

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

BIOCONTROLE DE *Fusarium verticillioides* EM MILHO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

FRANCISCO BELTRÃO
2011

ALESSANDRA MARCON GASPERINI

BIOCONTROLE DE *Fusarium verticillioides* EM MILHO

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em alimentos

Orientador: Prof^a. Dr^a Elisabete Hiromi Hashimoto.

FRANCISCO BELTRÃO
2011

BIOCONTROLE DE *Fusarium verticillioides* EM MILHO

Alessandra Marcon Gasperini

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^a Dr^a Alessandra Machado Lunkes
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof^a Dr^a Elisabete Hiromi Hashimoto
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
(Orientadora)

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

A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso

Francisco Beltrão, 25 de novembro de 2011.

Agradecimentos

À Deus.

À minha família pelo amor, compreensão e incentivo incondicional.

À Prof^a Dr^a Elisabete Hiromi Hashimoto pela orientação, paciência e grandes ensinamentos repassados.

Ao Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho pelos ensinamentos e auxílio durante o trabalho. Além a disponibilização das cepas de leveduras para os testes.

À Prof^a Dr^a Elisa Yoko Hirooka pela colaboração e oportunidade de trabalhar em projeto de pesquisa.

À Prof^a Dr^a Alessandra Machado Lunkes pela colaboração, apoio e amizade.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná em especial aos técnicos laboratoristas.

À Universidade Estadual de Londrina pela disponibilização de cepas fúngicas utilizadas.

Aos colegas de laboratório, em especial Michel Kanemaru, Mariluci do Santos Fortes e Cláudio Cartabiano Leite pela ajuda prestada no desenvolvimento dos experimentos.

Às cooperativas e produtores de milho da região por cederam as amostras utilizadas neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão de bolsa de iniciação científica.

À todos os colegas do curso Superior em Tecnologia em Alimentos.

Enfim, a todos que eu não tiver mencionado e que estiveram presentes durante a realização do trabalho, o meu muito obrigado.

RESUMO

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

O Brasil apresenta grande destaque na produção de grãos, sendo o milho amplamente cultivado e de grande importância nutricional e econômica. No entanto essa cultura é frequentemente afetada por fungos na pré-colheita ou no armazenamento. Entre esses fungos destaca-se *Fusarium verticillioides*, que além da deterioração ocasionando perda nutricional, pode provocar a contaminação pela produção de micotoxinas no milho e nos subprodutos. O controle deste fungo é de extrema importância, uma vez que os métodos químicos ou físicos geram custos elevados podendo afetar o ambiente e os alimentos devido a contaminação por resíduos. Desta forma, sugere-se o biocontrole como uma alternativa economicamente viável e menos agressiva ao meio ambiente e ao consumidor. O presente trabalho teve como objetivo a seleção de leveduras antagonistas a *F. verticillioides* micotoxigênico. Foram realizadas a análise das vias de antibiose com o emprego de leveduras isoladas da microbiota natural do milho e a capacidade destas de expressar caráter *killer*. Um total de 34 leveduras foram isoladas e testadas, sendo que 5 isolados apresentaram antagonismo estável por mais de 30 dias frente a cepa *F. verticillioides* 103F micotoxigênico. As cinco leveduras foram identificadas com kit comercial *RapID™ YEAST Plus* (Remel) como *Saccharomyces cerevisiae*, isolados AM2(-1) e AM3(-4), *Hansenula wingei* isolado AM2(-2) e *Pro wickerhamii* o isolado AM5(-1). O isolado AM12 não foi identificado com o kit. As leveduras AM5(-1) e AM12(-6) foram positivas quanto ao caráter *killer* (k+) para 4 das 5 leveduras testes sensíveis, em 72h. A levedura AM2(-2) foi k+ para três cepas testes sensíveis em 120h. O caráter *killer* foi expresso pelas leveduras positivas em 25 e 37°C. Essas leveduras *killer* positivas apresentam boas perspectivas para aplicação no biocontrole de *F. verticillioides* produtor de fumonisinas.

Palavras-chave: Leveduras, Antagonismo, Micotoxinas, *Fusarium* sp.

ABSTRACT

GASPERINI, Alessandra. **Biocontrol of *Fusarium verticillioides* in maize.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão.

Brazil shows great prominence in the production of grain, maize and widely grown of great economic and nutritional importance. However these cultures are often affected by fungi in the pre-harvest or storage. Among these fungi, *Fusarium verticillioides*, stands out by deterioration with nutritional loss, and contamination by mycotoxin production in maize and its products. The control of this fungus is extremely important, since the chemical or physical methods with high costs may affect the environment and food due to contamination by waste. Thus, it is suggested as a biocontrol economically viable and less harmful to the environment and the consumer. This work aimed to select antagonists yeasts against to mycotoxigenic *F. verticillioides*. The analysis of the process of antibiosis with yeasts isolated from the natural microbiota of maize and the ability to express character *killer* were performed. A total of 34 isolates were obtained and tested, among these 5 isolates showed stable antagonism for more than 30 days against mycotoxigenic strain *F. verticillioides* 103F. The five yeasts were identified with commercial kit Rapid Yeast Plus™ (Remel) as *Saccharomyces cerevisiae*, isolated AM2 (-1) and AM3 (-4), *Hansenula wingei* AM2 isolated (-2) and *Pro wickerhamii* isolate AM5 (-1). The isolate AM12 was not identified with the kit. Yeasts AM5 (-1) and AM12 (-6) were character *killer* positive (k+) for four of the five yeast sensitive tests in 72 hours. Yeast AM2 (-2) was k+ for three sensitive strains in 120h. The positive character *killer* was expressed by yeasts at 25 and 37 ° C. These positive *killer* yeasts have good prospects for application in the biocontrol of fumonisin producer *F. verticillioides*.

Key-words: Yeast, Antagonism, Mycotoxins, *Fusarium* sp.

Lista de Figuras

Figura 1: Principais partes do grão de milho a) pericarpo, b) endosperma, c) embrião, d)escutelo, e) coleóptilo, f) plúmula, g) radícula, h) coleorriza, i) camada de abscisão e j) pedúnculo.	12
Figura 2: Previsão de produção safra brasileira de milho em 2011 (milhões de toneladas).	14
Figura 3: a) Grãos ardidos pelo ataque do fungo <i>F. verticillioides</i> ; b) Podridão rosada da espiga (<i>F. verticillioides</i>).....	16
Figura 4: Distribuição e severidade de <i>Fusarium</i> no mundo.	17
Figura 5: <i>F. verticillioides</i> em microscopia eletrônica. a) Monofialides com cadeias de conídios; b-d) conidióforos e microconídios; e-g) microconídios....	18
Figura 6: Estrutura química de fumonisinas e análogos.....	21
Figura 7: Estrutura química da esfinganina, efigosina e fumonisina B1.	22
Figura 8: Modo de ação das fumonisinas (o símbolo X indica bloqueio da reação).....	23
Figura 9: a) célula de uma levedura comum e sua reprodução por brotamento; b) fotomicrografia de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Figura 10: Expressão de toxinas baseada no sistema de replicação do “vírus” de RNA dupla fita em células de leveduras <i>killer</i>	29
Figura 11: Mecanismos genéticos de secreção e de ação de toxinas <i>killer</i> de <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura 12: Antifungigrama com a Levedura AM2(-2) contra <i>F. verticillioides</i> isolado do milho analisado com leitura em 7 e 30 dias.	398
Figura 13: Antifungigrama com a Levedura AM5(-1) contra <i>F. verticillioides</i> isolado do milho analisado com leitura em 7 e 30 dias.	39
Figura 14: Antifungigrama com a Levedura AM12(-6) contra <i>F. verticillioides</i> isolado do milho analisado com leitura em 7 e 30 dias.	39
Figura 15: Comportamento da levedura Is-AM12(-5) frente a <i>F. verticillioides</i> 103F produtor de micotoxina, nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}	42
Figura 16: Formação de zona clara característico de killer positivo. a) Is-AM12(-6) levedura teste sensível CAY 15; b) Pro wickerhamii M5(-1) contra levedura teste sensível K8; c) Pro wickerhamii M5(-1) contra levedura teste sensível CAY 15; d) zona clara formada pela levedura killer positiva teste (A), Pro wickerhamii M5(-1) (B) e <i>Hansenula wingei</i> M2(-2) (C).....	44

Lista de tabelas

Tabela 1: Bases genéticas para a expressão de toxinas <i>killer</i> em leveduras ..	28
Tabela 2: Correlação das bases genéticas, seus receptores e mecanismo de ação de sistemas <i>killer</i> das espécies de leveduras mais estudadas.....	31
Tabela 3: Contagem de bolores e leveduras nas amostras de milho.....	37
Tabela 4: Antifungigrama com <i>Fusarium verticillioides</i> isolado de milho avaliado em 7, 14, 21 e 30 dias.....	40
Tabela 5: Antifungigrama das leveduras selecionadas contra <i>F. verticillioides</i> 103F.....	42
Tabela 6: Teste de caráter <i>killer</i> de leveduras isoladas de milho contra leveduras sensíveis.....	43
Tabela 7: Teste de caráter <i>killer</i> com as leveduras tratadas termicamente.	45
Tabela 8: Enzimas produzida pelas 5 leveduras utilizadas, constatadas com a utilização do teste RapID Yeast Plus (Remel).....	45

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	10
3 REFERENCIALTEÓRICO	11
3.1 MILHO.....	11
3.2 PRODUÇÃO DE GRÃOS NO BRASIL E MUNDO.....	13
3.3 DANOS NA CULTURA DE MILHO	15
3.4 FUSARIUM	18
3.5 MICOTOXINAS	19
3.6 BIOCONTROLE	24
3.6.1 Leveduras.....	25
3.6.2 Leveduras <i>killer</i>	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Avaliação microbiológica.....	33
4.1.1 Amostras de milho	33
4.2 Isolamento de bolores e leveduras	33
4.3 Antifungigrama em meio sólido	34
4.3.1 Bolor teste	34
4.3.2 Antifungigrama.....	34
4.4 Determinação de caráter <i>killer</i> das leveduras isoladas	35
4.5 Cura das leveduras <i>killer</i> por tratamento térmico	36
4.6 Identificação das leveduras	36
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A importância do cultivo de milho refere-se não somente não somente a sua composição química, composta por nutrientes, tais como vitaminas, minerais, proteínas e carboidratos, principalmente o amido em evidência por sua empregabilidade na indústria alimentícia (ABIMILHO, 2006). Outro fator que caracteriza o milho é a geração de renda, devido à extensa área cultivada, no mundo todo.

O processo de cultivo do milho iniciou-se na América Central e foi difundido por povos pré-colombianos. Relíquias arqueológicas indicam que o milho já era conhecido na costa do Peru por volta de 900 a.C. e que, possivelmente, a cultura atingiu a costa do Pacífico, atravessando a América do Sul de Leste a Oeste e transpondo a Cordilheira dos Andes (TEIXEIRA, 2008). No Brasil, o cultivo do milho vem desde antes da chegada dos europeus. Os índios, principalmente os guaranis, tinham o cereal como o principal ingrediente de sua dieta. Com a chegada dos portugueses, o consumo aumentou e novos produtos à base de milho foram incorporados aos hábitos alimentares dos brasileiros (TEIXEIRA, 2008).

Hoje o milho é cultivado em diversas regiões do mundo. O Brasil destaca-se entre os maiores produtores e exportadores de milho, sendo Mato Grosso do Sul e Paraná os estados líderes na sua produção (ABIMILHO, 2006). O plantio de milho é feito tanto na chamada “safrinha” quanto na safra principal, ou seja, a safra de verão. No entanto, devido a alguns fatores relacionados principalmente com a temperatura e umidade na época de colheita, o milho é comumente contaminado por fungos, tanto na pré-colheita, como na pós-colheita, acarretando em perdas e contaminações (DEMARCHI, 2010).

Entre os fungos de maior importância encontra-se o gênero *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. verticillioides* e *F. oxysporum*). Esses fungos são responsáveis por podridões tanto no colmo como nos grãos. Com relação à *Fusarium verticillioides*, contaminante mais comum desse tipo de cultura, ligado principalmente a podridão na espiga de milho, tem-se, além disso, a preocupação com a produção de micotoxinas.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos pelo fungo e liberados do seu metabolismo, e mesmo o fungo sendo eliminado a micotoxina continua no alimento. Os principais efeitos desses metabólitos tóxicos são em longo prazo, acumulados no organismo, tanto de humanos como de animais.

Até onde se sabe o processamento dos alimentos contaminados não elimina totalmente as toxinas presentes, e os mecanismos físicos ou químicos que possam ser empregados com eficiência, ou apresentam alto custo, ou degradam muito o meio ambiente, como é o caso da utilização de agrotóxicos para eliminar o fungo ainda na planta. Dessa maneira faz-se necessário eliminar a origem da produção e o biocontrole torna-se uma medida de menor custo, viável e menos agressiva ao ecossistema, pois trabalha com o princípio do antagonismo de micro-organismos.

O antagonismo entre fungos leveduriformes e fungos filamentosos, tanto pela competição por nutrientes, quanto pela produção de substância representa uma forma de biocontrole. A utilização de micro-organismos da microbiota natural sugere que os mesmos já estejam adaptados as condições ambientais propostas, facilitando a empregabilidade em grande escala ou em campo.

A utilização de leveduras remete a sua pouca ou nenhuma toxigenicidade, fácil desenvolvimento, requerendo para crescimento temperaturas próximas ao ambiente e pouca exigência nutricional. Além disso, algumas leveduras possuem a capacidade de produzir peptídeos tóxicos a outras células, conhecida como caráter *killer*, que demonstram capacidade de matar outros micro-organismos, agindo como micocida.

Em consideração a estes problemas emergentes na micotoxicologia atual que podem reduzir a qualidade dos alimentos a serem consumidos in natura ou utilizados no processamento, este trabalho propôs analisar os tipos de antibiose existente entre leveduras e *Fusarium verticillioides* produtor de micotoxinas, a fim de direcionar o controle de fungos micotoxigênicos através da microbiota natural do milho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de leveduras controlarem o crescimento de *Fusarium verticillioides* com cepas micotoxigênicas e não micotoxigênicas, contaminante comum de amostras de milho.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Isolar leveduras do milho
- Analisar os tipos de antibiose das leveduras isoladas com *Fusarium verticillioides*
- Selecionar leveduras promissoras
- Analisar os diferentes graus de inibição ocorridos pela interação (antifungigrama).
- Determinar a capacidade de produção de substâncias extracelulares (toxina *killer*) de leveduras isoladas do milho para a aplicação contra *F. verticillioides*
- Identificar as leveduras selecionadas com kit comercial

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MILHO

Consumido pelos povos americanos desde o ano cinco mil a.C., o milho foi à alimentação básica de várias civilizações importantes ao longo dos séculos. Os Maias, Astecas e Incas reverenciavam o cereal na arte e religião e grande parte de suas atividades diárias eram ligadas ao seu cultivo. Com a descoberta da América e as grandes navegações do século XVI, a cultura do milho se expandiu para outras partes do mundo. Hoje é cultivado e consumido em todos os continentes e sua produção só perde para a do trigo e do arroz. No Brasil, o cultivo do milho vem desde antes do descobrimento (CANÇADO, 2004)

O milho é uma planta que pertence à família *Gramineae / Poaceae*. O caráter monóico e a sua morfologia característica resultam da supressão, condensação e multiplicação de várias partes da anatomia básica das gramíneas (MAGALHÃES et al. 2002). A semente do milho é composta pelo pericarpo (a camada de fibra envolvendo a semente), pelo gérmen (rico em proteína e óleo) e pelo endosperma. O endosperma representa de 75 a 80% da semente e é constituído principalmente de amido e proteínas. Dentre as proteínas do endosperma temos albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas (PEREIRA, 2011).

O pericarpo (camada externa) é derivado da parede do ovário e pode ser incolor, vermelho, marrom ou variegado. A ponta do grão é a parte remanescente do tecido (pedicelo), que conecta o grão ao sabugo. Dentro do grão estão o endosperma e o embrião (MAGALHÃES et al., 2002). A concentração de açúcares atinge o máximo nesses tecidos um pouco antes do final da formação das células. O acúmulo de amido inicia-se à custa desses açúcares. A proteína do endosperma aumenta durante o período de formação das células (MAGALHÃES et al., 2002).

Na Figura 1, encontram-se listadas as principais partes do grão.

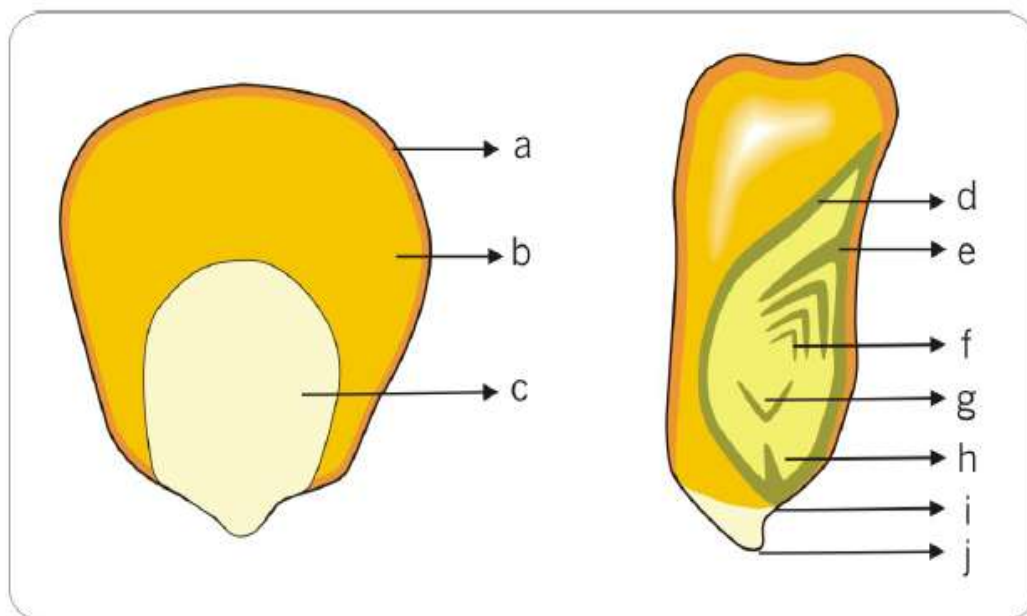


Figura 1: Principais partes do grão de milho a) pericarpo, b) endosperma, c) embrião, d)escutelo, e) coleóptilo, f) plúmula, g) radícula, h) coleorriza, i) camada de abscisão e j) pedúnculo. Fonte: Pedrochi (2004)

Muito energético, o milho traz em sua composição vitaminas A e do complexo B, proteínas, gorduras, carboidratos, cálcio, ferro, fósforo e amido, além de ser rico em fibras. Cada 100 gramas do alimento têm cerca de 360 Kcal, sendo 70% de glicídios, 10% de protídeos e 4,5% de lipídios (AGROSUL, 2008).

O milho puro ou como ingredientes de outros produtos, é uma importante fonte de energética para o homem. Ao contrário do trigo e o arroz, que são refinados durante seus processos de industrialização, o milho conserva sua casca, que é rica em fibras, fundamental para a eliminação das toxinas do organismo humano (ABIMILHO, 2008).

Além das qualidades nutricionais do milho, o grão se destaca pela sua versatilidade para o aproveitamento na alimentação humana. Ele pode ser consumido diretamente ou como componente para a fabricação de balas, biscoitos, pães, chocolates, geléias, sorvetes, maionese e até cerveja (ABIMILHO, 2006).

3.2 PRODUÇÃO DE GRÃOS NO BRASIL E MUNDO

O Brasil tem na agricultura uma das bases mais potentes de economia, garantindo fornecimento contínuo de insumos baseados em cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e respectivos produtos derivados oriundos de processamento (AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2003). Entre os produtos agrícolas de maior destaque está milho amplamente aplicado na alimentação humana e animal.

O milho (*Zea mays*) é o cereal mais cultivado do mundo. Entre os anos de 2005 a 2010 a produção mundial média foi de 778,8 milhões de toneladas. A evolução da produção mundial de milho vem sendo expressiva nas últimas décadas, passando de 452,8 milhões de toneladas obtidas no final da década de 80, para 819,6 milhões de toneladas estimadas na safra 2010/11, o que corresponde a um aumento de 81% no período (DEMARCHI, 2010).

Os Estados Unidos respondem por quase 50% da produção mundial, como é demonstrado no Gráfico 1. Outros grandes produtores são a China, a Índia, o Brasil, a França, a Indonésia e a África do Sul.

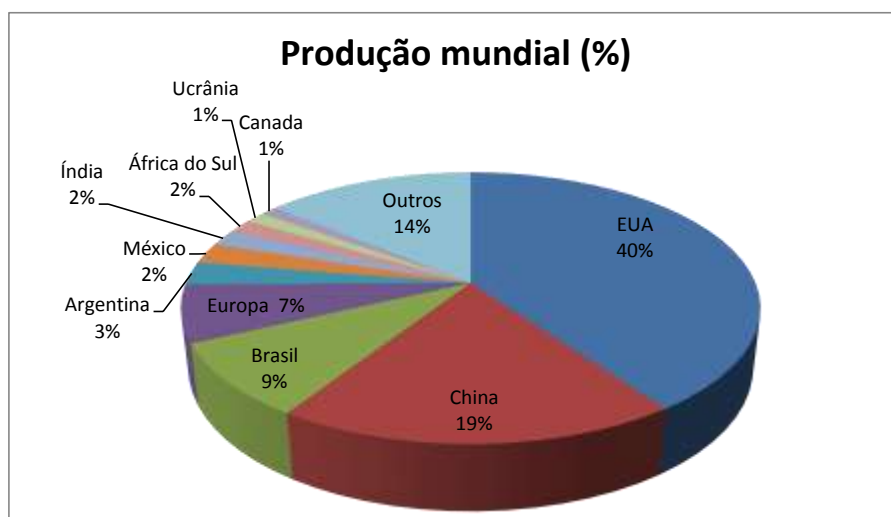


Gráfico 1: Produção mundial de milho em porcentagem (%) segundo USDA em novembro de 2010.

No parâmetro mundial o Brasil encontra-se na 3ª posição entre os maiores produtores de milho, com uma participação de 9% do comércio internacional, exportando, em média, 8,1 milhões de toneladas por ano. Segundo Demarchi (2010) nas últimas safras, a produção brasileira total de milho ficou, em média, em 54 milhões de toneladas ao ano. O Paraná é líder na produção brasileira de milho, participando, em média, com 25% da produção total.

O rendimento do milho pode ser influenciado por fatores como a disponibilidade hídrica, fertilidade do solo, população de plantas, sistema de cultivo, potencial produtivo do híbrido e manejo de plantas daninhas, pragas e doenças (SANDINI e FRANCIELLI, 2000). Ao longo dos últimos anos tem se observado um avanço das doenças nesta cultura, como consequência do estreitamento das relações patógeno-hospedeiro-ambiente (COSTA, 2001).

O milho tem evoluído como cultura comercial apresentando, nos últimos 28 anos, taxas de crescimento da produção de 3,0% ao ano e da área cultivada de 0,4% ao ano. A produção prevista, conforme a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2011), provém da soma de 32,8 milhões de toneladas da safra principal (que, na previsão atual, apresenta redução de 3,6% em relação à safra de 2010) e de 21,7 milhões de toneladas da safrinha que, assim, apresentaria redução anual de 1,1%.

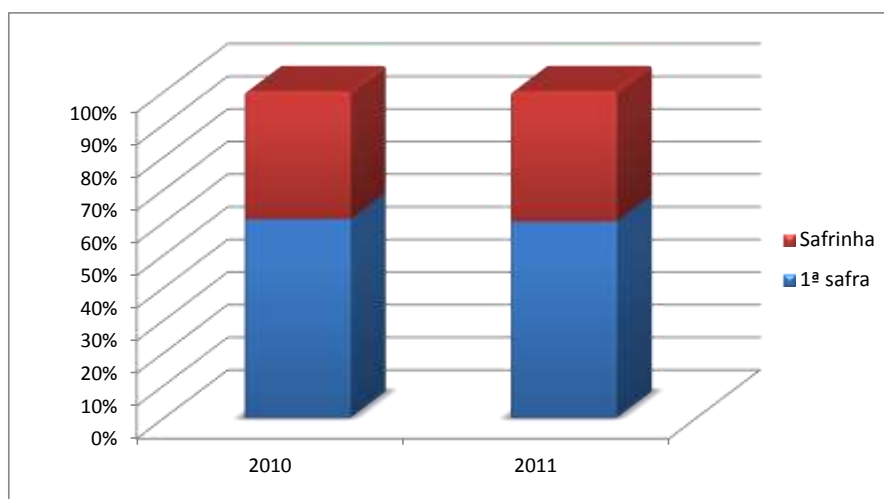


Figura 2: Previsão de produção safrinha brasileira de milho em 2011 (milhões de toneladas). Fonte: CONAB (2011).

3.3 DANOS NA CULTURA DE MILHO

Os grãos de milho podem ser afetados por fungos em duas etapas específicas: na pré-colheita (podridões fúngicas de espigas com a formação de grãos ardidos) e na pós-colheita durante o beneficiamento, o armazenamento e o transporte (grãos mofados ou embolorados) (PINTO, 2005). As podridões destacam-se, no mundo, entre as mais importantes doenças que atacam a cultura do milho por causarem redução de produção e de qualidade de grãos (COSTA et al., 2005; VIANA, 2009)

Os grãos ardidos em milho são o reflexo das podridões de espigas, causadas principalmente pelos fungos presentes no campo (PINTO, 2005; JULLIATTI et al., 2006; JULLIATTI et al., 2007). Esses fungos podem ser divididos em dois grupos: os que apenas produzem grãos ardidos e, os que, além da produção de grãos ardidos, são exímios produtores de toxinas, denominadas micotoxinas (PINTO, 2005). Os principais danos físicos causados pelo ataque fúngico são: descolorações dos grãos, reduções nos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de açúcares totais (COSTA et al., 2005).

Entre os fungos de maior destaque encontram-se o gênero *Fusarium*, não só por causar patologias em plantas, mas também por algumas espécies produzem toxinas como fumonisinas, tricotecenos, zearalenona, moliformina e ácido fusárico. É importante ressaltar que a presença do fungo toxigênico não implica necessariamente na produção de micotoxinas, as quais estão intimamente relacionadas à capacidade de biossíntese do fungo e das condições ambientais predisponentes, como, em alguns casos, a alternância das temperaturas diurna e noturna (PINTO, 2005).

O gênero *Fusarium* apresenta uma expressiva importância na agricultura por ser patógeno para várias culturas de interesse econômico, tais como milho, trigo, soja e até feijão, causando doenças conhecidas por podridão das raízes, murcha ou fusariose (TINOCO, 2010). Esse gênero fúngico pode ser encontrado no solo, nas mais diversas regiões do mundo, especialmente em locais de climas tropicais e subtropicais, sendo capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos, podendo colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus

conídeos que são disseminados pelo ar ou pela água (PINTO, 2005; TINOCO, 2010).

Conforme Pinto (2001), as principais podridões de espigas ocorrentes no Brasil são a podridão branca da espiga causada pelos fungos *Diplodia maydis* (*Stenocarpela maydis*) e *Diplodia macrospora* (*Stenocarpela macrospora*), as espigas infectadas apresentam os grãos de cor marrom, de baixo peso e com crescimento micelial branco entre as fileiras de grãos, podridão rosada da espiga é causada por *Fusarium verticillioides* e/ou por *Fusarium subglutinans* e a podridão rosada da ponta da espiga conhecida também pelo nome de podridão de giberela (*Gibberella zae*), sendo mais comum em regiões de clima ameno e de alta umidade relativa. Na Figura 3 são demonstrados os efeitos da contaminação por *Fusarium verticillioides*, causando grãos ardidos e podridão rosa.

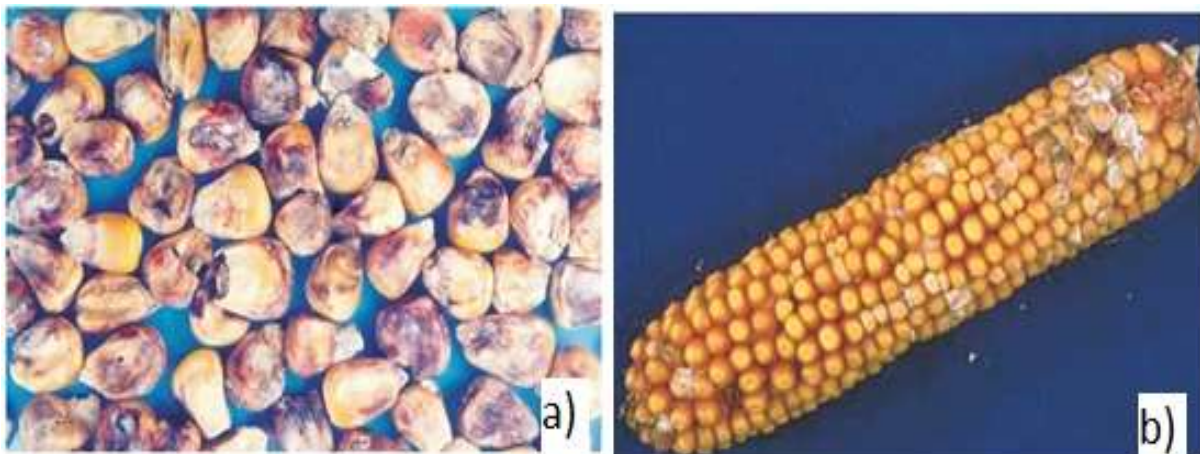


Figura 3: a) Grãos ardidos pelo ataque do fungo *F. verticillioides*; b) Podridão rosada da espiga (*F. verticillioides*). Fonte: Pinto (2005).

A alta precipitação pluvial na época da maturação dos grãos favorece o aparecimento da podridão rosa. A evolução da podridão praticamente cessa quando o teor de umidade dos grãos atinge 21 a 22%, em base úmida (PINTO 2001; PINTO, 2005).

A podridão causada por algumas espécies pode iniciar-se na base e progredir para a ponta da espiga, confundindo o sintoma com aquele causado por *F. verticillioides*. Chuvas frequentes no final do desenvolvimento da cultura, principalmente em lavoura com cultivar com espigas que não dobram,

aumentam a incidência desta podridão de espiga. Este fungo sobrevive nas sementes na forma de micélio dormente (JULIATTI, 2007).

O gênero *Fusarium* tem uma faixa de temperatura ótima para o seu desenvolvimento situada entre 20 a 25 °C. Contudo, suas toxinas são produzidas a temperaturas baixas, isto significa que o *Fusarium* produz as micotoxinas sob o efeito de choque térmico, principalmente com alternância das temperaturas, principalmente a diurna e a noturna. Para a produção de zearalenona a temperatura ótima é em torno de 10 a 12 °C (JAY, 2005, JULLIATTI, 2007).

A contaminação por *F. verticillioides* (= *moniliforme*) abrange vastas áreas no mundo, especialmente em regiões úmidas. Nessas áreas, a doença afeta 50-60% das sementes de milho. No hemisfério norte, a doença é mais prejudicial no Cáucaso do Norte, em regiões centrais da parte europeia da Rússia, na Sibéria, Altai, no Extremo Oriente, Ucrânia, Geórgia e Bielorrússia (LEVITTIN, 2005), como é demonstrado na Figura 4, que enfatiza as áreas de mais severidade do ataque fúngico.

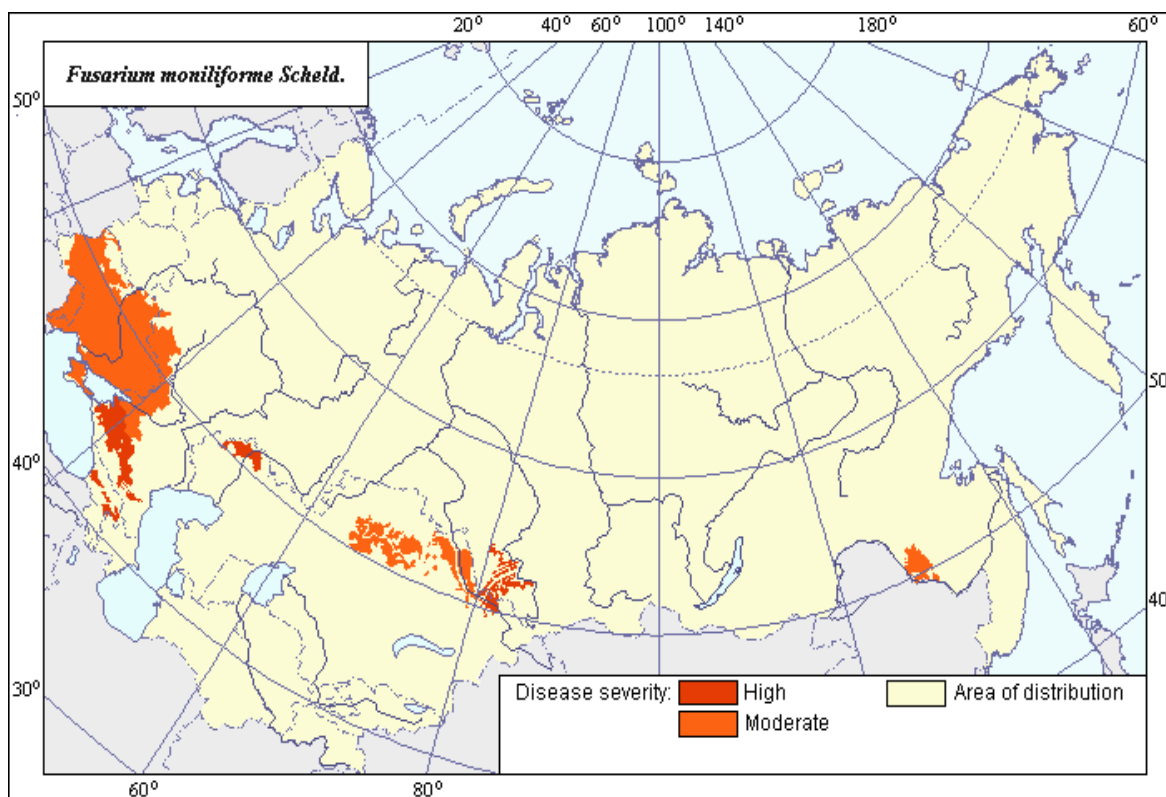


Figura 4: Distribuição e severidade de *Fusarium* no mundo. Fonte: Levittin (2005).

3.4 FUSARIUM

O gênero *Fusarium* sp. é classificado como um fungo imperfeito, caracterizado por um micélio hialino, ramificado e tabicado, com esporóforos em forma de fiálides e conídios de forma e tamanho variável (Figura 5). Apresenta macroconídeos fusiformes, com vários septos (LEAL et al. 2005).

Produzem um micélio com aspecto aveludado com matrizes rosadas, vermelhas, violetas ou marrons. Os conídeos possuem forma fusiforme. *Fusarium* sp classifica-se entre os fungos de campo, exigindo elevada umidade para o desenvolvimento, invade a semente e produz toxina no período de pré-colheita. Incapaz de competir com fungos de estocagem devido ao crescimento lento tende a desaparecer relativamente rápido durante a armazenagem, ficando apenas a toxina produzida durante o seu desenvolvimento.

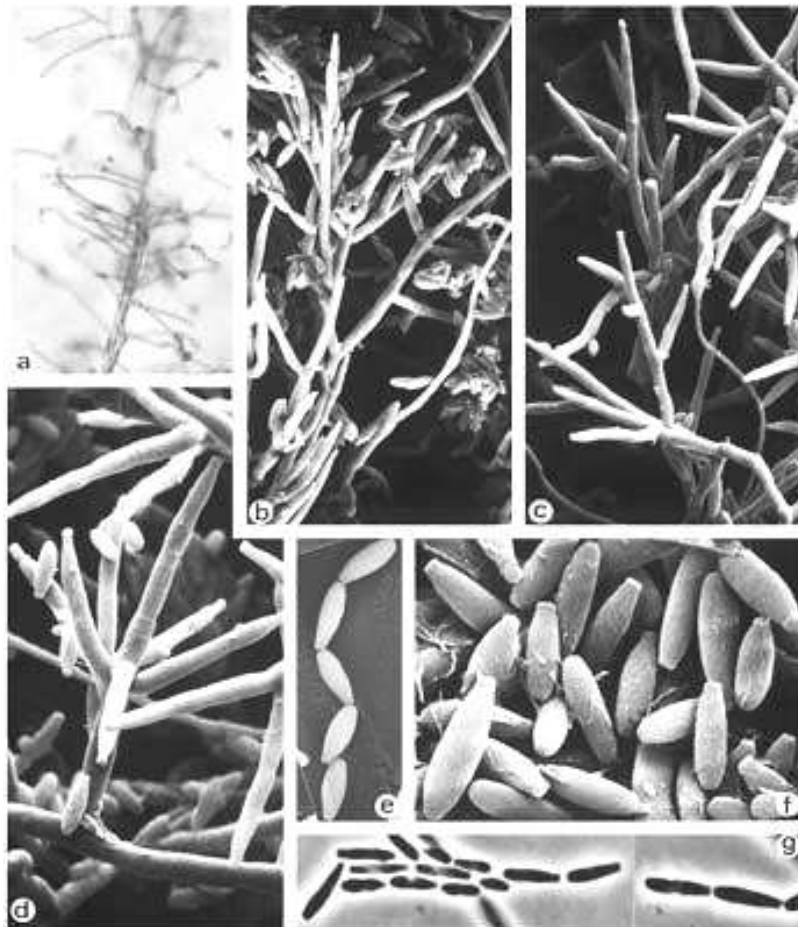


Figura 5: *F. verticillioides* em microscopia eletrônica. a) Monofialides com cadeias de conídios; b-d) conidióforos e microconídios; e-g) microconídios. Fonte: Hoog (2000).

3.5 MICOTOXINAS

Há muitos séculos se conhece a toxicidade de certos fungos. Entretanto, somente na década de 1850, ao relacionar-se a ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* com as características clínicas do ergotismo, foi levantada a possibilidade de haver risco à saúde humana e animal pela ingestão de metabólitos tóxicos produzidos por fungos (SANTURIO, 2000).

Jay (2005) define micotoxinas como sendo metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos. Os metabólitos primários são essenciais para o desenvolvimento e crescimento e os secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância aparente. Em geral os metabólitos secundários parecem ser formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros são acumulados (FREIRE et al., 2007).

A síntese de micotoxina representa uma maneira de os fungos reduzirem a quantidade de precursores, os quais não são requeridos para o metabolismo (JAY, 2005). As micotoxinas apresentam estruturas que variam de simples anéis heterocíclicos com massa molecular de até 50 Da, a grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos irregularmente dispostos e com massa molecular total >500 Da e que não apresentam imunogenicidade (FREIRE et al., 2007).

Um mesmo fungo pode produzir simultaneamente diferentes tipos de micotoxinas, portanto a dieta diária pode estar contaminada com várias micotoxinas (OGA et al., 2008). A presença de micotoxinas em grãos, cujo tipo ou estrutura química depende do desenvolvimento de linhagens fúngicas específicas, ocorre na presença de esporos dos fungos e está sujeita à influência de fatores ambientais como umidade do substrato e temperatura ambiente (SANTURIO, 2000). Além disso, a contaminação por micotoxinas podem variar de acordo com as práticas de cultivo, métodos de processamento ou produção, transporte e armazenamento. Depende, também, do tipo de alimento, já que alguns grãos são substratos mais susceptíveis que outros para o crescimento de determinados fungos. Ressalta-se, ainda, o fato das micotoxinas apresentarem, de modo geral, grande estabilidade química, o que

permite a sua persistência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem.

A maioria das micotoxinas não são afetadas pelo beneficiamento. Alguns processos de descontaminação com produtos químicos são capazes de controlar o desenvolvimento de fungos e reduzir a concentração de micotoxinas, mas possuem alto custo e não são eficientes para aplicação em larga escala (FOOD and INGREDIENTS BRASIL, 2009).

A intoxicação por micotoxinas é chamado de micotoxicose. Os órgãos mais afetados são o fígado, os rins, o cérebro, os músculos e o sistema nervoso. Cançado (2004) descreve como sendo sintomas de micotoxicose desde náuseas e vômitos até a falta de coordenação dos movimentos (ou ataxia) e morte. Freire et al. (2007) citam que os piores efeitos das micotoxinas no homem tendem a ser crônicos, de difícil associação com o consumo de alimentos contaminados. São reconhecidos os efeitos deletérios desses compostos sobre a saúde humana e animal, sendo capazes de induzirem efeitos carcinogênicos e mutagênicos.

Nas culturas de milho os principais contaminantes fúngicos são espécies do gênero *Fusarium*. As toxinas de *Fusarium* sp. suscitam um amplo espectro de efeitos tóxicos, incluindo a capacidade de modificar o sistema imunológico em humanos e animais.

F. graminearum, *F. tricinctum* e *F. verticillioides* podem produzir três tipos de micotoxinas mais comuns: os tricotecenos, fumonisinas e a zearalenona. Sendo a zearalenona produzida por *F. graminearum* associada a grãos como trigo, aveia e cevada. As fumonisinas, associadas a *F. verticillioides* apresentam maior risco a saúde humana.

As fumonisinas são moléculas estruturalmente relacionadas e, até o momento, 16 análogos foram isolados e caracterizados: fumonisina B1 (FB1), FB2, FB3, FB4, A1, A2, A3, AK1, C1, C3, C4, P1, P2, P3, PH1a, PH1b. A FB1 é a mais predominante, encontrada no milho contaminado naturalmente, e constitui normalmente cerca de 70% da quantidade total de fumonisinas presentes (LINO, SILVA e PENA, 2004; LEAL et al., 2005). A primeira descrição sobre a ocorrência natural de fumonisinas B1 foi realizada por Sydenham et al. (1990) a partir de milho mofado colhido em uma área em Transkei, Sul da África, que apresentava alta incidência de câncer de esôfago

em humanos (TINOCO, 2010). Na Figura 6 pode-se observar os grupos funcionais que diferenciam fumonisinas B1, B2 e B3.

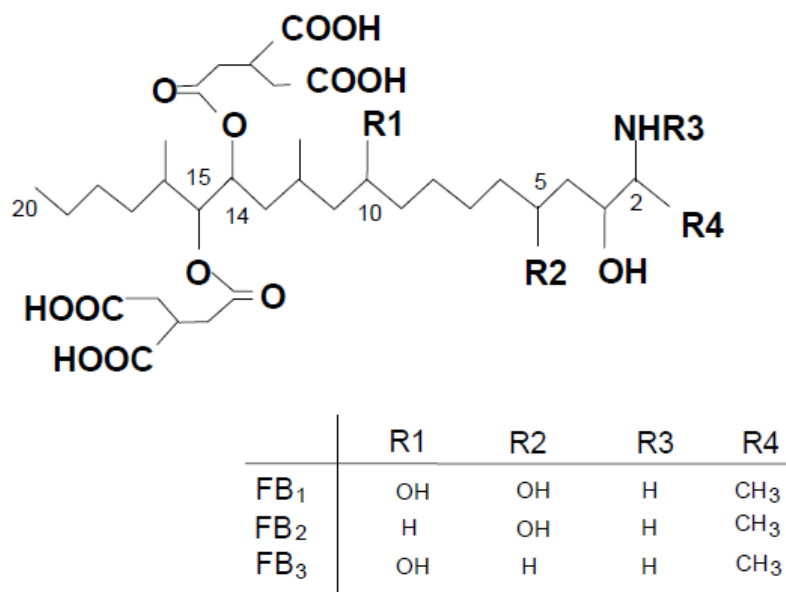


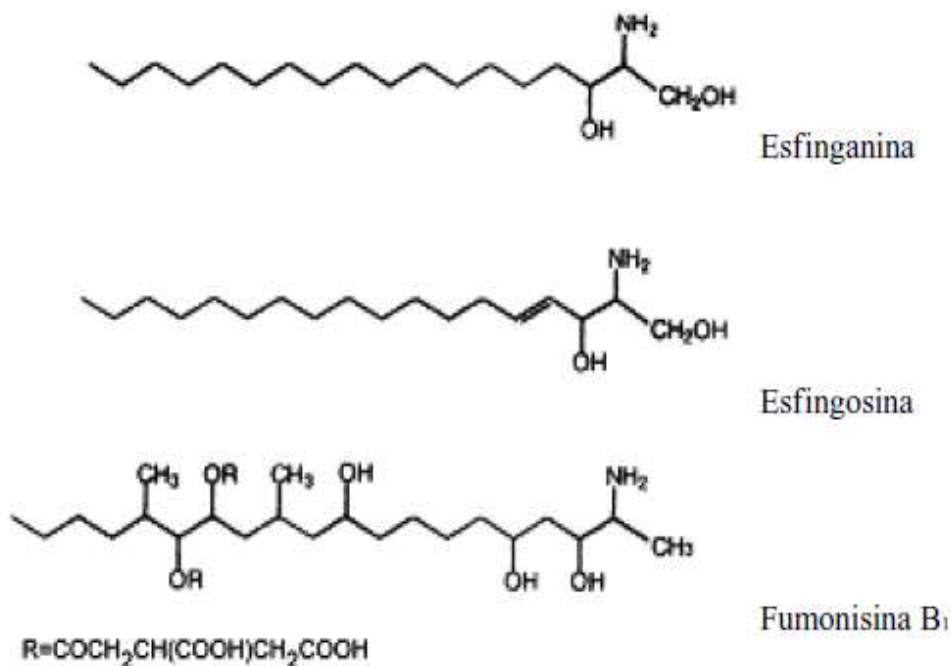
Figura 6: Estrutura química de fumonisinas e análogos. Fonte: Minami et al. (2004).

A biossíntese da fumonisina pode ocorrer em ambientes com temperaturas entre 20 e 30° C e em substratos com atividade de água de 0,85 a 1,0 (CANÇADO, 2004). O interesse sobre as fumonisinas tem aumentado a nível mundial. As manifestações clínicas que decorrem das toxicoses provocadas pelas fumonisinas, bem como os órgãos atingidos variam entre as espécies animais (LINO, SILVA e PENA, 2004).

A fumonisina é o fator etiológico de diversas micotoxicoses em animais domésticos e de laboratório e tem sido correlacionada com a incidência de câncer esofágico em humanos (SUN et al., 2007). Os efeitos da ingestão de fumonisina B1 no sistema imunológico permanecem controversos, alguns trabalhos apontam para a causa de imunossupressão em aves, suínos e bovinos. Outros autores apontam, que a fumonisina B1 é a causa de leucoencefalomalácia equína (LI e LEDOX et al., 2000).

Todos os problemas causados estão relacionados com a inibição da biossíntese de esfingolípido, sendo os órgãos mais afetados o fígado e o rim devido a semelhança das moléculas de fumonisinas com os esfingolípido

(RILEY et al., 1993) (Figura 7). Lesões mais avançadas em ambos os órgãos dos ratos são caracterizadas por morte celular simultânea (apoptose) e proliferação celular (VOSS et al., 2001).



**Figura 7: Estrutura química da esfinganina, esfingosina e fumonisina B₁.
Fonte: Lino, Silva e Pena (2004).**

Os esfingolípídeos mais simples são as bases esfingóides. Nas células dos mamíferos as bases esfingóides mais comuns são a esfingosina e a esfinganina (MINAMI et al., 2004) (Figura 7). As fumonisinas são potentes inibidores competitivos da esfinganina N-aciltransferase e da esfingosina N-aciltransferase (ceramida sintetase) uma vez que, estruturalmente, são análogas de bases esfingnóides (LINO, SILVA e PENA, 2004; SILVA, 2008) (Figura 8). As enzimas anteriormente referidas são elementos chave para a via metabólica da biossíntese *de novo* dos esfingolípídeos e turnover dos mesmos. Deste modo, as fumonisinas podem alterar a concentração e a proporção entre a esfinganina e a esfingosina, diminuindo a biossíntese de esfingosina e acumulando esfinganina (DESAI et al., 2002, CARRATÙ et al., 2003) (Figura 8).

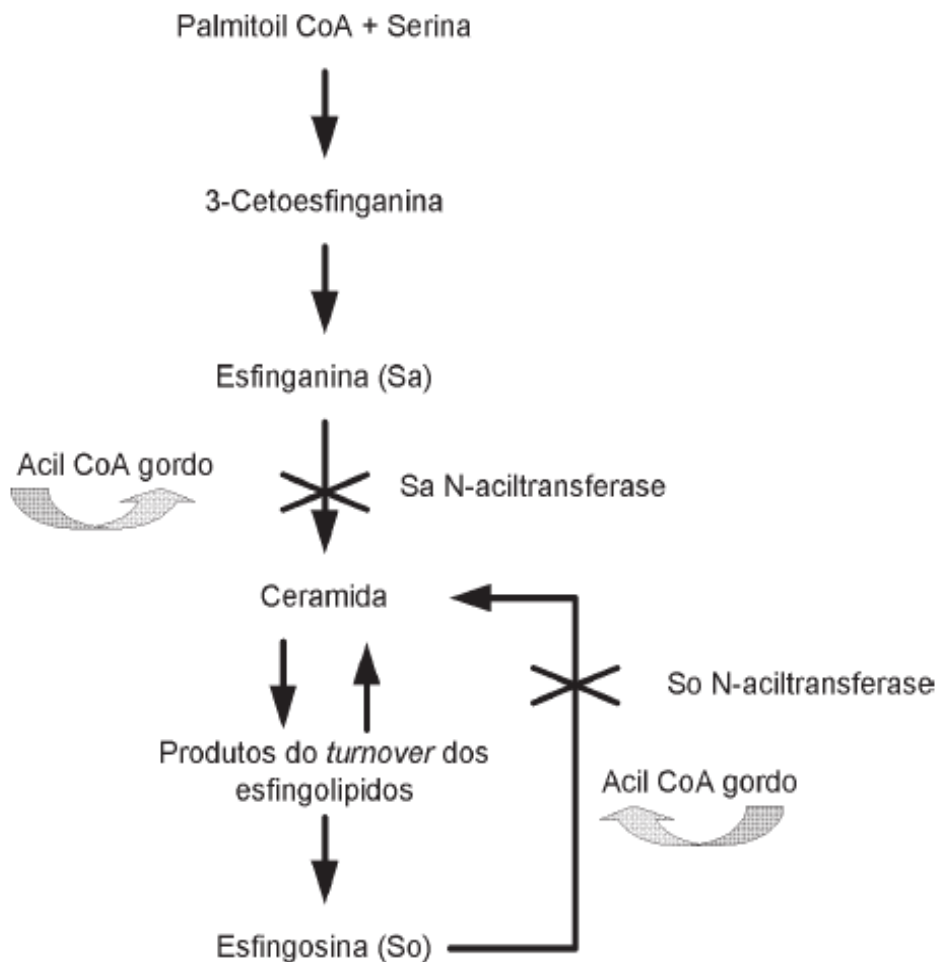


Figura 8: Modo de ação das fumonisinas (o símbolo X indica bloqueio da reação). Fonte: Silva (2008).

Baseados nos aspectos gerais da função dos esfingolipídeos dentro de uma célula, a redução dos esfingolipídeos complexos (ligados ao um cerídeo) e o acúmulo de intermediários são responsáveis pela toxicidade e também pelo prejuízo de outras funções celulares essenciais (FINK-GREMMELS, 1999).

As fumonisinas são de difícil eliminação. Podem ser utilizados métodos físicos ou químicos, além de estudos de controle biológico. Nos alimentos processados à base de milho, os níveis de fumonisinas dependem dos processos de moagem e de manufatura a que o milho bruto é submetido (LINO, SILVA e PENA, 2004).

3.6 BIOCONTROLE

A globalização exige qualidade com segurança e competitividade na cadeia produtiva desde o campo. Entretanto, a falta de controle resulta em perda e contaminação considerável, afetando a segurança do produto final. Neste contexto, *Fusarium* sp é um dos principais representantes fúngicos responsáveis pela deterioração e produção de micotoxinas, possuindo a capacidade de germinar, crescer e produzir toxinas em grande variedade de produtos agrícolas (FOOD and INGREDIENTS BRASIL, 2009). Aliado ao fato o setor agroindustrial, sem planejamento sustentável, tem como consequências os danos ao ecossistema.

O sistema permanente de controle de contaminantes requer eficiência associada a baixo custo. O biocontrole destaca-se dentre os métodos alternativos e econômicos, por ser menos agressivos ao meio ambiente, reduzindo efetivamente a concentração de toxinas ou concentração celular. O desenvolvimento de biocontrole de micro-organismos toxigênicos, principalmente fungos em culturas de milho, visa oferecer subsídios às melhorias ambientais necessárias no meio rural, gerando qualidade de vida e segurança alimentar na cadeia produtiva.

O desenvolvimento de micro-organismos como controle biológico envolve o isolamento a partir de amostras ambientais, caracterização da atividade antagônica, experimentos de campo em micro e macro-escala e o estudo final para aplicação do controle biológico na estratégia de manejo no ambiente (IMAMURA et al., 2000). Kawashima e Valente (2006) colocam como sendo um dos pontos centrais para a efetividade do biocontrole contra fungos o antagonismo, pois as chances de sucesso nos programas de controle biológico estão no isolamento e na seleção de micro-organismos que apresentem essa característica de forma eficiente.

Os métodos de controle biológicos constituem alternativas viáveis em relação aos químicos tradicionais aplicados ainda no campo para combater a infestação fúngica, principalmente por não deixarem resíduos químicos no alimento. Na tentativa de obter novos produtos de origem biológica, numerosos micro-organismos com atividade antimicrobiana vêm sendo identificados e testados, cujos mecanismos de ação, geralmente complexos, envolvem

antibiose, competição, parasitismo (JANISIEWICZ, 2000) e produção de substâncias extracelulares (caráter *killer*) (COELHO, 2005).

Em vista da situação, abre-se a perspectiva para o uso biocontrole empregando leveduras devido a baixa possibilidade toxigênica, não tendo sido relatado até o momento nenhum caso de leveduras que produzam micotoxinas (FAZIO, 2009). Algumas leveduras possuem capacidade de produzir compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de outras leveduras e em alguns casos de micro-organismos eucariontes e procariontes, entretanto são imunes à própria toxina (SENTE, 2010). Fungos filamentosos micotoxigênicos podem ser atingidos por substâncias produzidas por leveduras.

Os métodos físicos e químicos possuem grandes desvantagens, devido a eficácia limitada, provocam perda de nutrientes e apresentam alto custo. A detoxificação por biodegradação é destacada por muitos autores como uma alternativa futura (LINO, SILVA e PENA, 2004).

A pesquisa da detoxificação de micotoxinas por processos biológicos iniciou-se na década de 60, em pesquisas com bactérias, seguida, nos anos 80 pelos processos fermentativos, com o uso de leveduras. Nos últimos tempos têm sido também referenciados o recurso a compostos presentes em extratos de plantas ou a modificações genéticas (SORIANO e DRAGACCI, 2004). Assim surge a alternativa do uso de leveduras nesses processos de redução de toxinas ou do fungo produtor.

3.6.1 Leveduras

Leveduras são micro-organismos predominantemente unicelulares, amplamente distribuídos na natureza e pertencentes ao reino *Fungi*. São caracteristicamente esféricas ou ovais. Apresenta parede celular, nutrição heterotrófica através da absorção de nutrientes, reprodução assexuada por brotamento ou fissão e ausência de motilidade e filamentos (PELCZAR, 1997).

Estes micro-organismos de crescimento aeróbico ou anaeróbico facultativo podem utilizar o oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons, os que as torna capazes de sobreviver em diferentes

condições ambientais. Na ausência de oxigênio, fermentam hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono, sendo muito úteis em processos industriais na área de alimentos (AIDOO et al., 2006)

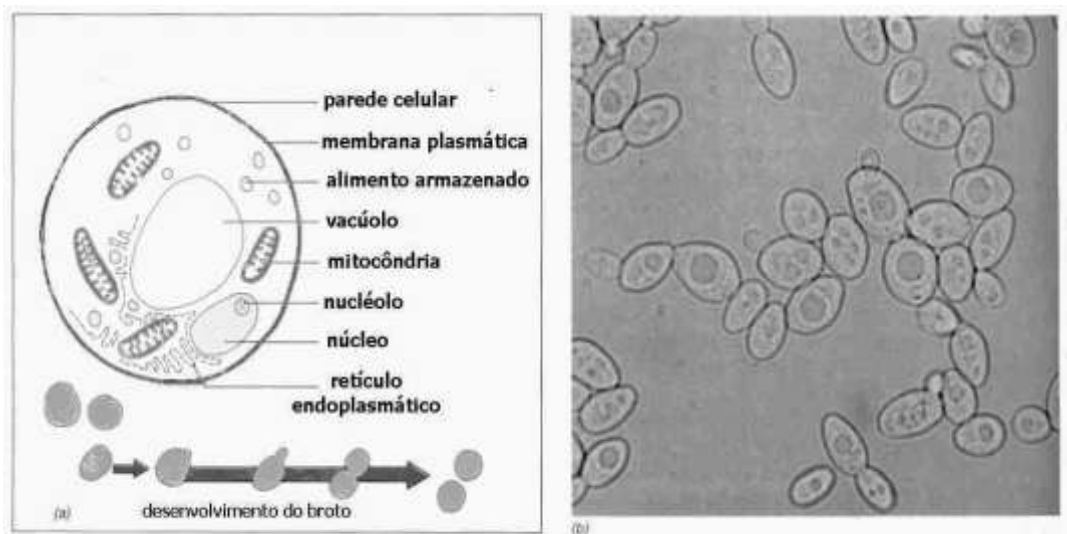


Figura 9: a) célula de uma levedura comum e sua reprodução por brotamento; b) fotomicrografia de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: Davis (1990)

3.6.2 Leveduras *killer*

O caráter *killer*, como é conhecido, é uma forma de competição biológica de leveduras, semelhante a produção de bacteriocinas em bactérias. Existem duas classes de compostos antimicrobianos extracelulares em leveduras: glicoproteínas e glicolípídeos. As glicoproteínas, ou toxinas *killer*, podem ter efeito fungicida ou fungistático (SENTE, 2010).

A atividade *killer*, de acordo com Somers e Bevan (1969), corresponde a produção de proteínas de baixa massa molecular que são letais às leveduras e outras células sensíveis. Suas toxinas *killer* possuem massa molar que varia de 18 a 300 kDa, dependendo da espécie de levedura (SOARES e SATO, 2000).

A capacidade de produção de toxina *killer* pode representar uma vantagem seletiva entre espécies competidoras em um mesmo habitat (SATO et al., 1993). Esta característica foi descrita pela primeira vez em linhagens de

Saccharomyces cerevisiae. Certas cepas de *S. cerevisiae* foram classificadas em três fenótipos: *killer*, sensível e neutra. Observou-se que quando células *killer* e sensíveis cresciam em um mesmo meio de cultura, uma grande proporção das células sensíveis era destruída. As células neutras não matavam células sensíveis, nem eram mortas por células *killers* (BRITES, 2003). Contudo, as toxinas produzidas pelas leveduras *killer* são sensíveis ao calor e a protease, sendo dependentes das condições do pH e oxigênio (WOODS; BEVAN, 1968; VAZ et al., 2002).

A toxina *killer* é constituída de uma macromolécula composta por 90% de um carboidrato (D-manose) e por 10% de proteína, o efeito tóxico é atribuído totalmente a fração protéica. A toxina *killer* é dotada de pouca estabilidade: essa pode ser facilmente inativada pela enzima proteolítica. As características *killer* não são efetivas em cultivos puros, porque uma levedura *killer* somente produzirá a morte de outras quando estiver em contato com cepas de leveduras que se mostrem sensíveis (KLEIN, 2006).

O fenômeno *killer* é amplamente difundido entre muitos gêneros de leveduras, como *Sacchamomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Williopsis*, *Zygosacchoromyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Rhodothorula*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Ustilago* e *Zigowillopsis* (CHEN et al., 2000; FAZIO, 2009). A ação dessas toxinas pode estar baseada em diferentes mecanismos como hidrólise, inibição de síntese da β 1-3 glucana, principal componente da parede celular, ou causando a saída de íons pelo rompimento da membrana plasmática (KAGAN, 1983).

Em relação aos caracteres genéticos de codificação e expressão das toxinas *killer*, são apresentadas variações de acordo com a biologia e fisiologia dos distintos gêneros e espécies de leveduras (Tabela 1). De um modo geral, são expressas através do envolvimento de duas bases genéticas: exclusivamente por genes cromossomais ou através da combinação destes com elementos genéticos extra-cromossomais. Estes últimos representam a base citoplasmática, que é constituída por RNA de fita dupla encapsulado (dsRNA) conhecido como VLPs (vírus-like particles) ou vírus de RNA e os plasmídeos de DNA de fita dupla linear. Esta codificação das toxinas, baseada

em elementos extra-cromossomais, é o sistema mais encontrado em leveduras *killer* até então estudadas (GOLUBEV, 2006)

Tabela 1: Bases genéticas para a expressão de toxinas *killer* em leveduras. Fonte: Oliveira (2009).

Levedura <i>killer</i>	Bases genéticas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	dsRNA
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	dsRNA
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	dsRNA
<i>Ustilago maydis</i>	dsRNA
<i>Kluyveromyces lactis</i>	dsDNA linear plasmidial
<i>Pichia acaciae</i>	dsDNA linear plasmidial
<i>Pichia inositovora</i>	dsDNA linear plasmidial
<i>Pichia kluyveri</i>	Cromossomal
<i>Pichia farinosa</i>	Cromossomal
<i>Pichia ianomala</i>	Cromossomal
<i>Williopsis mrakii</i>	Cromossomal

As leveduras *killer* ou neutras detentoras de sistemas de expressão de toxinas baseados em dsRNA, contêm dois tipos de VLPs de RNA de dupla fita em seu citoplasma: um grande (L-A - dsRNA) e outro pequeno (M - dsRNA) encapsulados em partículas virais, sendo que, cada tipo de RNA exerce uma função específica. A presença das partículas com o pequeno RNA é responsável pela expressão efetiva da toxina em si e por conferir imunidade à célula, contra a ação da sua própria toxina (Figura 10). Para tanto, depende do alelo cromossomal +mak 1 e das partículas contendo o RNA grande de dupla fita (BRITES, 2003).

Essas partículas virais podem, no entanto, sofrer um processo de “cura” e inativação quando as células de leveduras são submetidas a determinadas condições. Tratamentos por choque térmico, radiação ultravioleta, brometo de etídio, ciclohexamida ou corantes mutagênicos, além de gerar a perda da atividade *killer*, também podem causar a perda da imunidade celular à sua própria toxina (SCHAFFRATH e BREUNIG, 2000).

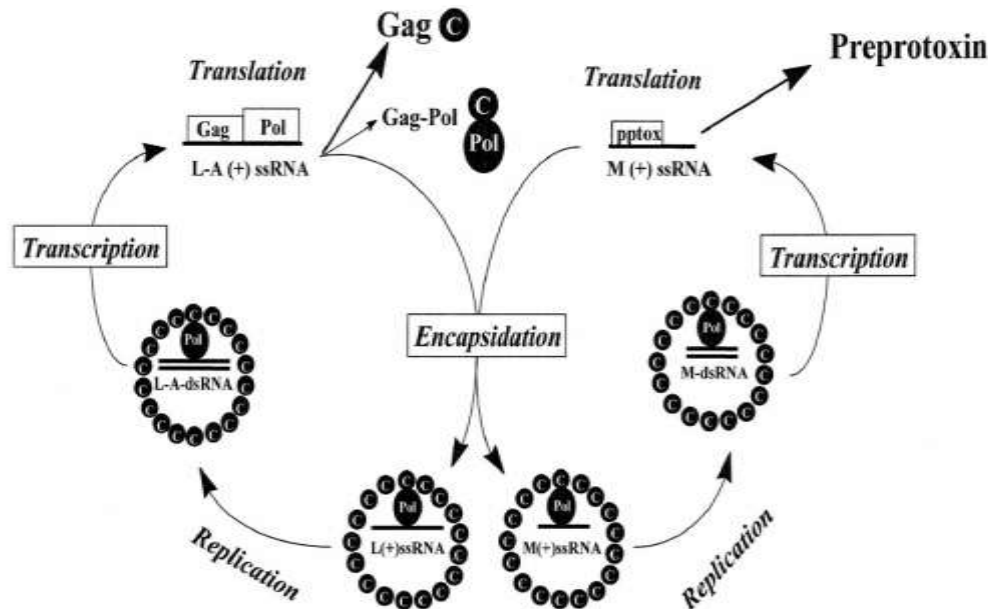


Figura 10: Expressão de toxinas baseada no sistema de replicação do “vírus” de RNA dupla fita em células de leveduras *killer*, Fonte: Magliani et al. (1997).

3.6.2.1 Mecanismo de ação

Wickner (1996) relata que a produção das toxinas *killer* ocorre de forma intensa durante a fase exponencial de crescimento das leveduras e seus diferentes mecanismos de ação dependem primordialmente de suas bases genéticas de expressão. Bussey (1972) avaliou o grau de ligação de toxinas *killer* de *S. cerevisiae* à parede celular de leveduras sensíveis e a importância desta ligação na sua ação. Foi relatado que quando a toxina era lançada no meio, ela ligava-se tanto a parede das células sensíveis, quanto às das células *killer*, no entanto estas últimas eram imunes à ação da toxina não havendo modificações. Segundo o autor, este fato demonstrou que os sítios de ligação na parede celular são fundamentais para que ocorra ação letal em uma célula sensível.

Geralmente os efeitos letais das toxinas *killer* sobre as células sensíveis ocorrem após duas ações básicas: ligação a receptores específicos de parede celular e membrana plasmática e translocação para o citoplasma. Contudo, uma vez dentro da célula, os principais mecanismos específicos que

as toxinas exercem sobre as células sensíveis são: aumento da permeabilidade da membrana plasmática, causando ruptura e perda de íons potássio, ATP e metabólitos intracelulares; inibição e síntese dos principais componentes da parede celular como glicana, manose e quitina; inibição da síntese de DNA e o bloqueio da fase G1 do ciclo celular (GOLUBEV, 2006).

Em alguns casos, os efeitos das toxinas são também capazes de afetar a célula sensível imediatamente após ligação à parede celular, por inibição do transporte de L-leucina e de prótons que normalmente seriam transportados com aminoácidos para o interior da célula. As toxinas modificam o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática inibindo o bombeamento para o meio externo, principalmente, em células que metabolizam ativamente glicose, sendo que todos os efeitos dependem da concentração da toxina no meio (BRITES, 2003)

Saccharomyces cerevisiae killer cell

Susceptible yeast cell

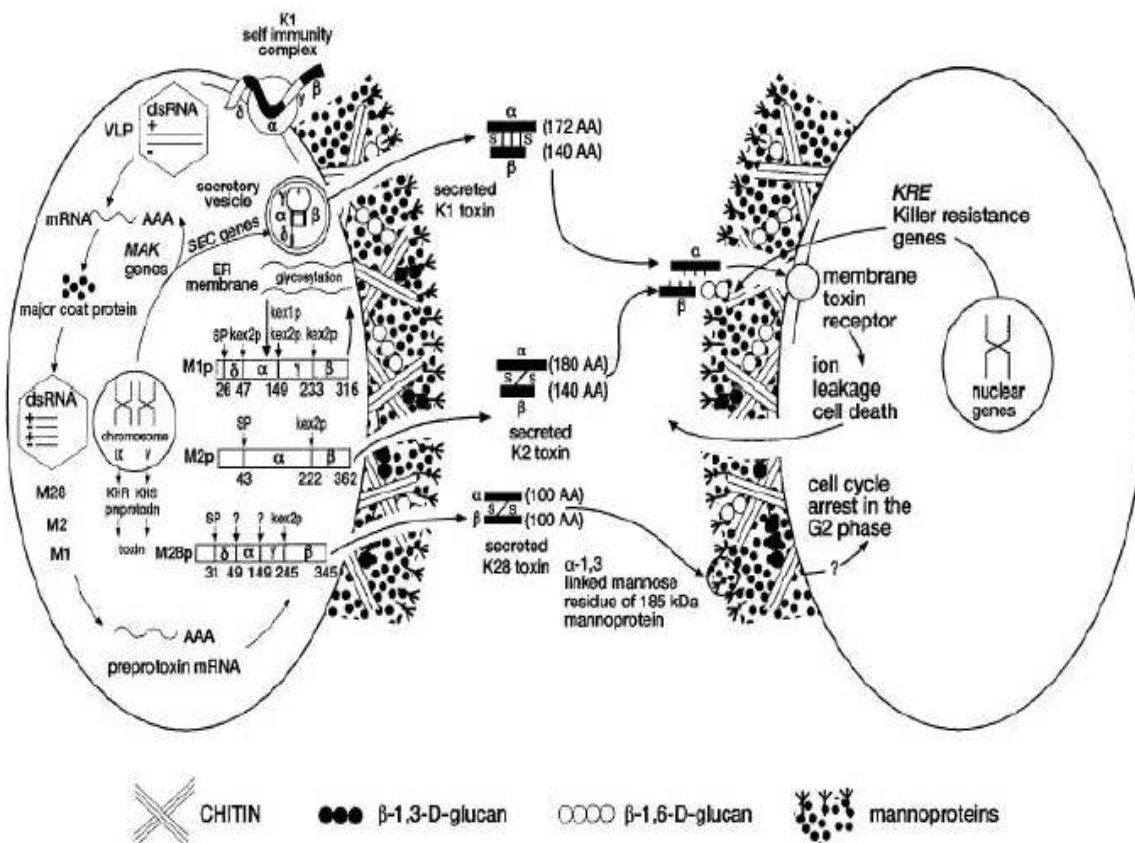


Figura 11: Mecanismos genéticos de secreção e de ação de toxinas *killer* de *S. cerevisiae*. Fonte: Magliani et al (1997).

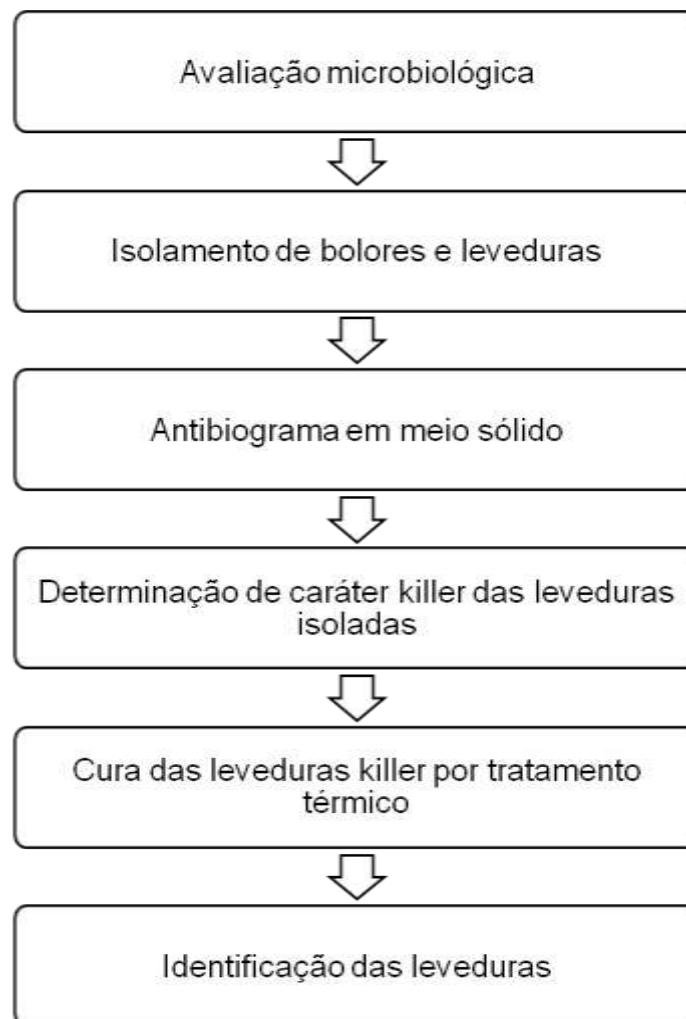
Tabela 2: Correlação das bases genéticas, seus receptores e mecanismo de ação de sistemas *killer* das espécies de leveduras mais estudadas.

Fonte: Marquina (2002).

Base Genética	Sistema <i>killer</i>	Tamanho da toxina <i>killer</i> (KDa)	Receptor	Mecanismo de ação
dsRNA encapsulado em VLPs	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
	K1	19	β -1,6-D-glicano	Aumento da permeabilidade da membrana à íons
	K2	21,5	β -1,6-D-glicano	Aumento da permeabilidade da membrana à íons
	K28	21,5	α -1,3-mannose	Inibição da síntese de DNA
	<i>Ustilago maydes</i>			
	P1	19	-	Aumento da permeabilidade da membrana à íons
	P4	11,1	-	Aumento da permeabilidade da membrana à íons
	P6	17,7	-	Aumento da permeabilidade da membrana à íons
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	-	-
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-	-	-
Plasmídeo linear de ds DNA	<i>Phaffia rhodozyma</i>	-	-	-
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	156,5	Quitina	Bloqueio do ciclo celular, atividade de quitinase
	<i>Pichia inositovora</i>	>100	-	-
	<i>Pichia acaciae</i>	~190	Quitina	Bloqueio do ciclo celular, atividade de quitinase
Genes nucleares	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
	KHR	20	-	Aumento da permeabilidade da membrana à íons
	KHS	75	-	Aumento da permeabilidade da membrana à íons
	<i>Pichia kluyveri</i>	19	-	Aumento da permeabilidade da membrana à íons
	<i>Pichia farinosa</i> KK1	14,2	-	Aumento da permeabilidade da membrana à íons
	<i>Williopsis nrakii</i> HM-1	10,7	β glicano de parede celular	Inibição da síntese de β -1,3-glicano

4 MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental realizado no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Francisco Beltrão está apresentado no Fluxograma 1.



Fluxograma 1 – Procedimento experimental

4.1 Avaliação microbiológica

4.1.1 Amostras de milho

Um total de 15 amostras de milho foram adquiridas de uma Cooperativa do município de Francisco Beltrão – PR, as amostras recém colhidas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da UTFPR- FB.

4.1.2 Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras realizou-se a partir de 10 g de amostra de análise, asépticamente triturada e homogeneizada. Procedeu-se a diluição seriada com peptona (Himedia ®) 0,1% (m/v) de 10^{-1} a 10^{-6} . Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi inoculada pela técnica *pour plate* em Placas de Petri e incubadas por 5 dias em estufa B.O.D a 25°C, conforme descrito por Nelson et al. (1983).

4.2 Isolamento de bolores e leveduras

As colônias de *Fusarium* sp apresentam pigmentação das culturas variando do vermelho carmim, cinza e marrom claro (ANGELOTTI et al., 2006). Colônias com esse aspecto foram isoladas, e transferidas para tubos contendo BDA (ágar batata dextrose - Himedia ®) inclinado e armazenado em temperaturas inferiores a 10°C. Colônias de leveduras, fenotipicamente distintas, foram isoladas com o objetivo de antagonismo em posteriores testes.

4.3 Antifungigrama em meio sólido

4.3.1 Bolor teste

Inicialmente utilizou-se como fungo teste assim *Fusarium verticillioides* isolados de uma amostra de milho.

As leveduras que apresentaram-se altamente antagônicas também foram testadas frente a *Fusarium verticillioides* 103F, cedida pela Universidade Estadual de Londrina foi utilizado com bolor teste, isolada de ração de milho e identificado morfológicamente no Centro de Ciências da Universidade de Tokyo, Japão.

4.3.2 Antifungigrama

A atividade antifúngica em meio sólido foi analisada pela técnica de semeadura em profundidade conforme Motomura e Hirooka (1996). Para o teste de biocontrole as linhagens de leveduras preservadas em BDA foram reativadas repicando-se para outro tubo contendo o mesmo meio e, incubados a 25° C por 5 dias. A seguir as leveduras foram inoculadas em erlenmeyer contendo 25 mL de caldo extrato de malte (glicose 0,6%; extrato de malte 0,6%; extrato de levedura 0,14%; maltose 0,18% m/v) e incubadas a 25° C por 24 horas sob agitação de 150 rpm. O inóculo para antifungigrama consistiu de em uma alíquota de leveduras da suspensão.

Para a reativação, as linhagens de bolores foram repicadas em placas de *Petri* contendo BDA solidificado, inoculadas pela técnica de estria por esgotamento e incubadas a 25° C por 7 dias. A seguir preparou-se uma suspensão de esporos, colocando-se alçadas da linhagem fúngica em 10 mL de Tween 80 a 0,1% (v/v). O inóculo para antifungigrama consistiu de 10⁶ esporos/mL⁻¹, determinada pela contagem em Câmara de Newbauer.

A suspensão contendo 10^6 esporos/mL⁻¹ de fungos foi plaqueada pela técnica de semeadura *pour plate* no meio MEA (Malt Extract agar- Agar bacteriológico 2%; glicose 0,4%; extrato de malte 1%). Depois de solidificado o meio, fez-se um orifício de 8 mm no centro da placa e 50 µL de células de leveduras suspensas em caldo extrato de malte foram introduzida. Avaliaram-se as placas durante 30 dias a 25 °C, medindo-se o diâmetro do halo de inibição em mm.

A interação bolor-levedura foi classificada como:

- *Não inibição (R)*: descartaram-se as leveduras desta categoria, por permitirem o crescimento do bolor por toda a superfície do meio, inclusive na borda do orifício contendo a levedura.
- *Inibição pelo crescimento microbiano (IP)*: O crescimento de leveduras inibiu o bolor por competição, porém no decorrer do ensaio ocorreu desenvolvimento de micélios de *Fusarium* na superfície da colônia, portanto procedeu-se leitura visualizando o verso da placa. Considerou-se o tempo de estabilidade até o início do desenvolvimento do bolor sobre a levedura.
- *Inibição pela produção de substância (IS)*: A inibição pela levedura ocorreu devido a produção de substâncias antagônicas, resultando na formação de um halo transparente. Considerou-se tempo final de estabilidade, quando o bolor reverte a situação.

4.4 Determinação de caráter *killer* das leveduras isoladas

Para a determinação do caráter *killer*/antagonismo, as cepas de leveduras sensíveis foram cultivadas em ágar MPL (glicose 2%; extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%; NaH₂PO₄ 0,3%; (NH₄)₂SO₄ 0,5%, m/v) após, suspensas em 3 mL de solução salina (NaCl 0,85% m/v) e padronizadas na escala nº 1 de McFarland. As culturas sensíveis padronizadas, apresentando aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/mL⁻¹, foram plaqueadas pela técnica *pour plate* em ágar Sabouraud modificado (glicose 2%; peptona bacteriológica 1%; ágar ágar 2%, m/v) conforme metodologia de Polonelli et al. (1983) e, após

autoclavado, adicionado de 0,03% (m/v) de azul de metileno. Após solidificação do ágar, inoculou-se uma alçada de cultura em massa das leveduras isoladas das amostras de milho, previamente reativadas overnight em tubos contendo MPL, sob forma de pequenos pontos na superfície do meio.

Como controle positivo para a produção da toxina *killer*, utilizou-se *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-738 e como linhagens padrão sensíveis foram utilizadas *Candida glabrata* NCYC 366 (K1), *C. glabrata* NCYC 388 (K3), *C. albicans* 12A, (K8), *Pichia kluyveri* CAY15 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 cedidas pela UNESP-Rio Preto.

4.5 Cura das leveduras *killer* por tratamento térmico

Para a cura, as leveduras positivas no teste de caráter *killer* foram pré-cultivadas a 25° C overnight em meio YPD (extrato de levedura 1,0%, peptona bacteriológica 2,0%, glicose 2,0% e ágar 1,7% m/v). Padronizou-se as leveduras na escala nº 1 de McFarland, e em seguida realizou-se diluições decimais seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} . Semeou-se uma alíquota de 0,1 mL (aproximadamente $3,0 \times 10^2$ células/mL⁻¹) na superfície das placas contendo meio YPD. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após a cura das leveduras, o teste de caráter *killer* foi novamente realizado, com o objetivo de analisar a estabilidade térmica das leveduras quanto à produção de substâncias antagônicas.

4.6 Identificação das leveduras

Os isolados foram identificados com o kit comercial *RapID™ Yeast Plus* (Remel) por série bioquímica, que identifica microrganismos isolados em Agar, conforme instruções do fabricante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 34 leveduras foram isoladas de milho, sendo empregadas no estudo das características antagônicas como antibiose e competição por nutrientes contra *Fusarium verticillioides* e presença de fator *killer*.

O isolamento procedeu-se a partir de análise microbiológica em 15 amostras de milho oriundas do Sudoeste do Paraná. A contagem em placa demonstrada na Tabela 3 variou de 4,65 a 8,33 log UFC g⁻¹. Paralelamente ao isolamento de leveduras fez-se o isolamento de cepas de *F. verticilloides*. A presença de *F. verticilloides* foi de 19,7% em relação a contagem total de fungos nas 15 amostras.

Tabela 3: Contagem de bolores e leveduras nas amostras de milho (AM).

Amostras	Contagem (Log UFC.g ⁻¹)*
AM1	4,70
AM2	4,95
AM3	7,11
AM4	6,74
AM5	4,84
AM6	5,05
AM7	4,65
AM8	5,11
AM9	5,11
AM10	6,83
AM11	8,33
AM12	6,82
AM13	5,46
AM14	4,68
AM15	5,52

* Log UFC.g⁻¹: Logaritmo de Unidade formadora de colônia por grama

Os bolores e leveduras constituem um grande grupo de micro-organismos, a maioria originária do solo ou do ar, que apresentam grande versatilidade e resistência a condições adversas. A temperatura ótima de crescimento da maioria dos fungos está na faixa de 25 a 28° C conforme Silva et al. (2007), encontrada nas regiões subtropicais e na época de plantio do milho, o que pode acarretar em alta contaminação.

A produção de micotoxinas por esse gênero fungico também está correlacionada com condições ambientais, estudos realizados por Jay (2005) apontam que, de modo geral para a produção de fumonisina análogo FB1 a temperatura ideal é de aproximadamente 25° C. Fator que remonta a importância do monitoramento da qualidade microbiológica em milho e derivados. O milho é bastante susceptível a contaminação fúngica por possuir uma boa composição de nutrientes. Embora neste trabalho não tenha sido analisada a contaminação das amostras de milho por micotoxinas, salienta-se que a presença de um fungo não implica diretamente a presença da toxina no alimento, mas torna-se preocupante.

Com relação ao antifungigrama, inicialmente, testaram-se todas as leveduras com uma cepa de *F. verticillioides* também isolado das amostras, esta cepa não foi confirmada quanto a produção de micotoxinas. Os resultados obtidos são demonstrados na Tabela 4, juntamente com a codificação das leveduras isoladas.

Analisando-se os resultados, observou-se que das 34 leveduras isoladas 5 isolados se destacaram quanto ao antagonismo, sendo estas então, testadas frente a cepa micotoxigênica, *F. verticillioides* 103F. A seleção das leveduras deu-se através da estabilidade no decorrer dos 30 dias. As leveduras mais estáveis, que não diminuíram significativamente a interação bolor/levedura. Nas Figuras abaixo demonstram-se o comportamento das leveduras frente ao bolor em 7 e 14 dias.



Figura 12: Antifungigrama com a Levedura AM2(-2) contra *F. verticillioides* isolado do milho analisado com leitura em 7 e 30 dias.

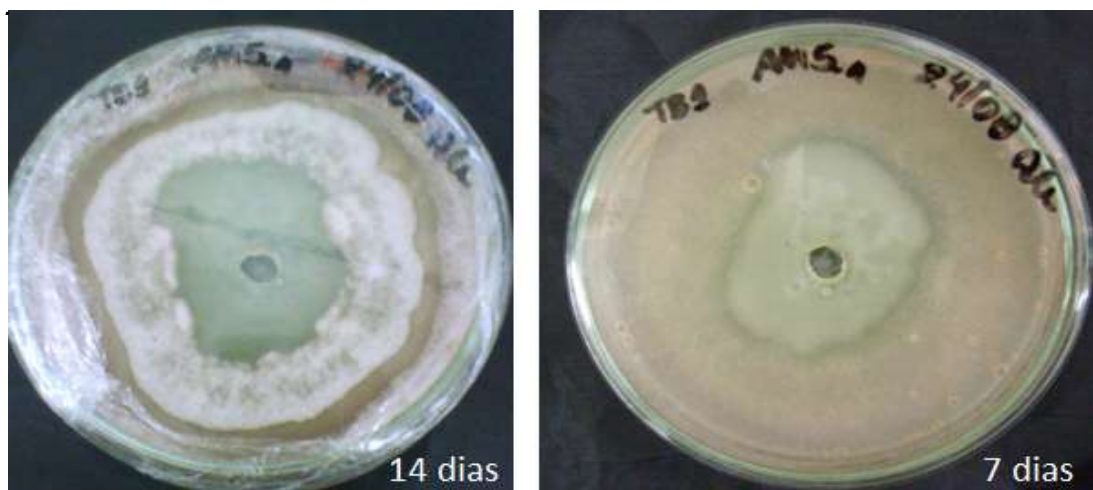


Figura 13: Antifungigrama com a Levedura AM5(-1) contra *F. verticillioides* isolado do milho analisado com leitura em 7 e 30 dias.

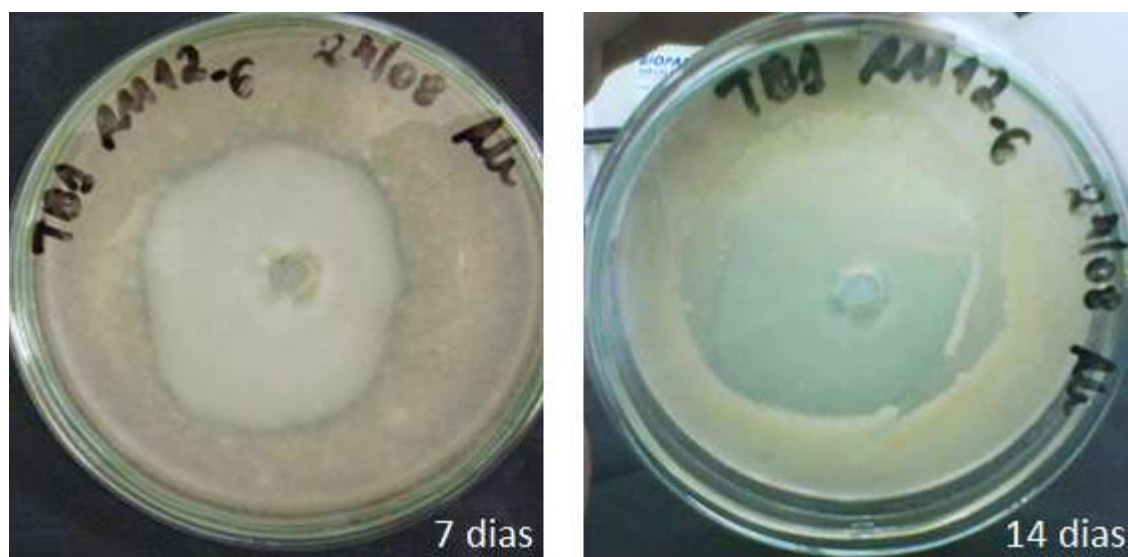


Figura 14: Antifungigrama com a Levedura AM12(-6) contra *F. verticillioides* isolado do milho analisado com leitura em 7 e 30 dias.

Tabela 4: Antifungigrama com *Fusarium verticillioides* isolado de milho avaliado em 7, 14, 21 e 30 dias.

Levedura	Halo de inibição (mm)				Categoria de inibição
	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias	
AM11 (-5)I	3,5	1	1	1	IS
AM12(-5)II	1	-	-	-	R
AM8(-5)II	1	1,5	1	1	IS
AM8(-4)I	1,25	2,5	1,5	1,5	IS
AM7(-6)II	3,25	1	1	1	IS
AM5(-4)	4,75	2	2,5	2,5	IS
AM5(-2)I	5	-	-	-	R
AM7(-6)I	0,95	1,4	1	1	IS
AM3(-5)II	1,12	1	1	1	IS
AM5(-5)	5,25	1	1	1	IS
*AM2(-1)	-	-	9	10	IS
AM2(-2)I	2,75	2,5	2,5	2,5	IS
AM2(-3)II	2,75	2,5	1	1	IS
AM3(-5)II	0,75	0,75	0,75	0,75	IS
AM2(-4)	0,1	0,1	0,1	0	R
AM14(-2)II	1,5	1,5	1,5	0	IS
AM5(-2)	3,5	3,5	2,0	2,0	IS
*AM3(-4)	4,5	4,5	4,5	4,5	IS
AM9(-4)	-	-	-	-	R
AM2(-3)III	-	-	-	-	R
AM9(-5)	-	-	-	-	R
AM5(-3)	-	-	-	-	R
AM11(-6)II	9,75	9,75	-	-	IS
AM11(-6)I	-	0,5	0,5	0,5	IS
AM2(-3)III	5,75	5,0	2	-	IS
AM8(-5)I	1	1	1	1	IS
AM14(-3)	1	1	1	1	IS
AM14(-6)	3	2,5	2	1	IS
AM9(-5)II	3	-	-	-	R
AM8(-3)	2	2	2	2	IS
AM8(-2)	2	3	3	-	IS
*AM12(-6)	17,5	12,5	12,5	9	IS/IP
*AM5(-1)	20	20	20	50	IS/IP
*AM2(-2)II	23	12,5	12,5	18	IS/IP
AT3(-3)	1	4	6	3	IS

*leveduras selecionadas. CATEGORIAS: Inibição pela produção de substância (**IS**); Inibição pelo crescimento microbiano (**IP**); Não inibição (**R**).

As cinco leveduras utilizada no teste anti- *F. verticillioides* 103F foram identificadas utilizando-se o kit RapID™ YEAST Plus (Remel, Norcross, Geórgia) que trata-se de um micrométodo qualitativo empregando testes convencionais de um único substrato cromogênico tendo um período de incubação de 4 h. As reações foram determinadas por mudanças de cor de substratos cromogênicos dentro dos poços de amostra. As reações do teste foram agrupados em tríades e marcadas com base em uma reação positiva ou negativa, resultando em um microcódigo de 6 dígitos que corresponde a um banco de dados, conforme instruções do fabricante.

O teste foi de 99,9% de precisão para *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula wingei* e *Pro wickerhamii* para os isolados AM2(-1), AM2(-2) e AM5(-1) respectivamente e, 76,91% para *Saccharomyces cerevisiae* no isolado AM3(-4). O isolado AM12(-6) não pode ser identificado através do kit utilizado.

Utilizando esse kit Heelan et al. (1998) identificaram corretamente 125 isolados de leveduras, com uma precisão geral de 94% (125 de 133). Encontrando excelente correlação no reconhecimento das leveduras mais comumente isoladas de fontes humanas, *Candida* spp. O teste foi de 99% (105 de 106 isolados). O RapID™ YEAST Plus alternativa simples e precisa aos métodos convencionais de assimilação para a rápida identificação dos isolados mais comumente encontrado. Com relação a *Pro wickerhamii* identificado de AM5(-1) não se tem nenhuma informação de trabalhos que já encontraram esse micro-organismo e constataram sua letalidade contra fungos filamentosos toxigênicos.

A Tabela 5 relata o antifungigrama das 5 leveduras frente a *F. verticillioides* 103F micotoxigênico. A interação foi avaliada como antagonismo por competição celular e/ou produção de substância antimicrobiana.

Tabela 5: Antifungigrama das leveduras selecionadas contra *F. verticillioides* 103F.

LEVEDURA	GRAU DE INIBIÇÃO	HALO DE INIBIÇÃO (mm), Nas diluições.			ESTABILIDADE
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M2(-1)	IS/IP	10*	5,5	-	30 dias
<i>Hansenula wingei</i> M2(-2)	IP	7,5	7,0	-	30 dias
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M3(-4)	IP	14,3	4	1	30 dias
<i>Pro wickerhamii</i> M5(-1)	IP	13	4,5	3	30 dias
Is-AM12(-6)	IS/IP	14*	10	7,5	30 dias

Os resultados indicaram que o halo de inibição variaram de 1 a 14,3mm com estabilidade por mais de 30 dias em todas as leveduras. As leveduras Is-AM12(-6) e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram halo por produção de substâncias (IS), somente na diluição de 10^{-4} , indicando que a concentração de leveduras presente influenciou no grau de antibiose. Na Figura 12 é apresentado o comportamento do Is-AM12(-6).

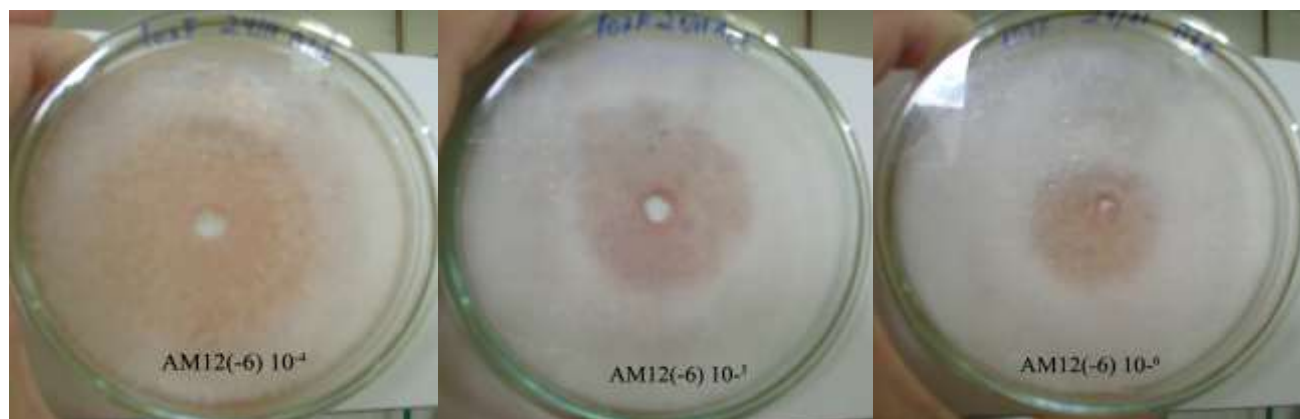


Figura 15: Comportamento da levedura Is-AM12(-5) frente a *F. verticillioides* 103F produtor de micotoxina, nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} .

As demais leveduras apresentaram o tamanho do halo em milímetros (mm) diretamente proporcional a concentração de leveduras utilizadas. As leveduras *S. cerevisiae* M2(-1) e *H. wingei* M2(-2) diluídas a 10^{-6} , não apresentaram nenhuma forma de inibição do bolor. Os maiores halos foram formados pelas leveduras *S. cerevisiae* M3(-4) e Isolado AM12(-6), com 14,3 e 14 mm respectivamente. Na presença de todas as leveduras testadas, no

decorrer dos dias, *F. verticillioides* 103F se desenvolveu na superfície da levedura, com menor densidade do que no restante da placa, mas sem inibir a levedura por >30 dias.

Walker, Mcleod e Hodgson (1995) realizaram o trabalho pioneiro, no qual constatou-se a susceptibilidade de fungos filamentosos deteriorantes às leveduras *killer* sendo que *S. cerevisiae* enquadrou-se entre os agentes com maior potencial antagônico, cuja exposição causou vacuolização da hifa e pigmentação do micélio, indicando lise celular.

Uma alternativa de utilização de leveduras contra bolores micotoxigênicos é a aplicação de substâncias extracelulares produzidas, denominadas toxinas *killer*, que possuem a capacidade de matar células de outras leveduras sensíveis e, por pressuposto podem agir contra fungos filamentosos.

Cepas de leveduras são classificadas como *killer*, quando o inóculo é cercado por uma zona clara, na qual nenhum crescimento das cepas sensíveis ocorre delimitado por uma zona de células mortas que pode ser percebido na presença de azul de metileno. A Tabela 6 demonstra os resultados obtidos no teste de caráter *killer* das leveduras testadas contra o *F. verticillioides* 103F.

Tabela 6: Teste de caráter *killer* de leveduras isoladas de milho contra leveduras sensíveis

LEVEDURAS TESTE	LEVEDURAS TESTE SENSÍVEIS				
	Cay 15	NCYC-1006	K8	K1	K3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M2(-1)	-	-	-	-	-
<i>Hansenula wingei</i> M2(-2)*	+	-	+		+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M3(-4)	-	-	-	-	-
<i>Pro wickerhamii</i> M5(-1)	+	+	+	+	-
Is-AM12(-6)	+	+	+	+	-

*positiva após 120 horas.

(+) apresentaram caráter *Killer*, (-) não apresentaram caráter *killer*.

A análise dos resultados demonstra que os isolados *Hansenula wingei* M2(-2), *Pro wickerhamii* M5(-1) e Is-AM12(-6) apresentaram formação de zona mais clara na placa (Figura 13). Os isolados *Pro wickerhamii* M5(-1) e Is-AM12(-6) apresentaram-se positivas em relação às leveduras sensíveis CAY-

15, NCYC 1006, K8 e K1. Já o isolado *Hansenula wingei* M2(-2) foi positiva com K3, K1 e CAY-15, apresentando formação de zona mais clara somente com 120 horas. Os resultados positivos para as mesmas sensíveis dão indícios que as leveduras testadas podem produzir substâncias similares.

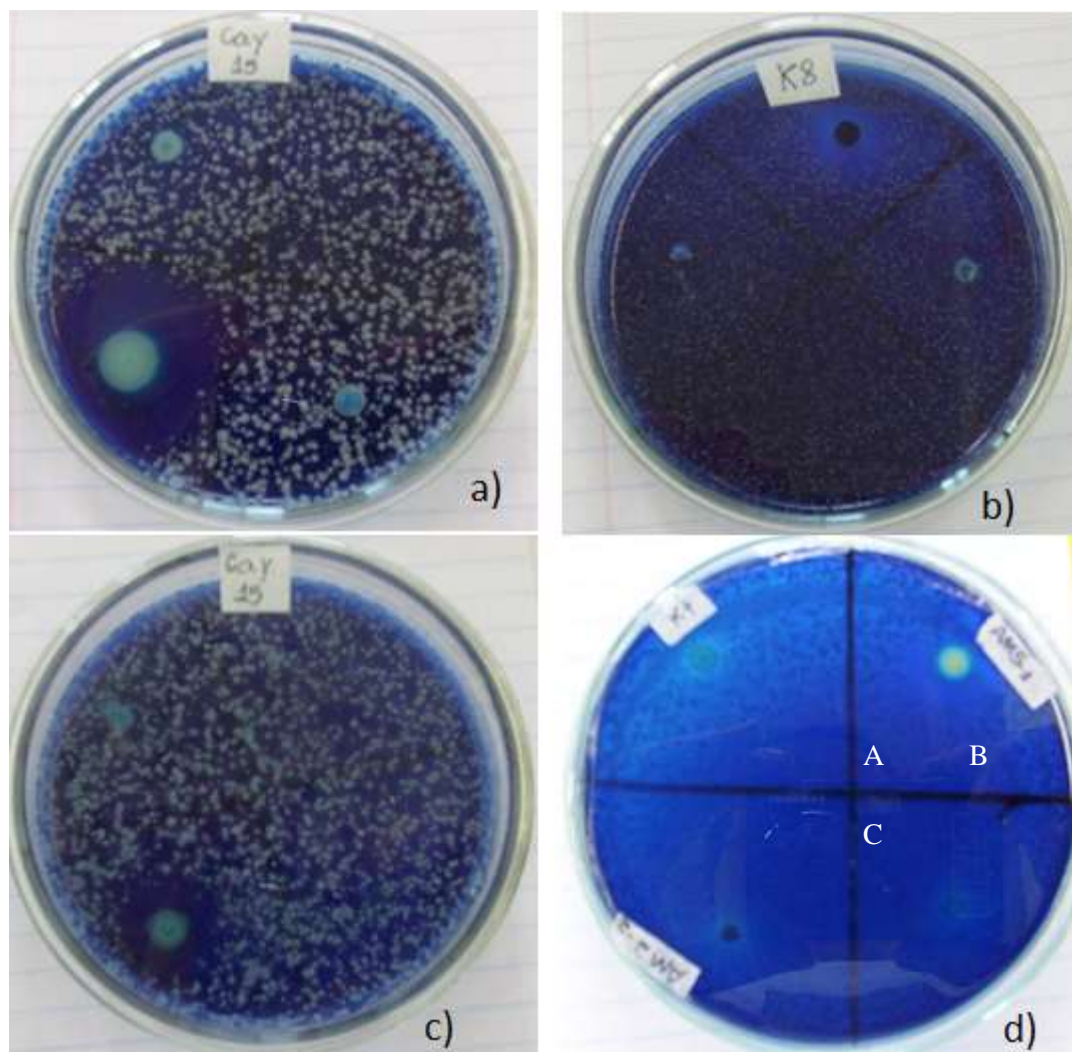


Figura 16: Formação de zona clara característico de killer positivo. a) Is-AM12(-6) levedura teste sensível CAY 15; b) *Pro wickerhamii* M5(-1) contra levedura teste sensível K8; c) *Pro wickerhamii* M5(-1) contra levedura teste sensível CAY 15; d) zona clara formada pela levedura killer positiva teste (A), *Pro wickerhamii* M5(-1) (B) e *Hansenula wingei* M2(-2) (C).

Sendo o fator *killer*, o elemento principal de antibiose produzida pelas leveduras, muitas vezes pertencem à categoria de substâncias oriundas de expressão com característica plasmidial, ocorrendo risco de perda da atividade produtora pela ação do calor, ou mudança das propriedades do meio. Embora leveduras venham a constituir grupo de micro-organismos com boa inocuidade para aplicação em controle biológico, surgem problemas referentes à

estabilidade da capacidade genética dos organismos produtores (COELHO, 2005).

A cura das leveduras é realizada com o intuito de verificar a estabilidade térmica da capacidade de produção de toxina *killer*, sendo que esse método afeta as partículas “virais” da RNA, responsáveis por expressar essas toxinas, as alterações, além de inativar a produção, podem destruir a imunidade que a célula possui à própria toxina. As leveduras que se apresentaram positivas no teste de caráter *killer*, foram submetidas a aumento na temperatura de incubação de 25°C para 37°C.

Os isolados *H. wingei* M2(-2), *P. wickerhamii* M5(-1) e Is-AM12(-6), que foram positivas para caráter *killer* no teste inicial, se desenvolveram bem mesmo com o aumento da temperatura, e continuaram a produzir zona clara. Portanto, mesmo com a cura os isolados *P. wickerhamii* M5(-1) e Is-AM12(-6) apresentaram-se positivas em relação às leveduras sensíveis CAY-15, NCYC 1006, K8 e K1. Já o isolado *H. wingei* M2(-2) foi positiva com K3, K8 e CAY-15, apresentando formação de zona mais clara somente com 120 horas (Tabela 7).

Temperaturas mais elevadas normalmente diminuem a capacidade micocinogênica das leveduras (GOLUBEV, 2006). O teste de cura avalia a capacidade de perda da característica micocinogênica após exposição a situações de estresse para a célula produtora, como choque térmico.

Tabela 7: Teste de caráter *killer* com as leveduras tratadas termicamente.

LEVEDURAS TESTE	LEVEDURAS TESTE SENSÍVEIS				
	Cay 15	NCYC 1006	K8	K1	K3
<i>Hansenula wingei</i> M2(-2)*	+	-	+	-	+
<i>Pro wickerhamii</i> M5(-1)	+	+	+	+	-
Is-AM12(-6)	+	+	+	+	-

*positiva após 120 horas.

(+) apresentaram caráter *Killer*, (-) não apresentaram caráter *killer*.

No teste de identificação para leveduras, constatou-se que a levedura Is-AM12(-6) é produtora da enzima lipase. Esse micro-organismo apresentou caráter *killer* bem expressivo e inibição de *F. verticilloides*, desta forma

supõem-se que através desta enzima, o isolado possa atuar sobre a membrana fosfolipídica de microrganismos sensíveis, provocando a lise celular.

Tabela 8: Enzimas produzida pelas 5 leveduras utilizadas, constatadas com a utilização do teste RapID Yeast Plus (Remel).

Enzimas	<i>S. cerevisiae</i> M2(-1)	<i>H. wingei</i> M2(-2)*	<i>S. cerevisiae</i> M3(-4)	<i>P. wickerhamii</i> M5(-1)	Is-AM12(-6)
Glicase	+	+	+	+	+
Maltase	+	-	-	+	+
Sucralase	+	-	+	+	-
Trealase	-	-	-	+	+
Rafinase	-	-	+	+	+
Lípase	-	-	-	-	+
α -Glicase	+	+	+	-	-
β -Glicase	+	+	-	-	-
α -Galactase	-	-	-	-	-

(+) reação positiva (-) reação negativa para produção de enzimas

A constatação da letalidade do fator *killer* de determinadas linhagens de leveduras perante fungos filamentosos amplia as perspectivas de aplicação, também sob o ponto de vista de biocontrole dos fitopatógenos e bolores deteriorantes de alimentos como foi descrita por Jacobs e Van Vuoren (1991). Fazio (2009) isolou leveduras de polpa de fruta, constatou a produção de toxina *killer* e as empregou contra *F. verticillioides* e obteve inibição por antibiose com 14 isolados, competição por nutrientes em 8 e os dois fatores em 2 isolados.

Portanto, leveduras que apresentam caráter *killer* positivo tornam-se uma possibilidade na aplicação contra fungos filamentosos micotoxigênicos, principalmente *F. verticillioides* alvo do estudo apresentado.

6 CONCLUSÕES

Analisando a interação bolor/levedura da microbiota natural isolaram-se cepas que possuem características antagônicas, sugerindo a técnica de biocontrole como viável, mas dependente de continuação nas pesquisas.

Um total de 34 leveduras foi isolado de 15 amostras de milho.

- 5 leveduras apresentaram antibiose por produção de substância e por competição por nutrientes;
- Cinco leveduras isoladas foram submetidas ao Kit RapID™ YEAST Plus (Remel) sendo identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, isolados AM2(-1) e AM3(-4), *Hansenula wingei* isolado AM2(-2) e *Pro wickerhamii* o isolado AM5(-1). O isolado AM12 não foi identificado com o kit
- As leveduras Is-AM12(-6) e *Pro wickerhamii* M5(-1) apresentaram bom desempenho no controle do crescimento de *F. verticillioides* 103F, havendo também liberação de toxinas *killer* a 25 e 37°C.
- A aplicação de leveduras *killer* no controle de fungos filamentosos representa uma alternativa promissora

REFERÊNCIAS

ABIMILHO- Associação brasileiras de indústrias de milho. 2006. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/ocereal.htm>. Acesso em 03/11/2011.

AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO, 2003, Agricultura.// Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso 10 de maio de 2011.

AGROSUL. Farinha de milho e fubá. 2008. Disponível em: <http://www.agrosul.ind.br/conteudo/fuba.asp>. Acesso 02/11/11.

AIDOO, K.E et al.. Occurrence and function of yeast in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v6, p30-39, 2006.

ANGELOTTI, F.; TESSMANN, D.J.; ALVES, T.C.A.; VIDA, J.B.; JACCOUD FILHO, D.S.; HARAKAVA. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticales no sul do Brasil. *SummaPhytopathol.* Botucatu, v. 32, n. 2, p. 177-179, 2006.

BRITES, A.S. M.. **Seleção de linhagens de *Sacchamomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator *killer*, H₂S e o caráter floculante.** 2003, 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BUSSEY, H. Effects of yeast *killer* factor on sensitive cells. **Natural New Biology**, v.235, p.7375, 1972.

CANÇADO, R. A. **Avaliação microbiológica e micotoxicológica de grãos de milho (*Zea mays* Linné) e soja (*Glycine max* (Linné) Merrill) provenientes de cultivo convencional das sementes naturais e geneticamente modificadas.** 2004. 166 f. Tese (doutorado em Tecnologia em alimentos)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARRATÙ, M.R., CASSANO, T., COLUCCIA, A., BORRACCI P. E CUOMO, V. Antinutritional effects of fumonisin B1 and pathophysiological consequences. **Toxicology Letters**, v.140-141, p459-463. 2003.

CHEN, W.; HAN, Y.; JONG, S.; CHANG, S. Isolation, purification, and caracteization of a *killer* protein from *Schwanniomyces occidentalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, p.5348-5352, 2000.

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

- CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Previsão de produção de safra. 2011. Boletim informativo.
- COSTA, F. M. P. Severidade de *Phaeosphaeria maydis* e rendimento de grãos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes ambientes e doses de nitrogênio. 2001. 99p. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Piracicaba, 2001.
- COSTA, R. V.; CASELA, C.R.; COTA, V.L. Podridões do Colmo e das Raízes. Embrapa-2005. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_64_168_20051120.html. Acesso em 02/11/2011.
- DEMARCHI, M. Análise da conjuntura agropecuária-safra 2010/11. SEAB (Secretaria da agricultura e do abastecimento -Estado do Paraná). **Boletim informativo**/outubro de 2010.
- DESAI, K., SULLARDS, M.C., ALLEGOOD, J., WANG, E., SCHMELZ, E.M., HARTL, M., HUMPF, H-U., LIOTTA, D.C., PENG, Q. E MERRILL, JR, A.H. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1585, p.188-192, 2002.
- FAZIO, M. L. S. **Caráter *killer* e antagonismo de leveduras aplicadas no biocontrole de fungos micotoxigênicos em fruta**. 2009, 102f. Tese (doutorado em engenharia e ciência em alimentos). UNESP, São José do Rio Preto.
- FINK-GREMMELS, J. H. Micotoxins: Their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v.21, n.4, p.115-120. 1999.
- FOOD INGREDIENTES BRASIL. Micotoxinas. **Rev. Fib**. ed. 2, n 7, p. 32-40, 2009.
- FREIRE, F. das C. O. [et al.]. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48p.
- GOLUBEV, W.I. Antagonistic interactions among yeasts. In: ROSA, C.A. e PETER, G.(Org.). **The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of yeasts**. Germany, Berlin: Springer. p.197-219. 2006.
- HOOG, G.S. Atlas of clinical fungi, ed. 2: 1-1126, 2000.
- IMAMURA, N., MOTOIKE, I., NODA, M., ADACHI, K., KONNO, A., FUKAMI, H., Argimicin A, a Novel Anti-Cyanobacterial Compound Produced by an Algal-Lysing Bacterium. **The Journal of antibiotics**. v. 53, n.11, p.1317-1319, 2000.
- JACOBS, C.J., VAN VUOREN, H.J.J. Effects of different “*Killer*” yeast on wine fermentations. *Journal of Amsterdam Society Brewing*, v.42. ed.4. p.295-99.1991.

JANISIEWCZ, W. J., TWORKOSKI, T.J., SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**, v.9, n.11, p.1196-1200, 2000.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. Trad. Tondo. E. C... [et al.]- ed.6.- Porto Alegre: **Artmed**, 2005, p. 633.

JULIATTI, F.C.; ZUZA, J.L.M.F.; SOUZA, P.P de.; Analy Castilho POLIZEL, A.C. efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de Fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 34-41, Apr./June 2007.

JULIATTI, F.C.;ZUZA, J. L. M.F.; SOUZA, P.A.; POLIZEL, A.C. Avaliação da incidência de grãos ardidos em genótipos de milho sob aplicação foliar de fungicidas.**Fitopatologia Brasileira**, Brasília (suplemento), v.31, p.S312, 2006.

KAGAN, B.L. mode of action of yeast *killer* toxins channel formation in lipid bilayer membranes. **Nature**, New York. v. 302, p. 709-711. 1983.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE, S. L. M. Incidência de fumonisinaB1, aflatoxinasB1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciênc.Tecnol.Aliment**.Campinas, v.26, n.3,p.516-521,jul.-set. 2006.

KLEIN, T. Avaliação de aromas característicos produzidos por diferentes leveduras comerciais inoculadas no mosto da cv. Chardonnay. Trabalho de Conclusão de Curso (Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia). IFRS-Bento Gonçalves, 2006.

LEAL, P da C.; CANTANHEDE, K de L.; SILVA, L.M.; BEZERRA, G.F de B.; VIANA, G.M de C.; NASCIMENTO, M do D. S. B. Micotoxinas do Fusarium e seu Potencial Carcinogênico. **NewsLab** - edição 70 – 2005.

LEVITIN, M.M. Distribuição e severidade de Fusarium Ear Rot (Fusarium moniliforme Scheld.). 2005. Disponível em: http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Zea/Zea_Fusarium_moniliforme/map/. Acesso em 23/10/2011.

LI, Y.C., LEDOUX, D.R., BERMUDEZ, A.J., FRITSCHKE, K.L., ROTTINGHAUS, G.E.,.The individual and combined effects of fumonisinB1 and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poults.**Poult. Sci.** v.79n.6, p. 871–878, 2000.

LINO, M.C.; SILVA, L.J.G.; PENA, A.S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativo. **RPCV** , vol.99, ed(552), p 181-19, 2004.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. Fisiologia do Milho. **Circular Técnica, 22**- Embrapa milho e sorgo: Sete Lagoas, MG. Dezembro de 2002.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D. POLONELLI, L. Yeast *killer* system. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, p.369–400, 1997

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

PELCZAR, M.J.JR.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.. Microbiologia: conceitos e aplicações. Vol 1. São Paulo: **Pearson Makron Books**, 1997.

MINAMI, L.; MEIRELLES, P.G; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S . Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 207-224, jul./set. 2004

MOTOMURA, M.; HIROOKA, E. Y. Método rápido para o isolamento de micro-organismos de solo com atividade antifúngica cobre *Fusarium verticillioides*. **Arquivos de biologia e tecnologia**, v. 39, n. 2, p. 313-322, 1992.

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

OGA, S., CAMARGO, M. M. de C., BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos da toxicologia. ed 3, São Paulo. **Atheneu**, 2008 (p. 610).

OLIVEIRA. B.M. Comportamento *killer* de leveduras associadas à fermentação espontânea do mosto de cana-de-açúcar de produtores de cachaça de alambique da Bahia. 2009. 123f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia)- Universidade Estadual de Feira de Santana-Bahia.

PEDROCHI, F. **Estudo de sistemas biológicos “in vitro” e “in vivo” utilizando a espectroscopia fotoacústica**. 2004. Monografia (especialização em Física)-Universidade estadual de Maringá.

PEREIRA, M.N. Milho reidratado e ensilado na alimentação de vacas leiteiras. Universidade Federal de Lavras Departamento de Zootecnia. Junho de 2011

PINTO, N. F. J. A. Qualidade sanitária de grãos de milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 4p. (Embrapa Milho e Sorgo. **Comunicado Técnico, 30**).

PINTO, N.F.J. de A. Grãos Ardidos em Milho. **Circular Técnica, 66**: dezembro de 2005- Embrapa milho e sorgo- Sete Lagoas, MG.

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.

RILEY, R. T.; AN, N. H.; SHOWKER, J. L.; YOO, H. S.; NORRED, W. P.; CHAMBERLAIN, W. J.; WANG, E.; MERRIL JR., A. H.; MOTELIN, G.;

BEASLEY, V. R.; HASCHEK, W. M. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.118, p.105-112, 1993.

SANDINI, I.E. & FANCELLI, A.L. Milho: estratégias de manejo para a região sul. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária. 2000. 209 p.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** vol. 2 n.1 Campinas Jan./Apr. 2000.

SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Study of some characteristics of newly isolated *killer* yeast. **Rev Microbiol.** v.24, p.71-72. 1993.

SCHAFFRATH, R.; BREUNIG, K. D. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology*, v.30, p.173-190, 2000.

SENTE, L. **Otimização da produção e purificação de compostos antimicrobianos de leveduras para desenvolvimento de um novo agente fúngico**. 2010, 70 f.Dissertação (mestrado em microbiologia agrícola). UFRGS, Porto Alegre.

SILVA, L.J.G. **Avaliação e validação do grau de exposição de distintos tipos de populações às fumonisinas B1 e B2: alimentos contaminados, teor na urina e relação esfinganine-esfingosina**. 2008. Tese (Doutorado em ciência e tecnologia da saúde)-Universidade de Coimbra, Portugal.

SOARES, G.A.M.; SATO, H.H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y-500-4L *killer* toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**.v.31: p. 291-297, 2000.

SOMERS, J. M.; BEVAN, E. A. The inheritance of *killer* character in yeast..**Genetic Researches**, v.13, p. 71-73, 1969.

SORIANO, J.M. E DRAGACCI, S.. Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. *Food Research International* 37(4), 367-374. 2004

SUN, G.,WANG, S., HU, X., SU, J., HUANG, T., YU, J., TANG, L., GAO,W.,WANG, J.S.. Fumonisin B1 contamination on home-grown maize in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China.**Food.Addit.Contam.**v.24 (2), p.181–185, 2007.

TEIXEIRA, F.F. Milho cultivado no Brasil e banco de germoplasma – uma forma de classificação. Informamático Técnico 155. Embrapa milho e sorgo. Sete Lagoas-MG, 2008.

TINOCO, M.L.P. **Silenciamento trans-específico in vivo de fumo e o fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides***. Tese (doutorado em biologia molecular)-Universidade de Brasília, 2010.

USDA- United State Department of agriculture. Grains. 2010. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/Briefing/Maize/2010baseline.htm>. Acesso em 02/11

VAZ, F. L. ; MARTINS, S. C. S. ; CARVALHO, A. F. F. U. ; Melo, V. M. M. . Isolamento e caracterização de um toxina *killer* de levedura isolada de cana-de-açúcar. In: VI Reunião Regional da SBBq Nordeste, 2002, Fortaleza.

VIANA, G. Milho: novos sistemas de produção e busca por maiores produtividades provocam aumento da severidade das doenças. **Jornal Eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo**. Ano 03 - Edição 19 - Novembro de 2009. Sete Lagoas-MG.

VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I.; HOWARD, P.C.; PLATTNER, R.D.; COLLINS, T.F.X.; HANSEN, D.K.; PORTER JK .. An overview or rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. **Environ Health Perspectives** (suplement). v 109 (suppl. 2), p. 259-266. 2001.

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

WICKNER, R. B. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Rev.**, v.60, p.250-265, 1996

WOODS, D.R., BEVAN, E.A. Studies on the nature of the *killer* factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Genetic Microbiology**. Vol. 51, p.115-126. 1968