

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Avaliação de Quitinase para o Controle de Fungos Filamentosos *in vitro*

Patrícia dos Santos<sup>1</sup>, Karine Cence<sup>1</sup>, Maira Zortea<sup>1</sup>, Jamile Zeni<sup>1</sup>, Maurício Moura da Silveira<sup>2</sup>, Denise Oliveira Guimarães<sup>3</sup>, Eunice Valduga<sup>1</sup>, Rogério Luis Cansian<sup>1</sup> e Geciane Toniazzo Backes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Depto. De Ciências Agrárias  
99709-910 Erechim – RS - E-mail: gtoniazzo@uricer.edu.br

<sup>2</sup>Universidade de Caxias do Sul (UCS), Instituto de Biotecnologia  
95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)  
27933-378, Macaé, RJ, Brasil.

### RESUMO

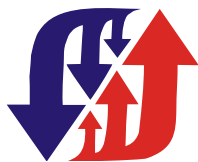
*As quitinases podem ser utilizadas como agentes no controle de fitopatógenos. O crescimento indesejado de fungos na superfície de salames é um grande desafio para as indústrias de alimentos, pois acarretam na baixa qualidade do produto. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação, in vitro, da quitinase comercial no controle de fungos. Os micro-organismos foram isolados de salame produzidos em um frigorífico de suínos localizado no Alto Uruguai Gaúcho. A concentração mínima inibitória foi determinada em sistema de micro diluição seriada, com concentrações de enzima entre 0 e 50%. Os micro-organismos isolados foram *Penicillium* e *Aspergillus* sp.. A quitinase comercial apresentou capacidade de retardar o crescimento dos fungos filamentosos sendo mais eficiente em maiores concentrações de enzima (50 e 40%) e menor concentração inicial de fungo ( $10^3$  esporos/mL). Sendo que o seu efeito com o passar das horas diminui conforme o crescimento fúngico aumenta.*

Palavras-chave: concentração inibitória mínima, salame, micro-organismos.

### INTRODUÇÃO

As quitinases são encontradas em fungos, leveduras, bactérias, plantas, insetos, e crustáceos e possuem diferentes funções em diversos organismos. A parede celular fúngica é composta por quitina,  $\beta$ -glucanas e mananas (SEVIOUR *et al.*, 1992). A quitina é o maior componente estrutural da parede celular da maioria dos fungos, sendo, susceptível a inúmeras espécies de bactérias, actinomicetos e fungos que podem agir como antagonistas devido à produção de enzimas quitinolíticas (SAHAI, 1993). As quitinases possuem uma dupla função durante a colonização dos fungos (COLLINGE *et al.*, 1993). Apresentam a capacidade de ataque direto à parede celular dos fungos, estas permitindo a libertação de oligo-N-acetilglucosaminas que funcionam como eliciadores na ativação de respostas relacionadas com a defesa em células de plantas (GOHEL *et al.*, 2006).

O crescimento indesejado de fungos na superfície de salames é um grande desafio para as indústrias de alimentos, visto que, limitam a troca de massa entre o produto e a sala de cura. Com a redução da saída de água o produto demora mais para atingir os limites de atividade de água estipulados. A presença de mofos é consequência natural do seu processo



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

tecnológico de fabricação (BRASIL, 2000). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação, *in vitro*, da quitinase comercial no controle de fungos isolados da superfície de salame.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os fungos filamentosos foram isolados de amostras de salame de um frigorífico de abate e industrialização de suínos localizado no Alto Uruguai Gaúcho pela técnica de *swab* (SWAB RÁPIDO 3M - 6432-6433) e identificados pela técnica de micro cultivo.

Os esporos dos fungos foram produzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio PDA. O meio foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Após resfriar o meio (45°C), inoculou-se em superfície os fungos, incubou-se por 7 dias à 28 °C até completa esporulação.

Os esporos foram recuperados da superfície do meio utilizando-se 30 mL de água destilada estéril contendo 0,2% de Tween 80 e cacos de porcelana (COSTA, 1996; PRADO, 2002). A solução adicionada sobre os esporos foi mantida sob agitação por 15 minutos. A suspensão obtida foi conservada a 4°C por até 30 dias.

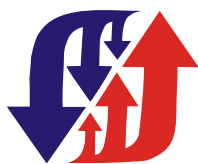
A quitinase (Sigma) foi diluída em tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0 a concentração de 1% (m/v). Em seguida foi realizada a avaliação da ação da quitinase no controle dos fungos utilizando o método da concentração inibitória mínima (CIM). Onde foi realizado em sistema de micro diluição seriada, a diluição da enzima variou entre 0 (controle negativo) e 50% de enzima (com oito repetições de cada concentração e cada tempo). Cada diluição recebeu 200µL de inóculo nas concentrações  $10^3$  e  $10^5$  esporos/mL. As microplacas foram incubadas a 25°C por até 115 horas. Para avaliar o crescimento (densidade ótica) e para determinar a CIM da enzima sobre o fungo, realizou-se a leitura da microplaca, utilizando-se o leitor automático de microplacas (Bio-Tec Instruments Inc., modelo EL800), acoplado em computador com programa Kcjunior, com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm. A inibição do crescimento foi determinada pela diferença entre as leituras realizadas nos diferentes tempos e 0 horas.

A análise estatística de comparação de médias para avaliar o efeito antifúngico dos dados das análises *in vitro*, realizou-se através do Teste de Tukey com 95% de confiança.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os micro-organismos isolados da superfície do produto cárneo curado foram *Penicillium nalgiovense* e *Aspergillus* sp. Cada um deles apresenta coloração e aspectos particulares, o *Penicillium nalgiovense* é um fungo de coloração branca aspergido sob as peças de salame e o *Aspergillus* sp. possui coloração preta.

Castro *et al.* (2000) relata a presença da cultura *starter* do *Penicillium nalgiovense* como sendo a responsável pelas mudanças ocorridas na maturação do produto e ele atua no bio-controle de fungos filamentosos de contaminação natural em câmaras de maturação de salames, as quais encontram-se a temperatura de 18°C e 80-60% de umidade relativa, apresentando desenvolvimento rápido e colonização quase completa das peças de salame. Assim considera-se que pelo risco envolvido na produção de micotoxinas por fungos filamentosos contaminantes a utilização da cultura *starter* se justifica pelo fator de proteção que oferece.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A presença dos fungos filamentosos contaminantes é um problema para a indústria, pois além de poderem ser produtores de toxinas, dificultam a desidratação e ainda o fungo de coloração preta causa o aparecimento de orifícios na tripa (MATOS, 2009; TERRA, 1998).

As Tabelas 1 e 2 apresentam a ação da quitinase sobre o crescimento celular do *Penicillium nalgiovense* e *Aspergillus sp.* na concentração  $10^3$  e  $10^5$  esporos/mL.

**Tabela 1:** Ação da quitinase sobre o crescimento celular do *Penicillium nalgiovense*.

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
	<b><math>10^3</math> esporos/mL</b>				
50%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$<0,01^{bD} \pm 0,01$	$0,25^{bC} \pm 0,05$	$0,42^{bB} \pm 0,05$	$0,84^{bA} \pm 0,03$
40%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$<0,01^{bD} \pm 0,01$	$0,25^{bC} \pm 0,05$	$0,43^{bB} \pm 0,04$	$0,84^{bA} \pm 0,03$
30%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$<0,01^{bD} \pm 0,01$	$0,19^{bC} \pm 0,01$	$0,43^{bB} \pm 0,09$	$0,92^{aA} \pm 0,02$
20%	$<0,01^{aE} \pm 0,01$	$0,11^{aD} \pm 0,02$	$0,17^{bC} \pm 0,03$	$0,43^{bB} \pm 0,05$	$0,95^{aA} \pm 0,01$
0	$<0,01^{aE} \pm 0,01$	$0,11^{aD} \pm 0,02$	$0,31^{aC} \pm 0,06$	$0,76^{aB} \pm 0,03$	$0,95^{aA} \pm 0,01$
	<b><math>10^5</math> esporos/mL</b>				
50%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,22^{bC} \pm 0,02$	$0,41^{dB} \pm 0,02$	$0,60^{dA} \pm 0,06$
40%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,23^{bC} \pm 0,06$	$0,42^{cdB} \pm 0,06$	$0,66^{cdA} \pm 0,02$
30%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,23^{bC} \pm 0,06$	$0,53^{bcB} \pm 0,06$	$0,71^{cA} \pm 0,03$
20%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,27^{bC} \pm 0,04$	$0,53^{bB} \pm 0,04$	$0,85^{bA} \pm 0,04$
0	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,43^{aC} \pm 0,03$	$1,07^{aB} \pm 0,03$	$1,38^{aA} \pm 0,03$

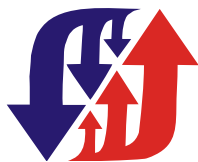
Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Conforme a Tabela 1, verifica-se que as concentrações de enzima retardaram o crescimento celular tanto com inóculo inicial de  $10^3$  como  $10^5$  esporos/mL, havendo diferença significativa entre as concentrações de enzima e o controle a partir de 72 h de incubação.

**Tabela 2:** Ação da quitinase sobre o crescimento celular do *Aspergillus sp.*

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
	<b><math>10^3</math> esporos/mL</b>				
50%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,12^{cC} \pm 0,01$	$0,51^{dB} \pm 0,09$	$0,92^{cA} \pm 0,07$	$1,08^{bA} \pm 0,09$
40%	$<0,01^{aE} \pm 0,01$	$0,12^{cD} \pm 0,01$	$0,65^{dC} \pm 0,06$	$0,95^{cB} \pm 0,02$	$1,08^{bA} \pm 0,09$
30%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,13^{bcC} \pm 0,02$	$0,78^{cB} \pm 0,03$	$1,04^{bA} \pm 0,04$	$1,04^{bA} \pm 0,06$
20%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,16^{bC} \pm 0,01$	$0,92^{bB} \pm 0,01$	$1,12^{bA} \pm 0,07$	$1,12^{bA} \pm 0,09$
0	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,29^{aC} \pm 0,05$	$1,00^{aB} \pm 0,04$	$1,25^{aA} \pm 0,08$	$1,36^{aA} \pm 0,08$
	<b><math>10^5</math> esporos/mL</b>				
50%	$<0,01^{aD} \pm 0,01$	$0,37^{bC} \pm 0,05$	$0,81^{cB} \pm 0,02$	$0,58^{dA} \pm 0,09$	$0,67^{cA} \pm 0,08$
40%	$<0,01^{aC} \pm 0,01$	$0,40^{bB} \pm 0,03$	$1,10^{bA} \pm 0,06$	$0,99^{cA} \pm 0,05$	$1,03^{bA} \pm 0,09$
30%	$<0,01^{aC} \pm 0,01$	$0,42^{bB} \pm 0,02$	$1,09^{bA} \pm 0,01$	$1,05^{bcA} \pm 0,06$	$1,11^{bA} \pm 0,05$
20%	$<0,01^{aC} \pm 0,01$	$0,52^{aB} \pm 0,04$	$1,11^{bA} \pm 0,02$	$1,14^{bA} \pm 0,03$	$1,18^{abA} \pm 0,06$
0	$<0,01^{aC} \pm 0,01$	$0,57^{aB} \pm 0,01$	$1,23^{aA} \pm 0,01$	$1,27^{aA} \pm 0,05$	$1,24^{aA} \pm 0,03$

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

De acordo com a Tabela 2, o controle do crescimento celular foi eficiente em todas as concentrações a partir de 48h de incubação, diferindo estatisticamente em relação ao controle. A concentração de 20% já demonstrou capacidade de retardar o crescimento, e em concentrações maiores a inibição foi maior, porém somente até 96h de incubação.

Comparando os resultados verifica-se que a quitinase mostrou-se mais eficiente no controle do fungo contaminante *Aspergillus* sp. em comparação com o *Penicillium nalgiovense*, inoculado pelas indústrias nas salas de cura, demonstrando a potencial aplicabilidade deste tipo de tratamento para o controle de fungos contaminantes de superfície de salame.

### CONCLUSÕES

A quitinase comercial apresentou capacidade de retardar o crescimento dos dois fungos filamentosos isolados da superfície de salame. Sendo mais eficiente em maiores concentrações de enzima (50 e 40%) e menor concentração inicial de fungo.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPERGS, a CAPES, ao CNPq e a URI Erechim pelo suporte financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brasil. 2000. Ministério da Agricultura. Secretaria da defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº. 22, de 31 de julho de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame Tipo Italiano. Publicado no Diário Oficial da União de 03/08/00.
- Castro LC, Luchese RH, Martins JFP. 2000. Effect of *Penicillium nalgiovense* starter culture on salami quality. *Ciencia Tecnol Alime* 20(1):40-46.
- Collinge DBK.M. Kragh JD, Mikkelsen KK, Nielsen U, Rasmussen VAD K. 1993. Plant chitinases. *Plant J* 3: 31-40.
- Costa JAV. 1996. Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz. 203f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afr J Biotechnol* (5):54-72.
- Matos CR. 2009. Parahidroxifenilsalicilamida e natamicina no controle de fungos na superfície de salames tipo Milano. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
- Prado FC. 2002. Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Sem piloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a partir do Bagaço de Mandioca. 81f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- Sahai AS, Manocha MS. 1993. Chitinase of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and hostparasite interactions. *FEMS Microbiol Rev* (11):317-338.
- Seviour R, Stasinopoulos S, Auer D, Gibbs P. 1992. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol* (12) 279-298.
- Terra NN. 1998. Apontamentos de tecnologia de carnes. São Leopoldo: Ed. UNISINOS.