

# Detoxificação de patulina por leveduras antagonistas a *Penicillium* spp

Ronaldo Maurício Levy<sup>1</sup> & Eliza Yoko Hirooka<sup>2</sup>

## Resumo

Com o intuito de avaliar a atividade detoxificadora sobre a patulina testaram-se 21 isolados de leveduras com atividade antagonista contra *Penicillium* spp n°18 isolado de maçã. Para o ensaio, o meio, contendo 588,4µg/100 ml de patulina, produzida em caldo de batata dextrosado a 25°C e extraída com acetato de etila, foi inoculado com leveduras e a concentração da toxina remanescente determinada após 15 dias por cromatografia de camada delgada. Seis cepas de leveduras (isolados n° 1, 2, 4, 9, 27 e 37) apresentaram atividade sobre patulina, cujo valor remanescente variara de 91,4 a 294,2µg/100 ml de patulina em relação a 588,4µg/100 ml do controle positivo. Os melhores resultados foram obtidos com os isolados n° 4 e 37 que atingiram níveis de redução de concentração de patulina de 85% e 75% respectivamente. A capacidade de detoxificação aliada à atividade antagonista em uma mesma levedura amplia ainda mais a aplicabilidade, vindo a constituir microrganismos promissores para futuros empregos.

**Palavras-chave:** detoxificação, leveduras, *Penicillium* spp.

LEVY, R. M.; HIROOKA, E. Y. Detoxificação de patulina por leveduras antagonistas a *Penicillium* spp. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde*, Londrina, v. 1, n. 1, p. 57-62, out. 1999.

## Introdução

O gênero *Penicillium* destaca entre os mofo que acometem produtos agrícolas submetidos à armazenagem a frio, com ênfase a *Penicillium expansum* produtor de patulina devido à deterioração dos frutos (Sanhueza, 1992), com conseqüente perdas substanciais na economia (Tavares, 1996).

A patulina consiste de uma micotoxina com caráter cancerígeno e teratogênico, que vem despertando interesse de órgãos responsáveis pelo controle de qualidade de maçãs e seus produtos, já que a sua presença indica entrada de frutos deteriorados no processamento (Moss, 1996; Syndeham, 1997). Considerando que a patulina é introduzida na alimentação humana, principalmente sob a forma de frutos *in natura* e suco de maçã (Scott, 1994) a Organização Mundial de Saúde (WHO), fixou o limite tolerável de patulina em suco de maçã em 50µg/l (Prieta *et al.*, 1994). Contudo, para a Associação Internacional de Suco de Frutas (AIJF) o limite tolerável de patulina em suco de maçã é de 50µg/l (Syndeham *et al.*, 1997). “Joint Expert Comittee on Food Additives” (JECFA), avaliaram efeito tóxico de patulina, propondo nível provisório de ingestão máxima tolerável diária de 0,4µg/Kg de peso corporal (FAO, 1996).

A patulina também é produzida por *Aspergillus clavatus*, *A. terreus*, *A. gingateus*, *Byssochlamys fulva*, *B. nivea*, *Penicillium patulum*, *P. griseofulvum*, *P. claviforme* e *P. roqueforti* (Engel & Teuber, 1984). Moss (1996) relatou intoxicação aguda com hemorragia cerebral fatal em gado que ingeriram malte contaminado com patulina produzida por *Aspergillus clavatus*.

Entre os indicativos promissores sobre controle de patógenos de pós colheita (Tavares, 1996), as leveduras vêm merecendo atenção especial, por ser inócua quanto à micotoxigenicidade, aliada à possibilidade detoxificadora sobre micotoxinas (Moss, 1996). No estudo preliminar conduzido com

<sup>1</sup> Docente do Curso de Engenharia de Alimentos (UNOPAR). Campus Universitário. Av. Paris, 675. Caixa Postal 401. CEP 86041-140. Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: ronylevy@sercomtel.com.br

<sup>2</sup> Docente do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos (UEL).

maçã inoculada com *P. expansum*, observou-se uma redução da concentração de patulina com a progressiva deterioração dos frutos, cujo fenômeno esteve relacionado com aumento da contagem de leveduras (Ross *et al.*, 1996). Por outro lado, em produtos fermentados como vinho e cidras, o conteúdo de patulina tornou-se nulo, com indício de degradação da toxina pelo processo (Moss, 1996).

Em vista aos fatos acima apresentados, o presente estudo propõe avaliar a atividade detoxificadora sobre a patulina, a partir de leveduras antagonistas a *Penicillium* spp. deteriorantes em maçãs.

## **Materiais e Métodos**

### **Leveduras antagonistas**

As leveduras estudadas consistiram de isolados obtidos de maçã (*Malus doméstica*), mamão (*Carica papaya*), pêra (*Pirus communis*), milho e respectiva ensilagem e fermento de pão, todas com atividade antagonista contra *Penicillium* spp (Levy *et al.*, 1999). Para o preparo de inóculo transferiu-se uma alçada de leveduras ativadas em caldo extrato de malte (MEB) para erlenmeyer de 125 ml, contendo 50 ml do mesmo meio e incubado a 25°C, até atingir absorvância de 0,3 a 600 nm (FEMTO, modelo 482).

### ***Penicillium* spp produtor de patulina**

No estudo, empregou-se *Penicillium* spp nº 18 obtido de maçã produtor de 588,4 µg/100 ml de patulina, fornecido gentilmente pelo Prof. Dr. Carlos Kmelmeier do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá

### **Produção e preparo de suspensão de patulina**

Para produção de patulina, inoculou-se 10<sup>5</sup> esporos/ml de *Penicillium* spp nº18, previamente contados em câmara de Neubauer, em frascos de erlenmeyer, contendo 25 ml de caldo de batata dextrosado – CBD – e incubados a 25°C em cultivo estático por 21 dias. A seguir o material foi filtrado através de papel de filtro qualitativo, e a patulina foi determinada pela cromatografia de camada delgada. O filtrado, contendo concentração conhecida de patulina, foi aliqotado em volumes de 25ml e mantidos a -20°C, até o preparo de suspensão de toxina a ser empregada no ensaio de detoxificação.

Para o preparo da suspensão de patulina, 25ml do filtrado de cultivo de *Penicillium* spp nº18 foi submetido ao processo de extração e clarificação, e a quantidade de patulina determinada por TLC. A seguir o extrato clarificado (100ml de benzeno – acetato de etila), contendo patulina, foi aliqotado em tubos de 200 x 2mm, contendo concentração de 588,4µg/100 mL de patulina secos a 40°C em banho maria, envoltos em papel alumínio e estocados a -20°C.

### **Degradação da patulina por leveduras antagonistas**

O ensaio, em duplicata consistiu de tubos contendo 58,84µg da película de patulina preparada, suspensa em 25 ml de caldo extrato de malte pH 4,42 e inoculado com 0,1 ml de cultivo de levedura padronizado. Os tubos em cultivo estático fora incubados a 25°C por 15 dias, juntamente com o controle negativo constituído de meio de cultura contendo patulina, porém sem o inóculo. Terminada a incubação imediatamente determinou-se o pH do cultivo e a concentração de patulina remanescente no cultivo.

### **Metodologia analítica**

#### *Determinação da concentração de patulina*

A determinação da patulina seguiu essencialmente a metodologia descrita em “Official Methods of Analysis-AOAC”, referente ao procedimento nº 974.18 (1990). O método consistiu na análise de patulina, empregando cromatografia de camada delgada, com limite de detecção de 20µg/l.

### *Preparo dos padrões*

A toxina adquirida em forma de película de 10mg (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES) foi dissolvida adicionando-se 1 ml de clorofórmio no frasco contendo o padrão. A seguir dividiu-se em 5 frascos, contendo alíquotas de 200µl cada e secos sob atmosfera de nitrogênio. Para a quantificação, a solução padrão diluída em etanol absoluto foi submetida a um espectro de ultravioleta, no comprimento de onda de absorção máxima da patulina (275 nm).

Os frascos, contendo resíduo seco, foram estocados a -20°C, envolto por papel alumínio.

### *Extração da patulina*

Para a extração procederam-se três partições, adicionando-se 25 ml de meio de cultivo ao mesmo volume de acetato de etila, em funil de separação de 250ml. Os extratos, correspondentes à fase superior do processo de partição foram combinados num béquer e desidratados, adicionado-se 10g de sulfato de sódio anidro e mantendo em repouso por 30 minutos. Os cristais de sulfato de Sódio foram lavados com 25ml de acetato de etila e o sobrenadante obtido combinado ao primeiro extrato. O volume final de 50 ml foi evaporado sob ar comprimido em banho maria a 40°C, para um volume inferior a 25 ml. A seguir, o extrato foi completado para 100 ml com benzeno e procedeu-se a clarificação em coluna sílica gel.

### *Clarificação do extrato em coluna cromatográfica*

A coluna de 500 x 10mm foi empacotada com 8,5g de sílica gel 60 G, 0.063-0.20 mesh (Merck). O extrato obtido foi introduzido no topo da coluna e eluído com 100 ml de benzeno-acetato de etila, na proporção de 75:25. O eluato foi evaporado até a secagem total, empregando-se ar comprimido e banho de vapor a 40°C. O resíduo redissolvido em 0.5 a 4.0 ml de clorofórmio, conforme a diluição requerida para a quantificação da patulina, foi utilizado para a cromatografia de camada delgada.

### *Cromatografia de camada delgada*

O extratos obtidos foram aplicados em placas de sílica gel 60 de (20 x 20cm) (Merck). Os “spots” consistiram de 5, 10, e 15 µl de extratos diluídos, aplicados paralelamente a 1, 3, 4, 7, 10, 15, e 20 µl de padrão contendo 18,389µg/ml de patulina, utilizando micropipetador com capacidade para 10 e 20µl (Gilson). As placas foram desenvolvidas em sistemas de solventes, utilizando tolueno-acetato de etila- ácido fórmico, na proporção de 5:4:1.

Terminada a corrida com solvente, as placas foram reveladas, pulverizando-se solução aquosa de hidrocloreto 3 metil 2 benzotialinona (MBTH) a 0,5%. Após a ativação em estufa a 130°C, durante 15 minutos, as placas foram analisadas sob luz ultravioleta (365 nm). A patulina foi caracterizada como pontos amarelo-marrom fluorescentes, apresentando Rf. de 0,47.

## **Resultados e Discussão**

A predominância de leveduras isoladas de frutos de maçãs condiz com os resultados apontados por Janisiewicz (1996), relatando que a superfície desta é colonizada por leveduras, podendo constituir futuros agentes antagonistas uma vez que sua presença indica o fenômeno de competição natural, pois tanto o fungo deteriorante quanto às leveduras participam do mesmo nicho ecológico (Singh & Faull, 1988). Baseados nos resultados da triagem contra *Penicillium* spp n° 1 (Levy *et al.*, 1999), foram selecionados 21 antagonistas empregando o sobrenadante de cultura. Os antagonistas foram testados empregando mais dois fungos testes, utilizando tanto o sobrenadante de cultura com cultura de células íntegras. Os dados indicaram que, quando empregou-se cultura de células íntegras, o número de leveduras antagonísticas foi menor tanto para o fungo teste n° 1 e n° 3, entretanto os halos de inibição foram mais

estáveis. Ênfase foi dada aos antagonistas n° 11 e 37 cujos halos permaneceram estáveis por 45 dias, indicando que podem ser aplicados em frutos a serem armazenados por longos períodos de tempo. As diferenças nos tamanhos dos halos, proporcionados por uma mesma levedura para diferentes isolados de *Penicillium* spp, empregando sobrenadante de cultura, indicam que os fungos testes possam pertencer a linhagens diferentes. No entanto, quando empregou-se cultura de células íntegras foi observado que as diferenças entre os isolados testes poderiam estar relacionadas com a patulina produzida pelos isolados de *Penicillium* spp, uma vez que já foi comprovada sua atividade antimicrobiana (Engel & Teuber, 1984).

Considerando que aliada à atividade anti-*Penicillium*, o ideal seria se os antagonistas fossem capazes de detoxificar metabólitos fúngicos, assim foi realizado novo ensaio para selecionar leveduras que apresentassem atividade detoxificadora sobre a patulina. Os dados na Tabela 1 indicam que dos 21 microrganismos antagonísticos, 6 diminuiram o conteúdo de patulina do meio.

**Tabela 1:** degradação da patulina e variação de pH por leveduras com atividade anti-*Penicillium* spp após 15 dias de cultivo.

MICROORGANISMOS	PATULINA µg/100ml	pH INICIAL	pH FINAL
1	294,2	4,42	3,95
2	290,0	4,42	3,90
4	91,4	4,42	4,38
9	292,0	4,42	3,97
27	147,1	4,42	4,30
37	290,0	4,42	3,62
Controle	588,4	4,42	4,42

O reduzido número de leveduras que apresentaram atividade detoxificadora sobre a patulina pode ser inerente também à atividade antimicrobiana desta, pois apresenta-se altamente letal a leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces* (Machinsky & Midio, 1995). As leveduras n° 1, 2, 9 e 37 apresentaram detoxificação igual a 50%, excedendo apenas o antagonista n° 4 e 27 apresentando uma redução no conteúdo de patulina em 85% e 75% respectivamente. Todas as leveduras empregadas no estudo tenderam a acidificação do meio, sendo que o menor valor de pH (3,62) foi promovido pelo isolado n° 37. Gourama (1997), estudando o efeito dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácidos lácticas como agentes antimicóticos e antimicotoxigênicos contra *Penicillium expansum*, concluiu que a atividade do sobrenadante é inerente a uma substância de natureza protéica, após ter verificado que a adição de tripsina neste promoveu a perda de ambas atividades. Relatos similares foram apresentados por Gourama & Bullerman (1995) onde espécies de *Lactobacillus* isoladas de silagem comercial reduziram o crescimento e produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* subsp. *Parasiticus*. Apesar do conteúdo de patulina ser reduzido no mínimo pela metade, ainda é muito alto, pois a Organização Mundial de Saúde permite apenas 50µg/l em suco de maçã. Ross *et al.* (1996) relataram que maçãs inoculadas com *Penicillium expansum* toxigênicos e mantidas a 25°C apresentaram redução no conteúdo de patulina, após 1 mês de incubação, sendo que a micotoxina que se encontrava na faixa de 2400 µg/l, no primeiro mês, chegou a níveis não detectáveis após 90 dias. Paralelamente a redução no teor de patulina houve um aumento crescente na contagem de leveduras, indicando a possível participação no decréscimo da patulina. Em nosso estudo, uma redução maior seria possível caso houvesse um

maior tempo de incubação. O mesmo pode ser relatado em relação ao pH que poderia ter seus valores substancialmente elevados com o tempo, tornando a patulina instável, já que sua faixa ótima de pH é ácida (Harrison, 1989).

## Conclusão

Apesar de serem selecionados 6 isolados com atividade detoxificadora, ênfase deve ser dada ao isolado 4 por apresentar maior nível de detoxificação, e ao isolado 37 pela sua alta atividade anti-*Penicillium*, sugerindo ainda o emprego como microrganismos sinérgicos em controle de pós colheita de maçãs.

## Referências Bibliográficas

- ENGEL, G.; TEUBER, Mark. Patulin and other small lactones. In: MYCOTOXINS. Netherland, 1984. p. 290 - 299.
- FAO. World Wide. *Regulation for Mycotoxins. A Compendium*. Rome, 1996. 45p.
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, v. 58, p.1249-1256, 1995.
- GOURAMA, H. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *Lebensm. – Wiss, Technology*, v. 30, p. 279-283, 1997.
- HARRISON, M. A. Presence and stability of patulin in apple products: a review. *Journal of Food Safety*, v. 9, p. 147-153, 1989.
- JANISIEWICZ, W. Biological control of pathogens affecting temperate fruit crops. In: SINCOBIOL, 5., 1996, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, 1996. p. 43-48.
- MACHINSKY, M.; MÍDIO, A. F. Patulina em alimentos – Aspectos toxicológicos e analíticos. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v. 31, n. 1, p.1-19, 1995.
- LEVY, R. M.; ODA, P., CARRERO, S.; PAGNOCCA, F.; HIROOKA, E. Y. Atividade anti-*Penicillium* spp por leveduras antagonistas. Enviado para publicação.
- MOSS, M. Mycotoxins. *Mycological Research*, v.100, n. 5, p.513 - 523, 1996.
- PRIETA, J.; MORENO, A. ; DÍAZ, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. *J. Agric. Food Chemistry*, v. 42, p. 1701-1703, 1994.
- ROSS, G.; HIROOKA, E. Y; VISONNI, E.; TANIWAKI, M. Aspectos relevantes sobre riscos da produção de patulina em maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 1, p.63-67, 1998.
- SANHUEZA, R. M.; KRETZSCHMAR, A. A.; BORSÓI, M. Avaliação de organismos antagonistas a *Penicillium expansum* em maçãs cv. Fuji em pós colheita. *Fitopatologia Brasileira*, v. 17, n. 4, dez. 1992.
- SCOOT, W.T.; BULLERMAN, L. B. A Research Note: Instability of patulin in cheddar cheese. *Journal of Food Science*, v. 41, 1976.
- SINGH, J.; FAULL, J. Antagonism and biological control. In: NALINI, N.; MIKERJI, K. (Ed.). *Biocontrol of plant disease*. [S. l : s. n.], 1988. v. 1, p. 167-169
- SYNDEHAM, E.; VISMER, H.; MARASAS, W.; BROWN, N.; SCHLECHTER, M. *et al.* The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. *Food Additives and Contaminants*, v. 14, p. 429-424, 1997.
- TAVARES, S. C. C de H. Controle biológico clássico de patógenos de frutos no Brasil -situação atual. In: SINCOBIOL, 5., 1996, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, 1996.. p. 57-68

# Patulin detoxification by antagonistic yeasts to *Penicillium* spp

## Abstract

With the objective to evaluate the detoxification activity on the patulin, 21 yeast isolates with antagonistic activity to *Penicillium* spp n° 18 of apple were tested. For the research, the medium containing 588,4µg/100ml of patulin, produced in glucose potato broth at 25°C and extracted with ethyl acetate, was inoculated with yeasts and the concentration of remaining toxin was determined after 15 days by a thin layer chromatography. Six yeast strains (isolates n° 1, 2, 4, 9, 27 and 37) presented an activity on the patulin, whose remaining value ranged from 91,4 to 294,2µg/100ml in relation to 588,4µg/100ml from the positive control. The best results were obtained from the isolates n° 4 and 37 which achieved the patulin concentration reduction levels of 85% and 75% respectively. The detoxification capacity, associated with antagonistic activity in a same yeast, enlarges the applicability thus becoming promising microorganisms for future employment.

**Key words:** detoxification, yeasts, *Penicillium* spp.

LEVY, R. M.; HIROOKA, E. Y. Patulin detoxification by antagonistic yeasts to *Penicillium* spp. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde*, Londrina, v. 1, n. 1, p. 57-62, out. 1999.