



**FABIANA APARECIDA COUTO**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspergillus*, SEÇÕES  
*Nigri*, *Flavi* E *Circumdati* POR TAXONOMIA POLIFÁSICA**

**LAVRAS - MG  
2013  
FABIANA APARECIDA COUTO**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspergillus*, SEÇÕES *Nigri*, *Flavi* E *Circumdati* POR  
TAXONOMIA POLIFÁSICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Coorientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

Coorientadores no exterior

Dr. Cledir Santos

Prof. Dr. Nelson Lima

**LAVRAS - MG  
2013**

**FABIANA APARECIDA COUTO**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspergillus*, SEÇÕES *Nigri*, *Flavi* E *Circumdati* POR  
TAXONOMIA POLIFÁSICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 22 de novembro de 2013

Pesquisadora Dra. Sara Maria Chalfoun

EPAMIG

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

UFLA

Prof. Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima      UMINHO

Prof. Dr. Cleidir Santos      UMINHO

Prof. Dr. Luís Roberto Batista  
UFLA  
(Orientador)

**LAVRAS - MG**  
**2013**

Aos meus pais, Nilton e Aparecida.  
Aos meus irmãos, Rodrigo, Daniela e Fernanda.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades que tive em minha vida, pela proteção e amparo nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus pais, Nilton e Aparecida, por terem me ensinado que a educação era o caminho mais correto a seguir. Vocês se sacrificaram durante todos estes anos, para que eu pudesse receber a minha maior herança e por isso resisti à todas as adversidades do caminho.

Aos meus irmãos, Dr. Rodrigo, Daniela e Fernanda, que são exemplos de dedicação e persistência. Com vocês aprendi que os sacrifícios valem a pena e que todo o sucesso é fruto da união e do amor da nossa família.

Aos meus grandes amigos e irmãos, Elizabeth e Wilson, que me ensinaram que os verdadeiros amigos resistem à distância e ao tempo, amo vocês! Agradeço também a uma das pessoas mais especiais que conheci, Mardem. Ao seu lado, compreendi que a biologia (microbiologia) era mais que um trabalho, era a minha paixão mais oculta.

Aos meus segundos pais, Aurélio e Adelina, que me mostraram como é bom ter uma grande família e aos meus tios Laura e Vítor pelo apoio.

À minha querida família lavrense, Wesley, Ludmila, Carolina, Thiago, Eduardo, Nivaldo, Simone, Amanda, por me ensinar que a família ampara e ajuda incondicionalmente. O que teria sido de mim sem vocês aqui?

Aos mestres e amigos Pascoal e Lília, que me ensinaram de forma tão brilhante e me fizeram acreditar que eu poderia ser como eles, obrigada!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Roberto Batista, por ter me orientado e me dado a oportunidade de sonhar em ser uma taxonomista. Obrigada por ter me ajudado neste longo caminho!

Aos co-orientadores Prof. Nelson e Dr. Cleidir, pela orientação no “Doutorado Sanduíche” e por me ensinarem como é grandioso o trabalho de um cientista. A todos os amigos de Braga, Portugal, em especial Martha e Thalita, por me ajudarem no desenvolvimento da tese.

Aos professores da Microbiologia, Profa. Rosane, Prof. Eustáquio, Profa. Cristina, Profa. Patrícia e Prof. Whasley, por me ensinarem o grandioso mundo dos microrganismos.

Às colegas e amigas do laboratório de Micotoxinas e Micologia do DCA, em especial à Ábiah, Fabiana, Michele, Priscila, Sirley e Thayana pelos momentos de trabalho e descontração.

A todas as amigas do Programa de Pós graduação em Microbiologia Agrícola, incluindo a secretária do Programa, Rose, pela ajuda incondicional durante toda esta jornada. Agradeço também à Simone pela amizade e todos os ensinamentos.

Os meus sinceros agradecimentos ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, à Universidade Federal de Lavras e à Universidade do Minho, pela oportunidade de estudar em instituições de excelência

nacionais e internacionais. E agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa do PDSE- Proc.8161-12-7, à FAPEMIG e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Com o apoio de todos vocês, realizei o sonho de ser Doutora!

Muito obrigada!

“Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas.”

Loius Pasteur

## RESUMO GERAL

Os fungos filamentosos estão entre os grupos de microrganismos que mais se destacam, devido à sua ampla utilização nos processos biotecnológicos e ambientais. Devido à grande importância destes microrganismos para o ambiente e para a humanidade, torna-se fundamental o estudo até espécies de fungos filamentosos. Este estudo foi realizado com o objetivo de utilizar diferentes metodologias para caracterizar e identificar isolados de *Aspergillus* Seção *Flavi*, Seção *Nigri* e Seção *Circumdati*, de diferentes substratos agrícolas do Brasil e verificar o poder discriminatório dos métodos morfológicos, bioquímicos e de espectrometria de massas. Setenta e seis isolados foram analisados pelos métodos macro e micro-morfológicos, em meios de cultivo padronizados, potencial micotoxigênico, aflatoxina e ácido ciclopiazônico para a Seção *Flavi*, ocratoxina e fumonisina para Seção *Nigri* e ocratoxina para Seção *Circumdati*. Posteriormente, foram analisados os espectros de proteínas gerados no MALDI-TOF MS (ionização de proteínas pela energia laser (MALDI), seguida pela separação e detecção de íons pelo tempo de voo (TOF). Foi possível identificar todos os isolados morfológicamente, exceto um isolado da Seção *Nigri* que se diferenciou devido à coloração do micélio em meio de cultivo CYA 25°C. Os resultados do MALDI-TOF apresentaram elevado poder discriminatório, entretanto não permitiram a identificação de todos os isolados, de acordo com a base de dados utilizada (SARAMIS™). Após a comparação das diferentes técnicas, os resultados indicaram que os isolados DCA 42 e DCA 19, são espécies raras ou novas espécies da Seção *Flavi* e Seção *Nigri*. Estes dados serão confirmados pela biologia molecular, como sendo o último passo para completar a abordagem polifásica. Portanto, o uso da abordagem polifásica foi considerado positivo para a reclassificação dos fungos filamentosos da Micoteca do Departamento de Ciência dos Alimentos.

Palavras-chave: Fungos, Abordagem polifásica e MALDI-TOF.

## GENERAL ABSTRACT

The filamentous fungi are among the groups of microorganisms that stand out due to its extensive use in biotechnological and environmental processes. The description of new species of filamentous fungi is essential due the importance of these microorganisms for the environment and the humanity. This study aimed to use different methodologies to identify and characterize isolates of *Aspergillus* Section *Flavi*, Section *Nigri* and Section *Circumdati* from different Brazilian agricultural commodities, as well as to determine the discriminatory power of morphological, biochemical methods and mass spectrometry. Macro and micromorphological methods were analyzed to the seventy six isolates on different standards culture media, as well as the mycotoxigenic potential to produce aflatoxin and cyclopiazonic acid for Section *Flavi*, ochratoxin and fumonisin for section *Nigri*, and ochratoxin for Section *Circumdati*. Subsequently, the spectra of proteins generated in the MALDI-



TOF MS (ionization of proteins by laser energy (MALDI), followed by separation and detection of ions by time of flight (TOF)) were analyzed. The dendrograms were generated and the results were compared. It was possible to identify almost all isolates morphologically except for an isolate that differs their mycelium's staining on agar CYA 25°C. The MALDI-TOF showed high discriminatory power, however, did not allow the identification of all isolates, according to the database used (SARAMIS™). After the comparison of the different techniques, the results indicate that DCA 42 and DCA 19 isolates are rare or new species of Section *Flavi* and *Nigri*. These data need to be confirmed by molecular biology, as the last step to complete the polyphasic approach. Therefore, the use of polyphasic approach was considered positive for the reclassification of filamentous fungi of the fungal collection of the Department of Food Science

Keywords: Fungi, Polyphasic approach and MALDI-TOF.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1	Conidióforo uniseriado de <i>Aspergillus</i> , b) Conidióforo biseriado de <i>Aspergillus</i> .....	17
Figura 2	Formas de vesículas de <i>Aspergillus</i> : a) globosa ou esférica; b) piriforme; c) espatulada e d) clavada.....	17
Figura 3	Estrutura química da molécula das aflatoxinas.....	24
Figura 4	Estrutura química da molécula do ácido ciclopiazônico.....	25
Figura 5	Estrutura química da molécula de ocratoxina A.....	29
Figura 6	Estrutura química da fumonisina.....	30

### CAPÍTULO 2

Figura 1	Utilização dos caracteres morfológicos (cor da colônia no reverso do meio AFPA), das seguintes espécies (a) <i>A. tamarii</i> , (b) II- <i>A. flavus</i> ; (c) III- <i>A. parasiticus</i> .....	58
Figura 2	Utilização dos caracteres morfológicos (cor da colônia em CYA, ornamentação dos conídios em meio CYA) para diferenciação dos três principais grupos: (a) I- <i>A. tamarii</i> , (b) II- <i>A. flavus</i> ; (c) III- <i>A. parasiticus</i> .....	58
Figura 3	Dendrograma construído com base nas sequências de proteínas obtidas no MALDI-TOF MS, das linhagens de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> . As distâncias são medidas como porcentagem de similaridade.....	61

### CAPÍTULO 3

Figura 1	Dendrograma construído com base nas sequências de proteínas obtidas no MALDI-TOF MS, das linhagens de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> . As distâncias são medidas como porcentagem de similaridade .....77
Figura 2	Dendrograma construído com base nas sequências de proteínas obtidas no MALDI-TOF MS, das linhagens de <i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i> . As distâncias são medidas como porcentagem de similaridade.....80

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1	Manual de identificação do gênero <i>Aspergillus</i> .....19
Tabela 2	Principais micotoxinas detectadas em alimentos .....21

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Marcadores bioquímicos utilizados na classificação dos isolados de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> .....59
----------	--

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Marcadores morfológicos e bioquímicos utilizados na classificação dos isolados de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> .....74
Tabela 2	Caracterização fenotípica e produção de ocratoxina A (OTA) para <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> .....79

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	12
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Importância e diversidade de fungos filamentosos</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Morfologia e fisiologia de <i>Aspergillus</i></b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Histórico da classificação e importância do gênero <i>Aspergillus</i></b> .....	18
<b>2.4</b>	<b>Micotoxinas</b> .....	19
<b>2.5</b>	<b>Gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i></b> .....	22
<b>2.6</b>	<b>Gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i></b> .....	26
<b>2.7</b>	<b>Gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i></b> .....	30
<b>2.8</b>	<b>Abordagem polifásica</b> .....	32
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	47
	<b>ARTIGO 1</b> Taxonomia polifásica e o uso de marcadores bioquímicos para caracterização e identificação de isolados de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> .....	47
	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	66
	<b>ARTIGO 2</b> Identificação de fungos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> e <i>Circumdati</i> através da abordagem polifásica e espectrometria de massa .....	66

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são capazes de colonizar uma grande variedade de *commodities* agrícolas, como café, arroz, milho, amendoim, cereais e frutas. O alto índice de contaminação com fungos tem gerado perdas significativas à indústria de alimentos, pois além da deterioração, estes microrganismos também são responsáveis pela produção de micotoxinas (BRASE et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009).

Os fungos foram inicialmente classificados tendo por base critérios morfológicos. A identificação clássica de fungos leva em consideração, principalmente, as características morfológicas das estruturas reprodutivas (sexual e assexual). No entanto, este critério de classificação possui algumas limitações, pois existem espécies estritamente relacionadas. Embora tenham sido descritas mais de 260 espécies desse gênero, a classificação está em constante processo de mudança (SAMSON; VARGA, 2009). Os últimos estudos taxonômicos feitos com as espécies de *Aspergillus* têm demonstrado que este gênero tem sido reclassificado através do uso da Taxonomia Polifásica. A abordagem polifásica tem como objetivo a integração dos diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, incluindo as proteômicas e metabólitos secundários, genéticas e filogenéticas) sobre o microrganismo, indicando assim uma taxonomia de consenso.

Recentemente, novas tecnologias foram desenvolvidas com o objetivo de identificar os microrganismos de forma rápida e segura. A Dessorção a Laser Assistida por Matriz em de Tempo de Voo (MALDI-TOF), vem sendo usada com grande eficácia na identificação de fungos filamentosos (SANTOS et al., 2010).

Neste aspecto, a identificação de fungos filamentosos por taxonomia polifásica é crucial para o desenvolvimento agrícola no Brasil, visto que o país é detentor de uma das maiores biodiversidades do mundo. Sendo assim,

o Capítulo 1, descreve uma revisão sobre a classificação de fungos *Aspergillus* Seção *Flavi*, *Nigri* e *Circumdati* e a produção das principais micotoxinas produzidas pelas respectivas Seções. No Capítulo 2, apresenta-se os resultados da identificação de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Flavi*, utilizando métodos morfológicos, bioquímicos e de espectrometria de massa. E no capítulo 3, são apresentados os resultados obtidos pela utilização de diferentes técnicas, para caracterizar os fungos da Seção *Nigri* e Seção *Circumdati*, sendo estas de elevada importância, devido à utilização em processos biotecnológicos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância e diversidade de fungos filamentosos

Os fungos eram conhecidos principalmente pelos seus efeitos prejudiciais como a contaminação de alimentos, frutas, grãos armazenados e produção de micotoxinas. No entanto, a cada dia que passa, estes microrganismos estão sendo destacados devido às suas características benéficas, pois participam dos processos de ciclagem de nutrientes, formação da estrutura do solo, decomposição de matéria orgânica, controle biológico de doenças e decomposição de resíduos orgânicos e tóxicos (ANDERSON; CAIRNEY, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2008; TAKAHASHI; CARVALHO, 2010). Algumas espécies de fungos como o gênero *Penicillium* são muito utilizadas na preparação de queijos do tipo *roquefort* e *camembert* (CHAVEZ et al., 2010) e ainda podem ser utilizados na alimentação humana, como os cogumelos *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus* sp. (DIAS, 2010).

Devido à importância destes microrganismos, diversas pesquisas foram feitas com o intuito de estimar o número de espécies de fungos no planeta Terra. Apesar de existirem diversas teorias, a estimativa de 1,5 milhão de espécies de fungos, proposta por Hawksworth (1991), ainda é a mais aceita. Entretanto, dez anos depois, foi feita uma revisão desta estimativa, onde o mesmo autor propõe a existência de 2.270.000 espécies de fungos (HAWKSWORTH, 2001). Este trabalho foi realizado baseado na proporção que pode ser observada entre a floração das plantas e da diversidade de fungos em plantas de alguns países da Europa, que possuem uma grande base de dados (SIMÕES et al., 2013). Contudo, estima-se que apenas 5% a 13% das espécies de fungos filamentosos tenham sido descritas até o momento (WANG; HYDE; SOYTONG, 2008). Sendo assim, os taxonomistas têm um grande desafio pela frente, pois se observa que em

todo o mundo, o número de especialistas tem diminuído, tornando-se uma grande preocupação devido à fundamental importância desses microrganismos para a saúde, o ambiente e para os processos biotecnológicos.

Trabalhos sobre estimativa de diversidade de fungos são de fundamental importância, pois sem uma estimativa real da diversidade de fungos, é difícil determinar a importância destes microrganismos para o ecossistema. O impacto positivo e negativo está relacionado ao conjunto total de espécies fúngicas. Portanto, é necessário utilizar alguns meios para estimar o total da riqueza de espécies de fungos (SCHMIT; MUELLER, 2007).

Quando se fala em biodiversidade, o Brasil têm-se destacado significativamente, pois está entre os países que apresentam uma das maiores biodiversidades do mundo. E por esta razão, é responsável pela conservação dessas espécies de microrganismos, dos ecossistemas naturais e dos processos biológicos (LEWINSOHN; PRADO, 2002). No entanto, pouco se sabe a respeito da diversidade microbiana brasileira. Sendo assim, o estudo de fungos filamentosos no Brasil, é de fundamental importância. É necessário compreender que está aumentando a taxa de perda da biodiversidade global. Estima-se que até o ano de 2050, haverá grande número de espécies extintas de microrganismos (JENKINS, 2003). A extinção destas espécies pode levar a uma perda econômica significativa das indústrias e agricultura, uma vez que estes microrganismos são constantemente utilizados em processos ambientais e biotecnológicos.

Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* estão entre os microrganismos de maior importância econômica (SAMSON; VARGA, 2012), pois eles podem ser utilizados em diversos processos na indústria de alimentos e farmacêutica. Eles são valorizados principalmente pela produção de grande variedade de enzimas como beta-glucosidases e endoglucanases e ácidos orgânicos (BAKER; BENNETH, 2008; TAKAHASHI; CARVALHO, 2010). Por exemplo, os isolados de *Aspergillus niger* têm sido objeto de

investigação biotecnológica por várias décadas, sendo que a importância deste fungo para a indústria alimentícia é conhecida desde 1919, quando ocorreu o primeiro relato de produção de ácido cítrico por *A. niger* (ABARCA et al., 2004). O ácido cítrico é um ácido orgânico amplamente utilizado em produtos das indústrias de alimentos e bebidas, como refrigerantes, sucos de frutas, sobremesas, compotas, geléias, doces e vinhos (VARGA et al., 2003).

Além dos impactos positivos das espécies de *Aspergillus*, algumas espécies são responsáveis por contaminar produtos agrícolas em diferentes fases, como pré-colheita, colheita, processamento e ainda podem produzir diversas micotoxinas (PERRONE et al., 2007).

## 2.2 Morfologia e fisiologia de *Aspergillus*

A primeira descrição do gênero *Aspergillus* ocorreu em 1729 pelo Padre Florentino e pelo micologista Pietro Antonio Micheli. O nome dado ao gênero se deve às similaridades estruturais do conidióforo e do *aspergillum*, instrumento litúrgico usado para aspergir água benta na igreja (KLICH, 2002; BENNETT, 2010). Este nome refere-se a um gênero de fungos que se reproduzem exclusivamente por reprodução assexuada (SAMSON; VARGA, 2012).

Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são considerados anamorfos de ascomicetos pertencentes ao Reino *Fungi*, Divisão *Ascomycota*, à ordem *Eurotiales* e, portanto, são caracterizados pela produção de esporos assexuais (KLICH; PITT, 1988). Uma das principais características que distingue as espécies é a coloração das colônias, que pode apresentar tons de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza (KLICH, 2002). Eles produzem um conidióforo asseptado e com a base normalmente em forma de “T” ou “L” comumente chamada de “célula pé” conectada a uma hifa vegetativa (Figura 1). O conidióforo estende-se a partir da “célula pé” e pode continuar a se estender por alguns milímetros de comprimento até



chegar à vesícula (Figura 2), na qual as células conidiogênicas, métulas e fiálides são formadas. Eles podem ser classificados como uniseriados (o conídio é diretamente ligado às fiálides que produzem conídios em cadeia) ou bisseriados (apresentam estruturas especializadas que ficam entre a vesícula e as fiálides que são designadas métulas) (KLICH; PITT, 1988; KLICH, 2002; RAPER; FENNELL, 1965; SAMSON; VARGA, 2012).

Figura 1 a) Conidióforo uniseriado de *Aspergillus*; b) Conidióforo biseriado de *Aspergillus*.

Fonte: Abarca et al. (2004).

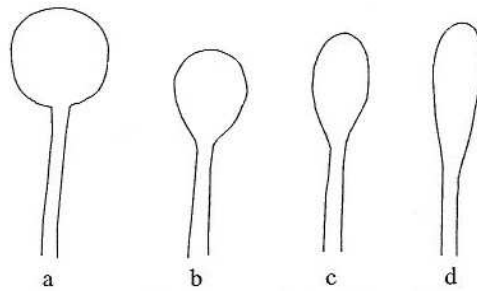


Figura 2 Formas de vesículas de *Aspergillus*: a) globosa ou esférica; b) piriforme; c) espatulada e d) clavada.

Fonte: Klich (2002).

O gênero *Aspergillus* é encontrado em todo o mundo, mas é mais comumente encontrado em ambientes de climas quentes e temperados. Os fungos pertencentes a este gênero podem se desenvolver em condições de altas temperaturas e baixa atividade de água (aw), o que lhes permite adaptar-se em diversos cereais e frutas secas (PITT; HOCKING, 1997).

No clássico artigo de Klich sobre a biogeografia do gênero *Aspergillus*, a autora relata que a maioria das espécies deste gênero ocorre em latitudes tropicais abaixo de 25° N e S. Este estudo sugere que estas espécies são mais encontradas em regiões subtropicais, sendo que a distribuição é atribuída a fatores bióticos e abióticos (KLICH, 2002).

*Aspergillus* é um gênero composto por mais de 180 espécies anamórficas e é dividido em diversas seções: *Flavi*, *Circundati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candidi*, *Cremeri*, *Sparsi* e *Wentii* (KLICH, 2002). Embora tenham sido descritas mais de 260 espécies desse gênero, a classificação está em constante processo de mudança (SAMSON; VARGA, 2009).

### **2.3 Histórico da classificação e importância do gênero *Aspergillus***

O primeiro trabalho publicado com o gênero *Aspergillus* foi em 1926, por Thom e Church (SAMSON; VARGA, 2012). Trinta e nove anos depois, em 1965, Raper e Fennell classificaram o gênero *Aspergillus* em 132 espécies e 18 grupos (RAPER; FENNELL, 1965). Estes grupos foram diferenciados de acordo com características morfológicas e padrões de colônias. No entanto, o termo “grupo” não tinha *status* nomenclatural para o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN) (BENNETT, 2010). Por isso, o gênero foi reclassificado por Gams et al. (1985), em diferentes seções pertencentes a seis subgêneros. Apesar de diversas técnicas terem sido utilizadas para a classificação taxonômica, a análise morfológica sempre foi de fundamental importância para a definição das espécies. Na

tabela 1, é possível analisar os principais manuais de identificação usados na identificação morfológica.

TABELA 1 Manual de identificação do gênero *Aspergillus*

ANO	REFERÊNCIA
1926	Thom, C. and Church, M. <i>The Aspergilli</i>
1954	Thom, C. and Raper, K. B. <i>A Manual of the Aspergilli</i>
1965	Raper, K. B., and Fennell, D. I. <i>The Genus Aspergillus</i>
1985	Samson, R. A., and Pitt, J. I. <i>Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics</i>
1988	Klich, M. A., and Pitt, J. I. <i>A laboratory Guide to Common Aspergillus Species and Their Teleomorphs</i>
1990	Samson, R. A. and Pitt, J. I. <i>Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification</i>
2000	Samson, R. A. and Pitt, J. I. <i>Integration of Modern Taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification</i>
2002	Klich, M. A. <i>Identification of Common Aspergillus Species</i>
2008	Samson, R. A. and Varga, J. <i>Aspergillus systematics in the genomic era</i>
2011	Varga, S. et al. <i>New and revisited species in Aspergillus section Nigri</i>
2012	Zeljko et al. <i>Two novel species of Aspergillus section Nigri from indoor air</i>

Fonte: Adaptado de Bennet (2010).

## 2.4 Micotoxinas

Os fungos, durante o seu ciclo de vida, conseguem metabolizar e sintetizar uma série de compostos orgânicos, que vão desde moléculas simples a complexas estruturas químicas. A maior parte destes compostos exibe algum tipo de atividade biológica, sendo ela benéfica ou maléfica (BRASE et al., 2009).

Um composto bem conhecido dentro da área micológica, são as micotoxinas, produzidas por algumas espécies de fungos em condições favoráveis, como a umidade e a temperatura (GONÇALVES et al., 2012). As micotoxinas são metabólitos secundários não voláteis, de baixo peso molecular, que causam sério risco à saúde dos humanos e dos animais

(KLICH, 2002; BRASE et al., 2009). Essas moléculas incluem diferentes famílias de metabólitos secundários, os quais foram implicados em surtos de doença (micotoxicoses) (SANTOS et al., 2011). As micotoxinas são consideradas metabólitos secundários por não serem necessárias para o crescimento dos fungos, sendo resultante do metabolismo primário desses microrganismos (BRASE et al., 2009). Entretanto, acredita-se que os fungos produtores destas substâncias estejam mais protegidos contra outros organismos que compartilham o mesmo nicho trófico (ABDIN; AHMAD; JAVED, 2010). Ainda não está totalmente claro o papel que estes metabólitos secundários têm na natureza, mas novas propostas têm sido elucidadas. Uma recente revisão feita por Reverberi et al. (2010), mostrou que a biossíntese de micotoxinas está diretamente relacionada com a proteção dos fungos contra o estresse oxidativo. Os metabólitos tóxicos são produzidos por diversas espécies de fungos, sendo que a síntese de um tipo de micotoxina pode ser exclusiva para uma espécie, no entanto, na maioria dos casos, uma determinada micotoxina é produzida por mais de uma espécie de fungo.

Na década de 60 houve grande interesse em se conhecer as enfermidades que essas micotoxinas poderiam causar, pois milhares de perus morreram na Inglaterra devido a hemorragias e necroses no fígado. Os resultados das pesquisas mostraram que a origem das enfermidades encontrava-se em alimentos derivados de amendoim, que estavam altamente contaminados com o fungo *Aspergillus flavus*. A toxina produzida por este fungo foi então nomeada de aflatoxina e, em seguida, várias outras micotoxinas foram identificadas. Embora tenham sido identificadas, aproximadamente, trezentas micotoxinas diferentes, apenas doze tipos apresentam importância relevante para a saúde humana (BENNETT; KLICH, 2003). As micotoxinas estudadas no presente trabalho são apresentadas na tabela 2.

TABELA 2 Principais micotoxinas detectadas em alimentos

<b>Micotoxinas</b>	<b>Referências</b>
Aflatoxina (B1, B2, G1,G2)	Astoreca et al. (2011); Baquião et al. (2013); Gonçalves et al. (2012); Reis et al. (2012); Rodrigues et al. (2011); Sirisomboon, Putthang, Sirisomboon (2013); Soares et al. (2012); Taniwaki et al. (2012).
Ocratoxina A	Batista e Chalfoun (2007); Batista et al. (2003; 2009); Cabañes, Bragulat e Castella (2013); Copetti et al. (2013); Lasram et al. (2012); Soares et al. (2013); Taniwaki et al. (2003).
Fumonisinias	Chiotta et al (2011); Frisvad et al. (2007); Mogensen et al. (2010).
Ácido Ciclopiazônico	Astoreca et al. (2011); Zorzete et al. (2013).

Apesar de existirem mais de 350 tipos de micotoxinas em alimentos (BRASE et al., 2009), apenas 12 apresentam risco à saúde (BENNETT; KLICK, 2003; ABDIN; AHMAD; JAVED, 2010). Os fungos que sintetizam estas micotoxinas são saprófitas e oportunistas, portanto, são considerados fracos patógenos. Eles ocorrem principalmente em regiões temperadas e tropicais do mundo e contaminam diversos produtos agrícolas como café, cacau, temperos, castanha e maçãs (BATISTA et al., 2009; MAHGUBI et al., 2013; REIS et al., 2012; RODRIGUES, 2010; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). As micotoxinas também podem entrar na cadeia alimentar humana por meio da carne ou outros produtos de origem animal, como ovos, leite e queijo, como o resultado de uma alimentação de gado contaminada.

O crescimento dos fungos e, conseqüentemente, a produção das micotoxinas ocorrem exclusivamente sob condições favoráveis. Diversos fatores como temperatura, pH, disponibilidade de água, estado nutricional e localização geográfica, influenciam na produção destes metabólitos

(REVERBERI et al., 2010; SANTOS et al., 2011), porém, de acordo com Paterson e Lima (2010), o clima ainda é o fator mais importante. Além disso, a produção de micotoxinas varia de acordo com as condições ambientais de produção, como a pré-colheita, armazenamento e transporte. Sendo assim, todas as etapas de produção são importantes e precisam ser frequentemente monitoradas (RODRIGUES et al., 2012).

As micotoxinas contaminam aproximadamente 25 a 50% de todas as culturas. Em regiões tropicais, a contaminação das lavouras pode chegar até 80%. Os produtos agrícolas contaminados com as micotoxinas geram uma perda significativa na renda dos produtores e na economia do país (ABDIN; AHMAD; JAVED, 2010).. As estratégias para impedir a entrada desses metabólitos na cadeia alimentar são necessárias para proteger a saúde pública e também reduzir perdas econômicas (ASTORECA; MAGNOLI; DALCERO, 2010). Os metabólitos tóxicos podem ser produzidos por uma ou diferentes espécies de fungos, que ocorrem simultaneamente nos ambientes e em diferentes produtos agrícolas. No entanto, suas implicações para a avaliação da segurança alimentar não são de conhecimento geral, pois há relativamente pouca informação sobre a interação entre as micotoxinas que ocorrem concomitantemente e a consequência para a toxicidade (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004).

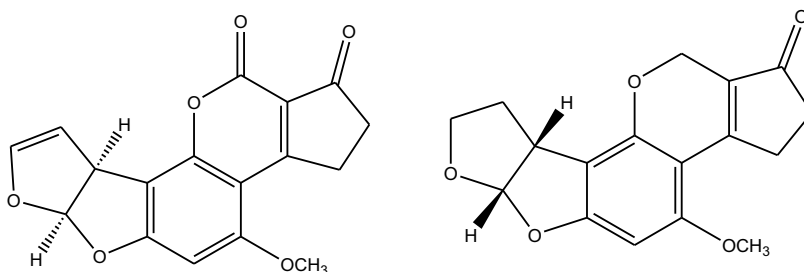
A presença dos fungos micotoxigênicos nos produtos agrícolas é preocupante e por isso o desenvolvimento de novas técnicas tem auxiliado a identificação de fungos micotoxigênicos (SIRISOMBOON; PUTTHANG; SIRISOMBOON, 2013; WILKES; LAY, 2001).

## **2.5 Gênero *Aspergillus* Seção *Flavi***

Os *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi* incluem espécies que apresentam conídios com coloração que varia de verde-amarela para verde-oliva (KLICH, 2002). Essa seção é composta por 22 espécies estreitamente relacionadas, separadas em sete clados e que produzem diferentes perfis de

metabólitos secundários. A Seção *Flavi* possui seis espécies economicamente importantes e que podem ser separadas em dois grupos, de acordo com o impacto sobre os alimentos e a saúde dos seres humanos (GODET; MUNAUT, 2010). O primeiro grupo inclui as espécies que causam danos aos produtos armazenados como amendoim e nozes e que produzem substâncias nocivas aos seres humanos, como as micotoxinas. O segundo grupo refere-se às espécies que não são produtoras de aflatoxinas, como *Aspergillus tamaris*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae*. É possível observar que muitas vezes o nome *A. flavus* é usado erroneamente para descrever as diferentes espécies de *Aspergillus* da Seção *Flavi*. Recentemente novas espécies foram descritas e incluídas nesta seção, como *A. novoparasiticus* (GONÇALVES et al., 2011), *A. mottae*, *A. sergii*, *A. transmontanensis* (SOARES et al., 2012) e *A. bertholletius* (TANIWAKI et al., 2012), no entanto, algumas destas espécies são raramente isoladas.

As aflatoxinas são um grupo de difuranocoumarinas estruturalmente relacionadas (Figura 3). Essa micotoxina foi relatada primeiramente em espécies de *A. flavus*, que é considerada patógeno oportunista de diversos produtos agrícolas, principalmente, de culturas oleosas como milho, amendoim e sementes de algodão (AMAIKE; KELLER, 2011). Essa toxina não é produzida por todas as linhagens de *A. flavus* e a maior parte das linhagens de *A. parasiticus* é potencialmente produtora de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, enquanto que *A. flavus* produzem somente aflatoxinas B1 e B2. A nomeação destes metabólitos é feita de acordo com a fluorescência emitida, azul ou verde, sendo assim denominada B1, B2, G1 e G2. A aflatoxina B1 é considerada a mais carcinogênica e é geralmente a principal aflatoxina produzida por cepas toxigênicas (ASTORECA et al., 2011). Essa toxina também pode ser produzida pelas espécies *A. nomius*, *A. pseudotamaris*, *A. parvisclerotigenus*, e *A. bombycis* (ABDIN; AHMAD; JAVED, 2010).



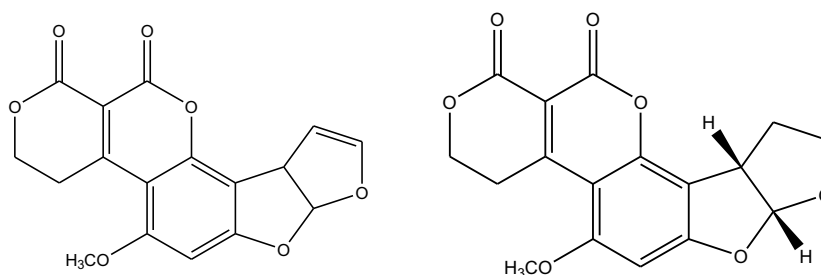


Figura 3 Estrutura química da molécula das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2

As aflatoxinas são responsáveis por contaminar lavouras com frequências em níveis de nanogramas, no entanto, ocasionalmente, podem ser encontrados níveis de dezenas a centenas de ng/g. As aflatoxinas ocorrem, principalmente, em grãos e leguminosas (BRASE et al., 2009). Os produtos agrícolas que possuem elevado risco de contaminação por aflatoxinas incluem amendoim, milho, algodão, castanha do Brasil, especiarias e figos. Os produtos com risco intermediário são amêndoas, nozes e passas. Soja, feijão, legumes, mandioca, sorgo, milheto, trigo, aveia, cevada, café e arroz, parecem ser menos suscetíveis à contaminação por aflatoxinas (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST, 2003; PERRONE et al., 2007; SAMSON; VARGA, 2009).

O crescimento dos fungos aflatoxigênicos e a biossíntese das aflatoxinas está diretamente relacionada com as condições de crescimento,



como a composição do substrato, pH, Aw e temperatura. A síntese desta micotoxina pode ser totalmente inibida dependendo da combinação específica de parâmetros de crescimento. Sendo assim, o conhecimento sobre estes parâmetros pode contribuir para o desenvolvimento de processos de crescimento dos fungos toxigênicos, e conseqüentemente, a biossíntese das aflatoxinas (RODRIGUES et al., 2010).

A ingestão de aflatoxinas provoca uma doença chamada aflatoxicose. Os sintomas incluem lesão hepática aguda, necrose aguda ou em casos graves, insuficiência hepática e morte (YU et al., 2005). Essa doença é influenciada por diversos fatores como o sexo, idade, nutrição e exposição a outros tipos de toxinas (SAMSON; VARGA, 2012).

Além das aflatoxinas, os fungos da Seção *Flavi* também são conhecidos por produzirem outro tipo de micotoxina, denominada ácido ciclopiazônico (Figura 4). Esta micotoxina pode ter contribuído para uma síndrome na Inglaterra, em 1960, e até hoje representa uma ameaça à indústria de alimentos, pois prejudica as mercadorias armazenadas. Muitos isolados de *A. flavus* são capazes de sintetizar tanto as aflatoxinas quanto o ácido ciclopiazônico (ZORZETE et al., 2013), mas o efeito destas duas substâncias no organismo ainda deverá ser estudado (BAQUIÃO et al., 2013).

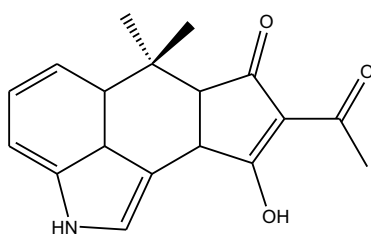


Figura 4 Estrutura química da molécula do ácido ciclopiazônico

Tradicionalmente, a produção de metabólitos secundários, incluindo as micotoxinas, tem sido utilizada para auxiliar o sistema taxonômico.

Baseado no perfil micotoxigênico dos isolados, Vaamonde et al. (2003) propuseram a criação de cinco quimiotipos desta espécie. Quimiotipo I: AFB<sup>+</sup> e CPA<sup>+</sup>, Quimiotipo 2: AFB<sup>+</sup>, AFG<sup>+</sup> e CPA<sup>+</sup>, Quimiotipo 3: AFB<sup>+</sup>, Quimiotipo 4: CPA<sup>+</sup>, Quimiotipo 5: (-) não produtor de toxina. Entretanto, estudos mais recentes têm reclassificado os fungos da Seção *Flavi* em sete quimiotipos: I- AFB1 > AFB2 e produtores CPA, II- AFB1 < AFB2 e produtores CPA, III - produtores somente da AFB, IV- os produtores de CPA, V- os fungos não produtores, VI- produtores de AFB, AFG e CPA e VII- produtores de AFB e AFG (GIORNI et al., 2007). Sendo assim, os quimiotipos têm sido frequentemente utilizados pelos taxonomistas para classificar os fungos filamentosos.

## 2.6 Gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*

Um dos trabalhos mais completos sobre fungos do gênero *Aspergillus* foi feito por Raper e Fennell (1965). Eles agruparam os fungos que possuíam os conídios pretos em grupo à parte, conhecido como Seção *Nigri* (ABARCA et al., 2004). Estes fungos apresentam características marcantes, como a coloração dos conídios que variam de marrom-escuro a preto, possuem conidióforos que podem ser uni ou bisseriados e vesículas esféricas (KLICH, 2002; PERRONE et al., 2007). Os isolados destas espécies são muito utilizados pela indústria alimentícia, para a produção de enzimas extracelulares e outros metabólitos secundários, como o ácido cítrico. Por esta razão, a utilização de um processo correto de identificação destas espécies é fundamental, devido à sua ampla utilização (ABARCA et al., 2004).

A taxonomia tradicional dos *Aspergillus*, baseada em critérios fenotípicos é demorada e exige grande conhecimento sobre a taxonomia de fungos. Os isolados pertencentes à Seção *Nigri* são identificados, tradicionalmente, por meio dos caracteres morfológicos como cor, forma, tamanho e ornamentação dos conídios (KLICH, 2002). Já os isolados pretos

variam significativamente em relação às características morfológicas e fisiológicas (PARENICOVÁ, 2001).

Mesmo tendo conhecimento sobre o assunto, a identificação pode ser complexa em algumas Seções, devido ao grande número de espécies estreitamente relacionadas. Por exemplo, as espécies de *A. niger stricto sensu*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis* são morfológicamente idênticas e por isso são classificadas como *A. niger* Agregado (CABANES et al., 2002; PARENICOVÁ et al., 2001). O potencial toxigênico dentro do grupo *A. niger* Agregado é incerto, com exceção da espécie *A. niger stricto sensu*, provavelmente devido à dificuldade no processo de identificação (FERRACIN et al., 2009).

A caracterização das espécies de *Aspergillus* da Seção *Nigri* tem sido constantemente revisada (SAMSON et al., 2004; VARGA et al., 2011) e outros trabalhos têm descrito novas espécies de fungos pertencentes à esta seção, como *A. uvarum* (PERRONE et al., 2008), *A. ibericus* (SERRA et al., 2006), *A. sclerotiiicarbonarius*, *A. aculeatinus* (NOONIM et al., 2008), *A. eucalypticola*, *A. fijiensis*, *A. indologenus* e *A. neoniger* (VARGA et al., 2011).

Através das análises morfológicas, produção de metabólitos secundários e sequenciamento da região ITS do gene da  $\beta$ -tubulina e calmodulina, Samson et al. (2007), aceitaram 19 espécies para a Seção *Nigri*, sendo elas: *A. aculeatinus*, *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricaensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. ibericus*, *A. japonicus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotiiicarbonarius*, *A. sclerotioniger*, *A. tubingensis*, *A. uvarum* e *A. vadensis*. Quatro anos mais tarde, Varga et al. (2011) estudaram a morfologia, fisiologia, ecologia e métodos moleculares na determinação das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*. Estes autores descreveram quatro novas espécies: *A. eucalypticola*, *A. fijiensis*, *A. indologenus* e *A. neoniger*. Entretanto, Hubka e Kolarik (2012) e Jurjević et al. (2012) sugeriram que *A. fijiensis* fosse considerado sinônimo de *A. brunneoviolaceus* pois as

seqüências de multilocus analisadas são indistinguíveis. Os autores também sugeriram que *A. japonicus* fosse considerado sinônimo de *A. violaceofuscus*, pois os resultados filogenéticos obtidos não confirmam a separação em duas espécies diferentes. *Aspergillus violaceofuscus* foi revisada por Varga et al. (2011) e considerada como uma espécie devido às diferenças filogenéticas.

Recentemente, as técnicas de biologia molecular têm sido bastante utilizadas, pois permitem a identificação das espécies em alguns dias ou algumas horas (FUNGARO; SARTORI, 2009). A abordagem polifásica, em que muitos tipos diferentes de caracteres (microscopia, perfil metabólico, métodos moleculares) são usados, é recomendada para a identificação das espécies da Seção *Nigri*. O perfil genético desta seção vem sendo estudado intensivamente e, devido à alta diversidade deste grupo, a classificação destas espécies torna-se ainda mais complexa (NIELSEN et al., 2009).

Os isolados desta seção, principalmente, as espécies *A. carbonarius* e *A. niger* Agregado são comumente encontrados em vinhas e são os principais responsáveis pela produção de ocratoxina em uvas e vinhos (CHIOTTA et al., 2011; LASRAM et al., 2012; VISCONTI et al., 2008). Tais espécies ocratoxigênicas também são encontradas em outros substratos como cacau (COPETTI et al., 2013), café (BATISTA et al., 2009)

Uma das espécies mais conhecidas desta Seção é *Aspergillus niger*, devido à síntese de enzimas, ácido cítrico e glucônico (ABARCA et al., 2004). Esta espécie é amplamente utilizada em processos biotecnológicos e industriais (CABAÑES et al., 2002). No entanto, o estudo realizado por Abarca et al. (1994) foi de grande importância para a comunidade científica, pois eles demonstraram que duas estirpes de *A. niger* var *niger*, foram capazes de produzir OTA em meio de cultura. Desde a descrição da produção de ocratoxina por *A. niger*, o número de publicações relacionadas com a síntese desta toxina nos membros da Seção *Nigri* tem aumentado significativamente (CABAÑES et al., 2002). Além de produzir ocratoxina, os isolados de *A. niger* são conhecidos por produzirem outros metabólitos

tóxicos como as malforminas, no entanto, estas micotoxinas não são de interesse econômico como as ocratoxinas (ABARCA et al., 2004).

A ocratoxina (OTA- Figura 5) é uma das principais micotoxinas encontradas principalmente em cereais e seus produtos, sendo também encontrada em uma grande variedade de alimentos e bebidas como, por exemplo, pão, chocolate, café e vinho (CABAÑES; BRAGULAT; CASTELLÁ, 2013; VARGA et al., 2010). Esta micotoxina apresenta potencial nefrotóxico, imunotóxico, genotóxico e teratogênico (SOLFRIZZO et al., 2010) e tem sido classificada pela International Agency for Research on Câncer (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, IARC, 1993) como possível carcinogênica para humanos (grupo 2B) (ESTEBAN et al., 2006; ROMERO et al., 2007). Depois que a OTA é ingerida, ela é absorvida pelo trato gastrointestinal, entra na circulação e liga-se às proteínas do soro. A maior toxicidade da OTA em mamíferos está relacionada aos rins, o que se deve, em parte, à reabsorção ativa pelo túbulo proximal, no sistema de transporte de ânions, acumulando altas concentrações de OTA neste órgão (FUNGARO et al., 2004). Os principais gêneros de fungos filamentosos produtores de ocratoxina são *Aspergillus* pertencentes as Seção *Nigri* e *Circumdati* e o gênero *Penicillium* (GIL-SERNA et al., 2011).

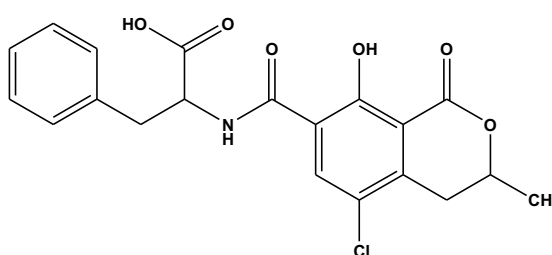


Figura 5 Estrutura química da molécula de ocratoxina A

Além da ocratoxina, as espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* produzem outro tipo de micotoxina, denominada fumonisina (Figura 6) (FRISVAD et al., 2007; MOGENSEN et al., 2010). Este metabólito tem sido

encontrado principalmente em uva (ABRUNHOSA; CALADO; VENÂNCIO, 2011; FRISVAD et al., 2011; SUSCA et al., 2010).

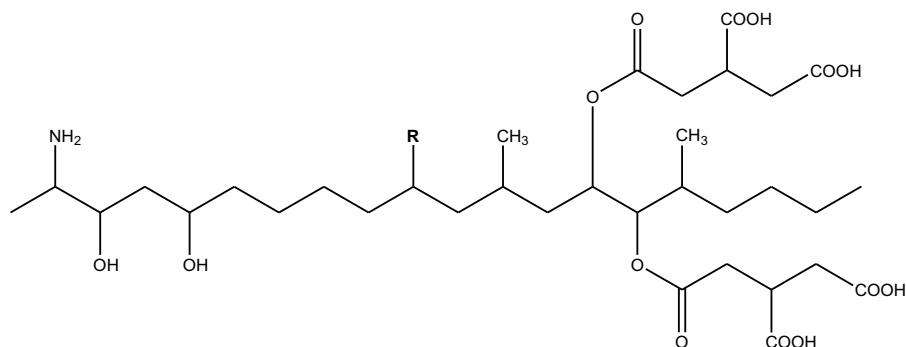


Figura 6 Estrutura química da fumonisina

A presença desta micotoxina nos alimentos representa mais um potencial risco para a saúde humana, pois existem associações epidemiológicas entre o consumo de alimentos contaminados por fumonisina e o câncer de esôfago e defeitos do tubo neural em humanos que consomem diariamente estes alimentos (SUSCA et al., 2010).

## 2.7 Gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*

As espécies da Seção *Circumdati* são economicamente importantes, pois algumas produzem a ocratoxina A. Esses microrganismos também são utilizados na biotransformação de esteroides e alcaloides (VARGA et al., 2003).

O primeiro isolado descrito como produtor de ocratoxina foi identificado como *A. ochraceus* (VAN DER MERWE; STEYN; FOURIE, 1965); desde então novas espécies têm sido descritas. Com o advento da taxonomia polifásica, o primeiro isolado produtor de OTA foi reclassificado como *A. westerdijkiae* (FRISVAD et al., 2004; SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006).

Os fungos pertencentes às Seções *Circumdati*, *Nigri* e *Flavi* foram encontrados em frutos de café, em estudo realizado por Pitt, Samson e Frisvad (2000). A presença desses fungos no café não é desejável, pois muitas espécies deste gênero são produtoras de micotoxinas. Diversas espécies, como *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae*, foram relatadas como sendo produtoras de ocratoxina A em café. *A. steynii* e *A. westerdijkiae* são consideradas as principais espécies da seção *Circumdati* produtores de OTA em alimentos, devido à sua ocorrência e porque estes isolados produzem grandes quantidades de ocratoxina (FRISVAD et al., 2004; SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006).

Batista et al. (2009) analisaram amostras de café processadas pela via seca e úmida e detectaram 80% de isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* em todas as fases de colheita e processamento. Em amostras de café, a presença das espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Circumdati* e Seção *Nigri* é a principal responsável pela produção de ocratoxina A (BATISTA et al., 2003; BATISTA et al., 2007; URBANO et al., 2001). As espécies da Seção *Circumdati*, além de produzirem esta micotoxina, também são responsáveis pela produção de ácido penicílico, xantomegnina e viomeleína (FRISVAD; SAMSON, 2000).

Recentemente, a taxonomia de *Aspergillus* da Seção *Circumdati* tem sido revista por taxonomia polifásica, devido à alta semelhança morfológica entre as espécies *A. ochraceus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae*. Gil-Serna e seus colaboradores (2009) realizaram ensaios específicos de PCR para os fungos produtores de OTA (*A. ochraceus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae*). Os ensaios foram testados em uma grande quantidade de amostras de isolados de diversas origens e coleções de culturas. O estudo revelou a especificidade das regiões do ITS do rDNA e a necessidade de uma revisão das cepas de fungos da seção *Circumdati*.

## **2.8 Abordagem polifásica**

A identificação de fungos é feita com o auxílio de diversas técnicas laboratoriais, que incluem o isolamento dos microrganismos em meios padronizados, a identificação em nível de gênero e espécie por caracterização morfológica e microscópica. Contudo, essas técnicas são consideradas demoradas e necessitam de profissionais qualificados (SIRISOMBOON; PUTTHANG; SIRISOMBOON, 2013), além de apresentarem algumas limitações como as culturas que não formam estruturas reprodutivas e as semelhanças morfológicas entre diferentes espécies (SANTOS et al., 2010). Sendo assim, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido amplamente aceita como uma ferramenta importante para o diagnóstico de fungos micotoxigênicos (NIESSEN, 2007). Atualmente, os taxonomistas têm classificado os fungos, com base em critérios evolutivos (SAMSON; VARGA, 2012).

A região do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) é considerada padrão ouro para a identificação de fungos (RODRIGUES, 2010), mas, para alguns gêneros, principalmente *Aspergillus* e *Fusarium*, esta região não tem discriminado as espécies. Sendo assim, outras regiões conservadas como os genes codificadores da calmodulina e da tubulina têm sido utilizadas para obter um resultado mais eficiente, baseado nos estudos filogenéticos. Portanto, as espécies que possuem poucas diferenças de nucleotídeos são consideradas mais próximas, quando comparadas com aquelas que apresentam significativa diferença molecular (SAMSON; VARGA, 2012).

Com o advento da biologia molecular, muitas técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de detectar polimorfismo e similaridade entre as espécies. Diversos marcadores moleculares vêm sendo constantemente aprimorados em laboratórios especializados para auxiliar as técnicas tradicionais na identificação de fungos como, RAPD, AFLP, RFLP, REAL-TIME PCR, sequência de RNA ribossomal (SIMÕES et al., 2013). Para o gênero *Aspergillus*, as sequências de calmodulina se destacam entre as



diferentes regiões que podem ser utilizadas (FRISVAD et al., 2004; SAMSON et al., 2004).

Sendo assim, recentemente, a identificação e a caracterização dos fungos tem sido realizada utilizando-se a abordagem polifásica, que consiste na aplicação de diferentes técnicas, que associam metodologias tradicionais como a macro e micromorfologia, os dados fenotípicos, bioquímicos e metodologias modernas, como a biologia molecular e a análise espectral de massa (especialmente o MALDI-TOF MS), que tem sido usada como uma importante ferramenta no processo taxonômico (BIZZINI et al., 2010; DE CAROLIS et al., 2012; SANTOS et al., 2010).

Em uma abordagem polifásica, a primeira técnica utilizada é a morfologia, seguida da bioquímica, análise espectral e, por último, a biologia molecular. Esta ordem foi estabelecida de acordo com os custos e o tempo de resposta das determinadas técnicas. Todos os dados obtidos pela abordagem polifásica são analisados e posteriormente comparados uns com os outros, até se chegar a uma correta identificação (SIMÕES et al., 2013).

Uma das técnicas mais recentes utilizadas para auxiliar na identificação dos fungos é o MALDI-TOF MS. Os princípios da técnica de espectrometria de massa foram estabelecidos há muito tempo, mas, os primeiros ensaios para identificação de microrganismos ocorreu em 1975. Na década de 1980, a técnica de MALDI-TOF MS (ionização de proteínas pela energia laser (MALDI), seguida pela separação e detecção de íons pelo tempo de voo (TOF), permitiu a análise de grandes biomarcadores, revelando-se então, como uma poderosa ferramenta para a caracterização de um amplo espectro de bactérias (BIZZINI et al., 2010). No entanto, poucos trabalhos têm sido publicados sobre o uso do MALDI-TOF MS para identificação de fungos. Recentemente, esta técnica tem sido vista como uma ferramenta para complementar os métodos de identificação bioquímica e genômica (DE CAROLIS et al., 2012).

O desenvolvimento deste tipo de espectrometria de massa foi tão importante para a análise de macromoléculas que, no ano de 2002, o Prêmio

Nobel de Química foi concedido ao pesquisador Koichi Tanaka (SANTOS et al., 2010). O princípio desta técnica envolve a ionização de grandes proteínas por meio de aplicação de luz ultravioleta, seguida pela detecção de íons (MARVIN; ROBERTS; FAY, 2003). Os espectros de massa gerados funcionam como “impressões digitais”, que são únicos para cada microrganismo e a identificação do fungo pode ser feita a partir de comparações com bases de dados previamente existente, como SARAMIS<sup>TM</sup>. O MALDI-TOF de células intactas pode obter um perfil protéico de 2000 – 20000 Da (KALLOW et al., 2006).

O banco de dados de espectros de proteínas (SARAMIS<sup>TM</sup>) foi o primeiro banco de dados criado para identificação de microrganismos com Espectrometria de Massa MALDI-TOF. Este banco de dados inclui mais de 35.000 diferentes isolados, representando mais de 2.000 espécies e 500 gêneros. Os microrganismos são identificados por meio de perfis de proteínas que são obtidos pela espectrometria de massa e depois comparados com o banco de dados.

O primeiro trabalho utilizando a técnica de MALDI-TOF MS para identificar fungos filamentosos foi realizado por Welham et al. (2000). Ele identificou espécies de *Penicillium* spp., *Scytalidium dimidiatum* e *Trychophyton rubrum* e, desde então, esta técnica vem sendo usada com sucesso, principalmente na identificação de fungos do gênero *Aspergillus* (SANTOS et al., 2010). Entretanto, é fundamental que a metodologia de MALDI-TOF seja padronizada, pois diferentes perfis de proteínas podem ser obtidos, devido a uma série de fatores, como condições de cultura e preparação de amostras. Sendo assim, a validação da técnica de MALDI-TOF pode ser obtida através do uso de linhagens fúngicas de referência que podem gerar espectros correspondentes aos do banco de dados. Portanto, a abordagem polifásica também pode ser utilizada para comparar e validar a técnica de espectrometria de massa (SANTOS et al., 2010).

## REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n.7, p. 2650-2652, July 1994.

ABARCA, M. L. et al. Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 33-49, Aug. 2004.

ABDIN, M. Z.; AHMAD, M. M.; JAVED, S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 192, n. 6, p. 409-425, Apr. 2010.

ABRUNHOSA, L.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Incidence of fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* in Portuguese wine regions. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 59, n. 13, p. 7514-7518, June 2011.

AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 107-133, Sept. 2011.

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 769-779, Aug. 2004.

ASTORECA, A. L. et al. A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* poultry feeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 38-43, Mar. 2011.

ASTORECA, A. L.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Ecophysiology of *Aspergillus* section *nigri* species potential ocratoxin a producers. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 11, p. 2593-2605, Nov. 2010.

BAKER, S. E.; BENNETH, J. W. An overview of the genus *aspergillus*. In: GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. **The Aspergilli: genomics, medical**

aspects, biotechnology, and research methods. Boca Raton: Taylor & Francis, 2008. p. 3-13.

BAQUIÃO, A. C. et al. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food Chemistry**, London, v. 139, n. 1/4, p. 1127-1132, Aug. 2013.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.

BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). **Aspergillus: molecular biology and genomics**. Poole: Caister Academic Press, 2010. chap. 1, p. 1-17.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July 2003.

BIZZINI, A. et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1549-1554, Nov. 2010.

BRASE, S. et al. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. **Chemical Reviews**, Washington, v. 109, n. 9, p. 3903-3990, June 2009.

CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 135-141, Dec. 2013.

CABAÑES, F. J. et al. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v.79, n.3, p. 213-215, Dec. 2002.

CHÁVEZ, R. et al. Evaluation of properties of several cheese-ripening fungi for potential biotechnological applications. **Mycoscience**, Tokyo, v. 51, n.1, p. 84-87, Dec. 2010.

CHIOTTA, M. L. et al. Phylogenetic characterization and ochratoxin A – fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 149, n. 2, p. 171-176, June 2011.

COPETTI, M. V. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Chemistry**, London, v. 136, n. 1, p. 100-104, Jan. 2013.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Ames, Iowa: CAST, 2003. (Task Force Report, n. 139).

DE CAROLIS, E. et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 7, p. 2479-2483, July 2012.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 34, n. 4, p. 795-803, jul./ago. 2010.

ESTEBAN, A. et al. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 7, p. 634-640, Oct. 2006.

FERRACIN, L. M. et al. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* Aggregate. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v. 52, p. 241-248, Nov. 2009. Special issue.

FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin and ochratoxins production in *Aspergillus niger* strains. **PLOS ONE**, San Francisco, CA, v. 6, n. 8, p. 1-6, Aug. 2011.

FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 23, p. 9727-9732, Oct. 2007.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 23-43, 2004.

FUNGARO, M. H. P. et al. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* on coffee beans. **Current Microbiology**, New York, v. 49, n. 2, p. 123-127, Aug. 2004.

FUNGARO, M. H.; SSARTORI, D. An overview on molecular markers for detection of ochratoxigenic fungi in coffee beans. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1-9, 2009. Special issue.

GAMS, W. et al. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: SAMSON, R.A., PITT, J. L. (Ed.). **Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics**. New York: Plenum Press, 1985. p. 55-62.

GIL-SERNA, J. et al. Discrimination of the main Ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1, p. 83-87, Nov. 2009.

GIL-SERNA, J. et al. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati* – *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 2, p. 343-345, Feb. 2011.

GIORNI, P. et al. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 3, p. 330-338, Feb. 2007.

GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 304, n. 2, p. 157-168, Mar. 2010.

GONÇALVES, S. S. et al. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. **Medical Mycology**, Oxford, p. 1-9, Apr. 2011.

GONÇALVES, J. S. et al. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 1817-1825, Apr. 2012.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 6, p. 641-655, June 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 2, p. 1422-1432, 2001.

HUBKA, V.; KOLARIK, M.  $\beta$ -tubulin paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. **Persoonia**, Leiden, v. 29, p. 1-10, Dec. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mucotoxins**. France: Lyon CEDEX, 1993. 599 p. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks on chemicals to humans ; v. 56).

JENKINS, M. Prospects for biodiversity. **Science**, Washington, v. 302, n. 5648, p. 1175-1177, Nov. 2003.

JURJEVIĆ, Ž. et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. **MMA Fungus**, Bethesda, v. 3, n. 2, p. 159-173, Dec. 2012.

KALLOW, W. et al. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* characterised by MALDI-TOF MS. In: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS, 8., 2006, Bologna. **Proceedings...** Bologna: Monduzzi, 2006. p. 189-193.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, Jan./Feb. 2002.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988. 116 p.

LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 75-80, Oct. 2012.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. São Paulo: Contexto, 2002. 176 p.

MAHGUBI, A. et al. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. **Food Control**, Guildford, v. 32, n. 1, p. 143-148, July 2013.

MARVIN, L. F.; ROBERTS, M. A.; FAY, L. B. Matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 337, n. 1, p. 11-21, Nov. 2003.

MOGENSEN, J. M. et al. Production of fumonisin B2 and B4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 2, p. 954-958, Dec. 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras, MG: Ed. UFLA, 2008. v. 1.



NIELSEN, K. F. et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1225-1242, Nov. 2009.

NIESSEN, L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n.1, p. 38-46, 2007.

NOONIM, P. et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 7, p. 1727-1734, July 2008.

PARENICOVÁ, L. et al. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 521-527, Feb. 2001.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, Aug. 2010.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* isolated from grapes in Europe. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 4, p. 1032-1039, Apr. 2008.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, n. 1, p. 53-66, Dec. 2007.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of species and their teleomorphs in the family *Trichocomaceae*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. C. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus***. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 9-47.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The Genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965.

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**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 61-68, Oct. 2012.

REVERBERI, M. et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 899-911, July 2010.

RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, n. 4. p. 877-892, July 2011.

RODRIGUES, P. et al. Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. **Food Research International**, Barking, v. 48, n. 1, p. 76-90, Aug. 2012.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z. A polyphasic approach to the identification and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 187-193, Feb. 2009.

RODRIGUES, P. C. A. **Mycobiota and aflatoxigenic profile of Portuguese almonds and chestnuts from production to commercialization**. 2010. 307 p. Dissertation for PhD (Chemical and Biological Engineering) - Universidade do Minho, Braga, 2010.

ROMERO, S. M. et al. Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 140-143, Apr. 2007.

SAMSON, R. A. et al. Diagnostic tools to identify black *aspergilli*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, n. 1, p. 129-145, Dec. 2007.

SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 45-61, 2004.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n. 1, p.133-148, 2006.

SAMSON, R. A; VARGA, J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). ***Aspergillus*: molecular biology and genomics**. Poole: Caister Academic Press, 2010. Chap. 2, p. 19-40.

SAMSON, R. A.; VARGA J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, n. 13/20, p. 813-820, 2009. Supplement 1.

SÁNCHEZ-HERVÁS, M. et al. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 336-340, July 2008.

SANTOS, C. et al. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 2, p. 168-175, Mar. 2010.

SANTOS, L. et al. Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in *Capsicum powder*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 3, p. 270-276, Sept. 2011.

SCHMIT, J. P.; MUELLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, n. 1, p. 99-111, Jan. 2007.

SERRA, R. et al. *Aspergillus ibericus* : a new species of section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 2, p. 295-306, Apr. 2006.

SIMÕES, M. F. et al. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: MALIK, A.; GROHMANN, E.; ALVES, M. (Ed.). **Management of microbial resources in the environment**. The Netherlands: Springer, 2013. chap. 5, p. 91-117.

SIRISOMBOON, C.; PUTTHANG, R.; SIRISOMBOON, P. Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. **Food Control**, Guildford, v. 33, n. 1, p. 207-214, Sept. 2013.

SOARES, C.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 30, n. 1, p. 9-13, May 2013.

SOARES, C. et al. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. **Mycologia**, New York, v. 104, n. 3, p. 682-697, May 2012.

SOLFRIZZO, M. et al. Removal of ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over grape pomaces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 1, p. 317-323, Jan. 2010.

SPEIJERS, G. J.; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 153, n. 1, p. 91-98, Oct. 2004.

SUSCA, A. et al. Correlation of mycotoxin fumonisin B2 production and presence of the fumonisin biosynthetic gene *fum 8* in *Aspergillus niger* from grape. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 58, n. 16, p. 9266-9272, July 2010.

TAKAHASHI, J. A.; CARVALHO, S. A. Nutritional potential of biomass and metabolites from filamentous fungi. **Current Research, Technology and**

**Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Badajoz, Spain, v. 2, p. 1126-1135, Dec. 2010.

TANIWAKI, M. H. et al. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. **PLOS ONE**, San Francisco, CA, v. 7, n. 8, p. 1-7, Aug. 2012.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

URBANO, G. R. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001.

VAAMONDE, G. et al. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* Section *Flavi* form diferente substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 79-84, Nov. 2003.

VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, p. 1112-1113, Mar. 1965.

VARGA, J. et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 30-32, Mar. 2003.

VARGA, J. et al. Fumonisin contamination and fumonising production black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 143-149, Oct. 2010.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 69, n. 1, p. 1-17, June 2011.

VISCONTI, A. et al. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, n. 2, p. 193-202, May 2008.

WANG, H.; HYDE, K.; SOYTONG, K. Fungal diversity on fallen leaves of *Ficus* in northern Thailand. **Journal of Zhejiang University: Science B**, Hangzhou, v. 9, n. 10, p. 835-841, Oct. 2008.

WELHAM, K. J. et al. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 14, n. 5, p. 307-310, 2000.

WILKES, J. G.; LAY, J. O. Electrospray mass spectrometry for mycotoxin detection and purity analysis. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 157, p. 37-48, 2001.

YU, J. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 22, n. 4, p. 194-202, Dec. 2005.

ZORZETE, P. et al. Mycobiota aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanuts cultivars. **Food Research International**, Barking, v. 52, n. 1, p. 380-386, June 2013.

## SEGUNDO CAPÍTULO

### ARTIGO 1

#### **Identificação fenotípica e uso de marcadores bioquímicos para caracterização e identificação de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Flavi***

Fabiana Aparecida Couto<sup>1</sup>, Eustáquio Souza Dias<sup>1</sup>, Cledir Santos<sup>2</sup>, Nelson Lima<sup>2</sup> e Luís Roberto Batista\*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup>IBB- Centro de Engenharia Biológica, Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

\*Autor para correspondência:

Luís Roberto Batista, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

E-mail: [luisrb@dca.ufla.br](mailto:luisrb@dca.ufla.br)

Tel: +35 38291407

## RESUMO

Os fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Flavi* representam uma das seções mais importantes do gênero, apresentando elevada variabilidade morfológica e bioquímica. Com o advento da abordagem polifásica, sua taxonomia tem sido constantemente revisada. O presente trabalho teve como objetivo, utilizar diferentes metodologias para caracterizar e identificar isolados de *Aspergillus* Seção *Flavi* de diferentes produtos agrícolas do Brasil e verificar o poder discriminatório dos métodos morfológicos, bioquímicos e de espectrometria de massas. Trinta e um isolados pertencentes às Coleções de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) e da Universidade do Minho (MUM), foram cultivados nos meios Czapeck Yeast Agar (CYA) 25°C e 37°C, Malt Extract Agar (MEA) 25°C, Czapek (CZ) 25°C e *A. flavus* e *A. parasiticus* Agar (AFPA) 25°C. Foi verificada a produção de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) e ácido ciclopiazônico (CPA) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Realizou-se também a análise de espectros de proteínas dos fungos no MALDI-TOF MS (ionização de proteínas pela energia laser (MALDI), seguida pela separação e detecção de íons pelo tempo de voo (TOF). Onze espécies foram identificadas por morfologia, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *A. sergii*, *A. mottae*, *A. transmontanensis*, *A. sojae*, *A. minisclerotigenes*, *A. oryzae*, *A. bertholletius* e *A. novoparasiticus*. O dendograma do MALDI-TOF MS foi gerado e os resultados morfológicos, bioquímicos e de espectrometria de massa foram comparados. Foi possível identificar pelo método morfológico 100% dos isolados, 90,6% dos fungos foram produtores de micotoxinas e os resultados do MALDI-TOF apresentaram elevado poder discriminatório, contudo, não permitiu a identificação de todos os isolados, de acordo com a base de dados utilizada SARAMIS™. Sendo assim, o uso da abordagem polifásica foi considerado positivo para classificar os fungos pertencentes à Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos, que foram utilizadas neste estudo. Palavras-chave: Fungos, Morfologia e MALDI-TOF.



## ABSTRACT

The fungi, of the genus *Aspergillus* Section *Flavi*, represent one of the most important sections of the genus, with a high morphological and biochemical variability. With the advent of polyphasic approach, their taxonomy has been constantly reviewed. This study aimed to use different methodologies to identify and characterize isolates of *Aspergillus* section *Flavi* from different Brazilian agricultural commodities, as well as check the discriminatory power of morphological, biochemical methods and mass spectrometry. Thirty-one isolates belonging to the Culture Collection of the Department of Food Science (CCDCA) and the University of Minho (MUM) were cultured in media Czapeck Yeast Agar (CYA) 25 °C and 37 °C, Malt Extract Agar (MEA) 25 °C Czapek (CZ) 25 °C and *A. flavus* and *A. parasiticus* Agar (AFPA) 25 °C. Production of aflatoxins (B1, B2, G1, G2) and Cyclopiazonic acid (CPA) by high performance liquid chromatography (HPLC) has been verified. We have also performed the analysis of spectra of proteins of fungi in the MALDI-TOF MS (ionization of proteins by laser energy MALDI), followed by separation and detection of ions by time of flight (TOF). Eleven species were identified by morphology as *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. tamaraii*, *A. sergii*, *A. mottae*, *A. transmontanensis*, *A. sojae*, *A. minisclerotigenes*, *A. oryzae*, *A. bertholletius* and *A. novoparasiticus*. The dendrogram of MALDI- TOF MS was generated and the morphological, biochemical and mass spectrometry results were compared. 100 % of the isolates were identified by morphological method, 90.6 % were fungi producing mycotoxins and the results of MALDI-TOF showed high discriminatory power, however, did not allow the identification of all isolates, according to the database SARAMIS<sup>TM</sup> used. Therefore the use of polyphasic approach was considered positive for classifying fungi belonging to the Culture Collection of the Department of Food Science, which were used in this study.

Keywords: Fungi, Morphology and MALDI-TOF.

## 1 INTRODUÇÃO

*Aspergillus* Seção *Flavi* são fungos do subgênero *Circumdati*, que apresentam conídios com coloração verde-amarela para verde-oliva e possuem escleródios escuros (KLICH, 2002; VARGA; FRISVAD; SAMSON, 2011). Os fungos desta seção são patógenos de humanos e animais, alérgenos e produtores de micotoxinas em diferentes substratos (ASTORECA et al., 2011; BRASE et al., 2009; KLICH, 2002). As espécies da Seção *Flavi* representam risco à indústria de alimentos, pois provocam deterioração aos produtos agrícolas armazenados (BAQUIÃO et al., 2013). De acordo com o sistema tradicional de identificação, essa seção é composta por seis espécies economicamente importantes: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* e *Aspergillus tamarii*. Estas espécies foram divididas em dois grupos, as que não sintetizam micotoxinas e por isso são utilizadas em processos fermentativos (*A. oryzae*, *A. sojae* e *A. tamarii*) (CHANCHAROONPONG; HSIEH; SHEU, 2012), e as toxigênicas que representam grande ameaça tanto à saúde humana, quanto a dos animais (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*) (MAHGUBI et al., 2013; RODRIGUES; VENÂNCIO; KOZAKIEWICZ, 2009).

Diversas espécies do gênero *Aspergillus* foram descritas no passado, utilizando o sistema tradicional de identificação (KLICH et al., 2002). Entretanto, devido à variabilidade intra e interespecífica (RODRIGUES et al., 2011), a caracterização desses microrganismos por morfologia é considerada muito difícil (SIRISOMBOON; PUTTHANG; SIRISOMBOON, 2013). Os caracteres microscópicos detectados em uma espécie, como, seriação da cabeça conidial, cor das colônias, presença e tamanho dos escleródios, também podem ser encontrados em outra espécie (SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2000). Além dos caracteres morfológicos, as micotoxinas, enzimas e pigmentos, têm sido utilizados para fins de identificação, com o objetivo de complementar os dados

morfológicos, bioquímicos e moleculares (BAQUIÃO et al., 2013; FRISVAD; SAMSON, 2004; RODRIGUES; VENÂNCIO; KOZAKIEWICZ, 2009). Por exemplo, isolados de *A. flavus* são geralmente produtores de aflatoxinas B, enquanto que *A. parasiticus* produzem aflatoxinas (AFBs e AFGs), mas não sintetizam ácido ciclopiazônico (CPA).

A taxonomia da Seção *Flavi* é complexa e assim como em outros grupos está em constante mudança (RODRIGUES et al., 2011; VARGA; FRISVAD; SAMSON, 2011). Nesse sentido, é de fundamental importância considerar o rigor da taxonomia, para conservar o sistema taxonômico confiável e assim, utilizar estas espécies em processos industriais e também no controle biológico (GEISER et al., 2007). Recentemente, novas espécies foram descritas, com base na abordagem polifásica e incluídas nesta seção, como *A. novoparasiticus* (GONÇALVES et al., 2011), *A. mottae*, *A. sergii*, *A. transmontanensis* (SOARES et al., 2012) e *A. bertholletius* (TANIWAKI et al., 2012), mas, algumas destas espécies são raramente isoladas.

Uma das espécies que mais se destaca dentro deste grupo é *A. flavus*, pois é uma das principais espécies produtoras de micotoxinas (ASTORECA et al., 2011). Isolados de *A. flavus* de distintas regiões geográficas (VAAMONDE et al., 2003) podem ser muito diferentes em termos de produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico (ASTORECA et al., 2011; BAQUIÃO et al., 2013; CALDERARI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2012; REIS et al., 2012).

É importante compreender que até o momento nenhum método isolado, seja ele morfológico, bioquímico ou molecular, é capaz de discriminar todas as espécies e é por este motivo que a abordagem polifásica tem sido fortemente apoiada pela maioria dos taxonomistas (RODRIGUES et al., 2011; SIMÕES et al., 2013). Portanto, novas técnicas têm sido incluídas na abordagem polifásica de fungos, como a técnica de MALDI-TOF MS (RODRIGUES et al., 2011). Os espectros de massa obtidos com a técnica, funcionam como “impressões digitais”, que são únicos para cada microrganismo. Assim, a identificação do fungo pode ser feita a partir de

comparações com bases de dados previamente existentes (KALLOW et al., 2006). Portanto, a ionização de proteínas pela energia laser (MALDI), seguida pela separação e detecção de íons pelo tempo de voo (TOF), é uma técnica que permite a identificação de fungos de forma rápida e segura, dando suporte à taxonomia polifásica. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi utilizar dados morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, de espectrometria de massa, para caracterizar 31 isolados de *Aspergillus* Seção *Flavi*, oriundos de produtos agrícolas, alimentos do Brasil e da Micoteca do Minho (MUM).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados

Vinte isolados de *Aspergillus* da Seção *Flavi* foram obtidos da Coleção de Cultura do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras/MG. Como controle, foram usadas onze espécies de referência da Micoteca da Universidade do Minho (MUM) (*A. flavus* - MUM10.232, *A. minisclerotigenes* - MUM 10.203, *A. oryzae* - MUM 10.242, *A. parasiticus* - MUM 10.201, *A. tamarii*-MUM00.10, *A. sojae* - MUM 10.241, *A. transmontanensis* - MUM 10.214, *A. mottae* - MUM 10.231, *A. sergii* - MUM 10.219) e duas espécies Tipo (*A. bertholletius* - MUM12.11 e *A. novoparasiticus* - CBS 126849).

Os fungos foram reativados em meio de extrato de malte (MA-extrato de malte 20,0g; ágar 20g; água destilada 1000 mL) e incubados a 25°C por sete dias.

### 2.2 Caracterização morfológica dos isolados

Os fungos foram cultivados em diferentes meios de cultivo padronizados. Para cada isolado, foi preparada uma suspensão de esporos em

meio água-ágar 0,2% (KLICH, 2002), que foi inoculada em três pontos de uma placa de Petri contendo 20 mL de cada meio de cultivo: Czapeck Yeast Agar – CYA (sacarose 30 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L,  $K_2HPO_4$  1,0g/L;  $NaNO_3$  2 g/L, KCl 0,5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g/L;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01 g/L,  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  0,05 g/L, agar 20 g/L), incubado às temperaturas de 25°C e 37°C por sete dias, Malt Extract Agar - MEA (extrato de malte 20,0 g/L; peptona 1,0 g/L; Glicose 30,0 g/L; ágar 20 g/L; água destilada 1 L) a 25°C por sete dias e Czapek – CZ (sacarose 30 g/L,  $K_2HPO_4$  1,0g/L;  $NaNO_3$  2 g/L, KCl 0,5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g/L;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  0,01 g/L,  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  0,005 g/L, agar 20 g/L) a 25°C por sete dias. Após o período de crescimento, foram observadas as características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) descritas conforme Klich (2002) e Pitt e Hocking (1997). A identificação das espécies foi feita conforme as chaves de identificação propostas para o gênero *Aspergillus* (KLICH, 2002). Para confirmação das espécies de *A. flavus* e *A. parasiticus*, os fungos foram cultivados no meio *A. flavus* e *A. parasiticus* Agar – AFPA (extrato de levedura 20,0 g/L, peptona 10,0 g/L, citrato de ferro e amônia 0,5 g/L, diclorano 0,002 g/L, agar 20 g/L), por cinco dias a 25°C, no escuro.

### 2.3 Análise micotoxigênica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### 2.3.1 Detecção de aflatoxinas

A análise da produção de aflatoxinas foi feita em todos os isolados, que foram cultivados em placas contendo meio YES (Yeast Extract Sucrose Agar) e incubados a 25° C por sete dias. Três *plugs* Agar, foram removidos da área central da colônia, pesados e introduzidos em um vial de 4 mL, onde foi adicionado um volume de 1 mL de metanol. Após 60 minutos, os extratos foram filtrados em filtros de 0,45µm, diluídos e depois analisados por CLAE (BRAGULAT; ABARCA; CABAÑES, 2001). Utilizou-se o cromatógrafo

equipado com um Jasco FP-920 com detector de fluorescência (comprimento de onda de excitação 365 nm, emissão 435 nm comprimento de onda), utilizando um reactor de derivatização pós-coluna fotoquímica (PHRED unidade-Aura Industries, EUA). As separações cromatográficas foram realizados em uma coluna C18 de fase inversa (Waters Spherisorb ODS2, 4,6 mm x 250 mm, 5 mm), equipado com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. O fluxo da fase móvel utilizada (água: acetonitrila: metanol (03:01:01, v/v/v)) foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 50 µL. O padrão de aflatoxinas utilizado foi o Biopure (Áustria), sendo 2 µg/ mL de AFB1 e AFG1, e 0,5 µg/mL de AFB2 e AFG2. As amostras foram consideradas positivas quando foi originado um pico no tempo de retenção similar ao de cada padrão, com um *height* cinco vezes maior do que o ruído da linha de base.

### 2.3.2 Detecção de ácido ciclopiazônico

Todos os isolados foram cultivados em placas contendo meio Czapeck Yeast Ágar – CYA (sacarose 30 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0g/L; NaNO<sub>3</sub> 2 g/L, KCl 0,5g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L; FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O 0,01 g/L, CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O 0.05 g/L, agar 20 g/L) e incubadas a 25° C por 14 dias (GQALENI et al., 1997). Três *plugs* agar foram removidos da área central da colônia, pesados e introduzidos em um vial de 4 mL, onde foi adicionado um volume de 1 mL de metanol. Após 60 minutos sem agitação, os extratos foram filtrados em filtros de 0.45µm, diluídos e depois analisados por HPLC. As amostras foram analisadas utilizando um HPLC equipado com uma Varian 2050 UV detector (285 nm). Realizaram-se as separações cromatográficas em uma coluna EuroSpher (Knauer, 4,6 mm x 250 mm, 5m), montada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. O fluxo da fase móvel utilizada foi de 1,0 mL/min e consistiu do seguinte programa: acetonitrila: acetato de amónio 50 mM (3:1, v / v), pH 5. O volume de injeção foi de 50 µL (BRAGULATI; ABARCA; CABAÑES et al., 2001). O

padrão de ácido ciclopiazônico utilizado foi o da Sigma (St. Louis, MO, EUA). As amostras foram tomadas como positivas quando foi originado um pico a um tempo de retenção similar ao do padrão, com tempos *height* cinco vezes mais elevados do que o ruído da linha de base.

#### 2.4 Perfis proteômicos por MALDI-TOF MS

Para a análise dos isolados de *Aspergillus*, uma suspensão de esporos foi transferida para placas de Petri contendo 10 mL de MEA. As culturas foram incubadas no escuro por cinco dias a 28° C. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi obtida da MUM e utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS. As células da *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foram cultivadas em meio Luria Bertani Agar (Tryptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) a 37° C durante 20 horas (Rodrigues *et al.*, 2011). Após o período de incubação dos fungos, 50  $\mu$ g de esporos e micélio jovem de cada microrganismo, foram transferidos diretamente da placa de cultura para a placa de aço inoxidável de MALDI-TOF MS. Imediatamente, 0,5  $\mu$ L da Solução de matriz (75 mg / ml de ácido 2,5- diidroxibenzoico em água/etanol/acetonitrila (1:1:1) com 0,03% de ácido trifluoroacético) foram adicionados na placa. O mix da amostra e da matriz foi seco ao ar e para a garantia de reprodutibilidade, cada amostra foi feita em duplicata.

As análises foram realizadas em um sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipado com um laser de nitrogênio (337 nm). Para calibração externa, doze proteínas ribossomais conhecidas de *E. coli* foram utilizadas: DH5 $\alpha$  (4.365,4; 5.096,8; 5.381,4; 6.241,4; 6.255,4; 6.316,2; 6.411,6; 6.856,1; 7.158,8; 7.274,5; 7.872,1; 9.742 e 12.227,3 Da). Após a obtenção das listas de picos, estes foram exportadas para o programa SARAMIS™ (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, ([www.anagnostec.eu](http://www.anagnostec.eu)), onde realizou-se a identificação microbiana, por meio de comparação das listas de picos das amostras individuais com o banco de dados. As identificações microbianas através do

Banco de dados SARAMIS™ são baseadas na presença ou ausência de cada pico no espectro. Um dendograma baseado na análise proteômica das linhagens foi criado através do SARAMIS™.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização morfológica

No presente trabalho, foi realizada a identificação e a caracterização de 31 estirpes de *Aspergillus* da Seção *Flavi*, isolados de diferentes produtos agrícolas do Brasil e isolados obtidos na Micoteca do Minho, Braga, Portugal.

Com base nas análises macroscópicas (CYA, CZ e MEA) e microscópicas, distinguiram-se três principais espécies: I - quatro isolados que apresentaram distinta cor marrom, presença de conídios globosos, com parede rugosa e predominantemente bisseriados (*A. tamarii*), II - 13 isolados com coloração verde-claro, com conídios lisos a finamente rugosos e variação no morfotipo, sendo uni e biseriados (*A. flavus*), e grupo III - três isolados que apresentaram coloração verde-escuro, esporos esféricos com parede rugosa e morfotipo predominantemente uniseriados (*A. parasiticus*) (Figura 2). Rodrigues et al. (2011) analisaram 352 isolados de *Aspergillus* da Seção *Flavi* e com base nas mesmas características utilizadas neste estudo, também obtiveram três morfotipos, sendo eles *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. tamarii*. Dentre os isolados analisados neste estudo, um se destacou dos demais *Aspergillus* (CDCA 42), pois apresentou no reverso do meio CYA 37°C, uma coloração mais escura do que os outros isolados da espécie *A. tamarii*. A última espécie descrita da Seção *Flavi*, *A. bertholletius*, também demonstrou característica diferenciada no meio de cultivo CYA 37 °C, os isolados tiveram um lento crescimento neste meio (TANIWAKI et al., 2012).

Para complementar os dados da fisiologia, foi utilizado o meio de cultivo AFPA, a fim de se confirmar a identificação das espécies *A. flavus* e



*A. parasiticus*. A figura 1 demonstra o perfil de cada espécie. Dos 20 isolados da Coleção de Cultura do DCA, 85% (17/20) apresentaram no reverso do meio AFPA, uma coloração laranja brilhante, confirmando ser *A. flavus* ou *A. parasiticus*, entretanto 15% (3/20) apresentaram reverso com coloração marrom, indicando ser *A. tamarii* ou *A. oryzae*. De acordo com Santos, Venâncio e Lima (1998), este meio de cultivo é utilizado para detectar fungos toxigênicos em diversos substratos. As espécies produtoras de toxina, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* apresentaram uma coloração amarela/laranja no reverso das colônias. Esta cor laranja é devida à reação de ácido aspergílico com citrato férrico.

Outra análise realizada foi a caracterização dos isolados, de acordo com a presença e a ausência de escleródios e a produção de micotoxinas. Cinquenta e oito por cento dos isolados analisados (18/31) produziram escleródios no meio de cultivo. Entretanto, 100% dos isolados que possuíam escleródios (18/18), sintetizaram aflatoxinas do tipo B e 72,22% (13/18) que sintetizaram escleródios, também foram produtores de ácido ciclopiazônico. Sendo assim, neste trabalho, foi observada relação positiva entre a presença de escleródio e a síntese de micotoxinas. De acordo com Pildain et al. (2004), os fungos que produzem escleródios, conseqüentemente produzem micotoxinas. Entretanto, Klich (2007) ressalta que apenas a presença de pequenos escleródios no meio de cultivo pode estar relacionada com a produção de aflatoxinas. Estudos genéticos realizados por Duran et al. (2007), demonstraram que a presença do gene *veA* em *A. flavus* é necessário para produção de aflatoxinas B1, B2, escleródios e também está relacionado com a síntese de ácido ciclopiazônico.

Figura 1 Observação do reverso das colônias para identificação de espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* em meio de cultivo *A. flavus* e *A. pasrasiticus* Agar (AFPA), dos isolados (a) I- CCDCA 042- *A. tamarii*, (b) II- CCDCA 046- *A. flavus* e (c) III- CCDCA 045- *A. parasiticus*

Na figura 2 e 3, é possível observar todas as características macroscópicas e microscópicas utilizadas na caracterização morfológica dos respectivos isolados.

Figura 2 Observação dos caracteres macroscópicos e microscópicos para diferenciação das três espécies: (a) I - CCDCA 042 - *A. tamarii*, (b) II - CCDCA 046 - *A. flavus* e (c) III - CCDCA 045 - *A. parasiticus*

Tabela 1 Marcadores morfológicos e bioquímicos utilizados na identificação dos isolados de *Aspergillus* Seção *Flavi*

Dados morfológicos				
Código da Coleção	Classificação	Origem	Diâmetro dos conídios ( $\mu\text{m}$ )	Seriação
MUM 12.11	<i>A</i> . <i>b</i> <i>e</i> <i>r</i> <i>t</i> <i>h</i> <i>o</i> <i>l</i> <i>l</i> <i>e</i> <i>t</i> <i>i</i> <i>u</i> <i>s</i>	Castanha do Brasil	6.0	u
CCDCA 044	<i>A</i> . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	Pimenta	4.5	b

CCDCA 046	A . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Uva</b>	4.5	b
CCDCA 047	A . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Ração Humana</b>	3.8	b
CCDCA 048	A . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Café</b>	3.5	u/b
CCDCA 049	A . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Café</b>	4.0	b
CCDCA 050	A . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Uva</b>	4.0	b
CCDCA 051	A . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Uva</b>	4.5	u/b

CCDCA 052	<i>A</i> . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Ração Humana</b>	4.5	u/b
CCDCA 053	<i>A</i> . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Pimenta</b>	4.5	u/b
CCDCA 054	<i>A</i> . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Ração Humana</b>	3.8	b
CCDCA 055	<i>A</i> . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Ração Humana</b>	3.8	u/b
CCDCA 056	<i>A</i> . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Uva</b>	4.3	u/b
CCDCA 057	<i>A</i> . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Café</b>	4.5	u/b
CCDCA 058	<i>A</i> . <i>f</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>v</i> <i>u</i> <i>s</i>	<b>Ração Humana</b>	4.5	u/b

	<i>f</i>			
	<i>l</i>			
	<i>a</i>			
	<i>v</i>			
	<i>u</i>			
	<i>s</i>			
MUM 10.232	<i>A</i>	<b>Milho</b>	4.8	b
	<i>.</i>			
	<i>f</i>			
	<i>l</i>			
	<i>a</i>			
	<i>v</i>			
	<i>u</i>			
	<i>s</i>			
MUM 10.203	<i>A</i>	<b>Fruto de Prunus dulcis</b>	3.5	b
	<i>.</i>			
	<i>m</i>			
	<i>i</i>			
	<i>n</i>			
	<i>i</i>			
	<i>s</i>			
	<i>c</i>			
	<i>l</i>			
	<i>e</i>			
	<i>r</i>			
	<i>o</i>			
	<i>t</i>			
	<i>i</i>			
	<i>g</i>			
	<i>e</i>			
	<i>n</i>			
	<i>e</i>			
	<i>s</i>			
MUM 10.231	<i>A</i>	<b>Milho</b>	3.5	b
	<i>.</i>			
	<i>m</i>			
	<i>o</i>			
	<i>t</i>			
	<i>t</i>			
	<i>a</i>			
	<i>e</i>			
CBS 126849	<i>A</i>	-	3.5	b
	<i>.</i>			
	<i>n</i>			
	<i>o</i>			
	<i>v</i>			
	<i>o</i>			
	<i>p</i>			
	<i>a</i>			
	<i>r</i>			
	<i>a</i>			

	<i>s</i>			
	<i>i</i>			
	<i>t</i>			
	<i>i</i>			
	<i>c</i>			
	<i>u</i>			
	<i>s</i>			
MUM 10.242	<i>A</i>	-	4.5	u
	<i>.</i>			
	<i>o</i>			
	<i>r</i>			
	<i>y</i>			
	<i>z</i>			
	<i>a</i>			
	<i>e</i>			
CCDCA 043	<i>A</i>	<b>Café</b>	4.5	u
	<i>.</i>			
	<i>p</i>			
	<i>a</i>			
	<i>r</i>			
	<i>a</i>			
	<i>s</i>			
	<i>i</i>			
	<i>t</i>			
	<i>i</i>			
	<i>c</i>			
	<i>u</i>			
	<i>s</i>			
CCDCA 045	<i>A</i>	<b>Café</b>	4.5	u/b
	<i>.</i>			
	<i>p</i>			
	<i>a</i>			
	<i>r</i>			
	<i>a</i>			
	<i>s</i>			
	<i>i</i>			
	<i>t</i>			
	<i>i</i>			
	<i>c</i>			
	<i>u</i>			
	<i>s</i>			
CCDCA 059	<i>A</i>	<b>Uva</b>	4.5	u
	<i>.</i>			
	<i>p</i>			
	<i>a</i>			
	<i>r</i>			
	<i>a</i>			
	<i>s</i>			
	<i>i</i>			
	<i>t</i>			
	<i>i</i>			
	<i>c</i>			

MUM 10.201	<i>u</i> <i>s</i> <i>A</i> <i>.</i>	<b>Fruto de Prunus dulcis</b>	4.5	u
MUM 10.219	<i>p</i> <i>a</i> <i>r</i> <i>a</i> <i>s</i> <i>i</i> <i>t</i> <i>i</i> <i>c</i> <i>u</i> <i>s</i> <i>A</i> <i>.</i>	<b>Fruto de Prunus dulcis</b>	3.5	u
MUM 10.241	<i>s</i> <i>e</i> <i>r</i> <i>g</i> <i>i</i> <i>i</i> <i>A</i> <i>.</i>	-	4.5	u
CCDCA 041	<i>s</i> <i>o</i> <i>j</i> <i>a</i> <i>e</i> <i>A</i> <i>.</i>	<b>Café</b>	5.0	b
CCDCA 042	<i>t</i> <i>a</i> <i>m</i> <i>a</i> <i>r</i> <i>i</i> <i>i</i> <i>A</i> <i>.</i>	<b>Ração Humana</b>	5.5	b
CCDCA 060	<i>t</i> <i>a</i> <i>m</i> <i>a</i> <i>r</i> <i>i</i> <i>i</i> <i>A</i> <i>.</i>	<b>Uva</b>	5.0	b



	<i>t</i>			
	<i>a</i>			
	<i>m</i>			
	<i>a</i>			
	<i>r</i>			
	<i>i</i>			
	<i>i</i>			
MUM 00.10	<i>A</i>	<b>Fruto de Prunus dulcis</b>	5.0	b
	.			
	<i>t</i>			
	<i>a</i>			
	<i>m</i>			
	<i>a</i>			
	<i>r</i>			
	<i>i</i>			
	<i>i</i>			
MUM 10.214	<i>A</i>	<b>Fruto de Prunus dulcis</b>	4.5	b
	.			
	<i>t</i>			
	<i>r</i>			
	<i>a</i>			
	<i>n</i>			
	<i>s</i>			
	<i>m</i>			
	<i>o</i>			
	<i>n</i>			
	<i>t</i>			
	<i>a</i>			
	<i>n</i>			
	<i>e</i>			
	<i>n</i>			
	<i>s</i>			
	<i>i</i>			
	<i>s</i>			

u: uniseriado; b: bisseriado; n/d: não detectado; AFLA: aflatoxina; CPA: ácido ciclopiazônico; l:liso; f/r: finamente rugoso; r: rugoso; f/e: finamente equinulado e n/d: não detectado.

r:

### 3.2 Perfil micotoxigênico

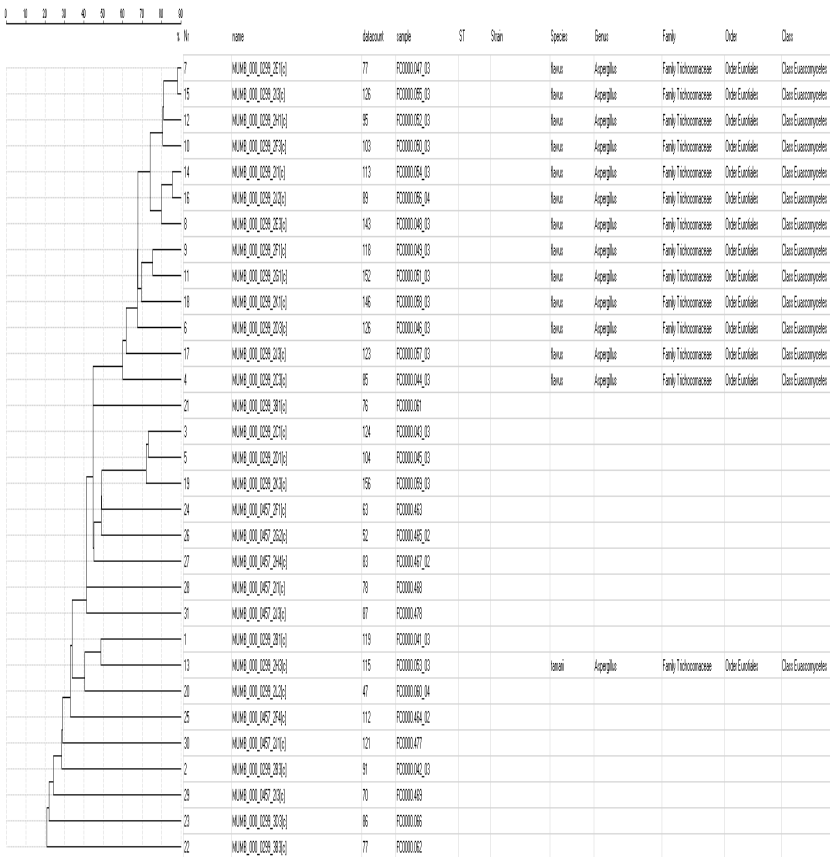
A produção de micotoxinas por fungos toxigênicos têm sido utilizadas para auxiliar a taxonomia. Entre os fungos da Seção *Flavi* do presente estudo, 70,96% (22/31) foram produtores de aflatoxinas, sendo 70,96% (22/31) de isolados produtores de aflatoxina do tipo B e 25,8% (8/31) do tipo G. Diversos autores também têm utilizado o perfil micotoxigênico para complementar os dados taxonômicos (AMAIKE; KELLER, 2011; ASTORECA et al., 2011; RODRIGUES; VENÂNCIO; KOZAKIEWICZ, 2009; RODRIGUES et al., 2011; SOARES et al., 2012; TANIWAKI et al., 2012).

Na tabela 1, é possível observar que o perfil micotoxigênico da espécie *A. parasiticus* foi bem consistente, pois sintetizou AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 e não produziu CPA. Para os isolados de *A. flavus*, observaram-se diferentes padrões de síntese de aflatoxinas, de acordo com o substrato utilizado. Quarenta por cento dos isolados (6/15) de *A. flavus* sintetizaram AFLA B1 e CPA, 46,6% (7/15) produziram BI, B2 e CPA e em apenas 13,33% (2/15) dos isolados não foi detectada a síntese de micotoxinas, de acordo com a metodologia utilizada (CLAE). E os isolados de *A. tamaritii* também apresentaram elevado perfil toxigênico, pois 100% (4/4) dos isolados não produziram aflatoxinas, mas sintetizaram ácido ciclopiazônico.

Além das aflatoxinas, os fungos da Seção *Flavi* também são conhecidos por produzirem outro tipo de toxina, conhecida como ácido ciclopiazônico (CHANG; HORN; DORNER, 2009; GQALENI et al., 1997). No presente trabalho, 70,96% (22/31) dos isolados foram produtores de CPA. As principais espécies conhecidas como produtoras de CPA são *A. flavus* e *A. tamaritii*, entretanto, *A. parasiticus* não sintetiza este tipo de micotoxina, como demonstrado na tabela 1.

### 3.3 Análise por MALDI-TOF

Quando é analisado o dendograma espectral, observa-se uma nítida separação das espécies analisadas no MALDI-TOF. Os 31 isolados ficaram agrupados em 13 diferentes *clusters*, mostrando assim que esta técnica conseguiu discriminar espécies morfológica e bioquimicamente relacionadas. A Figura 3 mostra o dendograma de parentesco baseado na análise espectral (MALDI-TOF MS).



Filter:  
 Error (%) 0.03  
 Absolute identity = 0  
 Relative identity = 1  
 Merge from 2001 to 2000  
 Select Evolution list

Figura 3 Dendrograma construído com base nas seqüências de proteínas obtidas no MALDI-TOF MS, das linhagens de *Aspergillus* Seção *Flavi*. As distâncias são medidas como porcentagem de similaridade.

Os isolados da Micoteca do Minho (MUM) não se agruparam com os isolados da Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA), mostrando que o método de armazenamento utilizado pelas Coleções de Cultura CCDCA e MUM também influenciou na análise de proteínas. Esta técnica é baseada nos dados gerados de proteínas ribossomais, com intervalo de massas de 2 a 20 kDa e podem ser utilizadas como biomarcadores (KALLOW et al., 2006; SANTOS et al., 2010). Através destes biomarcadores, foi possível separar o isodado (CCDCA 42), inicialmente identificado como *A. tamaraii*. Este isolado não se agrupou com os demais fungos identificados como *A. tamaraii*, mostrando que pela espectrometria de massa, a taxonomia deste isolado precisa ser complementada pela técnica de biologia molecular. Os resultados morfológicos destes isolados também apresentaram uma diferença em relação aos demais *A. tamaraii* analisados, pois o CCDCA42 apresentou um reverso

mais escuro em meio de cultivo CYA 37 °C. Sendo assim, estes resultados indicam uma rara ou nova espécie da Seção *Flavi*.

#### 4 CONCLUSÕES

O uso dos métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares permitiu uma identificação mais precisa das espécies da Seção *Flavi* da Coleção de Culturas do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA). Estes dados mostram a robustez da técnica morfológica, pois 100% dos isolados identificados pela análise morfológica foram confirmadas pelos métodos bioquímicos e quando é comparado à morfologia e o MALDI-TOF MS para identificação de fungos, obteve-se 95% de confiabilidade da técnica morfológica.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Brasil), pela concessão da bolsa do PDSE- Proc.8161-12-7, à FAPEMIG e CNPQ pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 107-133, Sept. 2011.

ASTORECA, A. L. et al. A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* poultry feeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 38-43, Mar. 2011.

BAQUIÃO, A. C. et al. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food Chemistry**, London, v. 139, n. 1/4, p. 1127-1132, Aug. 2013.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2/3, p. 139-144, Dec. 2001.

BRASE, S. et al. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. **Chemical Reviews**, Washington, v. 109, n. 9, p. 3903-3990, June 2009.

CALDERARI, T. O. et al. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: From rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 160, n. 3, p. 267-272, Jan. 2013.

CHANCHAROONPONG, C.; HSIEH, P. C.; SHEU, S. C. Enzyme production and growth of *A. oryzae* on soybean koji fermentation. **APCBEE Procedia**, [S.l.], v. 2, p. 56-61, Apr. 2012.

CHANG, P. K.; HORN, B. W.; DORNER, J. W. Clustered genes involved in cyclopiazonic acid production are next to the aflatoxin gene cluster in *Aspergillus flavus*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, n. 2, p. 176-182, Feb. 2009.

DURAN, R. M. et al. Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 73, n. 5, p. 1158-1168, Jan. 2007.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their Mycotoxins. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 49, n. 1, p. 1-74, 2004.

GEISER, D. M. et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p. 1-10, 2007.

GQALENI, N. et al. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 1048-1053, Mar. 1997.

GONÇALVES, J. S. et al. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 1817-1825, Apr. 2012.

GONÇALVES, S. S. et al. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. **Medical Mycology**, Oxford, p. 1-9, Apr. 2011. Disponível em: <<http://pgodoy.com/wp-content/uploads/2011/10/Aspergillus-novoparasiticus.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2013.

KALLOW, W. et al. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* characterised by MALDI-TOF MS. In: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS, 8., 2006, Bologna. **Proceedings...** Bologna: Monduzzi, 2006. p. 189-193.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, Jan. 2002.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 1-80, 2007.

MAHGUBI, A. et al. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. **Food Control**, Guildford, v. 32, n. 1, p. 143-148, July 2013.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

PILDAIN, M.B. et al. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 31-40, May 2004.

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**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 61-68, Oct. 2012.

RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, n. 4. p. 877-892, July 2011.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z. A polyphasic approach to the identification and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 187-193, Feb. 2009.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SANTOS, C. et al. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 2, p. 168-175, Mar. 2010.

SANTOS, I. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. **Fungos contaminantes na indústria alimentar**. Braga: Universidade do Minho, 1998. 128 p.

SIMÕES, M. F. et al. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: MALIK, A.; GROHMANN, E.; ALVES, M. (Ed.). **Management of microbial resources in the environment**. The Netherlands: Springer, 2013. chap. 5, p. 91-117.

SIRISOMBOON, C.; PUTTHANG, R.; SIRISOMBOON, P. Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. **Food Control**, Guildford, v. 33, n. 1, p. 207-214, Sept. 2013.

SOARES, C. et al. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. **Mycologia**, New York, v. 104, n. 3, p. 682-697, May 2012.

TANIWAKI, M. et al. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. **PLOS ONE**, San Francisco, CA, v. 7, n. 8, p. 1-7, Aug. 2012.

VAAMONDE, G. et al. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* Section *Flavi* from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n.1, p. 79-84, Nov. 2003.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 69, n. 1, p. 57-80, June 2011.

## TERCEIRO CAPÍTULO

### ARTIGO 2

#### **Integração de análises morfológica, fisiológica e de espectrometria de massa para identificação de fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* e *Circumdati***

Fabiana Aparecida Couto<sup>1</sup>, Eustáquio Souza Dias<sup>1</sup>, Cledir Santos<sup>2</sup>, Nelson Lima<sup>2</sup> e Luís Roberto Batista<sup>\*3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup>IBB- Centro de Engenharia Biológica, Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

\*Autor para correspondência:

Luís Roberto Batista, (DCA) Campus da Universidade Federal de Lavras, Caixa postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

E-mail: [luisrb@dca.ufla.br](mailto:luisrb@dca.ufla.br)

Tel: +35 38291407



## RESUMO

Fungos do gênero *Aspergillus* Seções *Nigri* e *Circumdati* fazem parte do subgênero *Circumdati* e são amplamente utilizados na indústria alimentícia e na biotecnologia. Entretanto, devido à presença de espécies estritamente relacionadas, estas seções têm sido reclassificadas por meio da abordagem polifásica. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo identificar os fungos filamentosos pertencentes às Seções *Nigri* e *Cicumdati* obtidos na Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos (CDCA) e na Micoteca do Minho (MUM). Quarenta e cinco isolados foram identificados pela combinação de diferentes métodos: morfológicos (nos meios de cultivo padronizados CYA 25°C, MEA 25°C, CZ 25°C (para Seção *Nigri*) e CYA 25°C, CYA 37°C, MEA (para Seção *Circumdati*), fisiológicos (análise de ocratoxina (OTA) e fumonisina (FUM) (para Seção *Nigri*) e produção de ocratoxina A (para a Seção *Circumdati*). Também foi realizada a técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). Os isolados foram identificados pelo método clássico de morfologia, porém, uma espécie da Seção *Nigri* destacou-se quanto à coloração do micélio e estruturas microscópicas. Este isolado, morfológicamente, não correspondia a nenhuma das espécies da Seção *Nigri* conhecidas até o momento e não era produtor de micotoxina. Cinquenta por cento dos isolados da Seção *Circumdati* (10/20), foram produtores de OTA, enquanto que apenas 19,23% de fungos ocratoxigênicos da Seção *Nigri* foram detectados. Seis isolados de *Aspergillus niger* também foram produtores de outro tipo de micotoxina, a fumonisina. Os resultados do MALDI-TOF MS apresentaram elevado poder discriminatório, principalmente, para espécies estritamente relacionadas da Seção *Nigri*. Sendo assim, os dados obtidos a partir dessa abordagem indicam que os resultados do MALDI-TOF corroboraram com os dados da taxonomia clássica e análises bioquímicas. O isolado da Seção *Nigri* DCA19, não se agrupou com nenhuma outra espécie utilizada neste trabalho, evidenciando assim os resultados obtidos na análise morfológica e indicando a provável existência de uma rara ou nova espécie da Seção *Nigri*. Esses dados serão posteriormente confirmados pela análise de biologia molecular, que irá finalizar a abordagem polifásica.

Palavras-chave: Taxonomia, Micotoxinas e MALDI TOF MS.

## ABSTRACT

The genus *Aspergillus* fungi sections *Nigri* and *Circumdati*, participate in the subgenus *Circumdati* and are widely used in food industry and biotechnology. However, due to the presence of closely related species, these sections have been reclassified by polyphase approach. Thus, this study aimed to identify filamentous fungi belonging to sections *Nigri* and *Circumdati* obtained in the Culture Collection of the Department of Food Science (CDCA) and Micoteca do Minho (MUM). Forty five isolates were identified by combining different methods: morphology (in standard culture media CYA 25 °C, 25 °C MEA, CZ 25 °C (for Section *Nigri*) and CYA 25 °C, and 37 °C, MEA (Section for *Circumdati*), physiological (analysis of ochratoxin (OTA) and fumonisin (FUM) (for Section *Nigri*)) and producing ochratoxin a (for section *Circumdati*). The mass spectrometry technique (MALDI–TOF MS) was also performed. The isolates were identified by the classical method of morphology, however, one species of section *Nigri* stood out for color and microscopic structures of the mycelium. This isolated, morphologically, did not correspond to any of the species of section *Nigri* known at the moment and was not producer of mycotoxin. Fifty percent of the isolates section *Circumdati* (10/20) was OTA producers. However, six isolates of *Aspergillus niger* were also producers of fumonisin. Results of MALDI- TOF MS showed high discriminatory power, especially for closely related species of section *Nigri*. Thus, the data obtained from this approach indicate that the MALDI-TOF results corroborate with data from classical taxonomy and biochemical analyzes. The isolate section *Nigri* DCA19, did not group with no species used in this work, this reveals the probable existence of a rare or new species of section *Nigri*. . These data will be subsequently confirmed by the molecular biology analysis, which will finalize the polyphasic approach.

Keywords: Taxonomy, Mycotoxins and MALDI TOF MS

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Aspergillus* é um dos mais comuns e um dos mais importantes gêneros de fungos filamentosos, pois atua diretamente sobre o ecossistema natural e na saúde humana (BRASE et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011; SAMSON; VARGA, 2012). Dentro do gênero *Aspergillus*, existem duas seções que se destacam devido à importância em processos alimentícios e industriais, sendo elas a Seção *Nigri* e a Seção *Circumdati*. Essas seções, juntamente com as seções *Flavi*, *Wentii*, *Candidi*, *Cremeri* e *Sparsi* compõem o subgênero *Circumdati* (KLICH, 2006).

Os fungos da Seção *Nigri* são organismos importantes em processos biotecnológicos, econômicos e clínicos (VARGA et al., 2011). Entretanto, esse grupo é considerado um dos mais difíceis de ser identificado devido à sua complexidade e similaridade morfológica (SAMSON et al., 2007; SILVA et al., 2011). Várias novas espécies têm sido descritas (JURJEVIC et al., 2012; NOONIM et al., 2008; SERRA et al., 2006; VARGA et al., 2011), no entanto, elas não podem ser distinguidas apenas com base nos critérios morfológicos ou fisiológicos (SAMSON et al., 2007; VARGA et al., 2011). Atualmente, existem 26 espécies dessa seção distinguidas com base na abordagem polifásica (VARGA et al., 2011).

Além da Seção *Nigri*, as espécies da Seção *Circumdati* também são economicamente importantes, pois algumas espécies são capazes de produzir metabólitos tóxicos e podem ser utilizadas na biotransformação de esteroides e alcaloides (VARGA et al., 2003). Estes fungos contaminam diversos produtos agrícolas, sendo que o café é um dos substratos com elevado índice de contaminação com fungos desta seção (BATISTA et al., 2009).

A taxonomia clássica para classificação das espécies do gênero *Aspergillus* é baseada, principalmente, em critérios morfológicos (KLICH, 2002), contudo, a taxonomia baseada exclusivamente na morfologia revelou uma série de incongruências taxonômicas e por esta razão, novas metodologias têm sido aliadas às técnicas convencionais. Portanto, o auxílio de dados bioquímicos, moleculares e de espectrometria de massa, juntamente com os dados morfológicos, torna a identificação mais precisa e a mais aceita entre os taxonomistas. Sendo assim, a abordagem polifásica, que utiliza diferentes técnicas de identificação, é considerada confiável na identificação de fungos e outros microrganismos (SIMÕES et al., 2013).

Outro componente muito utilizado na identificação de fungos é o perfil micotoxigênico das espécies. A micotoxina mais importante produzida por várias espécies do gênero *Aspergillus* é a ocratoxina A (OTA), uma substância que mostra efeitos nefrotóxicos, teratogênicos, hepatotóxicos, cancerígenos (PITT; HOCKING, 1997). Este metabólito secundário é produzido principalmente por espécies da Seção *Nigri* e Seção *Circumdati*, encontradas em clima quente e tropical (ASTA et al., 2008). Na última década, tem sido claramente demonstrado que as espécies *A. carbonarius* (Seção *Nigri*) e *A. westerdijkiae* (Seção *Circumdati*) são as principais

espécies produtoras de OTA (CABAÑES; BRAGULAT; CASTELLÁ, 2013), sendo que estas têm sido isoladas em alimentos e bebidas em todo o mundo (BATISTA et al., 2009; COPETTI et al., 2013; LASRAM et al., 2012; SOARES; CALADO; VENÂNCIO, 2013; TANIWAKI et al., 2003).

Devido às incongruências taxonômicas, novas ferramentas, como a espectrometria de massa, tem sido requerida para auxiliar o sistema taxonômico. O princípio desta técnica envolve a ionização de grandes proteínas por meio de aplicação de luz ultravioleta (MALDI), seguida pela detecção de íons (TOF) (MARVIN; ROBERTS; FAY, 2003). Recentemente, esta técnica tem sido vista como uma ferramenta rápida e eficaz para complementar os métodos de identificação bioquímica e genômica (DE CAROLIS et al., 2012). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar e identificar 45 estirpes de *Aspergillus* pertencentes às Seções *Nigri* e *Circumdati*, por meio da associação de dados morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e de espectrometria de massa.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cultura de fungos

Dezenove isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri* e 20 isolados da Seção *Circumdati*, foram obtidos na Micoteca do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos (CDCA) da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras/MG (Tabela 3). Também foram utilizadas neste trabalho, seis espécies de referência da Micoteca da Universidade do Minho (MUM 06.153 *A. vadensis*, MUM 08.01 *A. uvarum*, MUM 06.151 *A. sclerotioniger*, MUM 06.152 *A. tubingensis*, MUM 06.150 *A. lacticoffeatus* e MUM 03.49 *A. ibericus* (Tabela 3). Os fungos foram reativados em meio de extrato de malte (MA-extrato de malte 20,0g; ágar 20g; água destilada 1000 mL) por sete dias a 25°C.

### 2.2 Caracterização morfológica dos isolados

Os fungos foram cultivados em diferentes meios de cultivo padronizados. Para cada isolado foi preparada uma solução de esporos de 0,2% de agar (KLICH, 2002), que foi inoculada em três pontos de uma placa de Petri de nove centímetros de diâmetro, contendo 20 mL de cada meio de cultivo: Czapeck Yeast Ágar – CYA (sacarose 30 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0g/L; NaNO<sub>3</sub> 2 g/L, KCl 0,5g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01 g/L, CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O 0,05 g/L, agar 20 g/L), incubado às temperaturas de 25°C por sete dias, para Seção *Nigri* e CYA 25°C e 37°C para Seção *Circumdati*, Malt Extract Agar- MEA (extrato de malte 20,0 g/L; peptona 1,0 g/L; Glicose 30,0 g/L; ágar 20 g/L; água destilada 1 L) a 25°C por

sete dias e Czapek – CZ (sacarose 30 g/L,  $K_2HPO_4$  1,0g/L;  $NaNO_3$  2 g/L, KCl 0,5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g/L;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  0.01 g/L,  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  0.005 g/L, agar 20 g/L) a 25°C por sete dias para Seção *Nigri*. Após o período de crescimento, foram observadas as características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) descritas conforme Klich (2002) e Pitt e Hocking (1997). A identificação das espécies foi feita conforme as chaves de identificação propostas para o gênero *Aspergillus* (KLICH, 2002).

### 2.3 Produção de ocratoxina A

Esporos de cada uma das linhagens foram suspensos em um mL de solução aquosa contendo 0,2% de ágar e, em seguida, foram inoculados em um ponto único em placas de Petri, contendo cinco mL de meio Extrato de Levedura Sacarose Agar (YES: extrato de levedura 20 g/L, sacarose 150 g/L, agar 15 g/L). As linhagens foram então incubadas durante sete dias no escuro a 25°C. Para a extração da OTA, foi utilizada a metodologia descrita por Bragulat, Abarca e Cabañes (2001), onde foram retirados três *plugs* de cada colônia e colocados em um frasco de quatro mL e adicionado um mL de metanol. Após 60 minutos, os extratos foram filtrados através de filtros de seringa de PTFE com poros de 0,45  $\mu m$  e colocado em frascos de um mL, em seguida, o material foi evaporado com nitrogênio. As amostras foram analisadas utilizando HPLC equipado com um detector de fluorescência Jasco FP-920 (333 nm de comprimento de onda de excitação/emissão de 460 nm de comprimento de onda), utilizando-se um reator fotoquímico de derivatização pós-coluna (PHRED unit – Aura Industries, USA). As separações cromatográficas foram realizadas numa coluna de fase reversa C18 (Waters Spherisorb ODS2, 4,6 mm x 250 mm, 5  $\mu m$ ), equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila: água: ácido acético (99: 99: 2, v/v/v) com fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura da coluna foi ajustada para 28°C e o volume de injeção foi de 50  $\mu L$ . O padrão de OTA, contendo 10,0  $\mu g/mL$  foi obtido da Sigma-Aldrich. As amostras foram consideradas positivas quando um pico no tempo de retenção similar ao padrão foi detectado com uma altura cinco vezes maior do que o ruído de linha de base.

### 2.4 Produção de fumonisina B<sub>2</sub>

Para verificar a produção de FB<sub>2</sub>, foi preparada uma suspensão de esporos para cada linhagem em um mL de suspensão aquosa contendo 0,2% de ágar e foram inoculadas em um ponto único em placas de Petri, contendo cinco mL de meio de Czapek Yeast Agar (sacarose 30 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L,  $K_2HPO_4$  1,0g/L;  $NaNO_3$  2 g/L, KCl 0,5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g/L;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01 g/L,  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  0.05 g/L, agar 20 g/L). Todas as linhagens foram incubadas durante sete dias no escuro a 25°C. Após esse período, foram removidos cinco *plugs*

de ágar de cada colônia e transferidos para um frasco de quatro mL de e adicionado um mL de metanol: H<sub>2</sub>O destilada (3:1, v/v). Os frascos foram misturados em vórtex e colocados em banho de ultrasons (Sonicor) durante 50 minutos, para aumentar a eficiência na extração da FB<sub>2</sub>. Os extratos foram filtrados através de filtros de seringa de PTFE com poros de 0,45 µm e colocados em frascos de quatro mL e, em seguida, evaporados com nitrogênio. Após a extração, ocorreu o processo de derivatização com 2,3-naftaleno-dicarboxaldeído (NDA). Para a reação de derivatização, os reagentes foram adicionados a cada frasco: 200 µL de metanol, 200 µL de tampão borato 0,05 M (pH 9,5, ajustado com NaOH 2 N), 100 µL de solução de cianeto de sódio (0,13 mg/mL em água destilada) e 100 µL de solução de NDA (0,25 mg/mL em metanol). As amostras foram imediatamente agitadas em vórtex durante um minuto, mantidas a 60°C durante 15 minutos em banho termostático e depois esfriadas à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram diluídas com 1,4 mL de acetonitrila: H<sub>2</sub>O destilada (3:2, v/v) e analisadas por HPLC utilizando um injetor automático (ABRUNHOSA; CALADO; VENÂNCIO, 2011).

As amostras foram então analisadas utilizando HPLC equipado com um detector de fluorescência Jasco FP-920 (420 nm de comprimento de onda de excitação/500 nm de comprimento de onda de emissão). As separações cromatográficas foram realizadas numa coluna C18 (Waters Spherisorb ODS2, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm), equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila: água: ácido acético (60: 40: 1, v/ v/ v) e o fluxo foi ajustado para 1,0 mL/min. A temperatura da coluna foi ajustada para 28°C e o volume de injeção foi de 50 µL. O padrão para FB<sub>2</sub> contendo 50,0 µg/mL foi obtido da Sigma-Aldrich. As amostras foram consideradas positivas quando um pico no tempo de retenção similar ao padrão foi obtido, com uma altura cinco vezes maior do que o ruído de linha de base.

## 2.5 Perfis proteômicos por MALDI-TOF MS

Para a análise dos isolados de *Aspergillus*, uma suspensão de esporos foi transferida para placas de Petri contendo 10 mL de MEA. As culturas foram incubadas no escuro por cinco dias a 28°C. *Escherichia coli* DH5α foi obtida da MUM e utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS. As células da *Escherichia coli* DH5α foram cultivadas em meio Luria Bertani Agar (Tripton 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) a 37°C durante 20 horas (RODRIGUES et al., 2011). Após o período de incubação, 50 µg de esporos e micélio jovem de cada microrganismo foram transferidos diretamente da placa de cultura para a placa de aço inoxidável de MALDI-TOF MS. Imediatamente, 0,5 µL de Solução de matriz (75 mg / ml de ácido 2,5 - diidroxibenzoico em água/etanol/acetonitrila (1:1:1) com 0,03% de ácido trifluoroacético) foram adicionados na placa. O mix da amostra e da matriz foram secas ao ar e

em temperatura ambiente. Para a garantia de reprodutibilidade, cada amostra foi feita em duplicata.

As análises foram realizadas em um sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipado com um laser de nitrogênio (337 nm). Para calibração externa, doze proteínas ribossomais conhecidas de *E. coli* foram utilizadas: DH5 $\alpha$  (4.365,4; 5.096,8; 5.381,4; 6.241,4; 6.255,4; 6.316,2; 6.411,6; 6.856,1; 7.158,8; 7.274,5; 7.872,1; 9.742 e 12.227,3 Da). Após a obtenção das listas de picos, os espectros foram exportadas para o programa SARAMIS™ (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Germany, ([www.anagnostec.eu](http://www.anagnostec.eu)), onde realizou-se a identificação microbiana, por meio de comparação das listas de picos das amostras individuais com o banco de dados. As identificações microbianas através do SARAMIS™ são baseadas na presença ou ausência de cada pico no espectro. Um dendograma baseado na análise proteômica das linhagens foi criado através do SARAMIS™.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização e identificação dos isolados

Diversos marcadores morfológicos foram analisados neste estudo, como a textura da colônia, cor e crescimento nos meios de cultura, a formação de exsudato, de pigmentos solúveis e de escleródios. Além dos marcadores, as características mais importantes das colônias também foram exploradas, como o padrão de crescimento, tamanho e seriação, dimensões e textura da superfície dos conídios, a forma e o tamanho de métulas e fiáides. Estas características são fundamentais para a compreensão do conceito de espécie morfológica (KLICH, 2002).

#### 3.2 Identificação morfológica e bioquímica de *Aspergillus* Seção *Nigri*

Os isolados analisados neste trabalho pertencem à Seção *Nigri* e apresentam características marcantes, como a coloração dos conídios que variam de marrom-escuro a preto, possui conidióforos que podem ser uni ou biseriados e vesículas esféricas (Tabela 1) (KLICH, 2002; PERRONE et al., 2007).

Nas tabelas 1 é possível observar as características de crescimento das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* estudadas no meio de cultivo CYA 25°C, depois de sete dias de incubação.

Tabela 1 Marcadores morfológicos e bioquímicos utilizados na classificação dos isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri*

Dados Morfológicos								
Código da Coleção	Classificação Fenotípica	Origem	Cor	Diâmetro (mm)	CYA 25 °C		MEA 25°C	
					Cor	Tamanho	Diâmetro dos conídios (µm)	Textura conídios
CCDCA 07	<i>A. aculeatus</i>	Uva	Marrom escuro	6.8	Marrom escuro	6.9	3.5	e
CCDCA 14	<i>A. aculeatus</i>	Uva	Marrom escuro	6.8	Marrom escuro	6.9	3.5	e
CCDCA 12	<i>A. brasiliensis</i>	Solo contaminado com metal pesado	Preto-acinzentado	5.7	Preto	5.0	3.5	r
CCDCA 15	<i>A. carbonarius</i>	Uva	Preto	6.6	Preto	5.4	7.0	r
CCDCA 09	<i>A. foetidus</i>	Milho	Preto	6.3	Marrom escuro/preto	6.3	3.5	l/r
CCDCA 18	<i>A. foetidus</i>	Ração Humana	Preto	6.3	Marrom escuro/preto	6.3	3.5	l
MUM 03.49	<i>A. ibericus</i>	Uva	Marron	5.3	Marrom	6.2	5.0	e
CCDCA 10	<i>A. japonicus</i>	Uva	Marrom-escuro	6.7	Preto	6.3	4.0	e
CCDCA 17	<i>A. japonicus</i>	Uva	Marrom-escuro	6.7	Preto	6.3	4.0	e
MUM 06.150	<i>A. lacticoffeatus</i>	Café	Marron	4.7	Marrom	6.5	3.5	l
CCDCA 02	<i>A. niger Agregado</i>	Uva	Preto	6.3	Preto	6.6	2.5	l
CCDCA 03	<i>A. niger Agregado</i>	Silagem	Preto	6.6	Preto	6.3	3.5	l/r
CCDCA 04	<i>A. niger Agregado</i>	Uva	Preto	6.2	Preto	6.5	4.5	r
CCDCA 05	<i>A. niger Agregado</i>	Café	Preto	6.5	Preto	6.5	4.0	r
CCDCA 08	<i>A. niger Agregado</i>	Café	Preto	6.4	Preto	6.2	4.5	r
CCDCA 11	<i>A. niger Agregado</i>	Uva	Preto	6.5	Preto	6.5	4.5	r
CCDCA 13	<i>A. niger Agregado</i>	Uva	Preto	6.5	Preto	6.5	4.8	r
CCDCA 16	<i>A. niger Agregado</i>	Uva	Preto	6.6	Preto	6.3	4.8	r
CCDCA 06	<i>A. niger</i>	Café	Preto	6.7	Preto	5.5	4.8	r
MUM 06.151	<i>A. sclerotioniger</i>	Café	Amarelo	6.1	Amarelo	5.3	6.0	r
CCDCA 19	<i>Aspergillus sp.</i>	Café	Preto-amarelado	6.2	Preto	5.7	3.3	l/r
MUM 06.152	<i>A. tubingensis</i>	-	Cinza	5.5	Cinza claro	6.0	3.0	l
MUM 08.01	<i>A. uvarum</i>	Uva	Marron	6.4	Marron	7.1	4.5	e
MUM 06.153	<i>A. vadensis</i>	Tecido vegetal morto	Marron	5.5	Marron	6.6	4.0	r

e: equinulados; r: rugoso; l: liso; l/r: lisos à finamente rugosos.

Dos 26 isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri* estudados no presente trabalho, um destes destacou-se dos demais isolados, devido à coloração do micélio. *Aspergillus* sp. DCA19, que foi isolado do café apresenta características microscópicas que se assemelham à espécie *A. niger*. Entretanto, a textura dos conídios e, principalmente, o micélio, que exhibe distintamente



coloração amarela, se diferencia desta espécie. Apesar da coloração deste isolado ser semelhante à espécie *A. sclerotioniger*, que também foi isolada do café, todas as outras características não são encontradas neste isolado, principalmente a formação de escleródios, marcador morfológico de *A. sclerotioniger* (SAMSON et al., 2004).

Após a identificação morfológica, os 26 isolados da Seção *Nigri* foram analisados quanto à produção de ocratoxina A e fumonisina. Neste trabalho, foi possível observar a presença de cinco isolados ocratoxigênicos nas amostras de uva, café e milho (*A. niger* Agregado, *A. carbonarius*, *A. sclerotioniger* e *A. lacticoffeatus*). Diversos estudos têm utilizado as micotoxinas para auxiliar na identificação dos fungos do gênero *Aspergillus* da Seção *Nigri* (CHIOTTA et al., 2011; LASRAM et al., 2012; SOARES; CALADO; VENÂNCIO, 2013). A espécie *A. carbonarius* era conhecida como sendo uma espécie 100% ocratoxigênica. Entretanto, um recente estudo demonstrou, pela primeira vez, a caracterização e a identificação de isolados de *A. carbonarius* não produtores de ocratoxina, em diferentes vinhedos do sul da Espanha (CABAÑES; BRAGULAT; CASTELLÁ, 2013). Recentemente, descobriu-se que além da ocratoxina, as espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* produzem outro tipo de micotoxina, denominada fumonisina (FRISVAD et al., 2007; MOGENSEN et al., 2010). Foi possível observar neste trabalho a presença de 2 isolados de *A. niger* Agregado e 4 isolados de *A. niger*, produtores de fumonisina. Estes dados corroboram com os resultados obtidos em diversos trabalhos (FRISVAD et al., 2011; NOONIM et al., 2008; SUSCA et al., 2010; VARGA et al., 2010).

Além dos marcadores toxigênicos, utilizou-se marcadores bioquímicos, como as proteínas ribossomais, para a identificação dos fungos filamentosos. A análise de agrupamento da Figura 1 foi feita com base na lista de valores de massas dos respectivos isolados e resultou na formação de *clusters* separados em nível de espécie. Oitenta e nove por cento dos isolados de *A. niger* Agregado (9/11) analisados anteriormente pela morfologia, foram identificados de acordo com o MALDI-TOF MS como sendo *A. niger*. A técnica de MALDI-TOF MS permitiu a separação de espécies morfológicamente relacionadas, como *Aspergillus ibericus* e *A. carbonarius*, assim como as espécies *A. japonicus* e *A. aculeatus*. Através da análise de MALDI-TOF MS, Kallow et al. (2006) demonstraram o agrupamento e a separação das espécies *A. aculeatus* e *A. japonicus*, confirmando assim, a proximidade entre estas duas espécies uniseriadas.

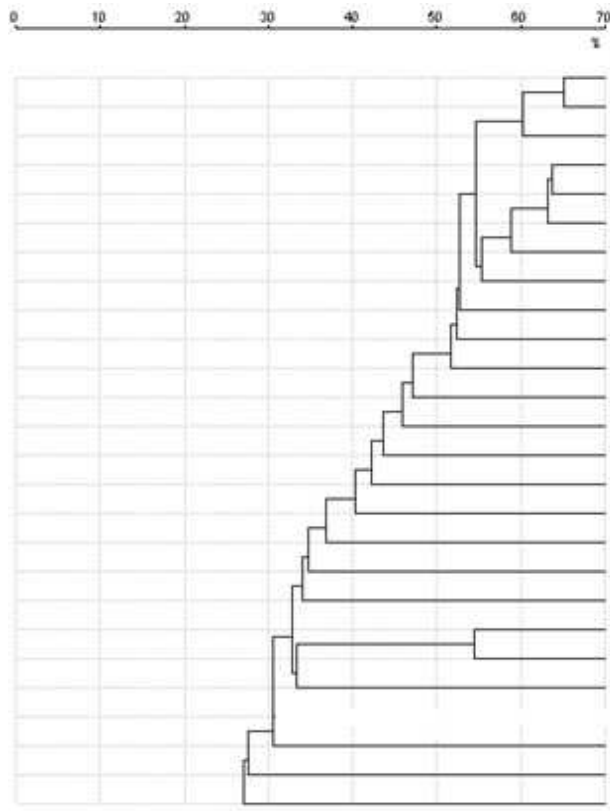


Figura 1 Dendrograma construído com base nas seqüências de proteínas obtidas no MALDI-TOF MS, das linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri*. As distâncias são medidas como porcentagem de similaridade

A espécie que não pôde ser identificada pela análise morfológica (CCDCA 19) não se agrupou com as outras espécies analisadas neste estudo. Sendo assim, após a realização da análise morfológica, bioquímica e de espectrometria de massas, sugere-se a provável existência de uma rara ou uma nova espécie da Seção *Nigri*, contudo, a confirmação destes dados será feita por biologia molecular.

Sendo assim, através da técnica de espectrometria de massa, foi possível obter espectros de qualidade que podem ser futuramente usados na construção de super-espectros e incluídos na base de dados já existentes, aumentando assim, a eficiência desta técnica na identificação de fungos filamentosos.

### 3.2 Análise morfológica e bioquímica de *Aspergillus* Seção *Circumdati*

Neste presente estudo também foram analisadas espécies pertencentes à Seção *Circumdati* que apresentam conídios variando do amarelo ao ocre, são biseriadas e muitas espécies sintetizam escleródios que variam na coloração e também auxiliam no processo de

identificação morfológica (Tabela 2) (KLICH, 2002; SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006). Recentemente, a taxonomia desta Seção, tem sido revista por taxonomia polifásica, devido à alta semelhança morfológica entre as espécies *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* (GIL-SERNA et al., 2009; 2011). Seis espécies de *Aspergillus* Seção *Circumdati* foram identificadas por morfologia, *A. auricomus*, *A. elegans*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum* e *A. sulphureus*.

Após o processo de identificação por morfologia, os isolados de *Aspergillus* Seção *Circumdati* foram analisados quanto à produção de ocratoxina A. Dos 20 isolados testados, 50% (10/20) foram produtores de OTA, sendo as espécies: *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. sulphureus* e *A. elegans*. Estas espécies também foram relatadas como sendo espécies ocratoxigênicas em outros trabalhos (BATISTA, Chalfoun, 2007; 2009; GIL-SERNA et al., 2011). Recentemente, Gil-Serna et al. (2011), também identificou por taxonomia polifásica uma espécie de *A. elegans* produtora de ocratoxina A (GIL-SERNA et al., 2009; 2011). Além destas espécies, Samson et al. (2004), descreveram oito novas espécies também produtoras de OTA: *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, *A. sulphurous* e *Neopetromyces muricatus*.

Morfologia				Micotoxina				
Código da Coleção	Classificação Fenotípica	Origem	Diâmetro dos conídios	Textura dos conídios	CYA 25°C	CYA 25°C	CYA 37°C	CYA 37°C
CCDCA 28	<i>A. auricomus</i>	Pimenta	3.5	l/r	Ocre-amarelada	5.1	-	-
CCDCA 39	<i>A. elegans</i>	Café	3.5	l/r	Ocre	5.3	Creme	0.5
CCDCA 23	<i>A. ochraceus</i>	Solo do cerrado	3.0	f/r	Ocre-amarelada	4.8	-	-
CCDCA 25	<i>A. ochraceus</i>	Solo do cerrado	3.0	f/r	Ocre-amarelada	5.4	-	-
CCDCA 26	<i>A. ochraceus</i>	Café	3.0	f/r	Ocre	5.0	-	-
CCDCA 27	<i>A. ochraceus</i>	Milho	3.0	f/r	Ocre	4.8	-	-
CCDCA 29	<i>A. ochraceus</i>	Café	3.0	f/r	Amarelo-dourado	5.5	Creme	1.5
CCDCA 30	<i>A. ochraceus</i>	Solo do cerrado	3.0	f/r	Ocre	4.8	-	-
CCDCA 34	<i>A. ochraceus</i>	Café	3.0	f/r	Ocre-amarelada	5.1	Amarelo claro	0.6
CCDCA 37	<i>A. ochraceus</i>	Café	3.0	f/r	Creme-ocre	4.1	-	-
CCDCA 40	<i>A. ochraceus</i>	Café	3.0	f/r	Ocre-amarelada	5.7	Amarelo claro	0.5
CCDCA 22	<i>A. ostianus</i>	Café	3.5	f/r	Ocre-amarelada	5.2	-	-
CCDCA 38	<i>A. sclerotiorum</i>	Café	3.0	f/r	Ocre	5.0	-	-
CCDCA 24	<i>A. sulphureus</i>	Café	3.5	f/r	Ocre	5.1	-	-
CCDCA 31	<i>A. sulphureus</i>	Solo do cerrado	3.5	f/r	Ocre	4.8	-	-
CCDCA 32	<i>A. sulphureus</i>	Café	3.5	f/r	Ocre-	5.3	Amarelo claro	0.7

					amarelada		
CCDCA 33	<i>A. sulphureus</i>	Ração	3.5	f/r	Ocre- amarelada	5.5	Amarelo claro 0.5
CCDCA 35	<i>A. sulphureus</i>	Silagem	3.5	f/r	Ocre	4.8	-
CCDCA 36	<i>A. sulphureus</i>	Pimenta	3.5	f/r	Ocre- amarelada	5.5	Amarelo claro 0.9

Tabela 2 Caracterização fenotípica e produção de ocratoxina A (OTA) para *Aspergillus* Seção *Circumdati*.

r: rugoso; l: liso; l/r: liso à finamente rugoso; f/r: finamente rugoso.

Para validar os métodos morfológicos e bioquímicos, os isolados foram analisados por MALDI-TOF MS. Os fungos da seção *Nigri* foram analisados com 32 horas de incubação, enquanto que para os isolados da Seção *Circumdati*, o período de 48 horas foi o mais indicado para as análises. Provavelmente, isso ocorre devido às diferenças nos níveis de esporulação dos fungos e gera diferenças significativas quanto ao número e intensidade dos picos de massas de proteínas (BIZZINI; GREUB, 2010). O dendrograma com base nos perfis proteômicos por MALDI-TOF MS das 20 linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* avaliadas neste estudo é apresentado na Figura 2.

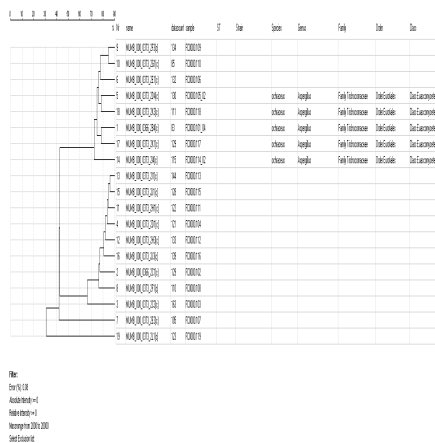


Figura 2 Dendrograma construído com base nas seqüências de proteínas obtidas no MALDI-TOF MS, das linhagens de *Aspergillus* seção *Circumdati*. As distâncias são medidas como porcentagem de similaridade.

Dos 20 isolados de *Aspergillus* Seção *Circumdati*, oito foram identificados como sendo *A. ochraceus*, pois, o restante dos isolados não pôde ser identificado por esta técnica, devido à falta de espectros de referência da Seção *Circumdati* na base de dados SARAMIS. Alanio et al. (2011) analisaram linhagens de *Aspergillus* seções *Circumdati*, *Fumigati*,

*Flavi, Terrei, Nigri, Nidulantes e Usti* e obtiveram 98,6% de confirmação taxonômica pelo MALDI-TOF MS.

## CONCLUSÕES

A taxonomia baseada no uso de diferentes técnicas permitiu uma identificação mais precisa das espécies da Seção *Nigri* e *Circumdati* da Coleção de Culturas do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA). Os dados obtidos na análise de espectrometria de massa confirmaram os resultados da análise morfológica, indicando uma taxonomia de consenso.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Brasil), pela concessão da bolsa do PDSE-Proc.8161-12-7, à FAPEMIG e CNPQ pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Incidence of fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* in Portuguese wine regions. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 59, n. 13, p. 7514-7518, June 2011.

ABRUNHOSA, L. et al. A fluorescence-lc method with NDA pre-column derivatization for fumonisin B<sub>2</sub> determination in black aspergilli cultures. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 34, n. 15, p. 1594-1603, Sept. 2011.

ALANIO, A. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 17, n. 5, p. 750-755, May 2011.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1549-1554, Nov. 2010.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2/3, p. 139-144, Dec. 2001.

BRASE, S. et al. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. **Chemical Reviews**, Washington, v. 109, n. 9, p. 3903-3990, June 2009.

CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 135-141, Dec. 2013.

CHIOTTA, M. L. et al. Phylogenetic characterization and ochratoxin A – fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated form grapes in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 149, n. 2, p. 171-176, June 2011.

COPETTI, M. V. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Chemistry**, London, v. 136, n. 1, p. 100-104, Jan. 2013.



DE CAROLIS, E. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 7, p. 2479-2483, July 2012.

FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin and ochratoxins production in *Aspergillus niger* strains. **PLOS ONE**, San Francisco, CA, v. 6, n. 8, p. 1-6, Aug. 2011.

FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 23, p. 9727-9732, Oct. 2007.

GIL-SERNA, J. et al. Discrimination of the main Ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1, p. 83-87, Nov. 2009.

GIL-SERNA, J. et al. Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati* – *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 2, p. 343-345, Feb. 2011.

JURJEVIĆ, Ž. et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. **MMA Fungus**, Bethesda, v. 3, n. 2, p. 159-173, Dec. 2012.

KALLOW, W. et al. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* characterised by MALDI-TOF MS. In: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS, 8., 2006, Bologna. **Proceedings...** Bologna: Monduzzi, 2006. p. 189-193.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, Jan. 2002.

KLICH, M. A. Identification of clinically relevant aspergilli. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 127-131, 2006.

LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 75-80, Oct. 2012.

MARVIN, L. F.; ROBERTS, M. A.; FAY, L. B. Matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 337, n. 1, p. 11-21, Nov. 2003.

MOGENSEN, J. M. et al. Production of fumonisin B2 and B4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 2, p. 954-958, Dec. 2010.

NOONIM, P. et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 7, p. 1727-1734, July 2008.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, n. 1, p. 53-66, Dec. 2007.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, n. 4, p. 877-892, July 2011.

SAMSON, R. A. et al. Diagnostic tools to identify black *aspergilli*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, n. 1, p. 129-145, Dec. 2007.

SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 45-61, 2004.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 133-148, 2006.

SAMSON, R. A; VARGA, J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). **Aspergillus: molecular biology and genomics**. Poole: Caister Academic Press, 2010. Chap. 2, p. 19-40.

SERRA, R. et al. *Aspergillus ibericus* : a new species of section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 2, p. 295-306, Apr. 2006.

SILVA, D. M. et al. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 761-773, Jan. 2011.

SIMÕES, M. F. et al. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: MALIK, A.; GROHMANN, E.; ALVES, M. (Ed.). **Management of microbial resources in the environment**. The Netherlands: Springer, 2013. chap. 5, p. 91-117.

SOARES, C.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 30, n. 1, p. 9-13, May 2013.

SUSCA, A. et al. Correlation of mycotoxin fumonisin B2 production and presence of the fumonisin biosynthetic gene *fum 8* in *Aspergillus niger* from grape. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 58, n. 16, p. 9266-9272, July 2010.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

VARGA, J. et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 30-32, Mar. 2003.

VARGA, J. et al. Fumonisin contamination and fumonising production black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 143-149, Oct. 2010.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 69, n. 1, p. 1-17, June 2011.