

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

HERRISON YOSHIKI YOCIDA FONTANA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE TOXINA *KILLER* DE *Hansenula wingei*  
VISANDO APLICAÇÃO NO CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE  
FUNGOS FILAMENTOSOS DETERIORANTES DE ALIMENTOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA  
2015

HERISON YOSHIKI YOCIDA FONTANA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE TOXINA *KILLER* DE *Hansenula wingei*  
VISANDO APLICAÇÃO NO CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE  
FUNGOS FILAMENTOSOS DETERIORANTES DE ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho

LONDRINA  
2015

**HERRISON YOSHIKI YOCIDA FONTANA**

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE TOXINA *KILLER* DE *Hansenula wingei* VISANDO  
APLICAÇÃO NO CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS DETERIORANTES DE ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Alimentos  
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Cláudio Takeo Ueno  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Prof. Dr. Paulo de Tarso Carvalho  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Orientador

Londrina, 17 de novembro de 2015

*À minha família, por sempre zelarem pela minha educação.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, pela orientação, confiança, dedicação e principalmente pela amizade. Seu apoio e orientação foram fatores imprescindíveis para que eu conseguisse concluir essa etapa de minha vida. Muito obrigado!*

*À Fernanda Gonzales Paião e Tatiana Ávila Miguel, por serem as responsáveis por todo meu conhecimento em genética e biologia molecular de micro-organismos que possuo. Muito obrigado por compartilharem essa riqueza!*

*À Prof. Dr. Elisa Yoko Hirooka, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica Nanobio - Capes e pelas oportunidades únicas.*

*Ao Prof. Dr. Benedito Corrêa, pela simpatia e hospitalidade em que me recebeu em seu laboratório na Universidade de São Paulo.*

*À Prof. Dra. Mayka Reghiany Pedrão por todo o auxílio e confiança.*

*À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina, pela qualidade de ensino. **BOLSA?***

*À Fundação Araucária, pelo suporte financeiro.*

*“Eu vos digo: é preciso, às vezes, ter um pouco de caos dentro de si,  
para poder dar à luz uma estrela dançante.”*

**Friedrich Nietzsche**

## RESUMO

FONTANA, Herrison Y. Y. **Purificação parcial de toxina *killer* de *Hansenula wingei* visando aplicação no controle do desenvolvimento de fungos filamentosos deteriorantes de alimentos.** 2015. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

O Brasil é um país agropecuário de destaque no cenário mundial da produção de *commodities* agrícolas. Neste contexto, durante o armazenamento, os grãos se tornam suscetíveis à proliferação de fungos filamentosos devido às suas características nutricionais. Durante o crescimento, determinadas espécies podem produzir micotoxinas que constituem um perigo natural na cadeia produtiva do alimento. Sendo assim, medidas de controle de desenvolvimento fúngico se tornam necessárias para prevenção de deteriorantes e, conseqüentemente, ocorrência destas toxinas nos alimentos. O objetivo deste trabalho é produzir e purificar toxina *killer* de *Hansenula wingei* visando aplicação no controle do desenvolvimento de fungos filamentosos deteriorantes de alimentos. Os fungos testes foram identificados por meio do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Para a obtenção do extrato bruto, a levedura foi cultivada em caldo MPL à 25°C por 96h. Após este período o cultivo foi centrifugado e filtrado em membrana de 0,20 µm para remoção das células e o extrato obtido. A purificação parcial do extrato foi realizada por sistema de ultrafiltração em membranas de exclusão molecular de 30 e 10 kDa, então essas frações foram testadas frente à germinação de esporos fúngicos de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*. O sequenciamento da região ITS dos fungos foi eficaz na confirmação da identificação morfológica. O sistema de ultrafiltração possibilitou a obtenção de três frações, denominadas Fração 1 (> 30 kDa), Fração 2 (entre 10 e 30 kDa), e Fração 3 (< 10 kDa). Embora as frações 1 e 2 terem sido concentradas 14 e 13 vezes, o processo de ultrafiltração não foi eficiente na purificação parcial da toxina *killer* de *H. wingei*. A porcentagem de esporos germinados nas frações 1 e controle positivo não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), embora a primeira fração tenha sido um pouco mais eficaz. Embora as frações 2 e 3 tenham diferido significativamente entre si e do controle negativo ( $p < 0,05$ ), foi observado que mais de 50% dos esporos de ambos os fungos germinaram na presença destas.

**Palavras-chave:** Biocontrole. *Internal Transcribed Spacer*. Levedura *killer*. Ultrafiltração.

## ABSTRACT

FONTANA, Herrison Y. Y. **Partial purification of killer toxin from *Hansenula wingei* aiming application in control of fungal growth deteriorating food.** 2015. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Federal Technology University - Parana. Londrina, 2015.

Brazil is a featured country in the global production of rural commodities. In this sense, during the storage, the grains become susceptible to fungi spoilage due its nutritional characteristics. During the growing, some of fungi species are able to product mycotoxins that are a natural danger to the food chain. Therefore, measures of fungal grow control are needed to prevention and consequently incidence of mycotoxins in food. The objective of this job is produce and partially purify killer toxin of *Hansenula wingei* aiming application in control of fungal growth deteriorating food. Test fungi were identified through sequencing of I.T.S. (Internal Transcribed Spacer) region. For the crude extract, the yeast were grown in MPL broth at 25°C for 96h. After this time, the broth was centrifuged in order to remove the yeast cells and the crude extract was obtained. The partial purification was done by an ultrafiltration system using 30 and 10 kDa molecular exclusion membrane then the fractions were tested against the germination of fungal spores from *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium expansum*. The sequencing of the ITS region of the fungus was effective in confirming the morphological identification. The ultrafiltration system made it possible to obtain three fractions, designated fraction 1 (> 30 kDa), fraction 2 (between 10 and 30 kDa) and fraction 3 (<10 kDa). Although the fractions 1 and 2 were concentrated 14 times and 13, the ultrafiltration process was not effective in partial purification of the killer toxin of *H. wingei*. The percentage of germinated spores in fractions 1 and positive control did not differ ( $p > 0.05$ ), although the first part was a little more effective. Although the fractions 2 and 3 differed significantly between itself and from the negative control ( $p < 0.05$ ) was observed over 50 % of both mold spores germinate in the presence thereof.

**Keywords:** Biocontrol. Internal Transcribed Spacer. Killer yeast. Ultrafiltration.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alinhamento do sequenciamento da região ITS de <i>Aspergillus ochraceus</i> com banco de dados <i>online</i> .....	23
Figura 2 - Alinhamento do sequenciamento da região ITS de <i>Penicillium expansum</i> com banco de dados <i>online</i> .....	24
Figura 3 - Porcentagens de inibição da germinação de esporos de <i>A. ochraceus</i> e <i>P. expansum</i> .....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos grupos <i>killer</i> segundo interação entre as linhagens.....	12
Tabela 2 – Leveduras <i>killer</i> e bases genéticas de sua toxina.....	14
Tabela 3 – Principais aplicações biotecnológicas das toxinas <i>killer</i> .....	18
Tabela 4 - Atividade antifúngica realizada com as frações obtidas após a ultrafiltração do extrato bruto.....	25

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados na PCR.....	19
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>11</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3 CARACTERÍSTICA <i>KILLER</i></b> .....	<b>12</b>
3.1 BASES GENÉTICAS E MECANISMOS DE AÇÃO .....	13
3.2 GÊNERO HANSENULA .....	16
3.3 APLICAÇÕES .....	14
3.3.1 Biocontrole .....	15
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>18</b>
4.1 FUNGOS TESTES .....	18
4.1.2 Extração de DNAr dos fungos filamentosos .....	18
4.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	19
4.1.4 Eletroforese do produto de PCR. ....	19
4.1.5 Purificação dos produtos de PCR. ....	19
4.1.6 Sequenciamento dos produtos de PCR .....	20
4.1.7 Edição, avaliação da qualidade e análise das sequências geradas.....	20
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE HANSENULA WINGEI.....	20
4.1.3 Sistema de ultrafiltração .....	21
4.1.4 Atividade antifúngica .....	21
4.1.6 Tratamento dos dados.....	22
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>23</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país agropecuário de destaque no cenário mundial da produção de *commodities* agrícolas, com produtividade de 209,1 milhões de toneladas de grãos\*, distribuídos em 58,0 milhões de hectares de área cultivada na safra de 2014/15 (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2015). Dentre a produção de cereais, leguminosas e oleaginosas, destacam-se o arroz, a soja e o milho com produção de 12.448, 96.243 e 84.729 mil toneladas, respectivamente (CONAB, 2015).

Não obstante, o país tem relevada participação como produtor de frutas frescas, colocando-o entre os quatro maiores produtores mundiais, juntamente com a China, Índia e os Estados Unidos da América (Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento - SEAB, 2015).

Os grãos, de forma geral, podem ser armazenados por longos períodos de tempo sem perdas significativas na qualidade. Entretanto, são suscetíveis à deterioração por fungos toxigênicos, quando não adotados controles adequados durante o armazenamento, acarretando perdas econômicas e riscos à saúde humana e animal (MIGUEL, 2009).

A respeito das infecções fúngicas que acometem os produtos agropecuários, citam-se, principalmente, a ocorrência de *Aspergillus ochraceus* em café, *A. flavus* em amendoim (ZORZETE, 2010) e castanhas do Brasil (REIS et al., 2012), *Fusarium verticillioides* em milho (MIGUEL, 2009) e *Penicillium expansum* em maçãs (COELHO, 2005).

Durante o crescimento, determinadas espécies podem produzir micotoxinas, metabólitos secundários, que constituem um perigo natural na cadeia produtiva do alimento. Sendo assim, medidas de controle do desenvolvimento fúngico se tornam necessárias, a fim de garantir a segurança desses alimentos.

Neste contexto, o controle biológico por meio da utilização de leveduras *killer* vem sendo promissor contra fungos filamentosos de importância econômica. Citam-se, por exemplo, o controle satisfatório *in vivo* de *P. expansum* em maçãs pós-colheita por *Hansenula wingei*, bem como contra fungos fitopatogênicos causadores da ferrugem asiática e do mofo branco (CALEGARI et al., 2014).

## 2 OBJETIVO

Produzir e purificar parcialmente toxina *killer* de *Hansenula wingei* visando aplicação no controle do desenvolvimento de fungos filamentosos deteriorantes de alimentos.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar fungos teste por meio do sequenciamento da região ITS;
- Produzir toxina *killer* de *Hansenula wingei* em Extrato bruto, por meio do cultivo em Caldo de cultura;
- Purificar parcialmente a toxina *killer* a partir do extrato bruto;
- Analisar as frações obtidas quanto à eficiência na inibição da germinação de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*;

### 3 CARACTERÍSTICA *KILLER*

Determinadas cepas de leveduras são capazes de inibir o crescimento de outras leveduras sensíveis e outros micro-organismos por meio de exotoxinas de natureza protéica ou glicoprotéica. Toxinas *killer*, como são denominadas, podem diferir entre espécies, em estrutura molecular, massa molecular, bases genéticas, maturação das proteínas, imunidade e mecanismos de ação (MAGLIANI et al., 1997; MARQUINA et al., 2002).

O primeiro fenômeno de atividade *killer* foi descrito em 1963, por Bevan e Makower a partir da observação de isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. Desde então, leveduras *killer* têm sido isoladas e caracterizadas dos mais diversos ambientes. Dentre os gêneros, destacam-se: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* e *Zigowillopsis* (MAGLIANI et al., 1997; PHILLISKIRK; YOUNG, 1975; YOUNG, 1981; SCHMITT; BREINIG, 2002).

Os fenótipos *killer* de leveduras podem ser classificados como *killer* resistente ( $K^+R^+$ ), *killer* sensível ( $K^+R^-$ ) e neutras ( $K^-R^-$ ). As linhagens resistente e sensível ( $K^+R^-$ ) são produtoras de toxina, podendo, ou não, ser resistente às toxinas de outras linhagens, ao passo que as linhagens classificadas como neutras não produzem toxina e não possuem resistência (MAGLIANI et al., 1997).

Young e Yagiu (1978) elaboraram um sistema de classificação das toxinas de leveduras, nomeando-as K1 a K10, tendo como base as interações entre as linhagens quanto aos padrões de sensibilidade e atividade *killer*. Posteriormente, Zhu e Bussey (1989) adicionaram ao sistema o grupo K11 (Tabela 01).

**Tabela 1: Classificação dos grupos *killer* segundo interação entre as linhagens**

Classificação <i>killer</i>	Classes sensíveis
K1	K2, K3 e K4
K2	K1 e K4
K3	K1 e K4
K4	K1
K5	K1, K3 e K4
K6	K1, K2, K3 e K4

Classificação <i>killer</i>	Classes sensíveis
K7	K1, K3, K4 e K6
K8	K1, K2, K3, K4 e K6
K9	K1, K2, K3, K4, K5 e K8
K10	K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7 e K8
K11	K1

Fonte: Young e Yaugiu (1978).

### 3.1 BASES GENÉTICAS E MECANISMOS DE AÇÃO

As bases genéticas que conferem o fenótipo *killer* às leveduras são variáveis entre espécies, podendo ser determinado por genes cromossomais ou extra-cromossomais, sendo este último dividido em plasmídeos lineares de DNA dupla fita e RNA de dupla fita encapsulados em *vírus-like-particles* (VLP), identificados respectivamente, em *K. lactis* e em *S. cerevisiae* (tabela 2).

A parede celular de células fúngicas determina sua forma e são essenciais para sua integridade, sendo constituídas principalmente de carboidratos livres e ligados a proteínas. Os principais constituintes da parede celular de leveduras são o (1→3)-β-D-glucana (50%), (1→6)-β-D-glucana (5%) e manoproteínas. Contendo, também, (1→6)-β-D-glucana com algumas ligações (1→3)-β (14%) e quitina (0,6 a 9%). A função dos polissacarídeos na parede celular é a de recepção de proteínas, mas ainda pouco se sabe sobre este mecanismo (SANTOS et al., 2000).

O processo de ação da toxina *killer*, foi proposto por Middelbeek et al., (1980) através da interação da toxina de *Pichia kluyveri* e células de *S. cerevisiae*, sendo determinado três estágios sucessivos: (I) ligação da toxina *killer* em receptores específicos, (II) transmissão da toxina para seu local reativo na membrana plasmática, (III) dano à permeabilidade da membrana resultando em extravasamento de íons potássio e diminuição do pH intracelular.

Segundo Marquina et al. (2002), as toxinas plasmidiais K1 e K2 de *S. cerevisiae*, apesar de serem diferentes, possuem mecanismos de ação semelhantes, se ligando ao receptor (1→6)-β-D-glucana da membrana plasmática, tornando-a permeável à prótons e íons potássio. Por outro lado, a toxina K9 codificada por genes cromossomais de *Hansenula mrakii* tem ação sobre os processos metabólicos

que envolvem a síntese de  $\beta$  – glucano, especificamente  $\beta$ -(1,3)-glucano, em células sensíveis tornando-as osmoticamente frágeis e defeituosa, resultando em sua lise e conseqüentemente, morte (YAMAMOTO et al., 1986).

**Tabela 2: Leveduras *killer* e bases genéticas de sua toxina**

Leveduras <i>killer</i>	Bases genéticas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	dsRNA
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	dsRNA
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	dsRNA
<i>Ustilago maydis</i>	dsRNA
<i>Kluveromyces 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 anomala</i>	Cromossomal
<i>Williopsis mrakii</i>	Cromossomal

**Fonte:** Schmitt e Breinig (2002).

### 3.2 APLICAÇÕES

Desde sua descoberta, leveduras *killer* e suas toxinas têm sido utilizadas em diversas aplicações; nos processos fermentativos industriais (VONDREJS; JANDEROVÁ; VALASEK, 1996; LIMA et al., 2007), biocontrole de fungos deteriorantes e/ou micotoxigênicos em alimentos (LIMA et al., 2013; FIEIRA et al., 2013; COELHO et al., 2003), desenvolvimento de antimicóticos para o tratamento humano e animal (MARQUINA et al., 2002) e em tecnologias de DNA recombinante (SCHMITT; BREINIG, 2002).

Marquina et al. (2002) relataram, também, uso das leveduras como sistemas modelo para o estudo dos mecanismos de regulação e processamento de polipeptídeos em eucariotos, de taxonomia, além de futuras aplicações em pesquisas de controle e expressão de vírus em organismos eucariontes, conforme apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3: Principais aplicações biotecnológicas das toxinas killer**

Campo de aplicação biotecnológica	Aplicações
Controle biológico na agricultura	Atividade antifúngica contra a podridão da madeira e fungos fitopatogênicos.
Fermentação de bebidas	Controle de contaminantes e como culturas <i>starters</i> em processos fermentativos.
Pesquisa de biologia celular em células eucariontes.	Estudos de biossíntese, processamento e secreção de proteínas.
Tecnologia de alimentos	Preservação de alimentos <i>in natura</i>
Genética	<i>Fingerprinting</i> de leveduras do vinho e tecnologia do DNA recombinante.
Medicina	Atividade zimocida contra patógenos.
Taxonomia	Padrão de sensibilidade <i>killer</i> como indicativo de parentesco filogenico

**Fonte:** Marquina et al. (2002).

### 3.3.1 Biocontrole

Proteínas antifúngicas providas de diversos organismos tal como: fungos, insetos e bactérias são naturalmente produzidos. Neste contexto, toxinas *killer* provenientes, principalmente, de leveduras não-*Saccharomyces* mostram um amplo poder de ação contra patógenos humanos e fitopatogênicos (SCHMITT e BREINIG, 2002).

Ainda hoje, o controle de doenças pós-colheita ainda se baseia no uso de fungicidas sintéticos (CASTORIA et al., 2001); todavia, o uso indiscriminado desses fungicidas levaram ao surgimento de cepas resistentes a eles (BARALDI et al., 2003). Logo, estudos vêm sendo realizados a fim de solucionar problemas de perda pós-colheita empregando micro-organismos capazes de realizar o biocontrole de fungos micotoxigênicos e/ou deteriorantes de alimentos.

Santos et al., (2009) descreveram uma nova toxina de *Pichia membranifaciens* CYC 1086 cuja atividade *killer* foi testada, juntamente com outra cepa previamente estudada de *P. membranifaciens* CYC 1106, contra vários micro-organismos relacionados à problemas agrônômicos a fim de avaliar seu possível potencial biotecnológico.

Como resultado, todas as cepas de *Brettanomyces bruxellensis*, levedura contaminante do vinho, se mostraram sensíveis à *P. membranifaciens* CYC 1086, enquanto que nenhuma cepa de *S. cerevisiae* isolada de processos fermentativos do



vinho foi afetada pela toxina. Entretanto, fungos filamentosos foram mais resistentes a esta toxina; nenhuma cepa de *Botrytis cinerea* e apenas duas de *Fusarium proliferatum* mostraram sensibilidade, enquanto que a toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106 se mostrou efetiva contra *B. cinerea* conforme relatado por Santos, Sánchez e Marquina (2004).

Calegari, et al (2012) indicaram a possibilidade de aplicação no controle pós-colheita de maçãs após relatarem ótima eficiência no controle *in vivo* de *P. expansum*, ao submeterem os frutos artificialmente infectados, em tratamento com leveduras *Hansenula wingei* e *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> aplicadas em sinergismo com o fungicida Tecto® em baixa dosagem.

Próximo de sua descoberta, linhagens *killer* contaminavam o processo fermentativo de elaboração do vinho, causando variações sensoriais no produto final, interferindo na qualidade. Tal fato levou pesquisadores a investigarem a possibilidade de “construir” cepas de leveduras *killer* a fim de serem utilizadas como culturas *starters*, benéficas na fermentação da cerveja e vinho (VONDREJS; JANDEROVÁ; VALASEK, 1996).

Diversos estudos demonstraram que leveduras fermentativas do vinho geneticamente modificadas, produtoras de diferentes toxinas, exibiram significativa capacidade antagônica contra potenciais contaminantes como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* e *Pichia* (BUSSEY, VERNET e SDICU, 1988; BOONE et al., 1990; SCHIMIT e SCHERNIKAU, 1997; SANTOS et al., 2009). Logo, o uso da tecnologia do DNA recombinante tornou possível o desenvolvimento/aprimoramento da capacidade *killer* em leveduras fermentadoras.

### 3.2 GÊNERO *Hansenula*

O gênero *Hansenula* possui exemplares com células esferóides, elipsoidais ou alongadas e em alguns casos, afuniladas. Os ascósporos são em forma de chapéu, saturno, semi-esferoidal ou esferoidal com borda. A reprodução assexuada é por brotamento multilateral e algumas espécies podem produzir pseudo-hifas e hifas verdadeiras (KURTZMAN; FELL, 1999).

Ashida et al. (1983) descreveram uma toxina *killer* (K9) produzida por *Hansenula mrakii* com propriedades superiores a outros gêneros relatados, como por exemplo, estabilidade em valores de pH entre 4,0-11,0 e termoestabilidade evidenciada pela manutenção da atividade após fervura por 3 minutos em pH 4,0, e à 100 °C por 10 minutos (TAKASUKA et al., 1995).

Toxinas *killer* de *H. mrakii* e *H. saturnus* foram purificadas anteriormente sendo suas massas moleculares e composição de aminoácidos similares; a toxina *killer* de *H. mrakii* é uma pequena proteína de 88 aminoácidos com 5 pontes dissulfeto (SELVAKUMAR et al., 2006), possui ponto isoelétrico (pI) 9,1 e massa molar de 10.7 kDa, enquanto que a toxina de *H. saturnus* é uma proteína de 87 aminoácidos, possui massa molar entre 8.5 - 9.0 kDa, e possui uma homologia de 87% com a toxina *killer* de *H. mrakii* (YAMAMOTO, 1986a; YAMAMOTO 1986b; TAKASUKA et al., 1995).

Lowes et al., (2000) inocularam *S. cerevisiae* e *C. krusei* em iogurte, juntamente com toxina heteróloga de *H. mrakii* purificada em duas diferentes concentrações, nas temperaturas de 10 e 20°C. Foi constatado o crescimento rápido dos inóculos no controle negativo nas duas temperaturas testadas, enquanto que nas amostras contendo toxina *killer*, todos os inóculos foram eliminados nas duas concentrações de toxina, em um período de 24h.

*C. krusei* tem sido classificada como patógeno de classe II por exibir altos níveis de resistência à fluconazol, entretanto foi eliminada com a toxina heteróloga de *H. mrakii*. A micocina exibe ampla ação de atividade contra espécies de levedura e possui boas características físico-químicas, incluindo estabilidade em amplo pH e temperatura, podendo ser utilizada, se necessário, como método alternativo contra infecções causadas por leveduras (LOWES et al., 2000).

## 4 METODOLOGIA

Trata-se de um trabalho de caráter científico envolvendo experimentos de biocontrole de fungos filamentosos e genética de fungos filamentosos, que foi realizado no período de março a novembro de 2015 no Laboratório de Micotoxinas na Universidade de São Paulo e no Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Londrina.

### 4.1 FUNGOS TESTES

*Aspergillus ochraceus* A152 e *Penicillium expansum* n. 2, previamente isolados de café e maçã (COELHO, 2005), foram identificados geneticamente (em nível molecular) para posteriormente serem testados frente ao efeito da toxina *killer* quanto à inibição da germinação de esporos.

Os fungos foram mantidos em Ágar Batata Dextrose - BDA inclinado a 4°C na ausência de luz.

#### 4.1.2 Extração de DNAr dos fungos filamentosos

As colônias fúngicas foram inoculadas em ágar YES e cultivadas por 3 dias em B.O.D a 25°C. Em seguida, um fragmento de micélio de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> foi recortado, o ágar removido, e o micélio transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 300 µL de PrepMan Ultra®. O microtubo foi agitado em vórtex por um minuto e colocado em banho de água a 100°C por 15 minutos e centrifugado por 7 minutos a 14000 rpm em temperatura ambiente. Após, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo de 1,5 mL e armazenado a -4°C.

#### 4.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a PCR foram utilizados microtubos de 0,2 mL. O fragmento da região ITS foi amplificado com os *primers* ITS1 e ITS4. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se no Quadro 1. A PCR foi realizada com 12,5 µL de PCR Master Mix, 6,5 µL de água Milli-Q e 2 µL de DNA (40 ng) e 2 µL (20 pmol) de cada iniciador para um volume final de 25 µL. O programa de amplificação incluiu uma desnaturação inicial (94°C por 3 min), seguido por 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento a 57°C, e extensão a 72°C por 1 min. Uma etapa de extensão final a 72°C por 5 min foi incluída ao final da amplificação.

Gene	Primer	Sequência do iniciador (5' - 3')	Referência
Internal Transcribed Spacer (ITS)	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCG	WHITE et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATAT	

**Quadro 1: Sequência dos *primers* utilizados na PCR.**

#### 4.1.4 Eletroforese do produto de PCR

Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel para verificação da amplificação. O gel de agarose foi preparado na concentração de 1,2% em solução de TBE (Tris Borato EDTA), acrescido de Sybr Safe. Para a aplicação das amostras nos poços do gel, 3 µL das amostras foram coradas com azul de bromofenol (2 µL). O gel foi submetido a 100 volts a 400 mA por 1 hora. Como referência, adicionou-se 6 µL de DNA Ladder 100 pb no primeiro poço do gel.

#### 4.1.5 Purificação dos produtos de PCR

A purificação do produto da reação de PCR teve como objetivo a remoção de *primers*, dNTPs, enzimas e sais dos produtos de PCR que pudessem interferir na

reação de sequenciamento. Para isso utilizou-se o kit QIAquick PCR purification, otimizado da seguinte forma: ao volume de 17  $\mu$ L do produto de PCR foi adicionado 100  $\mu$ L do Buffer PB – Binding Buffer (Tampão de Ligação) e todo conteúdo foi transferido para coluna que acompanha o kit, a qual foi deixada em repouso por um minuto, centrifugada a 13000 rpm por 1 minuto e descartada a fase inferior do microtubo. Após, foi adicionado 700  $\mu$ L de Buffer PE – Wash Buffer (Tampão de Lavagem), foi deixado em repouso por um minuto, centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto e descartado a fase inferior do microtubo. O conjunto foi centrifugado novamente a 13.000 rpm por 3 minutos para remoção total do tampão de lavagem. Para eluição, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionando 20  $\mu$ L de EB – Elution Buffer (Tampão de Eluição) no centro da coluna, deixado por 1 minuto em repouso e centrifugado 13.000 rpm por 1 minuto.

#### 4.1.6 Sequenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram sequenciados utilizando os primers usados na amplificação, seguindo o protocolo do Kit *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. As reações ocorreram em um sequenciador 3100 DNA.

#### 4.1.7 Edição, avaliação da qualidade e análise das sequências geradas

As sequências consenso foram obtidas utilizando o programa Sequencher versão 4.1.4. Estas, por sua vez, foram pesquisadas em BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) como forma de confirmar premissas iniciais.

## 4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *Hansenula wingei*

A levedura *Hansenula wingei* (AM2-2) *killer* positiva, previamente isolada de milho (GASPERINI, 2011), e mantida em ágar Meio Para Levedura - MPL (glicose

2%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1%, sulfato de amônio 0,5%, ágar 1,8%, acidificado com ácido tartárico 10% até pH 4,5) a 7 °C, foi reativada em Caldo MPL para obtenção do extrato bruto.

Para tanto, uma alçada da levedura foi transferida para 25 mL de Caldo MPL, seguido de incubação a 25°C por 24h. Em seguida, um inóculo de aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células, previamente padronizado na Escala número 1 de MacFarland, foi transferido para 17 erlenmeyers contendo 50 mL de Caldo MPL (totalizando 850 mL de cultivo) e incubados a 25°C por 96h em cultivo estático (SIMER, 2013). Após incubação, o cultivo foi centrifugado por 15 min a 10.000 rpm e filtrado em membrana de 0,20 µm para remoção das células (COELHO, 2005).

#### 4.1.3 Sistema de ultrafiltração

O extrato bruto (700 mL) foi submetido à duas etapas consecutivas de ultrafiltração, utilizando membranas de celulose de exclusão molecular de 30 e 10 kDa, conforme descrito por Coelho (2005). O sistema possibilitou a obtenção de três frações, denominadas Fração 1 (contendo moléculas de massa molecular maior que 30 kDa), Fração 2 (contendo moléculas de massa molar entre 10 e 30 kDa), e Fração 3 (moléculas menores que 10 kDa). As Frações 1 e 2 foram concentradas 14 e 13 vezes. Uma parte do extrato bruto foi reservada para o ensaio antifúngico.

#### 4.1.4 Atividade antifúngica

Um volume de 1,0 mL das frações obtidas na seção 4.1.3 foi distribuído em 3 tubos de ensaio contendo 1,0 mL de Caldo MPL. Paralelamente, utilizou-se o mesmo volume de extrato bruto como controle positivo e água destilada estéril como controle negativo.

A seguir, foram inoculados  $10^5$  esporos dos fungos a serem testados (suspensos em Tween 80 e padronizados em câmara de Neubauer). Após

incubação a 25°C/12 horas, os tubos foram submetidos à centrifugação (10.000 rpm/10 minutos) e 90% do sobrenadante descartado.

Após ressuspensão do pellet em volume reduzido (aproximadamente 200 µL), realizou-se a determinação da porcentagem dos esporos germinados em lâmina (CHEN et al., 1999). O ensaio antifúngico foi realizado 3 vezes, sendo que em cada repetição os tratamentos foram analisados em triplicata.

A porcentagem dos esporos germinados nas frações foi calculada conforme a fórmula a seguir:

$$X = \frac{100 \times \text{média esporos germinados na fração}}{\text{média esporos germinados no controle}}$$

**Equação 1 Cálculo determinação de esporos no tratamento**

Onde X corresponde a porcentagem de esporos que germinaram no tratamento.

Para determinar a porcentagem de inibição (Y), utilizou-se a fórmula:

$$Y = 100\% \text{ inibição} - X.$$

#### 4.1.6 Tratamento dos dados

As médias dos resultados encontrados nos ensaios antifúngicos foram analisadas estatisticamente por meio do Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), pelo programa BioEstat 5.3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A taxonomia de fungos filamentosos baseia-se, tradicionalmente, na análise qualitativa de sua morfologia e perfis bioquímicos. No entanto, variações na interpretação morfológica podem ocorrer, resultando em esquemas taxonômicos discutíveis (SAMSON et al., 2004). Desta forma, as ferramentas moleculares seriam as mais indicadas para a caracterização de fungos.

O sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal dos fungos testes *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* foram analisados em banco de dados *online*, resultando em 99% de similaridade (Figuras 1 e 2).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
876 bits(474)	0.0	488/494(99%)	4/494(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGCGGAAGGATCATTACTGAGTAAGGGTCCCTCGGGGCCAACCTCCCACCCGTGTATA			60
Sbjct 1	CTGCGGAAGGATCATTACTGAGTAAGGGTCCCTCGGGGCCAACCTCCCACCCGTGTATA			60
Query 61	CCGTACCTTGTGCTTGGGGCGAGCCCGCCCCCTTTTCTTAGGGGGGCACAGCGCTCGC			120
Sbjct 61	CCGTACCTTGTGCTTGGGGCGAGCCCGCCCCCTTTTCTTAGGGGGGCACAGCGCTCGC			120
Query 121	CGGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTTTGTCGTCTGAGTCGATTGTATCGCAAT			180
Sbjct 121	CGGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTTTGTCGTCTGAGTCGATTGTATCGCAAT			180
Query 181	CAGTTAAACCTTTCATCAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAA-GCAGCGAAA			239
Sbjct 181	CAGTTAAACCTTTCACAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA			240
Query 240	TGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTG-ACGCACATTG			298
Sbjct 241	TGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG			300
Query 299	CACCCCTGGTATTCGGGGGGTATGCGTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC-CAAGCACGG			357
Sbjct 301	CACCCCTGGTATTCGGGGGGTATGCGTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGG			360
Query 358	CTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCCGGGGACGGGCCGAAAGGCAGC-GCGGCACCG			416
Sbjct 361	CTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCCGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGCACCG			420
Query 417	CGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACACCGCTCTTGTAGGCCCGCCGGCTGC			476
Sbjct 421	CGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACACCGCTCTTGTAGGCCCGCCGGCTGC			480
Query 477	TGGCCGACGCTGAA			490
Sbjct 481	TGGCCGACGCTGAA			494

Figura 1: Alinhamento do sequenciamento da região ITS de *Aspergillus ochraceus* com banco de dados *online*.



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1057 bits(572)	0.0	592/600(99%)	7/600(1%)	Plus/Plus
Query 1	ACTAGTGATTTCCGTAGGTGTTCTCGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGG--CCTCTGGG			58
Sbjct 1	ACTAGTGATTTCCGTAGGTGTTCTCGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGG			60
Query 59	TCCAACCTCCCACCCGTGTTTATATTACCTTGTGCTTCGGCGCGCCCG-CTAAACTGGC			117
Sbjct 61	TCCAACCTCCCACCCGTGTTTATATTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTAAACTGGC			120
Query 118	CGCCGGGGGGCTTACGCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTG			177
Sbjct 121	CGCCGGGGGGCTTACGCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTG			180
Query 178	ATGATTGAAG-CTGAGTGAATATATATATTATTTATAACTTTCAACAAC-GATCTCTGG			235
Sbjct 181	ATGATTGAAGTCTGAGTGAATATATATATTATTTATAACTTTCAACAACGGATCTCTGG			240
Query 236	TTCCGGCATC-ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGT			294
Sbjct 241	TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGT			300
Query 295	GAATCATCGAGTCTATGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCCTGTC			354
Sbjct 301	GAATCATCGAGTCTATGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCCTGTC			360
Query 355	CGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCCCGATCTCCG			414
Sbjct 361	CGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCCCGATCTCCG			420
Query 415	GGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTT			474
Sbjct 421	GGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTT			480
Query 475	GTCAACCGCTCTGTAGGCCCGGCGGCTTGCCGATCAACCCTAATTTTATCCAGGTT			534
Sbjct 481	GTCAACCGCTCTGTAGGCCCGGCGGCTTGCCGATCAACCCTAATTTTATCCAGGTT			540
Query 535	GTCTCGGAT-AGGTAGGGATACCCGCTGAACCTATGCATATCAATAAGCGGAGGAAATC			593
Sbjct 541	GTCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTATGCATATCAATAAGCGGAGGAAATC			600

**Figura 2: Alinhamento do sequenciamento da região ITS de *Penicillium expansum* com banco de dados *online*.**

As técnicas moleculares têm apresentado expressivo progresso na taxonomia de fungos, agrupamentos e divisões de reinos.

Reis et al., (2012) isolaram e identificaram micobiota de castanhas do Brasil utilizando uma abordagem polifásica. Além da caracterização morfológica, a produção de metabólitos secundários e sequenciamento do DNA ribossomal das regiões ITS,  $\beta$ -tubulina e calmodulina foram utilizados para confirmação. Os gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. representaram 4 e 16% dos isolados.

Para estudos com enfoque principal na taxonomia e ecologia de fungos, a abordagem polifásica é a mais recomendada pois combina várias informações acerca da identidade dos micro-organismos. Entretanto, para confirmação da identificação morfológica, o sequenciamento da região ITS se mostra eficaz.

Para o ensaio antifúngico, o extrato bruto submetido ao sistema de ultrafiltração foi separado em 3 frações (1: maior que 30 kDa, 2: entre 10 e 30 kDa e 3: menor que 10 kDa).

Conforme a tabela 4, pode-se observar que a porcentagem de esporos germinados nas frações 1 (> 30 kDa) e controle positivo (extrato bruto) não diferiu entre si ( $p > 0,05$ ), embora a primeira fração tenha sido um pouco mais eficaz. Tal fato poderia ser explicado pela ressuspensão da fração em 50 mL de água destilada estéril, para retirada das moléculas da membrana, o que concentrou o extrato bruto em cerca de 14 vezes.

Embora as frações 2 e 3 tenham diferido significativamente entre si e do controle negativo ( $P < 0,05$ ), observou-se que mais de 50% dos esporos de ambos os fungos germinaram na presença destas.

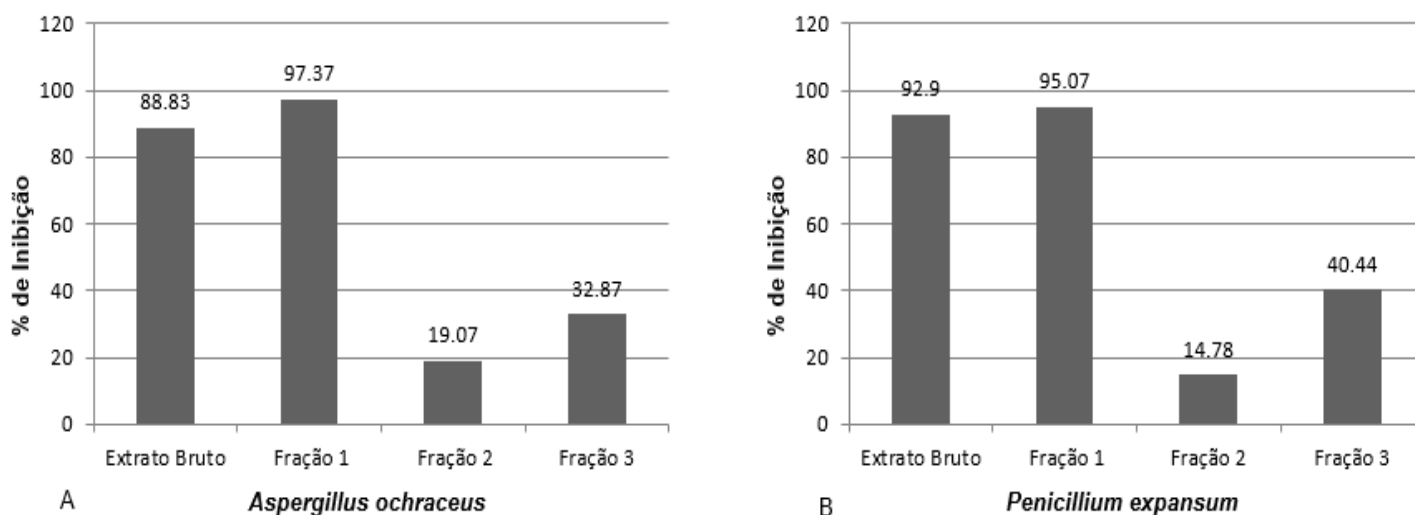
**Tabela 4: Atividade antifúngica realizada com as frações obtidas após a ultrafiltração do extrato bruto.**

Tratamento	Germinação de esporos (%)	
	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. expansum</i>
Controle negativo (água)	88,56±4,07 <sup>d</sup>	97,00±1,87 <sup>d</sup>
Extrato Bruto	9,89±5,82 <sup>a</sup>	6,89±6,39 <sup>a</sup>
1 (> 30 kDa)	2,33±2,24 <sup>a</sup>	4,78±4,89 <sup>a</sup>
2 (> 10 kDa)	71,67±6,02 <sup>c</sup>	82,67±4,09 <sup>c</sup>
3 (< 10 kDa)	59,44±13,04 <sup>b</sup>	57,78±10,47 <sup>b</sup>

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

A Figura 4 exibe a porcentagem (%) de inibição da germinação de esporos dos fungos filamentosos, apresentando uma relação inversa entre inibição e germinação de esporos, ou seja, a maior porcentagem de inibição indica menor germinação de esporos.

De acordo com a Figura 3, a toxina *killer* de *H. wingei* foi detectada na fração 1, que mostrou ser tão eficiente quanto o Extrato Bruto na inibição da germinação dos esporos de *A. ochraceus*, quando comparado com *P. expansum*. Entretanto, ambos mostraram sensibilidade à toxina *killer*. As demais frações não apresentaram resultados satisfatórios na inibição fúngica, cujos valores mostraram menos da metade da eficiência do extrato bruto, usado como controle positivo.



**Figura 3: Porcentagens de inibição da germinação de esporos de *A. ochraceus* e *P. expansum*.**

Com base na tabela 4 e figura 4, o processo de ultrafiltração não foi eficiente na purificação parcial da toxina *killer* de *H. wingei*, provavelmente devido ao fato de esta toxina possuir peso molecular maior que 30 kDa. Por outro lado, os compostos com peso molecular < que 30 kDa foram eliminados, diminuindo assim a presença de uma parte de interferentes no meio, e conseqüentemente aumentando a atuação contra os fungos, quando comparado com o extrato bruto.

A toxina *killer* > 30 kDa produzida por *Hansenula wingei* neste trabalho diferiu daquelas relatadas por outros pesquisadores em leveduras do mesmo gênero, como por exemplo as toxinas *killer* de 10.7 kDa de *H. mrakii* (SELVAKUMAR et al., 2006), e de 8.5 - 9.0 kDa de *H. saturnus*. Apesar de apresentarem tamanhos diferentes, os autores relataram homologia de 87% entre as duas toxinas (YAMAMOTO, 1986a; YAMAMOTO 1986b; TAKASUKA et al., 1995).

Por outro lado, Andrade (2011) caracterizou uma toxina *killer* de *Kodamaea ohmeri* ES92 como uma glicoproteína de massa molecular maior que 30 kDa, ao passo que a toxina de *Pichia anomala* NCYC 432 foi determinada em 47 kDa (IZGU; ALTINBAY; ACUN, 2006). Toxinas *killer* possuem variadas massas moleculares que variam entre gêneros e espécies, sendo seu tamanho determinado pelos tipos de resíduos monossacarídicos que as constitui.

A atividade de  $\beta$ -glucanases produzidas por leveduras tem sido relatada em diversos gêneros: *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* e *Saccharomyces* (DEL REY et al., 1979, SALIGKARIAS; GRAVANIS; EPTONA, 2002, BAR-SHIMON et al., 2004).

Yamamoto (1986b), em seu estudo, mostrou que toxina *killer* de *H. mrakii*, codificada por genes cromossomais, tem como sítio de ligação  $\beta$ -1,3-glucana,

principal constituinte da parede celular fúngica, e quando ligada causava danos à permeabilidade, tornando-a osmoticamente frágil e defeituosa, resultando em morte celular.

As proteínas *killer* do gênero *Hansenula*, particularmente, possuem estabilidade em ampla faixa de pH (4,0-10,0) e manutenção da atividade à 100°C (ASHIDA et al., 1983), além de ampla ação contra leveduras patógeno-oportunistas do gênero *Candida* spp. (HODGSON; BUTTON; WALKER, 1995).

Em estudo realizado por Simer (2013), *H. wingei* (AM2<sup>2</sup>) mostrou-se *killer* positiva perante as leveduras sensíveis de referência *Candida glabrata* NCYC 366, *C. albicans* 12A e *Pichia kluyveri* CAY-15. O fato de atuar contra mais de uma levedura sensível, sugere-se a possibilidade da levedura em questão ser capaz de produzir uma toxina *killer* com amplo espectro de ação, ou até mesmo estar associado com a produção de mais de uma toxina *killer*, a exemplo de toxinas K1, K2 e K28 produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* (SCHMITT, BREINING, 2002).

Brock (1965), relatou atividade de duas exo-hidrolases ( $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanases) produzidas por *H. wingei*. Este fato, associado às informações da literatura, pressupõe sugerir que a toxina de *H. wingei* possa estar associada a uma  $\beta$ -glucanase com peso molecular maior que 30 kDa uma vez que a análise da sequência de aminoácidos da toxina K5 produzida por *P. anomala* foi comparada com a de exo- $\beta$ -1,3-glucanase, resultando em uma homologia de 100% (IZGU; ALTINBAY, 2004).

## 6 CONCLUSÃO

O sequenciamento da região ITS de *A. ochraceus* e *P. expansum* foi eficiente na confirmação das premissas iniciais baseadas na identificação morfológica.

O cultivo de *H. wingei* em caldo de cultura a 25°C por 96h resultou em produção de toxina *killer* e quando submetida ao sistema de ultrafiltração, foi possível a separação deste extrato bruto em frações de diferentes massas moleculares (moléculas maiores que 30 kDa, entre 30 e 10 kDa e menores que 10 kDa).

A análise das frações obtidas quanto à eficiência na inibição da germinação de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* se mostrou eficiente com o controle positivo (extrato bruto) e fração 1 (> 30 kDa).

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, Marina L. **Caracterização e purificação parcial da toxina *killer* produzida pela levedura *Kodamaea ohmeri* ES92**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

ASHIDA, T. et al. New *killer* toxin of *Hansenula mrakii*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 47, p. 2953–2955, 1983.

BARALDI, E. et al. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. **Plant Pathology**, v. 52, p. 362-370, 2003

BAR-SHIMON, M. et al. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, v. 45, n. 3, p. 140-148, 2004.

BEVAN, E.A.; MAKOWER, M. **The physiological basis of the *killer*-character in yeast**. In: Proc. Int. Congr. Genet., 1963.

BOONE, C. et al. Yeast *killer* toxin: site-directed mutations implicate the precursor protein as the immunity component. **Cell** v. 46, p. 105–113, 1986.

BROCK, Thomas D. Biochemical and cellular changes occurring during conjugation in *Hansenula wingei*. **Journal of Bacteriology**. v. 90, n. 4, p. 1019-1025, 1995.

BUSSEY, H.; VERNET, T.; SDICU, A.M. Mutual antagonism among *killer* yeasts: competition between K1 and K2 *killers* and a novel cDNA-based K1-K2 *killer* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Can. J. Microbiol.** v. 34, p. 38-44, 1988.

CALEGARI, R. P.; PORTES, C. S.; GASPERINI, A. M.; HASHIMOTO, E. H.; COELHO, A. R. **Estudo do sinergismo entre leveduras antagonistas e fungicida em baixa dosagem no controle *in vivo* de *Penicillium expansum***. Simpósio em Tecnologia Química, Set. 2012.

CALEGARI, Rubens P. et al. **Biocontrole de mofo branco e tombamento e murcha de esclerócio por levedura *killer***. In: Simpósio Brasileiro do Mofo Branco, Londrina, 2014.

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

CHEN Z. et al. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microb**. v. 65, n. 3, p. 1320-1324, 1999.

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

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

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. 2015. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_09\\_11\\_10\\_42\\_03\\_boletim\\_graos\\_setembro\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_11_10_42_03_boletim_graos_setembro_2015.pdf)>. Acesso em: 30 out. 2015.

DEL REY, Francisco et al., Synthesis of 1,3- $\beta$ -glucanases in *Saccharomyces cerevisiae* during the mitotic cycle, mating and sporulation. **Journal of Bacteriology**. v. 139, n. 3, p. 924-931, 1979.

FIEIRA, C. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 33, p. 40-46, 2013.

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

IZGU, Fatih; ALTINBAY, Demet; ACUN, Tolga. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification characterization and its exo- $\beta$ -1,3-glucanase activity. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 669-676, 2006.

IZGU, Fatih; ALTINBAY, Demet. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with  $\alpha$ -exo- $\beta$ -1,3-glucanase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 68, n. 3, p. 685-693, 2004.

KIMURA, T. et al. Isolation and nucleotide sequences of the genes encoding *killer* toxins from *Hansenula mrakii* and *H. saturnus*. **GENE.** v. 137, p. 265-270, 1993.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts – A taxonomic study.** 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 1999.

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

LOWES, K.F. et al. Prevention of Yeast Spoilage in Feed and Food by the Mycocin HMK. Appl. **Environ. Microbiol.** v. 66, p. 1066-1076, 2000.

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

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

MIDDELBEEK, E. J.; van de Laar H. H.; Hermans J.M., Stumm C.; Vogels G.D. Physiological conditions affecting the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to a *Pichia kluyveri* *killer* toxin and energy requirement for toxin action. **Antonie van Leeuwenhoek.** v. 46, p. 483–497, 1980.

MIGUEL, Tatiana Á. **Avaliação dos efeitos da fertilização nitrogenada (uréia e uréia com NBPT) e do fungicida MAXIM – XL na produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides*.** 2005. 114f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

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

REIS, T. A. et al., Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **International Journal of Food Microbiology.** v. 159, p. 61-68, 2012.



SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTONA, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182. **Biological Control**, v. 25, n. 2, p. 151-161, 2002.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Med. Mycol.**, v. 44, p. 133-148, 2006.

SANTOS, A. et al. (1→6)-b-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, p. 1809–1813, 2000.

SANTOS, A. et al. PMKT2, a new *killer* toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. **Microbiology**. v. 155, p. 624-634, 2009.

SANTOS, A.; SÁNCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**. v. 159, p. 331-338, 2004.

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

SCHMITT, Manfred J.; SCHERNIKAU, G. Construction of a cDNA based K1/K2/K28 triple *killer* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technol. Biotechnol.** v. 35, p. 281-285, 1997.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – SEAB.

Fruticultura. 2015. Disponível em:

<[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura\\_2014\\_15.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2014_15.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2015.

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

SOARES, Giselle A. M.; SATO, Hélia H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. **Braz. J. Microbiol.** v. 31, n. 4, p. 291-297, 2000.

STOSCHECK, C. M.; In **Methods in Enzymology**; Deutscher, M. P., Ed.; Academic Press Inc.; New York, 1990.

TAKASUKA, T. et al. Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell. Mol. Biol.** v. 41, p. 575–581, 1995.

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

WANG, X. et al. Purification, characterization and gene cloning of the *killer* toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. **Microbiological Research.** v. 167, p. 558-563, 2012.

YAMAMOTO, T. et al. Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*. **FEBS Lett.** v. 195, p. 253-257, jan. 1996a.

YAMAMOTO, T. et al. *Killer* toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. **FEBS Lett.** v. 197, p. 50–54, mar. 1986b.

YOUNG, T.W. The genetic manipulation of *killer* character into brewing yeasts. **J. Inst. Brew.** v. 87, p. 292-295, 1981.

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

ZHU, H.; BUSSEY, H. The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 55, p. 2105-2107, 1989.

ZORZETE, Patrícia. **Fungos, micotoxinas e fitoalexina em variedades de amendoim do plantio ao armazenamento.** 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.