



Estudo da interação química entre linhagens de leveduras antagônicas ao fitopatógeno *Penicillium digitatum* utilizando a ferramenta de Imageamento por Ionização e Dessorção por Eletrospray (DESI-IMS)

Aluno: Caroline Rocha Vaz

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Fábio Augusto (IQ-UNICAMP)

1. Introdução

O estudo das relações entre micro-organismos que ao liberarem substâncias podem inibir ou dificultar o crescimento de um segundo, tem potencial para ser de grande relevância econômica, uma vez que já foi observado interações, como por exemplo, em colônias de fungos como *Penicillium digitatum* e *P. italicum* (responsáveis por adoecerem frutas como a laranja levando uma redução na produtividade desse alimento) que tem seu crescimento inibido na presença de algumas leveduras.

A citricultura tem contribuído de forma significativa para o desenvolvimento do Brasil. Acredita-se que a cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos em solo brasileiro, e por isso, o país é responsável por 50% da produção mundial de suco de laranja, exportando 98% do que produz e conseguindo 85% de participação no mercado mundial [1]. Este cultivo, entretanto, enfrenta diversas adversidades no país, podendo destacar os problemas relativos a doenças de pós-colheita responsáveis por grande parte das perdas no setor [2]. A perda média global em regiões da Europa, América do Norte e Oceania é de cerca de 29%, comparada a uma média de cerca de 38% para Ásia, África e América Latina. Assim, para minimizar as perdas, os devidos esforços precisam ser por meio de um melhor desenvolvimento da compreensão da biologia e da etiologia da doença [3].

Nos últimos anos, diversos micro-organismos foram utilizados como agentes de biocontrole no combate de doenças de pós colheita utilizando tanto metabólitos liberados no meio de cultura quanto voláteis [4]. Esses agentes tornaram-se componentes de sistemas integrados de proteção de culturas para o controle de patógenos fúngicos economicamente importantes [5]. O estudo de diversos micro-organismos se deve a esses se apresentarem altamente eficientes na redução da infecção e produção de micotoxinas por diferentes patógenos fúngicos, tanto no campo quanto nas fases pós-colheita [4-6]. Em alguns desses estudos, foram investigados a variação no potencial inibitório de leveduras nas pragas frente a variações como pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, dentre outras. Ademais, os mecanismos de ação fungicida desses micro-organismos têm sido explicados principalmente com relação a produção de enzimas hidrolíticas, competição por espaço e nutrientes, produção de toxina killer, indução de resistência ao hospedeiro, produção de sideróforos e antibióticos, dentre outros [7-9].

Este projeto tem como fim, estudar a interação química entre linhagens de leveduras antagônicas ao *Penicillium digitatum* através do uso de Imageamento por Ionização e Dessorção por Eletrospray (DESI-IMS). O imageamento por espectrometria de massas (MSI) é muito eficiente no que se refere ao estudo de compostos biológicos. Nesta técnica a habilidade de visualizar simultaneamente múltiplas distribuições moleculares ao longo da superfície de uma amostra sem a necessidade de marcadores químicos ou anticorpos é a principal vantagem. Não são necessárias etapas de extração e homogeneização durante o preparo da amostra, o que resultariam na perda da relação espacial nas amostras estudadas [10].

A Ionização e Dessorção por Eletrospray (DESI, do inglês Desorption Electro spray Ionization) é uma técnica recente e tem sido considerada uma ótima opção



para análises *in situ*, em tempo real e que possui baixo consumo de amostra, sendo uma excelente opção dentre as técnicas de ionização ambiente. A técnica trata-se de uma adaptação da ionização por Electrospray (ESI) na qual o spray de solvente eletricamente carregado é direcionado para a superfície da amostra levando a solubilização do analito [10,11]. No caso das amostras sólidas, é possível serem analisadas diretamente, já as líquidas devem ser suportadas em algum material e as amostras gasosas em alguma superfície sólida para que possam ser analisadas [12].

Dentre as muitas áreas de estudo que DESI-MS pode ser aplicado, o estudo de macromoléculas produzidas biologicamente tem ganhado grande destaque uma vez que consegue analisar moléculas de alto peso molecular sem dificuldades. Um desses estudos envolvendo esses tipos de compostos é o envolvendo a inibição do crescimento de micro-organismos por influência de um segundo micro-organismo [10].

2 Resultados

2.1 Seleção de Material Biológico a ser utilizado

Tanto as linhagens utilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* (ACBL-52) quanto de *Penicillium digitatum* foram cultivados em meio de cultura agar batata dextrose (previamente auto clavado) e cultivados em estufa à 25°C, retirados após 3 dias (no caso das leveduras *S. cerevisiae*) e 6 dias (para os fungos *P. digitatum*), sendo posteriormente refrigerados à aproximadamente 3°C.

2.2 Otimização das condições de cultivo e co-cultivo dos micro-organismos estudados

O estudo de otimização foi realizado através do método de Döhlert ou Matriz Döhlert bastante útil e atrativa que permite avaliar variáveis consideradas mais importantes, ou seja, que possuem efeitos mais pronunciados em um número maior de pontos do espaço estudado. Tendo em vista as variáveis de estudo (concentração de microrganismos, dias de crescimento, temperatura) e os valores de interesse para cada uma dessas variáveis (descrito na Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3), aplicou-se o método de Döhlert obtendo o planejamento representado na Tabela 4.

Tabela 1. Variação na concentração de microrganismos.

Concentração de Levedura	Concentração de Fungos
10 ⁶ UFC*	A concentração manteve-se constante em aproximadamente 10 ⁻⁴ UFC.
10 ⁷ UFC	
10 ⁸ UFC	
10 ⁹ UFC	

*UFC: Unidade formadora de colônias, unidade de medida usada para estimar o número de bactérias ou fungos viáveis.

Tabela 2. Variação no tempo em dias de crescimento dos microrganismos.

Analisar o crescimento após:	
1 dia	5 dias
2 dias	6 dias
3 dias	7 dias



4 dias	-
--------	---

Tabela 3. Variação na temperatura de cultivo.

Analisar o crescimento após:	
23°C	27°C
25°C	30°C

Tabela 4. Planejamento Doehlert das condições experimentais.

Planejamento			
Ensaio	Var01	Var02	Var03
1	1*10 ⁹	5.000	27
2	7,5*10 ⁸	7.000	27
3	7,5*10 ⁸	5.667	30
4	1*10 ⁶	5.000	27
5	2,5*10 ⁸	3.000	27
6	2,5*10 ⁸	4.333	24
7	7,5*10 ⁸	3.000	27
8	7,5*10 ⁸	4.333	24
9	2,5*10 ⁸	7.000	27
10	5*10 ⁸	6.333	24
11	2,5*10 ⁸	5.667	30
12	5*10 ⁸	3.667	30
13	5*10 ⁸	5.000	27
14	5*10 ⁸	5.000	27
15	5*10 ⁸	5.000	27

Onde Var01 é a variação na concentração de microrganismos, Var02 é a variação no tempo em dias de crescimento dos microrganismos temperatura e Var03 a variação na temperatura de cultivo.

De forma a facilitar a execução dos experimentos, decidiu-se iniciar os ensaios de menor temperatura avançando para as de maiores temperaturas progredindo na seguinte sequência.

Tabela 5. Sequência de ensaios realizados.

Primeira rodada de ensaios	
• Temperatura: 24°C	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ensaio 6 – Concentração: 2,5*10⁸ UFC, Tempo: 4 dias + 7,2h ○ Ensaio 8 – Concentração: 7,5*10⁸ UFC, Tempo: 4 dias + 7,2h ○ Ensaio 10 – Concentração: 5*10⁸ UFC, Tempo: 6 dias + 7,2h
Segunda rodada de ensaios	
• Temperatura: 27°C	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ensaio 1 – Concentração: 1*10⁹ UFC, Tempo: 5 dias



<ul style="list-style-type: none"> ○ Ensaio 2 – Concentração: $7,5 \cdot 10^8$ UFC, Tempo: 3 dias ○ Ensaio 4 – Concentração: $1 \cdot 10^6$ UFC, Tempo: 5 dias ○ Ensaio 5 – Concentração: $2,5 \cdot 10^8$ UFC, Tempo: 3 dias ○ Ensaio 7 – Concentração: $7,5 \cdot 10^8$ UFC, Tempo: 7 dias ○ Ensaio 9 – Concentração: $2,5 \cdot 10^8$ UFC, Tempo: 7 dias ○ Ensaio 13, Ensaio 14 e Ensaio 15 – Concentração: $5 \cdot 10^8$ UFC, Tempo: 5 dias
Terceira rodada de ensaios
<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura: 30°C <ul style="list-style-type: none"> ○ Ensaio 3 – Concentração: $7,5 \cdot 10^8$ UFC, Tempo: 5 dias + 14,4h ○ Ensaio 11 – Concentração: $2,5 \cdot 10^8$ UFC, Tempo: 5 dias + 14,4h ○ Ensaio 12 – Concentração: $5 \cdot 10^8$ UFC, Tempo: 3 dias + 14,4h

Para a primeira rodada de ensaios, ajustou-se a estufa para a temperatura requerida e preparou-se as soluções de leveduras nas devidas concentrações. As concentrações foram determinadas com o auxílio de um microscópio e uma câmara de Neubauer assim como descrito nos métodos. Da contagem de células obteve-se as seguintes concentrações:

Tabela 6. Sequência de ensaios realizados.

Ensaio 6	$2,3 \cdot 10^8$ UFC
Ensaio 8	$7,4 \cdot 10^8$ UFC
Ensaio 10	$4,8 \cdot 10^8$ UFC

Preparadas as soluções, estas foram repicadas em placas previamente preparadas com meio agar batata dextrose auto clavado, na presença da quantidade anteriormente citada de *P. digitatum*, encubadas na temperatura de interesse e retiradas após o tempo determinado descrito na Tabela 5. Através dos resultados obtidos nessa primeira rodada foi possível observar um maior desenvolvimento das populações de leveduras se comparadas aos fungos que pouco se desenvolveram, com exceção do Ensaio 10 que permaneceu mais dias em período de encubação. Em nenhum dos ensaios foi possível visualizar com clareza um alo de inibição entre as duas espécies de microrganismos.

Os mesmos procedimentos foram repetidos para a segunda rodada de ensaios, no entanto, devido à quebra do microscópio e ao recesso das atividades da universidade por conta da pandemia, não foi possível preparar as concentrações necessárias das leveduras que seriam utilizadas.

3. Discussões

Em decorrência da paralização das atividades presenciais e dos problemas com manutenção de equipamentos acima mencionados, não foi possível finalizar a coleta de dados planejada no cronograma experimental. Os resultados, mesmo que promissores, foram insuficientes para concluir de maneira concreta a eficácia do efeito fungicida dos metabólitos não voláteis produzidos pelos micro-organismos *Saccharomyces cerevisiae* na inibição do crescimento dos fungos *Penicillium digitatum*.

Ainda que não tenha sido possível a conclusão de acordo com o cronograma, por conta da importância que a citricultura possui na indústria agrícola brasileira e aos recursos, que se analisarmos com os outros existentes, possuem baixa toxicidade e um valor econômico relativamente interessante é válido retomar o estudo em projetos futuro.



4. Bibliografia

- [1] M.F. Neves, V.G. Trombin, Anuário Da Citricultura 2017, 2017.
- [2] M.F. Neves, V.G. Trombin, P. Milan, F.F. Lopes, F. Cressoni, R. Kalaki, O retrato da citricultura brasileira, 2010.
- [3] D. Spadaro, S. Droby, Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists, Trends Food Sci. Technol. 47 (2016) 39–49. [4] N. Hendel, L. Larous, L. Belbey, Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*, Int. Food Res. J. 23 (2016) 1725–1732.
- [4] M.G. Farbo, P.P. Urgeghe, S. Fiori, A. Marcello, S. Oggiano, V. Balmas, Z.U. Hassan, S. Jaoua, Q. Migheli, Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*, Int. J. Food Microbiol. 284 (2018) 1–10.
- [5] A. Carbó, R. Torres, N. Teixidó, J. Usall, A. Medina, N. Magan, Impact of climate change environmental conditions on the resilience of different formulations of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 on grapes, Lett. Appl. Microbiol. 67 (2018) 2–8.
- [6] H. Zhang, G.K. Mahunu, R. Castoria, Q. Yang, M.T. Apaliya, Recent developments in the enhancement of some postharvest biocontrol agents with unconventional chemicals compounds, Trends Food Sci. Technol. 78 (2018) 180–187.
- [7] L.P. Ferraz, T. Cunha, K.C. Kupper, Mecanismos de ação de isolados de leveduras envolvidos no biocontrole de *Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde em frutos cítricos, 3122 (2018) 1–11.
- [8] L.P. Ferraz, T. da Cunha, A.C. da Silva, K.C. Kupper, Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit, Microbiol. Res. 188–189 (2016) 72–79.
- [9] T. da Cunha, L.P. Ferraz, P.P. Wehr, K.C. Kupper, Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*, Int. J. Food Microbiol. 276 (2018) 20–27.
- [10] R. Augusti, M.N. Eberlin, L.G. De Oliveira, Direct Protocol for Ambient Mass Spectrometry Imaging on Agar Culture, (2015).
- [11] CHEN, H. W.; HU, B.; ZHANG, X. Principle and Application of Ambient Mass Spectrometry for Direct Analysis of Complex Samples. Chinese Journal of Analytical chemistry, v. 38, n. 8, p. 1069–1088, 2010.
- [12] LORDEIRO, R. A. Construção de uma fonte EASI-MS (easy ambient sonic-spray ionization) para análise direta de superfícies e sua aplicação em amostras de interesse forense. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.