAGONISTAS EM FRUTAS PÓS-  
COLHEITA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

FRANCISCO BELTRÃO  
2011

CIRO DA SILVA PORTES

**CONTROLE DE FUNGOS DETERIORANTES / MICOTOXIGÊNICOS  
POR LEVEDURAS *KILLER* ANTAGONISTAS EM FRUTAS PÓS-  
COLHEITA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito final para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientador: Prof. DSc. Alexandre Rodrigo Coelho

FRANCISCO BELTRÃO  
2011

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

### **CONTROLE DE FUNGOS DETERIORANTES / MICOTOXIGÊNICOS POR LEVEDURAS KILLER ANTAGONISTAS EM FRUTAS PÓS-COLHEITA**

Por

**Ciro da Silva Portes**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, no Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

#### **BANCA AVALIADORA**

---

Prof. Cleide Zimovski Baldo  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

---

Prof<sup>a</sup> *Dra.* Elisabete Hiromi Hashimoto  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

---

Prof.<sup>a</sup> *Dr.* Alexandre Rodrigo Coelho  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR  
(Orientador)

---

Prof. *Dr.* Luciano Lucchetta  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR  
(Coordenador do curso)

Francisco Beltrão, 28 de Junho de 2011.  
*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso*

*À Deus.  
Aos meus pais.  
À minha esposa.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Professor Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, pelo apoio, disponibilidade e auxílio durante a realização do trabalho prático e na elaboração desta monografia.

A equipe de técnicos laboratoriais, pela assistência em laboratório.

A Leônidas de Oliveira Portes e Eliane Joceli da Silva Portes (meus pais), Marina Liston Cwiertnia (esposa) e Miraci Maria Liston (sogra) pelo amor, apoio e incentivo permanentes.

A todos os meus amigos e colegas, cujo apoio foi imprescindível para a conclusão desta jornada.

## RESUMO

O biocontrole por leveduras *killer* antagonistas constitui uma alternativa viável em relação ao químico tradicional, devido à baixa possibilidade toxigênica e a ausência de resíduos tóxicos nos frutos tratados. Considerando o exposto, objetivou-se estudar o biocontrole de fungos filamentosos empregando-se leveduras antagonistas associadas ao caráter *killer*, isoladas de polpas de frutas congeladas, por meio de análise do potencial antagônico em meio sólido pela produção de composto bioativo, avaliando a inibição do desenvolvimento de fungos filamentosos (porcentagem de esporos germinados e medida do comprimento de hifas). Das 41 leveduras isoladas, 24 (58,5%) apresentaram inibição contra *Penicillium expansum* n.º 2, 25 (61,0%) foram ativas contra *Aspergillus ochraceus* A152 e 25 (61,0%) contra *Fusarium verticillioides* 103F no antifungigrama em meio sólido. No meio líquido, a cepa PF4<sub>13</sub>, identificada como *Kluyveromyces* sp., controlou significativamente tanto a germinação de esporos como o desenvolvimento de hifas de *P. expansum* e *A. ochraceus*, quando comparado ao controle. A inibição da germinação dos esporos de *P. expansum* e *A. ochraceus* com sobrenadante de *Kluyveromyces* sp. PF4<sub>13</sub> obtido após cultivo de 96 horas/25°C foi, respectivamente, 93,33 e 86,44%). A positividade para o fator *killer* foi evidenciada em 75,6% das leveduras isoladas. Os resultados obtidos reforçam a necessidade do estudo de micro-organismos antagonistas de caráter inócuo, melhorando assim a qualidade higiênico-sanitária e a segurança de produtos agroindustriais.

Palavras-chave: Biocontrole. Leveduras. Polpa de Frutas. Fungos deteriorantes.

## ABSTRACT

The biocontrol by antagonist killer yeast is a viable alternative for the traditional chemical, due the low toxigenic possibility and the nonappearance of undesirable residues on the considered fruits. Taking this into account, the aim of this work was to study the biocontrol of spoilage mould by using antagonist yeasts associated to the killer factor, isolated of frozen pulp fruits, through the analysis of antagonism by the production of bioactive compounds, evaluating the inhibition of spoilage mould growth (percentage of germinated spores and the hyphae length). From the 41 isolated yeasts tested, 24 (58,5%) showed inhibition activity against *Penicillium expansum* n.º 2, 25 (61,0%) were active against *Aspergillus ochraceus* A152 and 25 (61,0%) against *Fusarium verticillioides* 103F, by the antifungal susceptibility on solid medium. By the liquid medium technique, strain PF4<sub>13</sub> (identified as *Kluyveromyces* sp.), showed significant control of spore germination, as well as of hyphal development of *P. expansum* e *A. ochraceus*, when compared to control. The inhibition of *P. expansum* and *A. ochraceus* spores germination in the presence of *Kluyveromyces* sp. PF4<sub>13</sub> crude extract (96 hs/25°C cultivate), was respectively, 93.33 and 86.44%). The positivity for the killer factor was evidenced in 75.6% of the isolated yeasts. The results reinforce the need of studying antagonists microorganisms with innocuous character, thereby improving the hygienic-sanitary quality and the safety of agroindustrial products.

Key-word: Biocontrol. Yeasts. Pulp Fruits. Spoilage Mould.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>IMPORTÂNCIA DA FRUTICULTURA BRASILEIRA</b>	<b>10</b>
<b>3.2</b>	<b>PERDAS NA PRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>3.3</b>	<b>MINIMIZAÇÃO DAS PERDAS POR PROCESSOS AGROINDUSTRIAIS</b>	<b>11</b>
<b>3.4</b>	<b>CONTROLE DE MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES/MICOTOXIGÊNICOS EM FRUTAS</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>4.1</b>	<b>FUNGOS FILAMENTOSOS TESTE</b>	<b>13</b>
<b>4.2</b>	<b>LEVEDURAS ANTAGONISTAS</b>	<b>13</b>
<b>4.3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS <i>KILLER</i></b>	<b>14</b>
<b>4.4</b>	<b>ANTIFUNGIGRAMA POR LEVEDURAS ANTAGONISTAS</b>	<b>15</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Antifungigrama em meio sólido</b>	<b>15</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Antifungigrama em meio líquido</b>	<b>15</b>
<b>4.5</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS</b>	<b>16</b>
<b>4.6</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>18</b>
<b>5.1</b>	<b>ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS</b>	<b>18</b>
<b>5.2</b>	<b>FATOR KILLER</b>	<b>19</b>
<b>5.3</b>	<b>ANTIFUNGIGRAMA EM MEIO SÓLIDO</b>	<b>20</b>
<b>5.4</b>	<b>ANTIFUNGIGRAMA EM MEIO LÍQUIDO</b>	<b>24</b>
<b>5.5</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>29</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O sistema agroalimentar é uma das áreas em que o país vem investindo esforços para a melhoria de competitividade, onde as exportações brasileiras de frutas frescas obtiveram crescimento de 13% entre os anos 2003/2007. A produtividade da fruta brasileira supera os 39 milhões de toneladas, classificando o país entre os quatro maiores produtores mundiais juntamente com China, Índia e EUA (IBRAF, 2010; FAO, 2010). Do total produzido, 53% destinam-se ao consumo nacional *in natura*, 46% para a indústria processadora e apenas 1,0% à exportação de frutas frescas, evidenciando fraca inserção no mercado internacional (FAO, 2002).

Entretanto, as consideráveis perdas nas culturas de importância econômica resultam da susceptibilidade de frutas à infecção fúngica. Exemplificam-se as perdas causadas principalmente por *Penicillium expansum* (JANISIEWICZ et al., 1998), *Colletotrichum gloeosporioides* (REZENDE; FANCELLI, 1997), *Lasiodiplodia theobromae* (MICHEREFF et al., 1997) e *Botryodiplodia theobromae* (MASCARENHAS et al., 1995).

Logo, a produtividade da matéria-prima está relacionada à aplicação de fungicidas, cujo uso pode incrementar o nível de contaminantes químicos indesejáveis no produto final. Os métodos biológicos constituem alternativas viáveis em relação ao químico tradicional, principalmente por não deixarem resíduos tóxicos nas frutas tratadas (WILSON; WISNIEWSKI, 1994). Já existem produtos biológicos como o BIOSAVE II® (*Pseudomonas syringae*), o ASPIRE (*Candida oleophila*) e o YIELD PLUS® (*Cryptococcus albidus*) que vem sendo utilizados no controle de doenças pós-colheita em frutas.

Confirmando, assim, as perspectivas do emprego de leveduras no biocontrole, devido à baixa possibilidade micotoxigênica deste grupo (JANISIEWICZ, 1996) e a presença do fator *killer* em algumas cepas. O fator *killer* é um peptídeo extracelular capaz de inibir o crescimento de outros micro-organismos.

O controle de doenças de frutas pós-colheita devido aos fungos deteriorantes/toxigênicos, aliado à investigação de compostos bioativos inócuos compatíveis com a aplicação prática, é assunto prioritário para garantir a qualidade e a segurança dos produtos oriundos da fruticultura (COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista a prioridade do setor produtivo, analisar o biocontrole de fungos filamentosos empregando leveduras antagonistas positivas quanto ao caráter *killer*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar leveduras de polpas de frutas congeladas e analisar o potencial antagonico no controle de fungos filamentosos deteriorantes;
- Determinar o caráter *killer* nas leveduras isoladas;
- Analisar a produção de composto bioativo produzido pelas leveduras, com ênfase ao caráter *killer*, avaliando a inibição do desenvolvimento de fungos filamentosos (porcentagem de esporos germinados e medida do comprimento de hifas).

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 IMPORTÂNCIA DA FRUTICULTURA BRASILEIRA

O sistema agroalimentar é uma das áreas em que o país vem investindo esforços para a melhoria de competitividade, onde as exportações brasileiras de frutas frescas geraram um volume de 918 mil toneladas, correspondente a um crescimento de 13% entre os anos 2003/2007. Melão, manga, maçã e banana destacaram entre as frutas mais exportadas entre 2005 e 2008, indicando a apreciação crescente pelo consumo *in natura* de frutas tropicais/subtropicais (IBRAF, 2010). Em 2005 já ocupava posições de destaque no ranking de exportação de algumas das frutas mais comercializadas no mundo: mamão (2º lugar entre os maiores exportadores), manga (2º lugar) e melão (3º lugar) (BRASIL, 2007).

A produtividade da fruta brasileira supera os 39 milhões de toneladas, classificando o país entre os quatro maiores produtores mundiais juntamente com China, Índia e EUA (IBRAF, 2010; FAO, 2010). A extensão territorial e diversidade climática permitem o cultivo desde frutas de clima temperado (Região Sul e Sudeste) a tropical/subtropical (Sudeste, Norte e Nordeste), colocando o Brasil na posição privilegiada em relação às demais nações (SIMÃO, 1998). Do total produzido, 53% destinam-se ao consumo nacional *in natura*, 46% para a indústria processadora e apenas 1,0% à exportação de frutas frescas, evidenciando fraca inserção no mercado internacional (FAO, 2002).

#### 3.2 PERDAS NA PRODUÇÃO

As consideráveis perdas nas culturas de importância econômica resultam da susceptibilidade de frutas à infecção fúngica, desencadeada pelos fatores ambientais (temperatura, umidade) e danos mecânicos na colheita e estocagem. Exemplificam-se as perdas de 14% na armazenagem de maçãs, causadas principalmente por *Penicillium expansum* (JANISIEWICZ et al., 1998), assim como as doenças pós-colheita responsáveis por prejuízos de 1 a 93% em mamão, com ênfase a *Colletotrichum gloeosporioides* (REZENDE; FANCELLI, 1997). Em manga, os agentes deteriorantes comumente relatados são *Lasiodiplodia theobromae* (MICHEREFF et al., 1997) e *Botryodiplodia theobromae* (MASCARENHAS et al., 1995). É importante salientar que não há evidências de que os

tecidos das frutas abriguem qualquer tipo de microrganismo, no entanto na superfície das mesmas em estado fresco tem sido encontrada uma grande variedade, sendo necessário o seu rompimento, de forma natural ou mecânica, para que os mesmos penetrem nos tecidos internos (EVANGELISTA, 1989).

### **3.3 MINIMIZAÇÃO DAS PERDAS POR PROCESSOS AGROINDUSTRIAIS**

Conforme Intec e Arve (2005), a agroindústria de sucos e polpas de frutas cítricas e tropicais é bastante relevante no cenário mundial. A sazonalidade é a principal característica das matérias-primas utilizadas e a despolpa minimiza perdas nos períodos de safra. A polpa é o produto obtido por esmagamento das partes comestíveis de frutas carnosas por meio de processos tecnológicos adequados. Este método de processamento é o melhor meio para se minimizar problemas de manuseio, transporte e armazenamento das frutas *in natura* em decorrência das condições climáticas, da distância e da perecibilidade. Seu processamento deve se apresentar dentro dos padrões de higiene e qualidade, para que não ocorra o desenvolvimento dos microrganismos, que estavam presentes na casca, no produto final (ABREU; NUNES; OLIVEIRA, 2003). A importância de microhabitats para a variedade de espécies de leveduras na natureza está na alta concentração de açúcares simples, baixo pH e intensa visitação por insetos vetores (LACHANCE; STARMER, 1998).

### **3.4 CONTROLE DE MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES/ MICOTOXIGÊNICOS EM FRUTAS**

A produtividade da matéria-prima está relacionada à aplicação de fungicidas, cujo controle pode incrementar o nível de contaminantes químicos indesejáveis no produto final. Os métodos biológicos constituem alternativas viáveis em relação ao químico tradicional, principalmente por não deixarem resíduos tóxicos nas frutas tratadas (WILSON; WISNIEWSKI, 1994). Nos EUA, já existe produto biológico à base de *Pseudomonas syringae* (BIOSAVE II®) registrado para aplicação no controle de *P. expansum* e *Botrytis cinerea* em maçãs armazenadas (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). A biotecnologia israelense lançou o ASPIRE, um fungicida à base de *Candida oleophila* sob forma de grânulos dispersíveis em água para pós-colheita de maçã, cuja ação baseia-se na colonização

por hiperparasitismo (SUGAR; SPOTTS, 1999). Atualmente, um outro produto, constituído de *Cryptococcus albidus* (YIELD PLUS®, Ancor Yeast, Cape Town, South África) vem sendo utilizado no controle de maçãs pós-colheita, também baseado em hiperparasitismo (SUGAR; SPOTTS, 1999).

Os dados confirmam as perspectivas do emprego de leveduras no biocontrole, devido à baixa possibilidade micotoxigênica deste grupo elegido para os processos fermentativos, não tendo sido relatados casos de micotoxicose (JANIESIEWICZ, 1996).

Determinadas cepas de leveduras apresentam o fator *killer* (peptídeo produzido em nível extracelular), capaz de inibir o crescimento de outros micro-organismos. A constatação da letalidade do fator *killer* em determinadas linhagens de leveduras perante fungos filamentosos ampliou ainda mais as perspectivas de aplicação, ou seja, também sob o ponto de vista de biocontrole dos fitopatógenos e bolores deteriorantes de alimentos (JACOBS; VAN VUOREN, 1991). Estudos realizados por Coelho et al. (2006, 2007) mostraram inibição de 58,15% da germinação de esporos de *Penicillium expansum* com sobrenadante do cultivo de *Candida guilliermondii* obtido após 72 horas de incubação a 25°C, enquanto que *Pichia ohmeri* (25°C/48 horas) inibiu o desenvolvimento de hifas do mesmo fungo em 64,37%, ambos associados ao fator *killer*.

O antagonismo de leveduras *killer* isoladas de frutas *in natura*, silagem de milho e formigueiro de laboratório perante fungos filamentosos deteriorantes/micotoxigênicos reforçam os indicativos promissores (LEVY; HIROOKA, 1999; COELHO et al, 2007), devendo-se ampliar a variabilidade do nicho ecológico e aprofundar no estudo de antagonistas e obtenção/purificação de novos compostos bioativos de amplo espectro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 FUNGOS FILAMENTOSOS TESTE

*Aspergillus ochraceus* A152, *Fusarium verticillioides* 103F (produtores de toxinas em grãos e cereais) e *Penicillium expansum* n.º 2 (deteriorante de frutas), provenientes de cultura monospórica (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983), foram utilizados para analisar o amplo espectro de ação de leveduras antagonistas, quanto à inibição de crescimento.

Os fungos foram mantidos em Ágar Batata Dextrose - BDA inclinado a 4°C na ausência de luz, e o inoculo padronizado em Tween 80 com auxílio de câmara de Newbauer ( $10^5$  esporos/mL) para os testes subsequentes.

### 4.2 LEVEDURAS ANTAGONISTAS

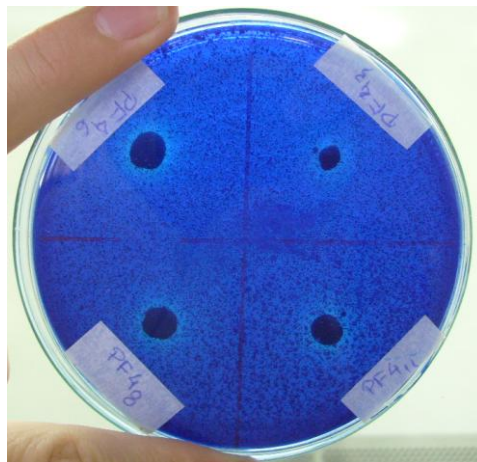
As leveduras foram isoladas a partir de 11 amostras de polpas congeladas de diferentes sabores de frutas, respeitando-se a utilização de polpas produzidas por uma única empresa processadora.

Para o isolamento de leveduras, 10 g da polpa de fruta previamente descongelada foram diluídos em 90 mL de água peptonada estéril a 0,1%, seguido de diluições decimais seriadas até  $10^{-5}$ . Em seguida, um volume de 0,1 mL de cada diluição foi asepticamente pipetado e distribuído em placas de Petri estéreis, seguido de homogeneização com aproximadamente 20 mL de Ágar MPL (glicose 2,0%; extrato de levedura 0,5%;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,23%;  $\text{NaCl}$  1,0%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5%; ágar 1,8%). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias, seguido de isolamento das colônias de leveduras, considerando diferentes morfologias e pigmentações. As leveduras isoladas foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar GYMP inclinado (glucose 2,0%, extrato de malte 1,0%, extrato de levedura 0,5%,  $\text{NaHPO}_4$  0,2% e ágar 1,8%) a 4°C. Após o isolamento, as leveduras receberam um código de identificação PF<sub>n</sub>, onde PF = Polpa Congelada de Fruta, n = número da amostra; n = número da cultura. Para a realização dos testes de fator *killer* e antagonismo as culturas foram reativadas em Ágar MPL a 25°C/48 horas.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS *KILLER*

Para a caracterização das leveduras isoladas quanto ao fator *killer* utilizou-se de uma levedura padrão positivo, para comparação com as leveduras isoladas, e cinco leveduras padrão negativo, sensíveis ao fator *killer*. As análises foram feitas em duplicata para cada levedura sensível.

Inicialmente, uma levedura sensível foi suspensa em 3 mL de solução salina a 0,85%, padronizada na Escala n.º 1 de McFarland ( $3,0 \times 10^6$  células) e inoculada por profundidade em placas de Petri contendo 20 mL de ágar Sabouraud adicionado de 0,003% de azul de metileno (POLONELLI et al., 1983). Após solidificação do ágar, inoculou-se uma alçada das leveduras testes, previamente cultivadas em tubos de Ensaio contendo ágar Sabouraud glicose, sob forma de pequenos pontos (2,0 mm de diâmetro) na superfície do meio. Após incubação a 20°C por 72 horas, a presença de fator *killer* foi evidenciada pela formação do halo de inibição ao redor das leveduras testes (WALKER et al., 1995), figura 1.



**Figura 1.** Visualização do halo de inibição/presença de fator *killer*

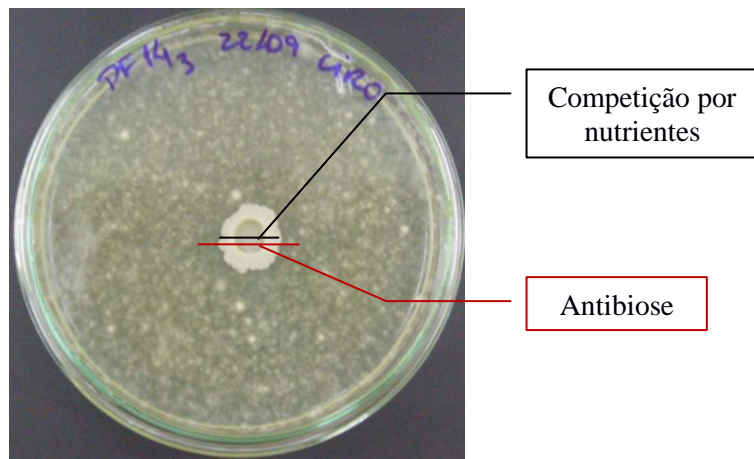
A cultura padrão de levedura utilizada como controle positivo consistiu de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-738 e as culturas sensíveis padrão utilizadas para a caracterização do fator *killer* foram *Candida glabrata* NCYC-366, *C. glabrata* NCYC-388, *Candida albicans*-12A, *Pichia kluyveri* CAY-15 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1006.

## 4.4 ANTIFUNGIGRAMA POR LEVEDURAS ANTAGONISTAS

### 4.4.1 Antifungigrama em meio sólido

A atividade antifúngica no meio sólido foi analisada pela técnica de semeadura em profundidade, em placas de Petri contendo 25 mL de Ágar MPL, de  $10^5$  esporos de *P. expansum*. Após a solidificação do ágar, procedeu-se uma perfuração no centro da placa (diâmetro, 8 mm) e introdução de 100  $\mu$ L do cultivo de levedura (Caldo MPL a 25°C/48 horas), correspondente a  $3,0 \times 10^6$  células (COELHO, 2005). As placas de Petri foram incubadas a 25°C e os diâmetros de inibição medidos após 5 dias com auxílio de paquímetro (MOTOMURA; HIROOKA, 1996).

Este método possibilita a visualização de dois tipos de inibição: a competição por nutrientes, identificada pelo crescimento em massa da levedura extravasando pela borda do orifício; e, a antibiose por produção de composto extra-celular, caracterizado por halo sem crescimento de levedura ou do fungo filamentoso. Podendo-se apresentarem isoladamente, onde, realizou-se a medida exclusiva do halo de cada tipo de inibição, ou simultaneamente, medindo-se pelo halo mais externo, que é o halo de antibiose. Como ilustra a figura 2.



**Figura 2.** Visualização dos halos de competição por nutrientes e antibiose

### 4.4.2 Antifungigrama em meio líquido

O antifungigrama em meio líquido foi baseado essencialmente nas metodologias descritas por Janisiewicz, Tworowski e Sharer (2000) e Chen et al. (1999),

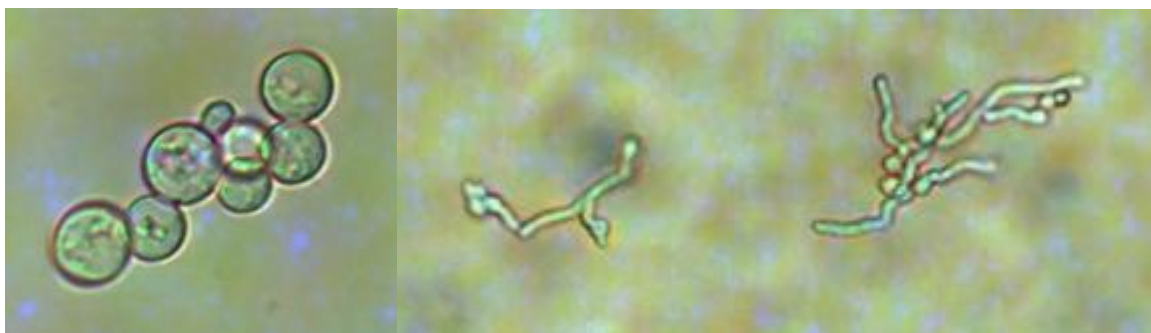


seguido de análise microscópica. Foram utilizadas leveduras selecionadas com os melhores resultados no antifungigrama em meio sólido e no teste de fator *killer*.

Inicialmente, preparou-se um pré-inóculo transferindo uma alçada da levedura teste para um Erlenmeyer com 25 mL de Caldo Meio Para Levedura - MPL e incubando a 25°C por 24 horas. A seguir,  $3,0 \times 10^6$  células de leveduras (100 µL) foram inoculadas em 5 Erlenmeyers contendo 50 mL de Caldo MPL e em 5 Erlenmeyers contendo 50 mL do mesmo caldo com  $10^5$  esporos de fungo teste, formando pares (sem e com fungo teste). Após 24, 48, 72, 96 e 120 horas a 25°C, um par de Erlenmeyers foi aliquotado em 10 mL, com micropipeta, transferindo-se para uma seringa acoplada a um suporte com membrana filtrante (“Millipore” 0,20 µm). O inóculo foi filtrado para um tubo de ensaio vazio sendo, então, inoculado em volume igual (1,0 mL) de Caldo MPL previamente inoculado com  $10^5$  esporos de fungo teste. Os tubos de ensaio foram incubados a 25°C, seus conteúdos centrifugados (150 rpm/10 min.) separadamente e o corpo de fundo analisado em microscópio após 12 horas, determinando-se a germinação dos esporos e tamanho das hifas.

Paralelamente, o controle foi preparado (branco), inoculando-se  $10^5$  esporos de fungo em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de Caldo MPL e 1,0 mL de água destilada estéril.

O comprimento das hifas foi realizado por meio da medida de 40 hifas selecionadas ao acaso, e a média aritmética utilizada para a comparação. A porcentagem de germinação dos esporos foi baseada na contagem de 100 células, incluindo-se os esporos germinados e os não germinados, visível na figura 3.



**Figura 3.** Visualização microscópica de esporos e hifas de *P. expansum*

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

As leveduras que apresentaram melhores indícios de antibiose foram

identificadas por meio do Kit comercial Rapid<sup>TM</sup> Yeast Plus System (Remel, Lenexa, EUA), que é um método qualitativo composto de 18 cúpulas contendo substratos convencionais e cromogênicos desidratados. As leveduras foram suspensas em meio líquido basal (KCl 0,6%, CaCl<sub>2</sub> 0,05%), seguido de preenchimento das cúpulas e incubação a 25°C/4 horas. As cúpulas com desenvolvimento e alteração de cor indicaram a utilização do substrato correspondente, sendo então codificadas e submetidas ao sistema de identificação computadorizado (Eletronic Rapid Compendium – ERIC, Remel).

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As tabelas, com os resultados obtidos no antifungigrama em meio líquido, foram analisadas no programa ANOVA (Statistica 7) mediante teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

Foi isolado um total de 41 leveduras, a partir de 11 amostras de polpas congeladas de diferentes sabores de frutas, respeitando-se a utilização de polpas produzidas por uma única empresa processadora, conforme apresentado na Tabela 1. A escolha pela utilização de uma única marca foi tomada para minimizar a variabilidade de processo e qualidade das polpas amostradas.

**Tabela 1.** Código das leveduras isoladas das amostras de polpa congelada de frutas

<b>Amostras de polpa congelada</b>	<b>Código das leveduras isoladas*</b>
Mamão integral	PF1 <sub>1</sub> , PF1 <sub>2</sub> , PF1 <sub>3</sub> , PF1 <sub>4</sub> , PF1 <sub>5</sub> .
Goiaba integral	PF2 <sub>1</sub> , PF2 <sub>2</sub> , PF2 <sub>3</sub> , PF2 <sub>5</sub> , PF2 <sub>6</sub> .
Framboesa integral	PF3 <sub>3</sub> , PF3 <sub>4</sub> , PF3 <sub>5</sub> .
Uva integral	PF4 <sub>1</sub> , PF4 <sub>2</sub> , PF4 <sub>3</sub> , PF4 <sub>6</sub> , PF4 <sub>8</sub> , PF4 <sub>11</sub> , PF4 <sub>13</sub> .
Abacaxi integral	PF8 <sub>1</sub> , PF8 <sub>4</sub> , PF8 <sub>5</sub> , PF8 <sub>8</sub> .
Laranja reconstituída	PF9 <sub>1</sub> , PF9 <sub>2</sub> , PF9 <sub>3</sub> .
Maracujá integral	PF10 <sub>2</sub> .
Pêssego integral	PF12 <sub>1</sub> .
Manga integral	PF13 <sub>1</sub> , PF13 <sub>3</sub> , PF13 <sub>4</sub> , PF13 <sub>5</sub> .
Açaí médio	PF14 <sub>2</sub> , PF14 <sub>3</sub> , PF14 <sub>4</sub> .
Acerola integral	PF16 <sub>2</sub> , PF16 <sub>4</sub> , PF16 <sub>6</sub> , PF16 <sub>7</sub> , PF16 <sub>8</sub> .

\* PF<sub>n</sub><sub>i</sub> = polpa de fruta; número da amostra; número da cultura

A polpa que apresentou maior quantidade de leveduras isoladas foi a de uva (7 leveduras), seguida pelas polpas de mamão, goiaba e acerola (5 leveduras). Trabalhos similares apresentam contagem e isolamento de leveduras muito variáveis em polpas de frutas, não demonstrando explicações consolidadas para as aparentes divergências na quantificação, além das condições higiênico-sanitárias ambientais, de colheita e processamento das matérias-primas (FAZIO, 2006; SANTOS; COELHO; CARREIRO, 2008).

As leveduras, embora dependentes do habitat e condições de manuseio e armazenamento, integram a microbiota natural de frutas e vegetais. Por sua vez, frutos colhidos do chão apresentam uma biota mais variada do que os apanhados na árvore, devido à

machucaduras causadas pela queda e o contato com grama e solo fornecerem uma fonte adicional de inoculo (FAZIO, 2006).

## 5.2 FATOR *KILLER*

Das 41 leveduras testadas, 31 (75,6%) apresentaram resultados positivos para o fator *killer*, indicando um bom número de leveduras com produção de substância extracelular, conforme mostrado na Tabela 2. Destas, 24 leveduras (77,4%), atuaram contra mais de uma levedura sensível padrão, sendo 6 (cepas PF1<sub>1</sub>, PF2<sub>1</sub>, PF2<sub>6</sub>, PF4<sub>11</sub>, PF14<sub>2</sub>, PF16<sub>6</sub>) positivas contra 2 leveduras sensíveis padrão; 13 (PF1<sub>3</sub>, PF2<sub>3</sub>, PF2<sub>5</sub>, PF3<sub>3</sub>, PF3<sub>4</sub>, PF4<sub>3</sub>, PF4<sub>6</sub>, PF4<sub>8</sub>, PF8<sub>1</sub>, PF12<sub>1</sub>, PF13<sub>1</sub>, PF13<sub>3</sub>, PF13<sub>5</sub>) contra 3; 4 (PF3<sub>5</sub>, PF4<sub>1</sub>, PF4<sub>13</sub>, PF16<sub>4</sub>) contra 4; e uma (PF4<sub>2</sub>) contra todas as leveduras sensíveis padrão testadas. Sete leveduras (cepas PF1<sub>2</sub>, PF1<sub>4</sub>, PF8<sub>4</sub>, PF9<sub>2</sub>, PF9<sub>3</sub>, PF10<sub>2</sub>, PF14<sub>3</sub>) atuaram somente contra uma levedura sensível padrão (Tabela 2).

**Tabela 2.** Caracterização de leveduras positivas para o fator *killer*\* empregando leveduras sensíveis de referência

Leveduras sensíveis	Leveduras (+) para fator <i>killer</i>
<i>Candida glabrata</i> NCYC 366	PF2 <sub>1</sub> , PF4 <sub>2</sub> .
<i>C. glabrata</i> NCYC 388	PF2 <sub>1</sub> , PF2 <sub>3</sub> , PF2 <sub>5</sub> , PF3 <sub>3</sub> , PF3 <sub>4</sub> , PF3 <sub>5</sub> , PF4 <sub>1</sub> , PF4 <sub>2</sub> , PF4 <sub>13</sub> , PF12 <sub>1</sub> , PF13 <sub>1</sub> , PF13 <sub>3</sub> , PF13 <sub>5</sub> , PF16 <sub>4</sub> .
<i>C. albicans</i> 12A	PF1 <sub>1</sub> , PF1 <sub>3</sub> , PF2 <sub>3</sub> , PF2 <sub>5</sub> , PF2 <sub>6</sub> , PF3 <sub>4</sub> , PF3 <sub>5</sub> , PF4 <sub>1</sub> , PF4 <sub>2</sub> , PF4 <sub>3</sub> , PF4 <sub>6</sub> , PF4 <sub>8</sub> , PF4 <sub>11</sub> , PF4 <sub>13</sub> , PF8 <sub>1</sub> , PF9 <sub>3</sub> , PF10 <sub>2</sub> , PF13 <sub>1</sub> , PF13 <sub>3</sub> , PF13 <sub>5</sub> , PF14 <sub>2</sub> , PF16 <sub>4</sub> , PF16 <sub>6</sub> .
<i>Pichia kluyveri</i> CAY-15	PF1 <sub>3</sub> , PF2 <sub>3</sub> , PF2 <sub>5</sub> , PF2 <sub>6</sub> , PF3 <sub>3</sub> , PF3 <sub>4</sub> , PF3 <sub>5</sub> , PF4 <sub>1</sub> , PF4 <sub>2</sub> , PF4 <sub>3</sub> , PF4 <sub>6</sub> , PF4 <sub>8</sub> , PF4 <sub>13</sub> , PF8 <sub>1</sub> , PF8 <sub>4</sub> , PF9 <sub>2</sub> , PF12 <sub>1</sub> , PF13 <sub>1</sub> , PF13 <sub>3</sub> , PF13 <sub>5</sub> , PF16 <sub>4</sub> , PF16 <sub>6</sub> .
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC-1006	PF1 <sub>1</sub> , PF1 <sub>2</sub> , PF1 <sub>3</sub> , PF1 <sub>4</sub> , PF3 <sub>3</sub> , PF3 <sub>5</sub> , PF4 <sub>1</sub> , PF4 <sub>2</sub> , PF4 <sub>3</sub> , PF4 <sub>6</sub> , PF4 <sub>8</sub> , PF4 <sub>11</sub> , PF4 <sub>13</sub> , PF8 <sub>1</sub> , PF12 <sub>1</sub> , PF14 <sub>2</sub> , PF14 <sub>3</sub> , PF16 <sub>4</sub> .

\* Ensaio em ágar Sabouraud adicionado de 0,03% de azul de metileno<sup>[13]</sup> com culturas sensíveis (3,0 x 10<sup>6</sup> células) incubadas a 25°C por 72 horas, em duplicata.

PF = leveduras isoladas de polpa de fruta congelada.

Os resultados obtidos neste teste foram superiores aos encontrados por Coelho (2005), cujo estudo realizado com 44 cepas de leveduras isoladas de diferentes fontes naturais na região norte do Paraná obteve apenas 13 (29,55%) com resultado positivo para o caráter

*killer*. Entretanto, Oliveira et al. (2011) obtiveram 100% de positividade para o fator *killer* em 24 leveduras isoladas de morango comercial e orgânico.

As leveduras que atuaram contra mais de uma levedura sensível, sugerem a produção de toxina *killer* com amplo espectro de ação, ou então produção de mais de uma toxina *killer*, a exemplo de toxinas K1, K2 e K28 produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* (SCHMITT; BREINIG, 2002). As cepas PF2<sub>1</sub> e a PF4<sub>2</sub> apresentaram caráter *killer* contra *Candida glabrata* NCYC 366 e *C. glabrata* NCYC 388, podendo indicar possível produção de uma mesma substância antagônica (POLONELI et al. 1983). Resultados semelhantes foram também encontrados por Coelho (2005) e Oliveira et al. (2011), contra as mesmas linhagens padrão sensíveis de referência.

### 5.3 ANTIFUNGIGRAMA EM MEIO SÓLIDO

As leveduras foram submetidas ao teste de antifungigrama em meio sólido, perante os fungos filamentosos *Penicillium expansum* n.º 2, *Aspergillus ochraceus* A152 e *Fusarium verticillioides* 103F, como método de triagem para a etapa posterior, o antifungigrama em meio líquido.

Das 41 leveduras testadas, 24 (58,5%) apresentaram inibição contra *P. expansum* n.º 2, sendo que destas, 19 (79,2%) baseado exclusivamente em produção de substância extracelular (antibiose), com diâmetro de inibição variando de 10 a 18 mm, 3 (12,5%) somente por competição de nutrientes (crescimento em massa celular na superfície do meio), e 4 (16,7%) por competição de nutrientes e antibiose, após leitura realizada entre 48 e 120 horas (Tabela 3).

Os diâmetros de inibição focados neste estudo são aqueles evidenciados por mecanismo de ação baseado em antibiose, ou seja, produção de substâncias extracelulares que inibem o desenvolvimento de outros micro-organismos. Sendo assim, as cepas PF2<sub>3</sub>, PF2<sub>6</sub>, PF4<sub>1</sub>, PF4<sub>13</sub>, PF8<sub>4</sub>, PF9<sub>3</sub>, PF10<sub>2</sub>, PF13<sub>3</sub>, PF13<sub>5</sub>, PF14<sub>4</sub>, PF16<sub>6</sub> e PF16<sub>7</sub> apresentaram maior atividade antagônica contra *P. expansum* n.º 2, com diâmetro de inibição variando de 12 a 18 mm. Coelho (2005) encontrou resultados positivos para o antagonismo em 20 (45,5%) das 44 leveduras testadas contra *P. expansum*, sendo 15 por competição de nutrientes e 5 com indícios de antibiose, com diâmetros de inibição variando de 10 a 31 mm e 13 a 17 mm, respectivamente.

**Tabela 3.** Efeito antagônico de leveduras (células íntegras) no desenvolvimento de *P. expansum*

Levedura/código	Diâmetro de inibição (mm)		
	CN*	A**	CN/A***
PF1 <sub>1</sub>		11	
PF1 <sub>3</sub>		10	
PF1 <sub>4</sub>		16	
PF2 <sub>1</sub>		14	
PF2 <sub>2</sub>			10/16
PF2 <sub>3</sub>		12	
PF2 <sub>5</sub>		10	
PF2 <sub>6</sub>		14	
PF4 <sub>1</sub>		13	
PF4 <sub>13</sub>		12	
PF8 <sub>4</sub>		14	
PF8 <sub>8</sub>			10/17
PF9 <sub>1</sub>		10	
PF9 <sub>2</sub>	13		
PF9 <sub>3</sub>		14	
PF10 <sub>2</sub>		12	
PF13 <sub>1</sub>		11	
PF13 <sub>3</sub>		12	
PF13 <sub>5</sub>		15	
PF14 <sub>2</sub>	10		
PF14 <sub>3</sub>			12/24
PF14 <sub>4</sub>		17	
PF16 <sub>4</sub>	11		
PF16 <sub>6</sub>		16	
PF16 <sub>7</sub>		18	
PF16 <sub>8</sub>			11/19

\* Competição por Nutriente: crescimento da levedura em massa, sobre o meio de cultivo.

\*\* Antibiose: formação de halo de inibição devido a produção de substâncias extracelulares.

\*\*\*Competição por Nutrientes / Antibiose: crescimento da levedura em massa e formação de halo de inibição devido à produção de substâncias extracelulares.

Já contra *Aspergillus ochraceus* A152, das 41 leveduras testadas, 25 (61,0%) apresentaram inibição, sendo 19 (76,0%) exclusivamente por antibiose, com diâmetros de inibição variando de 10 a 19,0 mm; 1 (4,0%) por competição de nutrientes; e 5 (20,0%) pelos dois mecanismos simultaneamente. As leveduras PF 1<sub>1</sub>, PF 2<sub>2</sub>, PF 2<sub>3</sub>, PF 2<sub>6</sub>, PF 4<sub>1</sub>, PF 4<sub>6</sub>, PF 4<sub>13</sub>, PF 8<sub>4</sub>, PF 9<sub>1</sub>, PF 9<sub>3</sub> apresentaram maior atividade antagônica por antibiose, com variação do diâmetro de inibição entre 13 e 19 mm (Tabela 4).

**Tabela 4.** Efeito antagônico de leveduras (células íntegras) no desenvolvimento de *A. ochraceus*

Levedura/código	Diâmetro de inibição (mm)		
	CN*	A**	CN/A***
PF 1 <sub>1</sub>		14	
PF 1 <sub>3</sub>		12	
PF 1 <sub>4</sub>		11	
PF 2 <sub>1</sub>		12	
PF 2 <sub>2</sub>		16	
PF 2 <sub>3</sub>		14	
PF 2 <sub>5</sub>		12	
PF 2 <sub>6</sub>		18	
PF 4 <sub>1</sub>		13	
PF 4 <sub>3</sub>			10/16
PF 4 <sub>6</sub>		14	
PF 4 <sub>8</sub>			9/16
PF 4 <sub>11</sub>			9/17
PF 4 <sub>13</sub>		19	
PF 8 <sub>4</sub>		14	
PF 8 <sub>8</sub>			10/16
PF 9 <sub>1</sub>		19	
PF 9 <sub>3</sub>		16	
PF 10 <sub>2</sub>		11	
PF 13 <sub>1</sub>		11	
PF 13 <sub>3</sub>		12	
PF 14 <sub>2</sub>	13		
PF 14 <sub>3</sub>			13/16
PF 16 <sub>6</sub>		12	
PF 16 <sub>8</sub>		10	

\* Competição por Nutriente: crescimento da levedura em massa, sobre o meio de cultivo.

\*\* Antibiose: formação de halo de inibição devido a produção de substâncias extracelulares.

\*\*\*Competição por Nutrientes / Antibiose: crescimento da levedura em massa e formação de halo de inibição devido à produção de substâncias extracelulares.

Em relação à *Fusarium verticillioides* 103F, também 25 leveduras (61,0%) apresentaram inibição; destas, 23 (92,0%) atuaram exclusivamente por antibiose (variação do diâmetro de inibição entre 10 e 14 mm), uma (4,0%) somente competindo por nutrientes e uma (4,0%) por ambos os mecanismos (Tabela 5). As leveduras PF1<sub>4</sub>, PF 2<sub>2</sub>, PF 2<sub>3</sub>, PF 2<sub>5</sub>, PF 2<sub>6</sub>, PF 4<sub>13</sub> e PF16<sub>8</sub> foram mais ativas contra este fungo, cujo diâmetro de inibição variou de 13 a 14 mm.

**Tabela 5.** Efeito antagônico de leveduras (células íntegras) no desenvolvimento de *F. verticillioides*

Levedura/código	Diâmetro de inibição (mm)		
	CN*	A**	CN/A***
PF1 <sub>1</sub>		11	
PF1 <sub>2</sub>		12	
PF1 <sub>3</sub>		12	
PF1 <sub>4</sub>		13	
PF 2 <sub>1</sub>		12	
PF 2 <sub>2</sub>		13	
PF 2 <sub>3</sub>		13	
PF 2 <sub>5</sub>		13	
PF 2 <sub>6</sub>		14	
PF 3 <sub>3</sub>		10	
PF 3 <sub>4</sub>		10	
PF 3 <sub>5</sub>		10	
PF 4 <sub>1</sub>		11	
PF 4 <sub>3</sub>		12	
PF 4 <sub>6</sub>		10	
PF 4 <sub>8</sub>		12	
PF 4 <sub>11</sub>		12	
PF 4 <sub>13</sub>		13	
PF12 <sub>1</sub>		10	
PF13 <sub>3</sub>		11	
PF14 <sub>2</sub>			10/13
PF14 <sub>3</sub>	19		
PF16 <sub>2</sub>		12	
PF16 <sub>7</sub>		12	
PF16 <sub>8</sub>		14	

\* Competição por Nutriente: crescimento da levedura em massa, sobre o meio de cultivo.

\*\* Antibiose: formação de halo de inibição devido a produção de substâncias extracelulares.

\*\*\*Competição por Nutrientes / Antibiose: crescimento da levedura em massa e formação de halo de inibição devido à produção de substâncias extracelulares.

Estudo realizado por Oliveira et al. (2011) mostrou o efeito antagônico de 22 leveduras no desenvolvimento de *Botrytis cinerea*, das 24 leveduras *killer* positivas testadas, onde somente duas cepas apresentaram atividade antifúngica por antibiose, entretanto, competindo também por nutrientes.

Contudo, algumas leveduras que atuaram por antibiose contra um ou mais fungos filamentosos testados não apresentaram positividade para o fator *killer* (cepas PF2<sub>2</sub>, PF8<sub>8</sub>, PF9<sub>1</sub>, PF14<sub>4</sub>, PF16<sub>7</sub> e PF16<sub>8</sub>). Isto pode ocorrer devido à produção de outras substâncias extracelulares, tais como a detecção de exoquitinase [N-acetyl-β-D-glucosaminidase (Nagase)] e β-1-3-glucanase produzidas por *Aureobasidium pullulans* (LS-30) contra o



desenvolvimento de *B. cinerea*, *P. expansum*, *Rhizopus stolonifer* e *A. niger* realizado *in vitro* e em fermentos de maçãs (CASTORIA et al., 2001).

De maneira geral, as cepas PF2<sub>3</sub>, PF4<sub>1</sub> e PF4<sub>13</sub> apresentaram bons resultados perante os três fungos filamentosos estudados, sendo então submetidas ao sistema de identificação (Rapid™ Yeast Plus System) e a cepa PF4<sub>13</sub> selecionada para o antifungigrama em meio líquido.

#### 5.4 ANTIFUNGIGRAMA EM MEIO LÍQUIDO

O antifungigrama em meio líquido foi realizado por ser um teste mais sensível que no meio sólido, visto que é possível uma quantificação na germinação de esporos e no desenvolvimento das hifas fúngicas (JANISIEWICZ; TWOROSKI; SHARER, 2000). Para a sua realização foi selecionada uma única cepa, com base nos resultados dos testes de caracterização de substância *killer* e antifungigrama em meio sólido.

Os parâmetros para tal escolha foram maior espectro de inibição (número de leveduras sensíveis), no teste de caráter *killer*, e resultados satisfatórios no antifungigrama em meio sólido, quanto ao número de fungos filamentosos inibidos e diâmetros de inibição. Sendo assim, optou-se pela levedura de código PF4<sub>13</sub>, já que seu score no caráter *killer* foi de 4 das 5 leveduras sensíveis (Tabela 2) e, no antifungigrama em meio sólido, com formação de diâmetros de inibição mais nítidos e estáveis (quanto as leituras de 48 a 120h) contra os 3 fungos filamentosos testados (Tabelas 3, 4 e 5).

Foram realizados ensaios com o sobrenadante do cultivo da levedura e com o sobrenadante do cultivo de levedura com os fungos testes, confrontados com um cultivo controle de cada um dos fungos filamentosos.

Nos testes realizados contra o desenvolvimento das hifas de *P. expansum* (Tabela 6), observou-se diferença significativa entre os tratamentos do sobrenadante da levedura e do sobrenadante da levedura e *P. expansum*, com relação ao controle a partir de 72 horas de incubação, indicando que a produção da substância extracelular inibitória iniciou-se neste período, apresentando influência sobre o desenvolvimento das hifas do fungo filamentosos.

Com relação à germinação dos esporos, observou-se diferença significativa do sobrenadante de levedura em relação ao controle, a partir de 48 horas, acentuando-se no tratamento com o sobrenadante da levedura até 96 horas (inibição de 93,33% da germinação

dos esporos), ao passo que o tratamento do sobrenadante da interação levedura/*P. expansum* não diferiu do controle (Tabela 6). Sendo assim, a diferença significativa observada entre os cultivos de levedura e de levedura/*P. expansum* poderia estar associada à interferência de metabólitos produzidos pelo fungo filamentosso na ação do composto bioativo. Logo, a indicação de uso para o sobrenadante da levedura para o controle de *P. expansum* seria do cultivo isolado da cultura por um período de 96 horas.

**Tabela 6.** Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/*P. expansum*

Incubação (horas)	Levedura PF4 <sub>13</sub>					
	Comprimento de hifas (µm)			Germinação de esporos (%)		
	Controle	Sobrenadante levedura	Sobrenadante Levedura/ <i>P. expansum</i>	Controle	Sobrenadante levedura	Sobrenadante Levedura/ <i>P. expansum</i>
24	40,10 ± 10,01 <sup>aA</sup>	39,42 ± 20,17 <sup>bcA</sup>	40,79 ± 10,97 <sup>bA</sup>	56,00 <sup>aA</sup>	65,00 <sup>dB</sup>	55,00 <sup>bA</sup>
48	36,67 ± 10,93 <sup>aA</sup>	38,05 ± 11,40 <sup>bcA</sup>	38,39 ± 11,28 <sup>bA</sup>	60,00 <sup>bC</sup>	30,00 <sup>cA</sup>	55,00 <sup>bB</sup>
72	34,96 ± 8,75 <sup>aB</sup>	31,19 ± 6,20 <sup>abA</sup>	30,51 ± 5,80 <sup>aA</sup>	62,00 <sup>bB</sup>	29,00 <sup>cA</sup>	61,00 <sup>cB</sup>
96	39,76 ± 15,15 <sup>aB</sup>	28,45 ± 3,66 <sup>aA</sup>	31,88 ± 7,21 <sup>aA</sup>	60,00 <sup>bC</sup>	4,00 <sup>aA</sup>	51,00 <sup>aB</sup>
120	53,47 ± 13,82 <sup>bB</sup>	40,79 ± 6,01 <sup>cA</sup>	39,42 ± 12,87 <sup>bA</sup>	77,00 <sup>cB</sup>	18,00 <sup>bA</sup>	78,00 <sup>dB</sup>

\* Ensaio realizado em caldo MPL incubado a 25°C/12 horas; cada valor corresponde à média dos valores de 40 dados para crescimento de hifas e 2 dados para germinação de esporos. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Nos testes realizados contra o desenvolvimento de hifas de *A. ochraceus* (Tabela 7) observou-se diferença significativa entre os tratamentos do sobrenadante da levedura e do sobrenadante da interação levedura/*A. ochraceus* com relação ao controle, nos períodos de 48 e 72 horas. Com relação à germinação dos esporos, observou-se resultado similar ao encontrado contra o *P. expansum*, ou seja, diferença significativa entre o sobrenadante de levedura a partir de 48 horas, acentuando-se em 72 horas (inibição de 76,39% da germinação dos esporos), com pico de atividade em 96 horas, atingindo assim inibição de 86,44% da germinação do fungo, quando comparado ao controle. Os tratamentos com os sobrenadantes obtidos dos cultivos de levedura e interação levedura/*A. ochraceus* também diferiram estatisticamente, conforme deduzido anteriormente. Logo, a indicação de uso para o sobrenadante da levedura para o controle de *A. ochraceus*, levando em conta o desenvolvimento de hifas e a germinação de esporos simultaneamente, seria do cultivo da levedura isolada, por um período de 72 horas/25°C.

Os testes realizados contra *F. verticillioides* não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos analisados (Tabela 8), indicando a não atuação do composto bioativo sobre o fungo teste analisado.

Estudos realizados por Coelho et al. (2006, 2007) mostraram inibição de 58,15% da germinação de esporos de *Penicillium expansum* com sobrenadante do cultivo de *Candida guilliermondii* obtido após 72 horas de incubação a 25°C, enquanto que *Pichia ohmeri* (25°C/48 horas) inibiu o desenvolvimento de hifas do mesmo fungo em 64,37%, ambos associados ao fator *killer*.

**Tabela 7.** Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/*A. ochraceus*

Incubação (horas)	Levedura PF4 <sub>13</sub>					
	Comprimento de hifas (µm)			Germinação de esporos (%)		
	Controle	Sobrenadante levedura	Sobrenadante Levedura/ <i>A. ochraceus</i>	Controle	Sobrenadante levedura	Sobrenadante Levedura/ <i>A. ochraceus</i>
24	30,51 ± 5,80 <sup>bA</sup>	31,02 ± 6,94 <sup>cA</sup>	33,42 ± 7,63 <sup>cA</sup>	79,00 <sup>cB</sup>	66,00 <sup>eA</sup>	83,00 <sup>eC</sup>
48	28,28 ± 6,62 <sup>bB</sup>	22,45 ± 3,10 <sup>aA</sup>	22,96 ± 3,31 <sup>aA</sup>	73,00 <sup>bC</sup>	20,00 <sup>cA</sup>	32,00 <sup>aB</sup>
72	29,31 ± 9,57 <sup>bB</sup>	23,14 ± 3,36 <sup>abA</sup>	22,96 ± 3,31 <sup>aA</sup>	72,00 <sup>bC</sup>	17,00 <sup>bA</sup>	45,00 <sup>bB</sup>
96	21,77 ± 2,64 <sup>aA</sup>	21,08 ± 1,83 <sup>aA</sup>	21,94 ± 2,78 <sup>aA</sup>	59,00 <sup>aC</sup>	8,00 <sup>aA</sup>	50,00 <sup>cB</sup>
120	27,25 ± 8,14 <sup>bA</sup>	25,54 ± 3,10 <sup>bA</sup>	28,11 ± 7,25 <sup>bA</sup>	90,00 <sup>dC</sup>	39,00 <sup>dA</sup>	79,00 <sup>dB</sup>

\* Ensaio realizado em caldo MPL incubado a 25°C/12 horas; cada valor corresponde à média dos valores de 40 dados para crescimento de hifas e 2 dados para germinação de esporos. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 8.** Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/*F. verticillioides*

Incubação (horas)	Levedura PF4 <sub>13</sub>					
	Comprimento de hifas (µm)			Germinação de esporos (%)		
	Controle	Sobrenadante levedura	Sobrenadante Levedura/ <i>F. verticillioides</i>	Controle	Sobrenadante levedura	Sobrenadante Levedura/ <i>F. verticillioides</i>
24	94,60 ± 28,59 <sup>aA</sup>	86,37 ± 38,93 <sup>aA</sup>	87,40 ± 36,96 <sup>aA</sup>	80,00 <sup>eA</sup>	83,00 <sup>eB</sup>	82,00 <sup>eA</sup>
48	115,85 ± 62,86 <sup>aA</sup>	117,22 ± 50,54 <sup>aA</sup>	116,88 ± 63,02 <sup>bA</sup>	30,00 <sup>bB</sup>	24,00 <sup>aA</sup>	30,00 <sup>aB</sup>
72	125,10 ± 53,34 <sup>aA</sup>	107,28 ± 61,00 <sup>aA</sup>	112,08 ± 58,24 <sup>abA</sup>	27,00 <sup>aA</sup>	38,00 <sup>bB</sup>	47,00 <sup>cC</sup>
96	117,22 ± 67,45 <sup>aA</sup>	111,74 ± 58,71 <sup>aA</sup>	108,99 ± 52,32 <sup>abA</sup>	43,00 <sup>cB</sup>	42,00 <sup>cB</sup>	35,00 <sup>bA</sup>
120	104,54 ± 34,53 <sup>aA</sup>	98,37 ± 47,28 <sup>aA</sup>	102,14 ± 38,40 <sup>abA</sup>	64,00 <sup>dA</sup>	80,00 <sup>dC</sup>	69,00 <sup>dB</sup>

\* Ensaio realizado em caldo MPL incubado a 25°C/12 horas; cada valor corresponde à média dos valores de 40 dados para crescimento de hifas e 2 dados para germinação de esporos. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 5.5 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

As leveduras PF2<sub>3</sub>, PF4<sub>1</sub> e PF4<sub>13</sub> foram identificadas por meio do kit comercial Rapid™ Yeast Plus System (Remel, Lenexa, EUA). De acordo com os resultados obtidos, a levedura PF2<sub>3</sub> foi identificada como *Saccharomyces cerevisiae* e as cepas PF4<sub>1</sub> e PF4<sub>13</sub> como *Kluyveromyces* sp., cujas probabilidades foram, respectivamente, >99,9%, 99,88% e 99,88%.

Os gêneros mais comuns encontrados na microbiota natural de frutas incluem *Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Trichosporum* (UBOLDI EIROA, 1989), sendo que *Kluyveromyces marxianus* está entre as 20 leveduras mais comuns em alimentos (DEAK; BEUCHAT, 1986).

Ivo (1982) isolou do abacaxi 99 leveduras pertencentes por ordem decrescente aos gêneros *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Hansenula* e *Kloeckera*.

Sancho et al. (2000) relataram maior incidência dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces* e *Candida* em 19 leveduras isoladas de polpas e concentrados de frutas, sendo *S. cerevisiae* uma das predominantes em concentrado de laranja. Tal espécie também foi isolada por Parish e Higgins (1989) e por Deak e Beuchat (1993), a partir de concentrados de frutas.

Leveduras do gênero *Kluyveromyces* também foram isoladas de concentrados de frutas por outros pesquisadores (ETHIRAJ; SURESH, 1988, DEAK; BEUCHAT, 1993, TRINDADE et al., 2002).

A produção de fator *killer* K1, K2 e K28 por *S. cerevisiae* e toxinas de *Kluyveromyces lactis* já foi relatada por outros pesquisadores (PHILLISKIRK; YOUNG, 1975, GOLUBEV, 1998, SCHMITT; BREINIG, 2002). Todas as toxinas *killer* detectadas consistiram de proteínas ácidas com o ponto isoelétrico aproximado de pH 4,0, sendo a maioria com a massa molecular entre 10-20 kDa, exceto a toxina de *K. lactis*, constituída de três subunidades polipeptídicas (27,5; 30 e 99 kDa) (RADLER et al., 1993).

## 6 CONCLUSÃO

Foi isolado um total de 41 leveduras de 11 polpas congeladas de diferentes frutas. Das 41 leveduras testadas, 31 (75,6%) apresentaram resultados positivos para o fator *killer*, indicando um bom número de leveduras com produção de substância extracelular.

O antagonismo observado nas leveduras testadas contra *P. expansum* n.º 2, *A. ochraceus* A152 e *F. verticillioides* 103F no meio sólido caracterizou basicamente atividade por antibiose. Constituindo-as como agentes promissores contra fungos deteriorantes na pós-colheita de frutas contra fungos deteriorantes.

*Kluyveromyces* sp. *killer* positiva (cepa PF4<sub>13</sub>), controlou significativamente a germinação de esporos e o desenvolvimento de hifas de *P. expansum* e *A. ochraceus*.

Os resultados obtidos reforçam a necessidade do estudo de micro-organismos antagonistas de caráter inócuo, melhorando assim a qualidade higiênico-sanitária e a segurança de produtos agroindustriais.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. C.; NUNES, I. F. S.; OLIVEIRA, M. M. A. Perfil microbiológico de polpas de frutas comercializadas em Teresina, PI. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 112, p. 78-81, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadeia produtiva de frutas** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura; Antônio Márcio Buainain e Mário Otávio Batalha (coord.). – Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007. 102 p.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruit: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology** 2001; 22:7-17.
- 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.; HOFFMANN, F.L.; HIROOKA, E.Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 347-368, 2003.
- COELHO, A.R. **Controle de *Penicillium expansum*/biodegradação de patulina**: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Londrina-Londrina, PR, 2005. 122 p.
- COELHO, A.R.; LEVY, R.M.; HOFFMANN, F.L.; TANIWAKI, M.H.; KMELMMEIER, C.; PAGNOCCA, F.C.; HIROOKA, E.Y. **Potential bio-control of patulin producing *Penicillium expansum* in post-harvest fruits using antagonistic yeasts**. In: NJAPAU, H., TRUJILLO, S., VAN EGMOND, H.P. and PARK, D.L. (Org.), 2006. Mycotoxins and Phycotoxins: advances in determination, toxicology and exposure management. Netherlands: Wageningen Academic Publishers pp. 249-257.
- COELHO, A.R.; CELLI, M.G.; ONO, E.Y.S.; WOSIACKI, G.; HOFFMANN, F.L.; PAGNOCCA, F.C.; HIROOKA, E.Y. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts with perspectives of application in biocontrol and patulin degradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50: 725-733, 2007.
- DEAK, T.; BEUCHAT, L. R. Identification of foodborne yeasts. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 3, p. 243-264, 1986.
- DEAK, T.; BEUCHAT, L. R. Yeasts associated with fruit juice concentrates. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 777-782, 1993.
- ETHIRAJ, S.; SURESH, E. R. Studies on micro-organisms associated during processing of mango. **Acta Horticulturae**, v. 231, n. 1, p. 731-735, 1988.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 652 p., 1989.

**FAO (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION)**. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em 14 ago. 2002.

**FAO (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION)**. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em 20 jun. 2010.

FAZIO, M. L. S. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em polpas congeladas de frutas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista - São José do Rio Preto, SP, 2006. 132 p.

GOLUBEV, W.I. Mycocins (*killer* toxins) In: **The yeasts, a taxonomic study** (Kurtzman, C.P.; Fell, J.W., Eds). Academic Press, London, pp. 55-62, 1998.

**IBRAF (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS)**. Estatísticas de Frutas Frescas. Disponível em <[http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est\\_frutas.asp](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp)>. Acesso em 20 jun. 2010.

INTEC Assessoria e Consultoria em Gestão Estratégica; ARVE Alimentos. **Estudo de Viabilidade Técnica e Econômica para Abertura de uma Agroindústria Processadora de Polpa de Frutas no Município Aimorés-MG**. Viçosa, 2005. p. 11.

IVO, M. I. **Leveduras do abacaxi**. 1982. p. 46. Tese (Mestrado), Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

JACOBS, C.J.; VAN VUOREN, H.J.J. Effects of different *killer* yeast on wine fermentations. **Journal of Amsterdam Society Brewing**, v. 42, n. 4, p. 295-299, 1991.

JANISIEWICZ, W.J.; KORSTEN, L. Biological control of post-harvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 411-441, 2002.

JANISIEWICZ, W.J.; TWORKOSKI, T.J.; SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of post-harvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**, v. 90, n. 11, p. 1196-1200, 2000.

JANISIEWICZ, W.J.; CONWAY, W.; GLENN, M.; SAMS, C. **Integrating biological control and calcium treatment for controlling post-harvest decay of apples**. **Hortscience**, v. 33, n. 1, p. 105-109, 1998.

LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T. Ecology and yeasts. **In: The yeasts: a taxonomic study** (Kurtzman, C. P.; Fell, J. W. eds.) 4ed., Elsevier Science Publ. B. V. Amsterdam, the Netherlands, p. 21-30, 1998.

LEVY, R.M.; HIROOKA, E.Y. Detoxificação de patulina por leveduras antagonistas a *Penicillium spp.* **Unopar Científica-Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 57-62, 1999.

MASCARENHAS, P.; BEHERE, A.; SHARMA, A.; PADWALDESAI, S.R. Post-harvest spoilage of mango (*Mangifera indica*) by *Botryodiplodia theobromae*. **Mycological Research**, v. 100, n. 1, p. 27-30, 1995.



MICHEREFF, S.J.; SILVA, J.B.; SILVEIRA, N.S.S.; PEDROSA, R.A.; MARIANO, R.L.R.; TAVARES, L.A.; TAVARES, S.C.C.H. Post-harvest biocontrol of *Lasiodiplodia rot* of mango fruits by saprophytic yeasts. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, n. 1, p. 29-37, 1997.

MOTOMURA, M.; HIROOKA, E.Y. Método rápido para o isolamento de micro-organismos de solo com atividade antifúngica sobre *Fusarium moniliforme*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 2, p. 313-322, 1996.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium species-an illustrated manual for identification***. Pennsylvania, Pennsylvania State University Press, 1983. p. 193.

OLIVEIRA, A. V.; RABELO, P. R.; PORTES, C. S. Biocontrole in vitro de *Botrytis cinerea* por leveduras *killer* visando aplicação em morangos pós-colheita. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.1, 2011.

PARISH, M. E.; HIGGINS, D. P. Yeasts and molds isolated from spoiling citrus products and by-products. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 4, p. 261-263, 1989.

PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T.W. The occurrence of *killer* character in yeasts of various genera. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 41, n. 2, p. 147-151, 1975.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. *Killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 774-780, 1983.

RADLER, F.; HERZBERGER, S.; SCHONIG, I.; SCHWARZ, P. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailli*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 495-500, 1993.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. Doenças de mamoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A. B.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, cap. 46, 1997. p. 261-297.

SANCHO, T.; GIMÉNEZ-JURADO, G.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. **Food Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 613-624, 2000.

SANTOS, C. A. A.; COELHO, A. F. S.; CARREIRO, S. C. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. **Ciência e tecnologia em alimentos**. v. 28, n. 4, p. 913-915, Campinas – SP. 2008.

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

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP. 1998. p. 760.



SUGAR, D.; SPOTTS, R.A. Control of post-harvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. **Plant disease**, v. 83, n. 2, p. 155-158, 1999.

TRINDADE, R. C.; RESENDE, M. A.; SILVA, C. M.; ROSA, C. A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 294-300, 2002.

UBOLDI EIROA, M. N. Microrganismos deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3/4, p. 141-160, 1989.

WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between *killer* yeast and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology**, v. 127, p. 213-222, 1995.

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. **Biological control of post-harvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 465.