



LIDIANE ROBERTA CRUZ DA SILVA

**ESPÉCIES DE *PENICILLIUM* EM SOLOS DE CAATINGA E MATA
ATLÂNTICA, PRODUÇÃO DE TANASE E DETECÇÃO DO POTENCIAL
MICOTOXIGÊNICO**

RECIFE

FEVEREIRO/2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**ESPÉCIES DE *PENICILLIUM* EM SOLOS DE CAATINGA E MATA
ATLÂNTICA, PRODUÇÃO DE TANASE E DETECÇÃO DO POTENCIAL
MICOTOXIGÊNICO**

**LIDIANE ROBERTA
CRUZ DA SILVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia básica e aplicada

Orientador: Prof^a Dr^a
Cristina Maria de Souza-
Motta

Co-orientadores: Prof^a Dr^a
Keila Aparecida Moreira e
Prof^o Dr^o Cledir Santos

RECIFE

FEVEREIRO/2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Lidiane Roberta Cruz da

Espécies de *Penicillium* em solos de caatinga e Mata Atlântica, produção de tanase e detecção do potencial micotoxigênico / Lidiane Roberta Cruz da Silva. – Recife: O Autor, 2013.

202 f.: il.

Orientadores: Cristina Maria de Souza-Motta, Keila Aparecida Moreira,
Cledir Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2014.

Inclui referências anexos

1. I. Souza-Motta, Cristina Maria de(orient.) II. Moreira, Keila (coorient.)
III. Santos, Cledir (coorient.) IV. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-272

**ESPÉCIES DE *PENICILLIUM* EM SOLOS DE CAATINGA E MATA
ATLÂNTICA, DETECÇÃO DO POTENCIAL MICOTOXIGÊNICO E
PRODUÇÃO DE TANASE**

LIDIANE ROBERTA CRUZ DA SILVA

Data da defesa: 26/02/2013

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr^a Cristina Maria de Souza-Motta – (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Érika Valente de Medeiros

Universidade Federal Rural de Pernambuco-UAG

Dr. José Luíz Bezerra
Universidade Estadual de Santa Cruz

Dr. Marcelo Fraga
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Dr. Nelson Lima
Universidade do Minho

MEMBROS SUPLENTEs

Dr^a Neiva Tinti de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Oliane Maria Correia Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

Vem me pedir
além do que eu posso dar
É aí que o aprendizado está
Vem de onde não sonhei
me presentear...
Quando chega o fim da linha
e já não há aonde ir
Num passe de mágica
A vida nos traz sonhos pra seguir
Queima meus navios
pr'eu me superar
às vezes pedindo
que ela vem nos dar
o melhor de si
E quando vejo,
**a vida espera mais de mim
mais além, mais de mim**
O eterno aprendizado é o próprio fim
Já nem sei se tem fim!!!
De elástica, minha alma dá de si
Mais além, mais de mim
Cada ano a vida pede mais de mim...

Jorge Vercilo

DEDICO

A Deus de infinita bondade e misericórdia que me guia e ilumina sempre.

Ao meu fiél amigo anjo de guarda, que recebeu a incumbência de guiar por caminhos corretos e me fazer crescer moralmente.

Aos meus pais Roberto (*in memorian*) e Célia pelos valores transmitidos e incansável amor e a minha doce avó Chica (*in memorian*) por todo amor, zelo e companheirismo materno, minha eterna saudade. Não me lembro de nada na vida que mais se pareça com o AMOR, como lembro de vocês.

OFEREÇO

*Às minhas filhas Brennda e Sophya e ao meu amado esposo Paulo Freitas, luz e razão
da minha vida. Amo vocês!*

Agradecimentos

A Deus pelas bênçãos derramadas sobre mim e por cumprir mais uma promessa em minha vida.

Ao Profº Drº Paulo Antônio Padovan, pelos ensinamentos, carinho, confiança e incentivo a minha jornada científica.

Ao Profº Severino do Monte Prazeres (in memorian) pelo exemplo de amor ao ensino, deixando-me valores que incorporei e os levarei sempre comigo.

À Profª Drª Norma Buarque de Gusmão que me recebeu em seu laboratório, despertando em mim o amor pelo “fantástico mundo dos fungos”.

À minha querida orientadora Profª Drª Cristina Maria de Souza-Motta, pelos ensinamentos, paciência e amizade incansáveis.

Às professoras Maria José dos Santos Fernandes e Débora Maria Massa Lima pela enorme colaboração e identificação de muitos dos fungos isolados neste trabalho.

À minha querida co-orientadora Profª Drª Keila Aparecida Moreira, pela imensa colaboração no desenvolvimento da pesquisa, carinho e amizade a mim dispensados, serei eternamente grata.

Ao meu querido co-orientador, Dr. Cledir Santos, por ter aceitado me co-orientar, por todo o acompanhamento, incentivo e dedicação, aprendi muito.

Ao Prof. Dr. Nelson Lima (Universidade do Minho) pela excelente recepção e colaboração na minha estada em Braga, Portugal, para realização de estágio sanduiche.

Aos alunos e profissionais da Micoteca da Universidade do Minho, pela excelente receptividade e colaboração, durante os dois meses de estágio.

À Prof^a Sigrid Newman (UFPE) por toda colaboração no tratamento dos dados ecológicos, toda paciência e grande atenção a mim dispensados.

A Luan Amim, pelo imenso auxílio na construção das pranchas apresentadas na tese, serei sempre grata.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos que contribuíram diretamente em minha formação. Um privilégio ter vocês como mestres.

Ao meu amado esposo Paulo Freitas, pelo amor paciente, cumplicidade e parceria durante todos os momentos de realização deste trabalho. Sem você ficaria difícil conseguir!

Às minhas amadas filhas Brennda Heloísa e Sophya Roberta, pela admiração, companheirismo e amor de sempre.

Aos familiares que sempre me apoiaram e incentivaram, minha mãe, meu tio Severino Cruz e minha irmã Cybelle Cruz.

À minha amada cunhada Célia Freitas por todo incentivo e amor fraternal e até maternal de sempre.

Às minhas queridíssimas Juliana Lima e Julyanna Fonseca, por todo o auxílio prático, todo o companheirismo, amizade e carinho. Esse título será nosso!

Aos amigos da Micoteca-URM, por todos os momentos compartilhados, auxílio, carinho e paciência: Bruninho, Cyndy, Eliane, Jadson, Luan, Marília, Minelli, Odacy, Phelipe, Polyanna, Susana, Tatiane, Vanila e Virgínia.

À Marília Maciel por ter me recebido gentilmente em sua casa na Cidade de Braga, Portugal, por todo companheirismo, carinho e amizade.

À FACEPE pela bolsa cedida durante os quatro anos de projeto e pelo apoio financeiro a minha estada em Portugal.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese de doutorado.

RESUMO GERAL

O Brasil é o país com a maior diversidade biológica, abrigando entre 15% e 20% do número total de espécies do planeta, sendo por isso considerado megadiverso. Dentre os biomas encontrados nesse país, estão a Mata Atlântica e a Caatinga. Dos fungos comumente isolados de solos destacam-se as espécies de *Penicillium*. A taxonomia desse gênero é bastante complexa e a dificuldade encontrada na identificação morfológica das espécies de *Penicillium* torna necessária a busca de novas ferramentas, tais como a microscopia eletrônica de varredura e a biologia molecular, que venham a complementar e validar a taxonomia clássica. Essas espécies possuem um largo potencial biotecnológico para a produção de enzimas de interesse industrial, como é o caso da tanase, que apresenta aplicação principalmente na produção de bebidas e fármacos. A produção industrial de tanase pode ser realizada através de Fermentação em Estado Sólido (FES) pela utilização de resíduos de frutos ricos em taninos, como o cajá, a manga e o umbu-cajá, visando minimizar os custos da produção. Apesar de excelentes produtores de enzimas de interesse biotecnológico, algumas linhagens de *Penicillium* produzem micotoxinas que podem apresentar ação carcinogênica, teratogênica, nefrotóxica, entre outras. Assim, torna-se necessária a avaliação da produção de tais metabólitos por linhagens de espécies de *Penicillium* que apresentem potencial para aplicação em processos biotecnológicos, principalmente nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Os objetivos desta tese foram 1) isolar e avaliar a diversidade de espécies de *Penicillium* em solos das áreas da Caatinga e da Mata Atlântica no Estado de Pernambuco (Brasil), 2) determinar qualitativa e quantitativamente a produção de tanase por espécies de *Penicillium* através da FES, utilizando resíduos de cajá, de manga e de umbu-cajá e 3) a caracterização desses isolados quanto aos seus perfis micotoxigênicos. Um total de 815 culturas de *Penicillium* foram isoladas, sendo 370 do solo da Caatinga e 445 do solo de Mata Atlântica. Trinta e uma espécies foram identificadas morfológicamente, sendo 23 provenientes da Caatinga e 17 da Mata Atlântica. Três isolados do solo da Caatinga foram identificados morfológicamente apenas ao nível de gênero. Destes, um foi posteriormente identificado através de análises morfológicas e filogenéticas como uma espécie nova, denominada *Talaromyces pernambucanus*. Um grupo de 3 isolados foi identificado como *Penicillium bilaiae*, porém apresentando um diferencial, a produção de esclerócios, sendo proposta a epitipificação dessa espécie. Todas as linhagens testadas

foram produtoras de tanase, sendo que o isolado *P. rolfsii* URM 6216 o melhor produtor em resíduos de manga, com 96,22 U mL⁻¹. Algumas linhagens de *Penicillium* avaliadas nesta tese, são possíveis produtoras das micotoxinas ocratoxina A e patulina. Contudo, nenhuma das micotoxinas avaliadas neste estudo foi observada para a maioria dos melhores produtores de tanase. O presente estudo revelou que os solos de Caatinga e Mata Atlântica apresentam alta diversidade de espécies de *Penicillium*, com a Caatinga apresentando espécies raras e uma espécie nova para a ciência. Tais linhagens apresentam um elevado potencial biotecnológico para a produção de tanase através da FES utilizando resíduos de cajá, de manga e de umbu-cajá como substratos.

Palavras-chave: diversidade, FES, ocratoxina A, citrinina, patulina.

ABSTRACT

Brazil is the country with the greatest biological diversity, harbouring between 15% and 20% of the total number of species on the planet, been considered a megadiverse country. The Caatinga and Atlantic Forest are among the biomes found in Brazil. Species of *Penicillium* are outstanding among the fungi commonly isolated from the soil. The morphological taxonomy of this genus is very complex. The use of new tools such as scanning electronic microscopy and molecular biology are required to improve taxonomy of this genus. *Penicillium* are of great ecological importance and possess high biotechnological potential for the production of enzymes, such as tannase. Tannase can be assessed through the Solid State Fermentation (SSF) using low cost fruit by-products rich in tannins, such as cajá, mango, and umbu-cajá. Some *Penicillium* strains are excellent producers of enzymes, however, some of them can produce carcinogenic, teratogenic and/or nephrotoxic mycotoxins need to be evaluated as to their applied in the pharmaceutical and food industries process. The aims of this thesis were 1) the isolation and diversity evaluation of *Penicillium* species from the soils of Caatinga and Atlantic Forest, in the Pernambuco State (Brazil); 2) the ability of these isolates to produce tannase through SSF of cajá, mango and umbu-cajá by-products, and 3) the characterisation of the mycotoxigenic profiles of the isolates. A total of 815 *Penicillium* isolated were obtained, 370 from Caatinga soils and 445 from Atlantic Forest soils. Thirty-one species were morphologically identified, 23 from Caatinga soils and 17 from Atlantic Forest. Moreover, 3 fungi isolated from the Caatinga soil were initially at genus level. One of these isolates was afterwards described as the new species *Talaromyces pernambucanus*. Other 3 isolates sclerotia producing were identified as *Penicillium bilaiae*. However, sclerotia production is a different trait for this species. The epitypification of *P. bilaiae* is proposed in this thesis in order to include in the species description the ability to produce sclerotia by some of this isolates. All *Penicillium* species evaluated were producers of tannase but the bestproducer of this enzyme was the isolate *P. rolfsii* URM 6216, which produced tannase with an activity of 96.22 U mL⁻¹, using mango by-products as substrate. Some *Penicillium* evaluated here are potential producers of Ochratoxin A and Patulin, however, neither mycotoxin evaluated was observed for the majority of the best isolates producers of tannase. The present study showed that Caatinga and Atlantic Forest soils were very rich of *Penicillium* species. Rarer species were found in Caatinga soils. The lineages found in both biomes

present high biotechnological potential for tannase production through SSF using cajá, mango and umbu-cajá substrates.

Key-words: diversity, FES, citrinin, ochratoxin A, patulin.

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1 - Biomas do Brasil, baseados nas ecorregiões terrestres definidas por Dinerstein (1995). Informações adicionais do <i>Digital Chart of the World</i> (DCW).....	28
Figura 2- Vista de uma área do bioma Caatinga (Vale do Catimbau, Buíque-PE).....	30
Figura 3- Vista de uma área do bioma Mata Atlântica (Reserva Ecológica de Dois Irmãos, Recife-PE).....	32
Figura 4 – Conidióforo (<i>Penicillus</i>).....	35
Figura 5- Texturas das colônias no gênero <i>Penicillium</i> . (a) Velutínea; (b) Flocosa (lanosa); (c) Fasciculada; (d) Funiculosa. Fonte: Onions; Brady (1987).....	37
Figura 6 - Conidióforos de <i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx.....	39
Figura 7 - Conidióforos de <i>Penicillium oxalicum</i> Currie and Thom.....	40
Figura 8 - Conidióforos de <i>Penicillium janczewskii</i> Zaleski.....	41
Figura 9 - Conidióforos de <i>Penicillium vulpinum</i> (Cooke & Massee) Seifert & Samson....	42
Figura 10 - Conidióforos de <i>Penicillium variabile</i> Sopp.....	42
Figura 11 - Conidióforos de <i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx.....	44
Figura 12 - Conidióforos de <i>Penicillium olsonii</i> Bainer & Sartory (Seção <i>Coronatum</i>).....	45
Figura 13 - Conidióforo de <i>Penicillium arenicola</i> Chalabuda (Seção <i>Coronatum</i>).....	45
Figura 14 - Conidióforos de <i>Penicillium italicum</i> Wehmer.....	46
Figura 15 - Estrutura química da citrinina.....	51
Figura 16- Estrutura química da ocratoxina A.....	52
Figura 17- Estrutura química da patulina.....	52
Figura 18 - Hidrólise do ácido tânico (tanino hidrolisável) pela tanase.....	62

Figura 19- Mecanismo de ação da tanase durante a degradação do ácido tânico.....	63
Figura 20- Cajá, fruto da cajazeira.....	69
Figura 21- Manga, fruto da mangueira.....	70
Figura 22- Umbu-cajá, fruto da umbu-cajazeira.....	71

Capítulo 1

Figura 1- Dendrograma de relação entre as amostras de fungos de solo provenientes de da Caatinga e Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil, coletadas em período chuvoso nos meses de junho, julho e agosto de 2009 e em período seco, durante os meses de fevereiro, março e abril de 2010. Índice de Bray-Curtis; método de ligação WPGM (peso proporcional).....	87
--	----

Figura 2- Dendrograma de proximidade entre as espécies de <i>Penicillium</i> provenientes de solo de Caatinga e Mata Atlântica, de Pernambuco, Brasil. As amostras foram coletadas em período chuvoso nos meses de junho, julho e agosto de 2009 e em período seco, durante os meses de fevereiro, março e abril de 2010 A análise estatística com base no índice de Bray-Curtis; método de ligação do peso proporcional (WPGM, Weighted Pair-Group Method, Arithmetic Average). Análise cofenética: $r > 0,8$	88
--	----

Figura 3- Frequência (%) das espécies de <i>Penicillium</i> , nos períodos chuvoso e seco, em área do bioma Caatinga, Pernambuco, Brasil.....	89
---	----

Figura 4- Frequência (%) das espécies de <i>Penicillium</i> , nos períodos chuvoso e seco, em área do bioma Mata Atlântica, Pernambuco, Brasil.....	89
---	----

Figura 5- Diversidade (bits.ind^{-1}) das espécies de <i>Penicillium</i> na Caatinga (C) e na Mata Atlântica (A), nos períodos, chuvoso (PC) e seco (PS) em três coletas (C1, C2, C3). Análise estatística com base no índice de Shannon.....	90
--	----

Capítulo 2

Figura 1- Árvore filogenética de espécies do gênero *Talaromyces* baseada em análises das sequências da região ITS do rDNA. Os valores de bootstrap são de neighbor-joining (acima dos ramos), máxima parcimônia e análise Bayesiana (abaixo dos ramos respectivamente). As sequências são seguidas pelo número de acesso do GenBank. O isolado utilizado neste estudo está em negrito. São mostrados apenas os valores de bootstrap acima de 50% (Índice de Consistência = 0.48; Índice de retenção = 0.73). * Taxa que precisam de um estudo taxonômico adicional de acordo com Samson et al.,

(2011)..... 98

Figura 2- Árvore filogenética de espécies do gênero *Talaromyces* baseada em análises das sequências do gene da β -tubulina. Os valores de *bootstrap* são de neighbor-joining (acima dos ramos), máxima parcimônia e análise Bayesiana (abaixo dos ramos respectivamente). As sequências são seguidas pelo número de acesso do GenBank. O isolado utilizado neste estudo está em negrito. São mostrados apenas os valores de *bootstrap* acima de 50% (Índice de Consistência = 0.41; Índice de retenção = 0.56)..... 99

Figura 3- *Talaromyces pernambucanus*. Culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C. A. Verso sobre CYA; B. Verso sobre MEA; C. Verso sobre G25N; D. Reverso sobre CYA; E. Reverso sobre MEA; F. Reverso sobre G25N; G e H. Conidióforos biverticilados simétricos (10 μ m); I. Conídios (10 μ m); J e K. Conídios em MEV, 5 μ m e 2 μ m, respectivamente..... 100

Capítulo 3

Figura 1- *Penicillium bilaiae* Chalab., culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre CYA, B. Verso sobre MEA, C. Verso sobre G25N. D. Reverso sobre CYA, E. Reverso sobre MEA, F. Reverso sobre G25N. G e H. Conidióforos monoverticilados, I. Conídios. Escala de BAR nas figuras G e I. 10 μ m..... 115

Figura 2- *Penicillium bilaiae* Chalab., A-D. Esclerócios. E e F. Conídios, MEV. Escala de Bar na figura E= 5 μ m e na figura F= 2 μ m..... 116

Figura 3- Árvore filogenética de *Penicillium* – seção Sclerotiora, baseada em análises sequências da região ITS do rDNA. Valores de bootstrap são de neighbor-joining (acima ramos) e máxima parcimônia (abaixo dos ramos). As sequências são seguidas pelo número de acesso no GanBank. Os isolados utilizados nesse estudo estão em negrito. São mostrados apenas os valores de bootstrap acima de 50% (Índice de Consistência = 0.56; Índice retenção = 0.90)..... 117

Figura 4- Árvore filogenética de *Penicillium* – seção Sclerotiora, baseada em análises de sequências parciais do gene da β -tubulin. Valores de bootstrap são de neighbor-joining (acima dos ramos) e máxima parcimônia (abaixo dos ramos). As sequências são seguidas pelo número de acesso no GanBank. Os isolados utilizados nesse estudo estão em negrito. São mostrados apenas os valores de bootstrap acima de 50% (Índice de Consistência = 0.59; Índice de retenção = 0.88)..... 118

Capítulo 4

Figura 1- Diversidade (bits.ind^{-1}) das espécies *Penicillium* na Caatinga (C) e Mata Atlântica (A) na estação chuvosa (RS) e estação seca (DS) em três transectos (T1, T2, T3) e amostras (C1, C2, C3). Análise estatística com base no índice de Shannon..... 133

Índice de tabelas

	Pág.
Tabela 1 - Meios de culturas utilizados no cultivo e na identificação das espécies de <i>Penicillium</i>	38
Tabela 2 - Índices aplicados na avaliação ecológica de comunidades de espécies de <i>Penicillium</i>	56
Tabela 3 - Índices binários aplicados na comparação entre duas comunidades de espécies de <i>Penicillium</i>	58
Tabela 4 - Espécies de <i>Penicillium</i> relatadas como produtoras de tanase entre os anos de 1969 à 2007.....	64
 Capítulo 1	
Tabela 1- Número de isolados de espécies de <i>Penicillium</i> por coleta, nos períodos chuvoso e seco, nos biomas Caatinga e Mata Atlântica e Dominância Relativa, de acordo com Magurran (1988).....	84
 Capítulo 2	
Tabela 1- Comparação entre <i>Talaromyces pernambucanus</i> URM 6894 com os taxa relacionados.....	104
 Capítulo 3	
Tabela 1- Fontes dos isolados de <i>Penicillium bilaiae</i> utilizados no presente estudo filogenético e as sequências da região ITS do rDNA utilizadas na análise, obtidas a partir de GenBank.....	119
Tabela 2- Fontes dos isolados de <i>Penicillium bilaiae</i> utilizados no presente estudo filogenético e as sequências parciais do gene da β -tubulina utilizadas na análise, obtidas a partir de GenBank.....	120

Capítulo 4

Tabela 1- Variáveis e níveis do delineamento experimental 2 ⁴ para a produção de tanase pela espécie melhor produtora.....	134
Tabela 2- Produção de tanase por espécies de <i>Penicillium</i> isoladas de solo de Caatinga e Mata Atlântica, estocadas na Coleção de Culturas Micoteca- URM, através de Fermentação em Estado Sólido, utilizando sementes de cajá (<i>Spondias lutea L.</i>) e manga (<i>Mangifera indica L.</i>).....	135
Tabela 3- Resultados do delineamento experimental 2 ⁴ para produção de tanase através de FES por <i>Penicillium rolsii</i> URM 6216.....	136

Capítulo 5

Tabela 1- Detecção da produção das micotoxinas CIT, OTA e PAT através de CLAE e espectrometria de massa MALDI-TOF por espécies de <i>Penicillium</i> isoladas de solos de Caatinga e Mata Atlântica, estocadas na Micoteca URM.....	152
Tabela 2. Atividade de tanase produzida por espécies de <i>Penicillium</i> , através de FES utilizando resíduo de sementes de umbu-cajá (<i>Spondias spp.</i>).....	154

Índice Geral

	Pág.
1.INTRODUÇÃO.....	24
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	27
2.1. Biomas brasileiros.....	27
2.1.1.Bioma Caatinga.....	29
2.1.2. Bioma Mata Atlântica.....	30
2.2. Gênero <i>Penicillium</i> Link.....	32
2.2.1. Taxonomia do gênero <i>Penicillium</i> Link.....	34
2.1.1.1. Taxonomia Clássica.....	34
2.2.1.2. Meios de cultura utilizados para identificação de espécies de <i>Penicillium</i> ..	37
2.2.1.3 Espécies monoverticiladas.....	38
2.2.1.4. Espécies biverticiladas.....	39
2.2.1.5. Espécies triverticiladas e quadrivericiladas.....	43
2.3. Utilização da biologia molecular para identificação de espécies de <i>Penicillium</i>	46
2.4. A utilização de perfis micotoxigênicos na identificação e caracterização de espécies de <i>Penicillium</i>	50
2.5. As micotoxinas produzidas por espécies de <i>Penicillium</i> como contaminantes na indústria alimentar.....	53
2.6. Ecologia numérica: ferramenta para avaliar a diversidade de espécies de <i>Penicillium</i> ..	54
2.6.1. Comparando duas comunidades.....	57

2.7. Espécies de <i>Penicillium</i> isoladas do solo.....	58
2.8. Tanase.....	62
2.8.1. Tanase produzida por espécies de <i>Penicillium</i>	64
2.8.2. Aplicações da tanase.....	65
2.8.2.1. Fabricação de chás instantâneos.....	66
2.8.2.2. Produção de compostos antioxidantes.....	66
2.8.2.3. Indústria de bebidas.....	66
2.8.2.4. Aditivo para ração animal.....	67
2.8.2.5. Produção de ácido gálico.....	67
2.8.2.6. Tratamento de efluentes.....	67
2.9. Fermentação em Estado Sólido (FES).....	68
2.10. Potenciais resíduos a serem utilizados como substratos para produção de tanase por FES.....	68
2.10.1. Cajá (<i>Spondias lutea</i> L.).....	69
2.10.2. Manga (<i>Mangifera indica</i>).....	70
2.10.3. Umbu-cajá (<i>Spondias tuberosa</i> L. x <i>Spondias mombin</i> L.).....	71
3. Capítulo 1- Diversidade de espécies de <i>Penicillium</i> presentes no solo de áreas da Caatinga e da Mata Atlântica no estado de Pernambuco, Brasil: uma abordagem ecológica.....	72
4. Capítulo 2- <i>Talaromyces pernambucanus</i> , nova espécie isolada de solo do bioma Caatinga, Brasil.....	91
5. Capítulo 3- Epiteficação de <i>Penicillium bilaiae</i> Chalabuda.....	105
6. Capítulo 4- Resíduo de manga como potencial substrato para produção de tanase por espécies de <i>Penicillium</i> através de FES.....	121

7. Capítulo 5- Capacidades produtivas de tanase através da FES por linhagens de <i>Penicillium</i> isoladas dos solos da Caatinga e da Mata Atlântica, no Estado de Pernambuco (Brasil).....	137
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
ANEXOS.....	173

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem a mais rica biota continental do planeta, abrigando seis importantes biomas e o maior sistema fluvial do mundo. Esse país detém cerca de 15 a 20% da biota mundial e, é por isso, considerado megadiverso. Dentre os biomas encontrados no Brasil, estão a Mata Atlântica e a Caatinga (IBGE, 2011). A Mata Atlântica é um bioma de alta diversidade, sendo a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano. No Brasil, após a degradação e o desmatamento das áreas de mata, sobretudo para o plantio de culturas de interesse econômico, apenas 2% da superfície original estão legalmente protegidas em unidades de conservação. Sendo estas unidades dos tipos mais restritivos, tais como parques nacionais e reservas biológicas (Câmara, 1996; Trindade et al., 2005). A Caatinga, que é um bioma exclusivamente brasileiro, ocupa uma área de 734.478 km², ou seja cerca de 11% do território nacional. Trata-se de um bioma ainda pouco explorado cientificamente, porém com várias espécies endêmicas de vegetais, animais e micro-organismos, possivelmente com muitas espécies de fungos ainda a serem descritas, principalmente provenientes de solos (Souto et al., 2008).

De um modo geral, dentre os fungos comumente isolados do solo, destacam-se as espécies de *Penicillium*. A maioria destas espécies são sapróbias e não são muito exigentes do ponto de vista nutricional. Estas características conferem às espécies desse gênero a capacidade de crescerem em qualquer ambiente onde existam quantidades mínimas de sais minerais, ou por outro lado, as mais diversas e complexas fontes de carbono orgânico. O gênero *Penicillium* é de extrema relevância na natureza, pois as suas espécies atuam ativamente na degradação da matéria orgânica (Pitt, 1991).

A taxonomia de *Penicillium* é bastante complexa devido à grande variabilidade inerente ao gênero e ao grande número de espécies descritas, sendo difícil a distinção entre algumas espécies utilizando apenas a caracterização morfológica. A dificuldade encontrada na identificação das espécies de *Penicillium* com base na morfologia torna necessária a busca de novas ferramentas que venham complementar a taxonomia clássica. Neste contexto, cada vez mais tem-se utilizado técnicas modernas tais como a microscopia eletrônica de varredura, que visualiza detalhes da estrutura reprodutora do

fungo e a biologia molecular, considerada o “padrão de ouro” da taxonomia (Samson; Frisvad, 2004).

Além da importância ambiental na degradação de matéria orgânica, espécies de *Penicillium* possuem largo potencial biotecnológico, sendo amplamente utilizadas para a produção de enzimas de interesse industrial, ambiental, farmacêutico, alimentício, entre outros. Dentre as várias enzimas produzidas por espécies de *Penicillium* destaca-se a tanase (Bon et al., 2008).

A tanase é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis como o ácido tânico, em glicose e ácido gálico (Costa, et al., 2008; Belur; Mugeraya, 2011). Trata-se de uma enzima extracelular, induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Dentre os fungos filamentosos, as espécies do gênero *Penicillium* estão na segunda posição como melhores produtoras de tanase, precedidas apenas por espécies do gênero *Aspergillus* (Aguilar et al., 2001a; 2001b; Aguilar; Gutiérrez-Sanches, 2001; Macedo et al., 2005; Costa, et al., 2008). Para o processo de produção da tanase por fungos, duas metodologias se apresentam como alternativas: 1) Fermentação Submersa (FSM), onde o micro-organismo é inoculado em meio líquido contendo fontes de carbono e nitrogênio; e 2) Fermentação em Estado Sólido (FES), na qual o micro-organismo é inoculado em um meio contendo geralmente resíduo agroindustrial, umedecido ou não com uma solução salina, porém sem água livre disponível.

A FES oferece vantagens sobre a FSM (Lagemaat; Pyle, 2001; Macedo et al., 2005). O meio de produção é simples e resíduos agroindustriais como cascas de uva, caju, café, farelo de trigo, arroz e aveia, acrescido de ácido tânico, podem ser utilizados. O interesse na FES para a produção de compostos de importância comercial é uma consequência da demanda por insumos de menor custo (Macedo et al., 2005).

Embora existam em potencial muitas aplicações industriais da tanase, poucas são efetivamente empregadas. Isto é devido essencialmente ao custo de produção da enzima, que ainda é elevado, e também ao pouco conhecimento sobre seu modo de ação catalítica. Esta enzima pode ter uma vasta aplicação na indústria de bebidas (principalmente sucos e cervejarias), cosméticos, farmacêutica e na indústria química (Belur; Mugeraya, 2011). Porém, a tanase é principalmente utilizada na produção de ácido gálico, na estabilização da coloração dos vinhos, refrigerantes à base de café, na detanificação de alimentos e no tratamento de efluentes da indústria de couros (Banerjee

et al., 2005). Por outro lado, os micro-organismos do solo, produtores de tanase, desempenham um papel ativo na decomposição de materiais vegetais ricos em taninos, promovendo assim a despoluição ambiental (Lekha; Lonsane, 1997; Macedo et al., 2005).

Além de serem excelentes produtoras de metabólitos de interesse industrial, algumas linhagens pertencentes a algumas espécies de *Penicillium* podem produzir micotoxinas (Pariza et al., 1983). Micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular, sendo alguns desses compostos potenciais agentes nefrotóxicos e carcinogênicos a humanos e outros animais (Hoeltz et al., 2009).

Dentre as micotoxinas produzidas por linhagens do gênero *Penicillium*, destacam-se a citrinina (CIT) a ocratoxina-A (OTA) e a patulina (PAT) (Frisvad et al., 2004). A CIT é um poliquetídeo com peso molecular de 250,25 Da. Trata-se de uma micotoxina que apresenta ação nefrotóxica e é produzida principalmente por *Penicillium citrinum*. No entanto, outras espécies de *Penicillium* mostraram-se capazes de produzirem esta toxina (Frisvad et al., 2004; 2005). A OTA é uma micotoxina termoestável que apresenta um peso molecular de 403.81 Da. Este metabólito é considerado citotóxico, nefrotóxico, carcinogênico, teratogênico e imunossupressor (Abrunhosa, 2008). Enquanto a PAT é uma hidroxí-furo-piranona que apresenta fórmula empírica $C_7H_6O_4$ e um peso molecular de 154,12 Da. Trata-se de um metabólito secundário com potencial teratogênico e genotóxico (Morales et al., 2010).

A técnica mais comumente aplicada para detecção de micotoxinas é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Entretanto, mais recentemente a espectrometria de massas pela técnica de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight* (MALDI-TOF MS) também vem sendo aplicada para este fim. Esta técnica permite a análise de biomoléculas de baixo peso molecular de forma rápida e econômica, com um sistema de preparação da amostra relativamente simples. O MALDI-TOF MS representa assim, uma alternativa moderna e eficiente para a detecção de micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* (Blechová et al., 2006; Kemptner et al., 2009).

Diante do exposto, os objetivos desta tese foram o isolamento e a avaliação da diversidade de espécies de *Penicillium* em solos da Caatinga e da Mata Atlântica do estado de Pernambuco e a caracterização dessas espécies quanto aos perfis micotoxigênicos e quanto as capacidades de produção de tanase.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Biomas brasileiros

Define-se bioma como uma área do espaço geográfico, com dimensões de mais de um milhão de quilômetros quadrados, que tem por características a uniformidade de um macroclima definido, de uma determinada fitofisionomia ou formação vegetal, de uma fauna e outros organismos vivos associados, e de outras condições ambientais, como a altitude, o solo, a ocorrência de alagamentos e de salinidade, entre outras. Todas estas características conferem ao bioma uma estrutura e uma funcionalidade peculiares, ou seja, apresenta ecologia própria (Coutinho, 2006).

De acordo com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2008), o Brasil é o país com a maior diversidade biológica, abrigando entre 15% e 20% do número total de espécies do planeta. Seis grandes biomas estão inseridos no Brasil (Amazônia, Caatinga, Campos Sulinos, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal), além das áreas marinha e costeira (Figura 1). O Brasil apresenta, indiscutivelmente, a mais vasta biota continental da Terra.

O bioma Amazônia, responsável pela maior biodiversidade terrestre e de água doce do Brasil, representa cerca de 40% das florestas tropicais remanescentes no mundo. Possui uma área de cerca de seis milhões de quilômetros quadrados, é formada por um mosaico de fitofisionomias, apesar da dominância de Florestas Ombrófilas (Sestini et al., 2007). A Caatinga, por sua vez, é considerada um mosaico de arbustos espinhosos e de florestas secas sazonais, tendo relativamente, poucos endemismos. Trata-se de um dos biomas mais conservados do Brasil (Leal et al., 2005).

De acordo com Barreta (2001), os Campos Sulinos se referem a um tipo de vegetação composta basicamente por gramíneas e outras herbáceas. Este bioma é classificado como Estepe, no sistema fitogeográfico internacional e é uma fonte de alimento para aproximadamente 65 milhões de ruminantes. No Brasil, este bioma é também conhecido como Campos do Sul, Campanha Gaúcha ou Pampa e engloba também algumas áreas semelhantes a savanas.

O Cerrado, um “hotspot” brasileiro, é a savana mais rica em diversidade botânica do mundo e abriga muitas espécies de plantas, aves, peixes, répteis, anfíbios e insetos endêmicos (Klink; Machado, 2005). A Mata Atlântica é outro “hotspot” de

floresta tropical com alto nível de endemismo. Trata-se de uma área que, ao longo dos últimos cinco séculos, foi muito fragmentada pela agricultura e pela presença de centros urbanos, como o Rio de Janeiro e São Paulo (Tabarelli et al., 2005). O Pantanal é considerado a maior área úmida tropical do mundo. Está presente nos estados do Mato-Grosso e do Mato-Grosso do Sul. O clima e os estágios de inundação proporcionaram ao bioma Pantanal uma interseção de quatro grandes domínios fitogeográficos: Floresta Amazônica, Floresta Atlântica, Cerrado e Chaco. Neste bioma, o mosaico de ambientes abriga uma grande diversidade de espécies de plantas e animais. Apesar da ocupação interior da planície ser extensiva, do planalto adjacente advém uma gama de impactos ambientais (Silva et al., 2005).



Figura 1: Biomas do Brasil, baseados nas ecorregiões terrestres definidas por Dinerstein (1995). Informações adicionais do *Digital Chart of the World* (DCW). Fonte: Brandon et al., (2005).

2.1.1. Bioma Caatinga

A palavra caatinga é originária do tupi-guaraní e significa “floresta-esbranquiçada”. Este nome é o retrato da vegetação que é caracterizada pelo seu aspecto seco, sobretudo na estação seca, quando suas folhas caem, numa tentativa de economizar água para garantir sua sobrevivência, deixando na paisagem apenas troncos (Prado, 2003).

A Caatinga cobre a maior parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte nordeste do estado de Minas Gerais, no Vale do Jequitinhonha. Este bioma estende-se por cerca de 735.000 km², é limitada a leste e a oeste pelas Florestas Atlântica e Amazônica, respectivamente, e ao sul pelo Cerrado. Geomorfologicamente, a Caatinga está localizada nas depressões interplanálticas (300 – 500 m), expostas a partir de sedimentos do Cretáceo ou Terciário que cobriam o escudo brasileiro basal do Pré-Cambriano (Leal et al., 2005, Franca - Rocha et al., 2007). Na tentativa de incluir a vegetação brasileira em um sistema universal, a Caatinga foi classificada como “savana estépica” (Figura 2) (Pereira et al., 2001).

São reconhecidos 12 tipos diferentes de Caatingas, que chamam atenção especial pelos exemplos fascinantes de adaptações aos ambientes semi-áridos (*cf.* Sampaio; Rodal, 2000). Trata-se de um bioma com grande diversidade de espécies vegetais, com pelo menos 932 espécies registradas, sendo 380 endêmicas. Esse bioma apresenta um tipo de formação vegetal com características bem definidas: árvores baixas e arbustos, além de muitas cactáceas. Apresenta três estratos: arbóreo (8 a 12 m), arbustivo (2 a 5 m) e o herbáceo (abaixo de 2 m).

O clima em regiões de Caatinga é semi-árido, quente e com baixa pluviosidade, entre 200 e 800 mm anuais. Apesar dos longos e frequentes períodos de seca, a maioria das chuvas na Caatinga (50-70%) é concentrada em três meses consecutivos. O número de meses secos aumenta da periferia para o centro da região, e algumas localidades experimentam períodos de 7 a 11 meses de baixa disponibilidade de água (Leal et al., 2005).

Geologicamente, a região é composta de vários tipos diferentes de rochas. Nas áreas de planície as rochas prevaletentes têm origem na era Cenozóica. Estas rochas encontram-se cobertas por uma camada de solo bastante profunda e com afloramentos

rochosos ocasionais, em particular nas áreas mais altas que bordejam a Serra do Tombador. Tais solos (latossolos) são argilosos, ricos em minerais e possuem boa porosidade (Alves et al., 2009).



Figura 2. Vista de uma área do bioma Caatinga (Vale do Catimbau, Buíque- PE). Foto: Roberta Cruz.

2.1.2. Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica brasileira é um dos 25 “hotspots” mundiais de biodiversidade e é considerada a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano. Originalmente, a Mata Atlântica estendia-se de forma contínua ao longo da costa brasileira, penetrando até o leste do Paraguai e nordeste da Argentina em sua porção sul. Este bioma cobria mais de 1,5 milhões de km², com 92% desta área no Brasil (Figura 3). Entretanto, a floresta perdeu mais de 93% de sua área restando menos de 100.000 km² de vegetação. Algumas áreas de endemismo, como no estado de Pernambuco, agora possuem menos de 5% da floresta original (Tabarelli et al., 2005).

O Decreto Federal 750/93 considera Mata Atlântica “as formações florestais e ecossistemas associados inseridos no domínio Mata Atlântica, com as respectivas delimitações estabelecidas pelo Mapa de Vegetação do Brasil: Floresta Ombrófila Densa Atlântica, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, manguezais, restingas, campos

de altitude, brejos interioranos e encraves florestais do Nordeste” (IBGE, 2011; SOS Mata Atlântica, 2011).

No Brasil, este bioma está presente tanto na região litorânea quanto nos planaltos e serras do interior da faixa terrestre que se estende do estado do Rio Grande do Norte ao estado do Rio Grande do Sul. A área principal ou central está nas grandes Serras do Mar e da Mantiqueira, abrangendo os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. No Nordeste Oriental, a Mata Atlântica ocupa as restingas e, principalmente, os Tabuleiros Costeiros, desde o Rio Grande do Norte até Alagoas. Ao sul do estado de Pernambuco e no estado de Alagoas, reveste também as serras baixas próximas à costa Atlântica. Nesta faixa terrestre também existem disjunções da Mata Atlântica, que estão isoladas nos topos de chapadas sedimentares e nos cumes das serras interioranas do Nordeste, mais conhecidas como Brejos de Altitude (Barbosa; Thomas 2002). A Mata Atlântica é composta por uma série de fitofisionomias que propiciaram uma significativa diversidade ambiental e, como consequência, a evolução de um complexo biótico altamente rico de natureza vegetal, animal e microbiana (Cruz et al., 2007).

A Mata Atlântica engloba vários ecossistemas florestais e apresenta interpenetrações de outros ecossistemas não florestais. Ocorre associada aos ecossistemas costeiros de mangues, enseadas, foz de grandes rios, baías e lagunas de influência de marés, restingas, baixadas arenosas do litoral, florestas mistas com araucárias, no Paraná e em Santa Catarina. A Mata Atlântica ocorre ainda associada a ecossistemas como os campos de altitude e rupestres, localizados em altitudes acima de 900 m, cumes das Serras da Bocaina, na Mantiqueira, no Caparaó, entre outros. Este bioma, em função da latitude, longitude, relevo e clima, apresenta variações nas formações vegetais sem perder, no entanto, certa homogeneidade florística (Barbosa; Thomas 2002). O solo da Mata Atlântica é em geral bastante raso, pouco ventilado, sempre úmido, sobretudo por receber pouca luz, pois a maior parte da luminosidade é absorvida pelas folhas das árvores mais altas. Trata-se de um solo pobre, porém com fertilidade garantida pela presença da serrapilheira que recobre a superfície do solo (Cruz et al., 2007).

No Brasil Colônia, foi a primeira floresta a receber iniciativas extrativistas. Da Mata Atlântica saíram as primeiras riquezas a serem exploradas pelos colonizadores. Desde então, vários ciclos se desenvolveram no seu domínio. O resultado de todos os

ciclos econômicos pelos quais a Mata Atlântica passou foi a perda quase total das florestas originais e a contínua devastação e fragmentação dos remanescentes florestais existentes. Isto a coloca em uma péssima posição de destaque, como um dos conjuntos de ecossistemas mais ameaçados de extinção do mundo. O uso indiscriminado dos recursos naturais da Mata Atlântica pelo homem têm causado sérios problemas, sendo talvez o maior deles a perda da biodiversidade (Resende et al., 2002).

De acordo com Myers et al., (2000), a Mata Atlântica ainda abriga muitas espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e micro-organismos. Dentre os micro-organismos, destacam-se os fungos, principalmente pelo seu papel relevante na decomposição de matéria orgânica. Os estudos taxonômicos e os levantamentos ecológicos quanto às comunidades de fungos que habitam o solo deste bioma são escassos.



Figura 3. Vista de uma área do bioma Mata Atlântica (Reserva Ecológica de Dois Irmãos, Recife-PE). Foto: Roberta Cruz.

2.2. Gênero *Penicillium* Link

Penicillium é um dos diversos gêneros de fungos que se reproduzem através da produção de esporos denominados de conídios, que são originados a partir de estruturas designadas conidióforos ou esporóforos. Em 1809 Link descreveu o gênero, propondo o nome *Penicillium*, do Latim *Penicillius*, por observar que espécies do gênero produzem

conidióforos em forma de pincel. Em 1910, Thom designou *P. expansum* como espécie tipo para este gênero (Raper; Thom, 1949).

Raper; Thom (1949) publicaram o “Manual of the Penicillia”, no qual propuseram 137 espécies. Nesse manual, a identificação das espécies foi baseada em características macroscópicas, tais como a textura e desenvolvimento da colônia em meios de cultura padrões, bem como em características microscópicas e fisiológicas, tais como a temperatura de crescimento e a pigmentação das colônias. Segundo os autores, as espécies de *Penicillium* geralmente crescem utilizando uma ampla diversidade de monossacarídeos, dissacarídeos, álcoois e ácidos como única fonte de carbono. A trealose e os polióis, como o manitol, são compostos importantes e frequentemente armazenados nas suas hifas e conídios. Apesar do crescimento da maioria das espécies de *Penicillium* ser acelerado com a adição de peptona, as espécies desse gênero conseguem crescer na presença de nitrato como a única fonte de nitrogênio. Além de carbono e nitrogênio outros elementos podem ser mobilizados a partir de fontes inorgânicas. Muitas espécies de *Penicillium* não exigem vitaminas complexas para crescerem.

Pitt (1979) descreveu 150 espécies de *Penicillium* estimando que possam haver cerca de 300 espécies para o gênero e afirmou que provavelmente cerca de 1000 fenótipos diferentes ainda seriam catalogados. Em 1991, Pitt catalogou um conjunto de espécies de *Penicillium* e concluiu que cerca de 30 a 40 dessas espécies eram comuns na natureza. É devido a essa elevada diversidade e à complexidade morfológica, que a taxonomia deste gênero é difícil, tornando-se necessárias outras ferramentas que venham a auxiliar a taxonomia clássica. Pitt et al., (2000) listaram 225 espécies aceitas para o gênero *Penicillium*, com seus respectivos sinônimos.

De acordo com Pitt (1991), os teleomorfos são reconhecidos como gêneros separados. As espécies de *Penicillium* são associadas com dois gêneros teleomorfos de Ascomycetes: *Eupenicillium* Ludwig e *Talaromyces* C. Benjamin, que são taxonomicamente bastante distintos. As espécies pertencentes ao gênero *Talaromyces* produzem gimnotécio, que é um ascocarpo no qual os ascos são circundados por um emaranhado de hifas frouxamente dispostas. Enquanto as espécies de *Eupenicillium* produzem cleistotécio de várias cores, com parede pseudoparenquimatosa lisa.

De acordo com Alexopoulos et al., (1996) o gênero *Penicillium* é constituído apenas por espécies anamorfas que são incluídas no Filo Ascomycota, Classe

Plectomycetes, Ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae. Entretanto, recentemente, Houbraken; Samson (2011) propuseram a segregação da família Trichocomaceae em três famílias: Aspergillaceae, Thermoascaceae e Trichocomaceae. Essa segregação foi baseada em análises morfológicas e filogenéticas. Após esta última reclassificação o gênero *Penicillium* foi denominado *Penicillium sensu stricto*, no qual se encontram tanto espécies anamorfias, quanto teleomorfias. O gênero *Penicillium sensu stricto* foi assim reclassificado e inserido na família Aspergillaceae.

Ecologicamente, as espécies do gênero *Penicillium* são de extrema importância na natureza, pois participam ativamente em ciclos biogeoquímicos, atuando na decomposição de matéria orgânica. Embora o solo seja o habitat natural dessas espécies, elas podem ser encontradas em todos os ecossistemas. Devido à sua elevada competência metabólica, não são muito exigentes nutricionalmente, tolerando uma imensa variedade de condições físicas e físico-químicas, como temperatura, atividade da água e pH. É exatamente esta alta tolerância às condições extremas que lhes conferem a capacidade de crescerem em quaisquer ambientes que lhes proporcionem desde o mínimo de sais minerais até às mais complexas fontes de carbono (Onions; Brady, 1987).

2.2.1. Taxonomia do gênero *Penicillium* Link

2.2.1.1. Taxonomia Clássica

A taxonomia clássica do gênero *Penicillium* baseia-se na observação das características macroscópicas e microscópicas das espécies. As colônias são geralmente formadas por micélio produzido em abundância e podem ser verdes, verde-amarelas, verde-azuladas, verde-acinzentadas, ou menos frequentemente incolores, brancas, salmon, avermelhadas, amarelo-arroxeadas, ou de outras tonalidades. O reverso das colônias pode ser incolor, ou variar de tons de amarelo, verde, vermelho e marrom. Os isolados de algumas espécies podem produzir pigmentos que modificam a tonalidade do meio de cultura. Esses isolados podem também produzir gotas de exudato de coloração diversa, especialmente quando crescidos sobre Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA, cf. Tabela 1, página 36). Tais exudatos são visualizadas macroscopicamente e consideradas como critérios para fins taxonômicos.

Microscopicamente, em espécies de *Penicillium* observam-se hifas septadas. Essas hifas geralmente anastomosadas, apresentam paredes desprovidas de pigmentação (Pitt, 1991). Os conidióforos surgem como ramos do micélio e são frequentemente perpendiculares ao substrato (Figura 4). A estrutura do conidióforo consiste de um estipe que pode ser estreito ou alargado. Dependendo da espécie, podem apresentar parede delgada ou espessa, lisa ou finamente à fortemente rugosa. No ápice do estipe surge o “Penicillus”, que pode consistir de células conidiogênicas, denominadas fiálides. As fiálides podem incidir diretamente no estipe ou em células de apoio denominadas métulas e ramos. Algumas espécies de *Penicillium* apresentam uma ramificação adicional, denominada râmulo, localizada entre a métula e o ramo (Onions; Brady, 1987; Pitt, 1991).

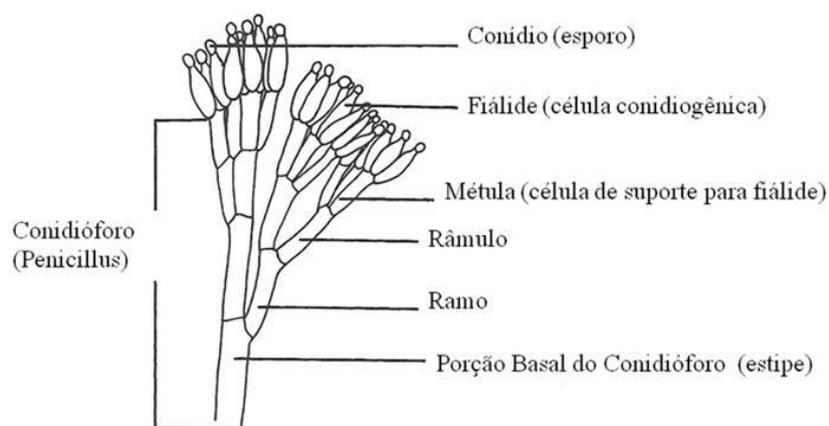


Figura 4. Conidióforo (“Penicillus”). Fonte: Onions; Brady (1987).

As células conidiogênicas geralmente possuem forma de balão ou de garrafa que se estreitam no ápice, sendo esse estreitamento denominado “collula”. Algumas espécies apresentam forma acerosa, ou seja, forma de agulha. É no interior das fiálides que os conídios são formados, geralmente em cadeia e de forma basípeta, isto é, o conídio mais velho ocupa o topo da cadeia (Raper; Thom, 1949).

Os conídios são unicelulares, uninucleados, hialinos, pequenos, com formas que variam de globosas a cilíndricas. Dependendo da espécie, a parede pode ser lisa, rugosa, fortemente rugosa ou espinescente. Algumas espécies produzem esclerócios, que são estruturas multicelulares de resistência que podem permanecer latentes por longos períodos até as condições do meio se tornarem propícias ao seu

desenvolvimento. Rizza; Kornfeld (1969) estudaram a composição química da parede de hifas e de conídios de *P. chrysogenum* e detectaram a presença de glicose, galactose, manose, aminoácidos e glicosamina, em concentrações diferentes.

Devido à complexidade morfológica dos conidióforos do gênero *Penicillium*, foi necessário agrupar espécies que possuíssem padrão de ramificação similar. Para determinação do subgênero ao qual o isolado de *Penicillium* pertence, deve-se contar o número de pontos de ramificação entre o estipe e as fiálides. A interpretação do padrão de ramificação varia de autor para autor. No entanto, todos os autores concordam que os ramos devem ser contados de cima para baixo, sendo considerado para classificação, o tipo de conidióforo predominante (Onions; Brady, 1987). De acordo com Pitt (1991), as ramificações são classificadas como: monoverticiladas, biverticiladas, triverticiladas e quadriverticiladas.

Além do padrão de ramificação, alguns autores como Raper; Thom (1949) usam como critério taxonômico a textura da colônia. Espécies de *Penicillium* produzem colônias com quatro tipos de texturas (Figura 5), nomeadamente:

- Velutínea: conidióforos surgem de uma camada densa, situada abaixo da superfície do meio. Apresenta textura aveludada (Figura 5 a);
- Flocosa ou lanosa: apresenta uma camada solta de micélio flocoso acima do meio de cultura (Figura 5 b);
- Fasciculada: alguns conidióforos surgem a partir de uma hifa fértil, e em seguida, proliferam em um feixe vertical paralelo, onde o “*Penicillus*” está posicionado no ápice (Figura 5 c);
- Funiculosa: um aglomerado de hifas férteis formam uma estrutura torcida, como um tipo de cabo, na qual os conidióforos curtos estão dispostos lateralmente (Figura 5 d).

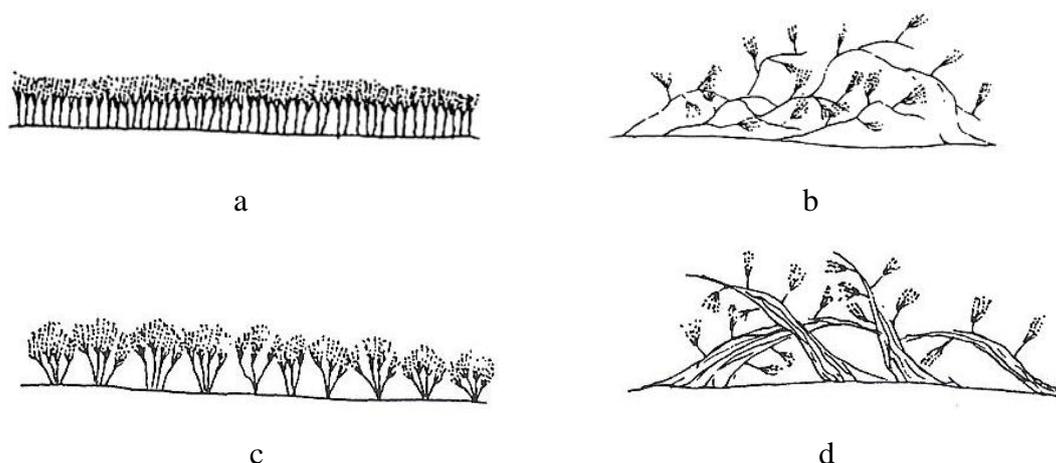


Figura 5: Texturas das colônias no gênero *Penicillium*. (a) Velutínea; (b) Flocosa (lanosa); (c) Fasciculada; (d) Funiculosa. Fonte: Onions; Brady (1987).

2.2.1.2. Meios de cultura utilizados para identificação de espécies de *Penicillium*

De acordo com Rapper; Thom (1945), o ágar Czapek é um excelente meio de cultura para a identificação da maioria das espécies de *Penicillium* e tem sido utilizado desde 1909. Segundo os autores, trata-se de um meio neutro que, por não fornecer muitos nutrientes, limita o crescimento micelial de espécies que se desenvolvem rapidamente, sendo excelente na comparação de amostras. A substituição de glicose por sacarose fornece um meio mais favorável para certas cepas e espécies. Pitt (1991) indica três meios de cultura para identificação de espécies de *Penicillium*: ágar extrato de malte (MEA), ágar suplementado com 25% de glicerol (G25N) e ágar extrato de levedura Czapeck (CYA). De acordo com este autor, cada isolado deve ser inoculado ao mesmo tempo em três pontos equidistantes, em placa invertida nos três meios de cultura. Os isolados devem ainda ser incubados no escuro a 5, 25 e 37 °C para CYA e a 25 °C para MEA e G25N. Em uma monografia sobre o subgênero *Penicillium*, Samson; Frisvad (2004) indicam uma extensa lista de meios de cultura utilizadas para identificação de espécies pertencentes a este subgênero. Dentre esses meios, o CYA, o ágar nitrato sacarose (NSA) e o ágar creatina sacarose (CREA), podem ser citados como exemplos dos principais meios usados para este fim (Tabela 1).

Tabela 1: Meios de culturas utilizados no cultivo e identificação de *Penicillium*. Fonte: Moss (1987).

Meio de Cultura	Composição (g/l)
ágar Czapek (CZ)	NaNO ₃ , 3,0; K ₂ HPO ₄ , 1,0; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,5; KCl, 0,5; FeSO ₄ .7H ₂ O, 0,01; sacarose, 30,0; ágar, 15,0.
ágar extrato de malte (MEA)	Extrato de malte, 30,0; peptona, 1,0; glicose, 20,0; ágar, 15,0.
Czapek concentrado	NaNO ₃ 30,0; KCl, 5,0; MgSO ₄ .7H ₂ O, 5,0; FeSO ₄ .7H ₂ O, 0,1; ZnSO ₄ .7H ₂ O, 0,1; CuSO ₄ .7H ₂ O, 0,1.
ágar extrato de levedura Czapek (CYA)	KH ₂ PO ₄ .3,0; extrato de levedura, 5,0; sacarose, 30,0; ágar, 15,0; Czapek concentrado, 10,0 ml.
ágar suplementado com 25% de glicerol (G25N)	K ₂ HPO ₄ , 0,75; Czapek concentrado, 7,5 ml; extrato de levedura, 3,7; glicerol, 250,0; ágar, 12,0; água, 750 ml.
ágar nitrito sacarose (NSA)	NaNO ₂ , 3,0; K ₂ HPO ₄ .37H ₂ O, 1,3; KCl, 0,5; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,5; FeSO ₄ .7H ₂ O, 0,01; sacarose, 30,0; ágar, 20,0.
ágar creatina sacarose (CREA)	KH ₂ PO ₄ .3,0; H ₂ O, 1,3; KCl, 0,5; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,5; creatina 1H ₂ O, 3,0; sacarose, 30,0; ajustar o pH para 8 com solução NaOH 1N, após autoclavagem.

2.2.1.3. Espécies monoverticiladas

De acordo com Onions; Brady (1987), é difícil a taxonomia de espécies monoverticiladas, pois estas variam entre isolados e podem perder facilmente as suas características. Raper; Thom (1949) e Pitt (1979) descreveram um número similar de espécies monoverticiladas (30-40). Em 1991, Pitt elaborou um manual com as espécies mais comuns de *Penicillium* das quais, 14 foram incluídas no subgênero *Aspergilloides* Dierckx. Essas espécies foram caracterizadas por apresentarem conidióforos predominantemente monoverticilados, como é o caso de *Penicillium citreonigrum* (Figura 6), onde as métulas são produzidas por algumas espécies, embora sejam relativamente raras.

Este subgênero é dividido em duas seções, *Aspergilloides* Pitt e *Exilicaulis* Pitt. As espécies que apresentam vesícula são incluídas na seção *Aspergilloides*, pela semelhança com o conidióforo do *Aspergillus*, sendo elas: *P. sclerotiorum*, *P. glabrum*, *P. spinulosum*, *P. lividum*, *P. thomii*, *P. spinulosum*, *P. implicatum*, *P. lividum*, *P. montanense* e *P. bilaiae*. As espécies que não apresentam vesícula são incluídas na

seção *Exilicaulis*, sendo elas: *P. citreonigrum*, *P. restrictum* e *P. decumbens*. Além da vesícula, a taxa de crescimento da colônia, o comprimento e a forma do conidióforo, e a forma e a ornamentação dos conídios são utilizados por Pitt (1991) como critérios taxonômicos. São poucas as espécies monoverticiladas comuns na natureza e de importância econômica.

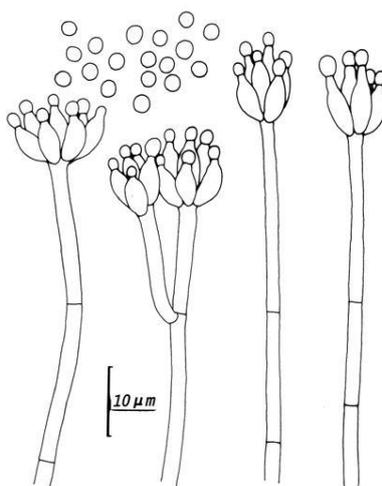


Figura 6: Conidióforos de *Penicillium citreonigrum* Dierckx. Fonte: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp

2.2.1.4. Espécies biverteciladas

Pitt (1991) inclui as espécies biverteciladas em dois subgêneros, *Furcatum* Pitt e *Biverticillium* Dierckx. No subgênero *Furcatum*, estão incluídas as espécies que produzem regularmente ou irregularmente “penicilli” bivertecilados, geralmente com 2 - 5 métulas terminais. As fiálides são mais curtas que as métulas e apresentam forma ampuliforme. Algumas espécies produzem uma pequena quantidade de penicilli monoverticilados. Sobre G25N as colônias apresentam bom crescimento, comumente excedendo os 9 mm de diâmetro em 7 dias de incubação. Algumas espécies deste subgênero produzem métulas em verticilos de 5-9 fiálides. Essas espécies são, ainda assim, reconhecidas como integrantes do subgênero *Furcatum* por crescerem

rapidamente sobre G25N e por apresentarem fiáides menores que as métulas. Este subgênero é dividido por Pitt (1979) em duas seções, *Furcatum* e *Divaricatum*. Na primeira, estão incluídas espécies cujas métulas estão dispostas terminalmente. Estas espécies contam com “penicilli” que consistem de verticilos de métulas e fiáides, sendo elas: *Penicillium citrinum*, *P. corylophyllum*, *P. miczynskii*, *P. oxalicum* (Figura 7), *P. raistrickii* e *P. simplicissimum*.

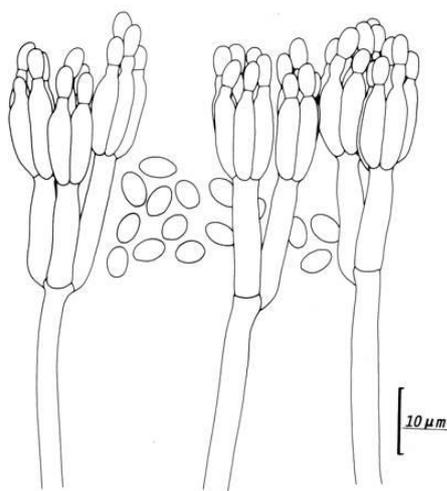


Figura 7: Conidióforos de *Penicillium oxalicum* Currie and Thom. Fonte: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp

Na seção *Divaricatum* as espécies produzem conidióforos biverticilados irregulares, com métulas terminais, subterminais e posicionadas mais abaixo no estipe, sendo elas: *P. canescens*, *P. fellutanum*, *P. janczewskii* (Figura 8), *P. janthinellum*, *P. melinii* e *P. waksmanii*. Caso o isolado seja difícil de ser identificado e tenha um padrão de ramificação difícil de ser definido, provavelmente pertencerá à seção *Divaricatum* (Figura 9).

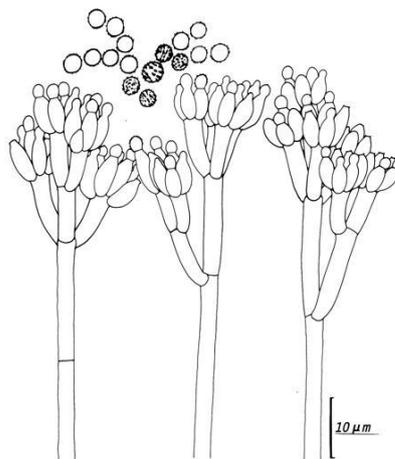


Figura 8: Conidióforos de *Penicillium janczewskii* Zaleski. Fonte: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp

As espécies biverticiladas normalmente estão associadas à madeiras ou produtos têxteis (Samson; Frisvad, 2004).

No subgênero *Biverticillium* foram inseridas espécies cujo “penicilli” são caracteristicamente biverticilados. Porém, essas espécies possuem uma proporção de conidióforos triverticilados. As suas métulas são numerosas, dispostas em verticilos simétricos ou divergentes e apresentam comprimento aproximadamente igual ao das fiálides. As fiálides são tipicamente acerosas, com collula cônica. Os conídios são tipicamente elipsoidais para fusiforme, porém algumas espécies apresentam conídios de forma esférica. As colônias crescidas sobre CYA a 25 °C apresentam cores amarelo ou vermelho, geralmente com exudato e/ou pigmento solúvel. Crescem frequentemente a 37 °C, mas raramente a 5 °C. Sobre G25N o crescimento é lento, sempre inferior a 10 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Pitt, 1991).

Em 1923 Biourge dividiu o subgênero *Biverticillium* em duas seções, *Corimigena* e *Simplicia* (Pitt, 1991). Pitt (1979) seguiu esta classificação. Na seção *Corimigena* classificam-se as espécies produtoras de corêmio ou sinêmio. Nesta seção, Pitt (1991) incluiu apenas duas espécies, *P. vulpinum* (Figura 9), produtora de corêmio, e *P. duclauxii*, produtora de sinêmio.

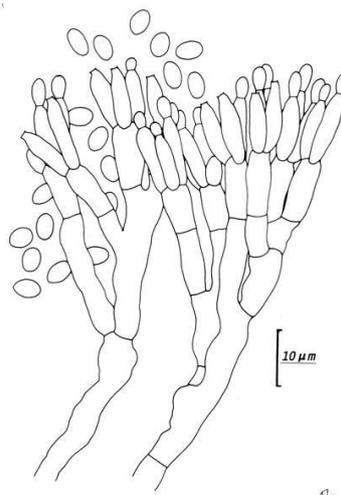


Figura 9: Conidióforos de *Penicillium vulpinum* (Cooke; Masee) Seifert; Samson.
 Fonte: www.bcrc.firdi.org.tw

Na seção *Simplicia* foram classificadas as espécies não produtoras de corêmio ou sinêmio. As espécies *Penicillium purpurogenum*, *P. verruculosum*, *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. minioluteum*, *P. islandicum*, *P. rugulosum* e *P. variabile* (Figura 10), são incluídos nesta seção (Pitt, 1991).

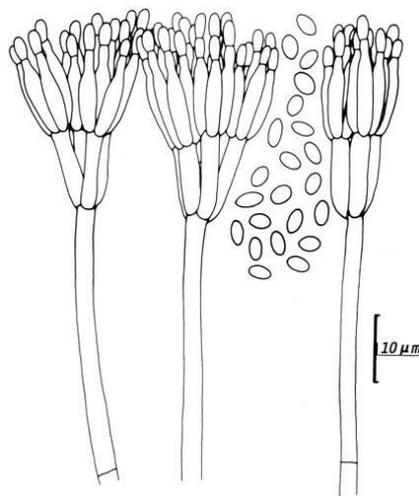


Figura 10: Conidióforos de *Penicillium variabile* Sopp. Fonte: www.bcrc.firdi.org.tw

2.2.1.5. Espécies triverticiladas e quadriverticiladas

As espécies com padrão de ramificação triverticilado compõem o maior grupo em *Penicillium*. Estas espécies apresentam três níveis de ramificação, incluindo as fiálides. Pitt (1979; 1991) agrupou as espécies com este padrão de ramificação no subgênero *Penicillium*. Os conidióforos triverticilados são formados em culturas com 5 a 7 dias de crescimento sobre os meios CYA e MEA. Porém, alguns isolados produzem, concomitantemente, um percentual de conidióforos biverticilados. Os conidióforos quadriverticilados são produzidos mais raramente, ou seja, com quatro níveis de ramificação, incluindo as fiálides (Pitt 1979; 1991; Samson; Frisvad, 2004).

As fiálides são sempre apoiadas em métulas e estas, em râmulos os quais são geralmente ampuliformes, embora em algumas espécies possam ser acerosas (Pitt 1979; 1991). As colônias destas espécies quando crescidas sobre G25N, normalmente excedem os 18 mm de diâmetro. Geralmente não crescem a 37 °C, porém *Penicillium chrysogenum* é uma exceção. A melhor faixa de temperatura de crescimento é entre 15 e 25 °C. No entanto, são capazes de crescer a 5 °C. Crescem em meios com baixa atividade de água e baixo pH (Pitt 1979; 1991).

De acordo com Samson; Frisvad (2004), este subgênero é distinto tanto filogenética quanto ecologicamente. A maioria das espécies apresenta importância econômica por produzirem vários metabólitos, dentre estes, as micotoxinas. *Penicillium chrysogenum*, produtor de penicilina, é uma das espécies mais conhecidas deste subgênero. As colônias das espécies do subgênero *Penicillium* apresentam padrões diferentes. Podem apresentar textura velutínea, flocosa, fasciculada, sinematosa ou crustosa. A textura crustosa é típica de *Penicillium crustosum*, que apresenta massa crustosa de conídios a partir do 7º dia de desenvolvimento (Samson; Frisvad, 2004). A parede do estipe pode ser lisa, finamente rugosa ou equinulada. A ornamentação é induzida pelo meio de cultura. Em ágar Czapek e ágar sacarose extrato de levedura (YES) os estipes são geralmente lisos. Porém, em MEA, algumas espécies podem apresentar parede ornamentada (Samson; Frisvad, 2004). Muitas espécies produzem gotículas de exudatos. O reverso das culturas é mais ou menos típico para as espécies, embora o meio de cultura também interfira na produção de pigmento. Geralmente, em CYA a coloração do reverso é mais destacada e, dependendo da espécie, pode ser

incolor, creme a amarelo, amarelo a marrom, ou vermelho (Pitt, 1991; Samson; Frisvad, 2004).

Pitt (1979), baseado em características microscópicas das espécies, dividiu o subgênero em quatro seções. A seção *Penicillium* inclui espécies com esporos grandes, como *P. aurantiogriseum* (Figura 11). Por outro lado, nas seções *Coronatum*, *Inordate* e *Cylindrosporium*, encontram-se espécies com esporos menores. As seções *Coronatum* e *Inordate* possuem cada uma, apenas uma espécie, nomeadamente: *Penicillium olsonii* (Figura 12), que produz “penicillus” multiramulado, e *P. arenicola*, que produz “penicillus” irregularmente ramulado (Figura 13), respectivamente. A seção *Cylindrosporium* inclui espécies com conídios cilíndricos, como por exemplo, *P. digitatum* e *P. italicum* (Figura 14).

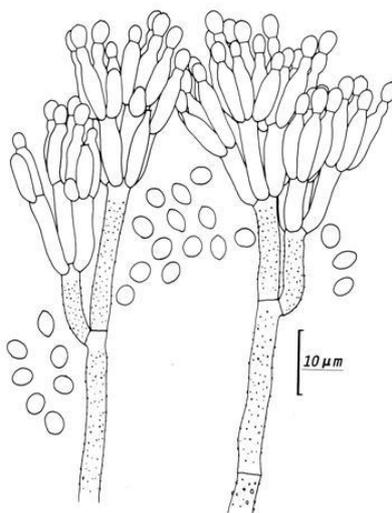


Figura 11: Conidióforos de *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx (seção *Penicillium*). Fonte: www.bcrc.firdi.org.tw

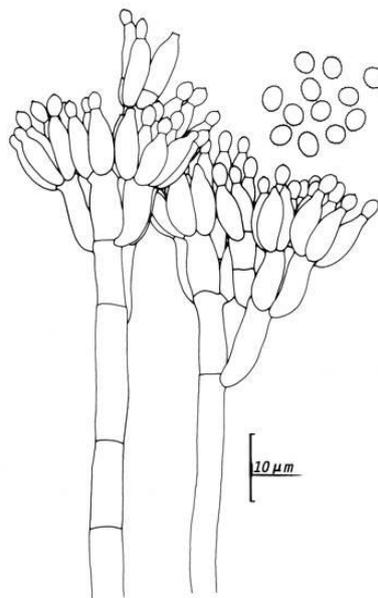


Figura 12: Conidióforos de *Penicillium olsonii* Bainer; Sartory (seção *Coronatum*). Fonte: www.bcrc.firdi.org.tw

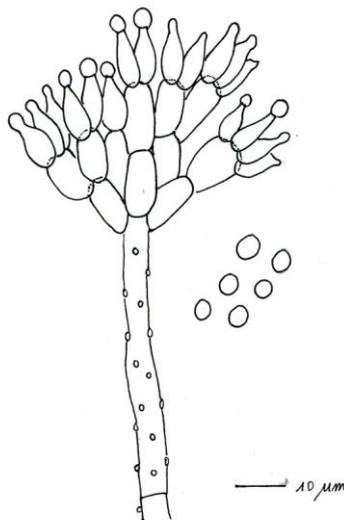


Figura 13: Conidióforos de *Penicillium arenicola* Chalabuda (seção *Coronatum*). Fonte: www.plantasyhongos.es

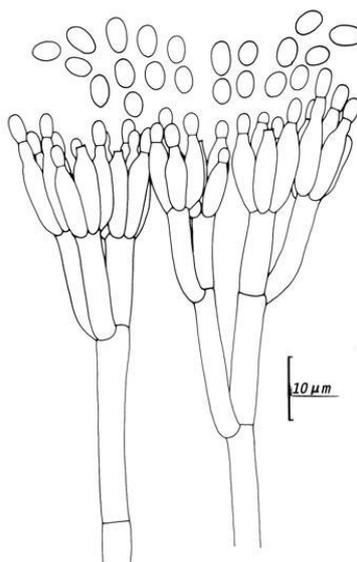


Figura 14: Conidióforos de *Penicillium italicum* Wehmer. Fonte: www.bcrc.firdi.org.tw

De acordo com Pitt (1991), o subgênero *Penicillium* é provavelmente o que apresenta maior dificuldade taxonômica, sobretudo pelo elevado número de espécies e pela semelhança morfológica entre as mesmas. Vinte e uma espécies deste subgênero são de comum ocorrência.

Devido a elevadas similaridades macroscópicas e microscópicas entre espécies, ao nível do gênero, as análises morfológicas são, por vezes, insuficientes para a classificação de isolados de *Penicillium*. Por isso, torna-se necessária a utilização de ferramentas tais como a biologia molecular, de modo a garantir o sucesso na identificação ao nível de espécies.

2.3. A utilização da biologia molecular para identificação de espécies de *Penicillium*

A biologia molecular apresenta-se como uma ferramenta importante para identificação de fungos. De acordo com as recomendações estabelecidas por uma comissão internacional de especialistas, para a taxonomia do gênero *Aspergillus* (Samson et al., 2007), que pode ser aplicada ao gênero *Penicillium*, a descrição de espécies novas deste gênero deve seguir regras particulares. Dentre as quais, para qualquer espécie nova a ser descrita, devem-se mostrar evidências de divergência evolutiva de espécies. Assim, é requerida a análise molecular baseada em pelo menos

dois “loci” gênicos diferentes, tais como RNA polimerase, actina, β -tubulina ou calmodulina. Com efeito, estes dois últimos são os genes frequentemente mais utilizados. Por isso, tanto para o gene da β -tubulina quanto para o da calmodulina, existem grandes conjuntos de dados disponíveis em bancos de dados, como o *GenBank*.

As tubulinas são as principais proteínas constituintes dos microtúbulos, sendo estas responsáveis pela formação do citoesqueleto. São encontradas em todos os eucariotos e exercem um papel crítico em vários processos celulares, tais como a motilidade celular, o transporte citoplasmático e a divisão celular (Stotz; Long, 1999). De acordo com Tuszynski et al., (2006), tanto a sequência de nucleotídeos do gene β -tubulina, quanto a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene, têm sido extensivamente usadas para estimar as relações filogenéticas em fungos. Os resultados dessas análises são importantes para a estimativa e análise de parentesco entre os organismos e são indispensáveis ao entendimento de processos evolutivos. Porém, para espécies do gênero *Penicillium*, são escassos os trabalhos com análises moleculares que venham contribuir com a taxonomia clássica na identificação precisa.

Samson et al., (2004) avaliaram as sequências parciais do gene da β -tubulina, de 180 isolados de espécies de *Penicillium*, pertencentes ao subgênero *Penicillium*. A estrutura filogenética geral foi determinada por uma análise de parcimônia com cada espécie representada pela espécie tipo, ou outra identificada de forma confiável. De acordo com os autores, as sequências da β -tubulina foram excelentes marcadores de espécies, relacionando-se bem com as características fenotípicas.

As calmodulinas (CaMs) são proteínas que possuem um domínio *calmodulin-like* que é capaz de realizar ligações com o íon Ca^{2+} por meio de uma estrutura hélice-giro-hélice. Trata-se de uma proteína termoestável e de baixo peso molecular, sendo geralmente encontrada no citosol, núcleo e matriz extracelular (Huang; Liu, 2007). Wang; Zhuang (2007) analisaram sequências parciais (cerca de 600 nucleotídeos) do gene da calmodulina para estudos filogenéticos em *Eupenicillium*, *Talaromyces* e *Penicillium*. Nesse estudo foram avaliados 76 isolados pertencentes a 56 taxa. Após as análises dos agrupamentos, a taxonomia clássica foi confirmada pela molecular.

Houbraken et al., (2010), analisaram isolados de *P. citrinum* e espécies afins, estocadas na coleção de culturas do “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS, Utrecht, Holanda). Esse estudo foi baseado nas análises de a) biologia molecular, com a

amplificação parcial e posterior sequenciamento dos genes da β -tubulina e calmodulina e das regiões do ITS, e b) no padrão de extrólitos e caracteres fenotípicos.

Os isolados analisados foram provenientes de vários substratos como, solos de diferentes locais, alimentos e ar. Dentre eles, as espécies presentes foram: *Penicillium citrinum*, (quinze); *P. gorlenkoanum*, (dois); *P. hetheringtonii*, (quatro); *P. sizovae*, (sete); *P. steckii*, (nove); *P. tropicoides*, (dois); *P. tropicum*, (um). Os dados moleculares revelaram que seis espécies eram relacionadas com *P. citrinum*, quatro delas, *P. hetheringtonii*, *P. gorlenkoanum*, *P. sizovae* e *P. steckii*, eram estritamente anamorfias e duas formavam um teleomorfo, *P. tropicoides* e *P. tropicum*. Os autores concluíram que essas sete espécies pertenciam à série *Citrina*.

Penicillium sizovae e *P. steckii* estão relacionados com *P. citrinum*. A espécie tipo do *Penicillium gorlenkoanum* foi revisada morfológicamente e não apresentou métulas terminais dispostas em espirais, conforme descrição original da espécie. Porém, o tamanho dos conídios, bem como os desenhos originais da descrição da espécie, indicam que ela pertença à série *Citrina*. Assim, *Penicillium hetheringtonii* e *P. tropicoides* foram descritas como espécies novas.

Peterson et al., (2005) descreveram *P. coffeae*, como novo endofítico de *Coffea arabica* L. no Havaí. A espécie apresenta padrão de ramificação monoverticilado, conidióforo vesiculoso e crescimento lento. Através da amplificação da região ITS do rDNA, e da amplificação parcial dos genes calmodulina e fator de alongamento da tradução 1- α (TEF1- α), os autores evidenciaram que *Penicillium coffeae* apresenta relação filogenética com *P. fellutanum*, *P. charlesii*, *P. chermesinum*, *P. indicum*, *P. phoeniceum* e *P. brocae*, embora apresente características morfológicas distintas.

Nonaka et al., (2011) descreveram *P. viticola* como nova espécie monoverticilada e a incluíram no subgênero *Aspergilloides* baseados em análises moleculares, pela amplificação parcial dos genes β -tubulina, calmodulina, da região ITS e do gene LSU do rDNA. De acordo com os autores, *P. viticola* apresenta relação filogenética com *P. angulare*. *Penicillium viticola* foi isolado a partir de uvas (*Vitis vinifera* L.) colhidas no Japão. Morfológicamente esta espécie é caracterizada por apresentar conídios e conidióforos finamente rugosos e rápido crescimento sobre o meio de cultura G25N.

Rivera; Seifert (2011) revisaram o complexo *Penicillium sclerotiorum* (subgênero *Aspergilloides*) através de análises morfológicas e filogenéticas de cinco

regiões do DNA: genes β -tubulina (Bena), citocromo c oxidase subunidade 1 (COX1), calmodulina (CMD), fator de alongamento da tradução 1- α (TEF1- α) e da região ITS do rDNA. *Penicillium sclerotiorum* é a espécie tipo do complexo sendo caracterizada por produzir conidióforos monoverticilados e vesiculados, colônias laranja a vermelho e pela produção de esclerócios por alguns isolados. Com base nos resultados obtidos os autores afirmam que se trata de um complexo composto por sete espécies: *P. sclerotiorum*, *P. guanacastense*, *P. mallochii*, *P. viticola*, *P. cainii*, *P. jacksoni*, e *P. johnkrugii*, sendo as três últimas espécies recém descobertas pelos autores. Tais espécies são filogeneticamente diferentes e algumas produtoras de esclerócios. *Penicillium adametzioides*, *P. bilaiae* e *P. multicolor* foram excluídas do complexo *Sclerotiorum*.

Ainda em 2011, Houbraken; Samson estudaram a filogenia de espécies de *Penicillium* e segregaram a família Trichocomaceae em três, além de avaliar a relação de espécies de *Penicillium* com outros gêneros incluídos na família Trichocomaceae. Tal estudo foi baseado na amplificação parcial dos genes RPB1, RPB2 (genes para a RNA polimerase II), Tsr1 (ribossomo de biogênese da proteína putativa) e Cct8 (possíveis componentes do complexo caperona TCP-1). Com base nos resultados obtidos, os autores dividiram Trichocomaceae em três famílias distintas: Aspergillaceae, Thermoascaceae e Trichocomaceae (Houbraken; Samson, 2011) .

De acordo com Houbraken; Samson (2011), espécies pertencentes à família Aspergillaceae são caracterizadas por produzir fiálides ampuliformes ou cilíndricas, ascos produzidos dentro de cleistotécios ou rodeados por células de Hülle. Os ascósporos apresentam um sulco ou fenda. Enquanto na família Trichocomaceae foram incluídas espécies que produzem fiálides lanceoladas e ascos envolvidos por camadas de hifas soltas e ascosporos sem fendas. Na família Thermoascaceae, as espécies incluídas também produzem ascosporos com ausência de sulco, porém distinguem-se por produzirem ascos em báculos, além de serem termotolerantes ou termófilas. Neste caso incluem-se os gêneros *Thermoascus* e *Paecilomyces*. De acordo com os autores, *Penicillium* é um gênero polifilético, entretanto, propõem a junção dos anamorfos com os teleomorfos criando *Penicillium sensu stricto*. Após a reclassificação estabelecida por Houbraken; Samson (2011), o gênero *Penicillium* foi denominado *Penicillium sensu stricto*, sendo agora inserido na família Aspergillaceae. Os autores incluíram em *Penicillium* os antigos gêneros *Chromocleista*, *Eupenicillium*, *Hemicarpenales*,

Thysanophora e *Torulomyces*, propondo combinações novas para as espécies pertencentes a estes gêneros. A partir da análise filogenética foram formados 25 clados para o gênero *Penicillium*, sendo cada clado denominado seção.

Em 2011, Samson e colaboradores avaliaram a relação filogenética entre as espécies anamorfas atribuídas ao subgênero *Biverticillium* do gênero *Penicillium* e as espécies teleomorfas atribuídas ao gênero *Talaromyces*, através do sequenciamento parcial da SSU (subunidade pequena) e/ou LSU (subunidade grande) do rDNA, bem como da região ITS do rDNA. De acordo com os autores, espécies pertencentes ao subgênero *Biverticillium* e ao gênero *Talaromyces* formam um grupo monofilético distante das espécies pertencentes a outros subgêneros de *Penicillium*. Seguindo o conceito de nomenclatura única para uma espécie, os autores transferiram todas as espécies presentes no subgênero *Biverticillium* para o gênero *Talaromyces*, mesmo que para algumas, ainda não tenha sido descrita a fase teleomorfa.

Em 2012, Rivera e colaboradores isolaram 25 estirpes de *Penicillium* monoverticilados a partir de intestinos dissecados e fezes de lagartas na Costa Rica. Através da amplificação parcial dos genes β -tubulina, calmodulina, fator de alongamento da tradução 1- α (TEF1- α) e da região ITS do rDNA, duas espécies foram descritas como novas, *Penicillium mallochii* e *P. guanacastense*. Ambas as espécies produzem massas de conídios esverdeadas, globosas à subglobosas, conidióforos com ápices moderadamente vesiculados e se assemelham à *Penicillium sclerotiorum*, mas diferem na largura da vesícula e forma dos conídios.

2.4. A utilização de perfis micotoxigênicos na identificação e caracterização de espécies de *Penicillium*

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidas por espécies de fungos, que podem atuar diretamente na proteção dos fungos que as produzem contra fatores ambientais e bióticos adversos (Frisvad et al., 2005; Abunhosa, 2008). As micotoxinas são compostos de baixo peso molecular, sendo alguns desses compostos potenciais agentes nefrotóxicos e carcinogênicos a humanos e a outros animais (Hoeltz et al., 2009). São produzidas a partir das vias metabólicas dos policetídeos, dos terpenóides e de alguns processos que usam aminoácidos essenciais. A estrutura das micotoxinas

varia desde um anel heterocíclico até oito anéis associados, o que está relacionado com a diversidade de efeitos tóxicos (Abrunhosa, 2008; Abrunhosa et al., 2010).

Dentre as micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium*, estão as que apresentam caráter maléfico aos homens e outros animais, como aquelas que são encontradas como contaminantes de produtos agrícolas, tais como milho, soja, uva, damasco, maçã, pêssigo e em produtos industrializados derivados de frutas (Frisvad et al., 2004; Zhou et al., 2010).

Por outro lado, existem micotoxinas que são produzidas por espécies de *Penicillium* e que apresentam valor agregado para a indústria farmacêutica e alimentícia, como é o caso da penicilina, produzida pelo *Penicillium notatum* e da roquefortina produzida pelo *P. roqueforti*.

Dentre as micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* e utilizadas na caracterização e identificação dessas espécies, destacam-se a patulina, a citrinina e a ocratoxina A (OTA). A citrinina (Figura 17) é um poliquetídeo, com peso molecular de 250,25 Da e fórmula empírica $C_{13}H_{14}O_5$, que apresenta ação nefrotóxica. Trata-se de uma micotoxina produzida principalmente por *Penicillium citrinum*, entretanto, outras espécies de *Penicillium* e até mesmo de *Aspergillus* mostraram-se capazes de produzir esta toxina (Frisvad et al., 2004; 2005).

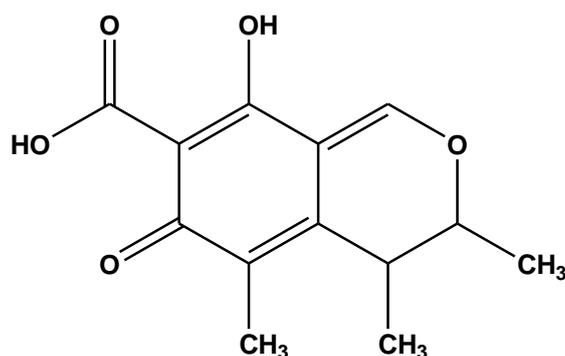


Figura 15: Estrutura química da citrinina.

A OTA (Figura 16) é uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina. Apresenta peso molecular de 403,81 Da e fórmula empírica $C_{20}H_{18}O_6NCl$, sendo considerada citotóxica, nefrotóxica, carcinogênica, teratogênica e imunossupressora, apresentando efeitos tóxicos como danos ao DNA, inibindo síntese protéica, induzindo a peroxidação de lipídios e causando estresse oxidativo (Abrunhosa, 2008). Assim como a patulina a OTA é um metabolito termotolerante.

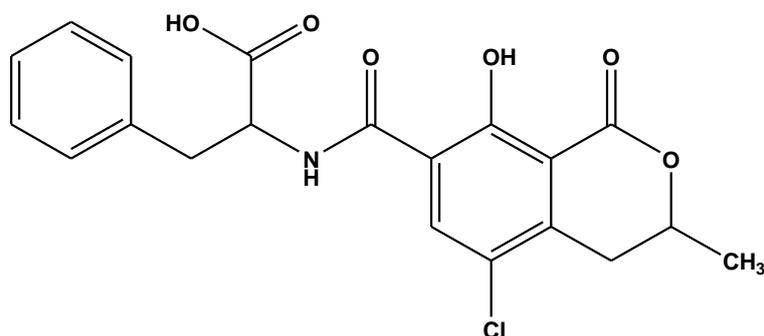


Figura 16: Estrutura química da OTA.

A patulina (Figura 15) é um composto termo-resistente e tolerante à condições ácidas. Pertencente à classe hidroxifuropiranona, também conhecida como clavicina, claviformina ou expansina, apresenta fórmula empírica $C_7H_6O_4$, cujo peso molecular é de 154,12 Da. Trata-se de um metabólito secundário produzido por espécies de *Aspergillus*, *Bissochlamys* e *Penicillium*, sendo *P. expansum* a espécie mais estudada quanto à produção desta micotoxina (Celli et al., 2009).

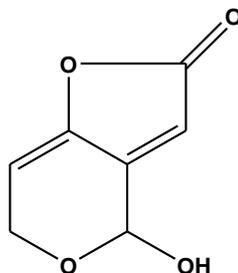


Figura 17: Estrutura química da patulina.

Outros exemplos de micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* e usadas como biomarcadores para a identificação e caracterização dessas espécies são o ácido ciclopiazônico, o ácido penicílico, o ácido terrétrico, a aurantiamina, as communesinas, o penitrem A e a roquefortina C (Samson; Frisvad 2004).

2.5. As micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* como contaminantes na indústria alimentar

A presença de micotoxinas em alimentos e rações animais é um problema sério que tem chamado a atenção das autoridades sanitárias a nível internacional. Muitas restrições a produtos contaminados com esses metabolitos tóxicos têm ocorrido em diversos países. Estas restrições traduzem-se diretamente em impactos na economia, e por isso no produto interno bruto de países produtores desses alimentos e de rações animais (Freire et al., 2007).

A Organização Mundial de Saúde estabeleceu em 50mg/L (p/v) como máximo tolerado de patulina em suco de maçã (Freire et al., 2007). A União Européia adotou recentemente este mesmo nível máximo. Além disso, estabeleceu como 25 µg/kg (p/p) em produtos sólidos incluindo as compotas e os purês de maçã e ainda o nível máximo permitido de 10 µg/kg (p/p) para produtos derivados de maçã destinados a crianças (Fonseca, 2013). O Brasil, por sua vez, estabeleceu Resolução RDC 07/2011, publicada no Diário Oficial da União em fevereiro de 2011, determinando que alimentos comercializados no Brasil como leite e produtos lácteos, sucos de maçã e uva, café torrado (moído ou em grão) e solúvel, entre outros, deverão respeitar um limite máximo para a presença de micotoxinas. Este regulamento estabelece limites máximos para as aflatoxinas (Aflatoxina B1, B2, G1, G2 e M1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1 + FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZON). Os produtores deverão seguir um cronograma que entrou em vigor apartir da publicação no Diário Oficial da União, tendo vigência até janeiro de 2016 (Anvisa, 2013).

Santos et al., (2002) avaliaram as características morfológicas e a capacidade de produção da patulina e da citrinina por 10 isolados de *P. expansum* nos meios de cultura ágar extrato de levedura (YEA) e ágar suco de uva (SU). Os isolados de *P. expansum* estudados estavam preservados sob óleo mineral, sílica gel e sob liofilização por 12 meses. Esses isolados foram testados quanto à produção das referidas micotoxinas antes e após serem preservados. A citrinina foi detectada em todas as culturas inoculadas em YEA, mas não em SU. A maioria dos isolados produziu patulina nos dois meios, antes e após preservação. De acordo com os autores, dependendo do método e do tempo de preservação, o metabolismo secundário de algumas culturas pode ser alterado.

Bandoh et al., (2009) analisaram quatro cultivares de maçãs inoculadas com *P. griseofulvum* e *P. expansum*, quanto ao teor de patulina, através de métodos cromatográficos. As maçãs inoculadas com *P. griseofulvum* não apresentaram sinais de contaminação. No entanto, as inoculadas com *P. expansum* apresentaram alto teor de patulina, confinados às áreas em que houve danos visíveis. Os níveis de patulina nas áreas circunvizinhas foram relativamente baixos. Os autores concluíram que a eliminação física das partes afetadas ou fervura com hidróxido de sódio a 15% é um meio eficaz para remoção desse metabólito tóxico quando presentes como contaminantes em maçãs.

Em 2010, Reddy e colaboradores analisaram a produção de patulina por 10 isolados de *P. expansum* isolados de maçã, damasco, kiwi, ameixa e pêsego. Os autores observaram que todos os isolados produziram a toxina, sendo a produção em ameixas e pêsegos inferior, em comparação com os outros frutos testados. Dois isolados produziram maior quantidade de patulina, em damascos (13.200 mg/ kg de fruto podre) e maçãs (12.500 mg/ kg) a 25 °C após 9 dias de incubação.

De um modo geral, estes dados apresentados na literatura apontam para a produção das micotoxinas por espécies de fungos filamentosos com potencial biotecnológico como um possível entrave na utilização desses micro-organismos em processos biotecnológicos. Por isso, a caracterização prévia de isolados com potencial biotecnológico no que tange a produção de micotoxinas, tanto do ponto de vista molecular quanto do ponto de vista cromatográfico ou espectrométrico, é fundamental.

2.6. Ecologia numérica: ferramenta para avaliar a diversidade de espécies de *Penicillium*

A ecologia numérica é uma ciência que agrega bioestatística e modelagem Ecológica. Trata-se de uma ciência exata, pela qual podem ser analisadas grandes tabelas de dados ecológicos, de modo a descrever a sua estrutura e a quantificação do grau de associação entre variáveis e objetos. Esta ciência é capaz de definir as comunidades biológicas e as áreas ou os períodos de mesmas características ecológicas (Valentin, 2000). Ao estudar a ecologia de uma comunidade biológica, vários parâmetros ou variáveis numéricas podem ser empregadas, dentre estas, população, diversidade, frequência, riqueza, dominância e equitabilidade de espécies (Tabela 2).

De acordo com Pinto-Coelho (2002), população é o conjunto de indivíduos da mesma espécie que vivem em um território cujos limites, em geral, são definidos pelo ecossistema no qual essa população está presente. As populações são entidades reais, cujos atributos, distribuição espacial, densidade, estrutura etária e taxas de crescimento podem ser estimados quantitativamente em condições naturais/experimentais. Por outro lado, comunidade é um conjunto de espécies (populações) que ocorre conjuntamente no tempo e no espaço (Begon et al., 1990). As comunidades apresentam propriedades estruturais e funcionais, tais como: presença de muitas espécies em uma determinada área, recorrência no tempo e no espaço, presença de mecanismos homeostáticos e estabilidade dinâmica (superorganismo). A comunidade pode ter vários atributos mensuráveis, tais como: composição específica (catálogo de espécies que compõem a comunidade), diversidade (riqueza e equitabilidade), formas de crescimento, estrutura espacial (estratificação, zonação), associações tróficas, dinâmica temporal (ciclos diurnos, sazonais e sucessionais) e fenômenos de interdependência (simbioses *sensu lato*) (Pinto-Coelho, 2002).

Diversidade refere-se à variedade de espécies de organismos vivos de uma determinada comunidade, habitat ou região. Riqueza, por sua vez, refere-se à abundância numérica das espécies de uma determinada área geográfica, região ou comunidade. Equitabilidade refere-se ao padrão de distribuição de indivíduos entre as espécies, sendo proporcional a diversidade, exceto se houver co-dominância de espécie. O termo dominância refere-se à dominância de uma ou mais espécies numa determinada comunidade, habitat ou região (Odum, 1985).

Em comunidades microbianas geralmente são consideradas dominantes as espécies que apresentam muitos indivíduos. Embora algumas espécies dominantes normalmente representem a maior parte do fluxo de energia dentro de um nível trófico, as menos abundantes determinarão, em grande parte, a diversidade de espécies desse nível trófico e de toda a comunidade (Magalef, 1970). Quando uma ou poucas populações atingem altas densidades, geralmente há a diminuição da diversidade e o aumento da competição. Isto leva a um possível sucesso da população que domina com o seu número elevado de indivíduos (Odum, 1985).

A maturidade de uma comunidade está intimamente relacionada à diversidade e produtividade. Uma comunidade altamente diversa permite muitas relações entre espécies, pois há uma menor exigência de energia. Isto é refletido em uma menor taxa

de produção primária de biomassa por unidade e no nível da diversidade, que é mantido estável (Atlas; Bartha, 1993). A forte relação inversa entre a diversidade e a produtividade é expressa quando alterações no meio ambiente favorecem o rápido crescimento microbiano. Se um ambiente é dominado por um forte fator unidirecional, menos flexibilidade é necessária para manter a estabilidade. Nestes casos, algumas populações tendem a se tornar altamente especializadas e a comunidade passa a ser dominada por algumas populações (Edwards, 1990). Em ecossistemas controlados fisicamente, a diversidade tende a ser baixa, sobretudo porque adaptações ao estresse físico são as prioridades máximas dos micro-organismos. Estas adaptações levam a pouco espaço para a evolução de interações estreitamente integradas e equilibradas das espécies. Exemplos de ecossistemas controlados fisicamente são águas termais e habitats desérticos da Antártica (Gould; Corry, 1980; Brock, 1985).

Em ecossistemas biologicamente controlados, onde as interações interpopulacionais compensam o estresse abiótico, a diversidade é mais alta. Nestes casos, as comunidades com elevada diversidade são capazes de lidar com flutuações ambientais dentro de uma ampla faixa de tolerância. Entretanto, isto não significa que essas comunidades consigam lidar com graves e contínuos distúrbios ambientais, podendo vir a entrar em colapso (Brock, 1985). Dentro de uma comunidade microbiana com elevada diversidade, nenhuma população é mais importante que outra. Mesmo que alguma população seja anulada, a estrutura da comunidade não será prejudicada (Atlas; Bartha, 1993).

Tabela 2: Índices aplicados na avaliação ecológica de comunidades de *Penicillium*.

Parâmetros	Definição	Autor
Índice de diversidade-Shannon-Wiener (H')	Índice que considera tanto o número quanto a abundância das espécies. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa. A diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice.	Valentin (2000)
Frequência	É a proporção de indivíduos de uma espécie em relação ao total de indivíduos da amostra.	Magurran (1988)

Riqueza	É o número total de espécies observadas na comunidade.	Magurran (1988)
Dominância	Expressa a relação entre o número de indivíduos de uma determinada espécie e o número de indivíduos de todas as espécies encontradas.	Magurran (1988)
Equitabilidade – índice de Pielou	Expressa a maneira pela qual o número de indivíduos está distribuído entre as diferentes espécies, isto é, indica se as diferentes espécies possuem abundância (número de indivíduos) semelhante ou divergentes.	Valentin (2000)

2.6.1. Comparando duas comunidades

Para compararmos duas comunidades entre si, através da análise de *stands* (entenda-se *stand* como uma amostra da comunidade tomada para objeto de estudo) podemos utilizar índices de similaridade-dissimilaridade. Neste caso, verificamos se os *stands* que compõem a comunidade são similares, ou seja, se todas ou muitas de suas espécies têm distribuição similares (Pinto-Coelho, 2000). As medidas de similaridade são muito usadas em ecologia de comunidades microbianas. Tratam de coeficientes descritivos e não de parâmetros estatísticos, sendo, portanto, muito peculiares. Não existem, por isso, intervalos de confiança ou erro estimados (Valentin, 2000). Existem basicamente dois tipos de índices de similaridade: binários e quantitativos (Tabela 3). Os índices binários somente são usados quando apenas dados de presença ou ausência estão disponíveis. Os índices quantitativos requerem a existência de dados numéricos, tais como as abundâncias ou biomassas das diferentes espécies que compõem a comunidade (Krebs, 1989).

Tabela 3: Índices binários aplicados na comparação entre duas comunidades de *Penicillium*.

Índices	Definição	Autor
Índice de Sorensen	É aplicado quando se quer comparar a similaridade ou dissimilaridade entre duas comunidades, sobretudo quando se têm apenas dados qualitativos. A faixa de variação deste coeficiente é de 0 (comunidades dissimilares, não apresentando nenhuma espécie em comum) a 1 (comunidades similares com todas espécies comuns a ambas).	Valentin (2000)
Distância Euclidiana	É aplicado quando se pretende visualizar graficamente a proximidade entre duas comunidades ou amostras, com base em dados quantitativos. Um coeficiente de distância nulo significa que as comunidades são idênticas. Assim, quanto mais próximas forem as amostras, menor será a distância métrica entre os pontos representativos dessas duas amostras e maior será a similaridade entre elas.	Magurran (1988)
Distância de Bray-Curtis	É aplicado quando se pretende visualizar graficamente a proximidade entre duas comunidades ou amostras, com base em dados quantitativos. Varia entre 0 (similaridade) e 1 (dissimilaridade).	Magurran (1988)

2.7. Espécies de *Penicillium* isoladas do solo

Asan (2000) realizou um levantamento das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* reportadas na Turquia, provenientes de diversos substratos. Esse trabalho teve como finalidade a integração dessas publicações para servir de base para futuros trabalhos que venham a propor novos registros de ambos os gêneros nesse país. Foram listadas 154 espécies de *Penicillium* e os autores concluíram que *P. chrysogenum* Thom e *P. frequentans* Westling são as espécies de *Penicillium* mais comuns na Turquia.

Chen et al., (2002) baseados apenas na taxonomia clássica, descreveram uma nova espécie de *Penicillium* isolada do solo em Taiwan. A espécie possui padrão de ramificação biverticilado e produz sinêmio. Apresenta fiálides acerosas e foi denominada *P. calidicanum* J.L. Chen. Esta espécie foi incluída no subgênero *Biverticillium* Dierck, na seção *Coremigenum* (Biourge), de acordo com Pitt (1979), e na série *Duclauxii*, de acordo com Raper; Thom (1949). De acordo com os autores, *Penicillium calidicanum* apresenta semelhanças morfológicas com *P. duclauxii* e *P. vulpinum*, porém difere destas pela taxa de crescimento da colônia e ornamentação da parede do conídio.

Souza-Motta et al., (2003) avaliando a diversidade de fungos presentes na rizosfera de girassol (*Helianthus annuus* L.), isolaram e identificaram 49 espécies de fungos filamentosos. Dentre os gêneros isolados, *Penicillium* foi o mais representativo, com nove espécies *citreonigrum*, *P. fellutanum*, *P. janthinellum*, *P. oxalicum*, *P. restrictum*, *P. variabile*, *P. verruculosum*, *P. vinaceum* e *P. waksmanii*. De acordo com os autores, o gênero *Penicillium* é o mais frequente na rizosfera de girassol (*Helianthus annuus* L.) da área analisada. Um ano mais tarde, Asan (2004) publicou um novo levantamento de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* reportadas na Turquia e isolados de diferentes substratos. De acordo com o autor, *Penicillium chrysogenum* foi a espécie mais comum dentre os trabalhos publicados por pesquisadores da Turquia.

Markovina et al., (2005) buscando conhecer a diversidade de espécies de Trichocomaceae no solo seco e no solo da mata da Reserva Natural Katandra, na Austrália, encontraram uma maior diversidade de espécies do gênero *Penicillium* em relação ao gênero *Aspergillus*. O solo seco apresentou uma maior diversidade de espécies de *Penicillium*, em relação ao solo da mata.

Na região de Xingó, no Brasil, Cavalcanti et al., (2006) avaliaram a diversidade de fungos filamentosos do solo de municípios da região e observaram que os dois gêneros mais representativos foram *Penicillium* e *Aspergillus* com 31 e 17 espécies, respectivamente. Das espécies de *Penicillium*, *P. restrictum*, *P. simplicissimum*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum* e *P. pinophilum* foram as mais abundantes.

Deacon et al., (2006) avaliaram a diversidade de fungos isolados do solo de uma pastagem em Roxburghshire, no Reino Unido, bem como a capacidade desses fungos em decompor resíduos ricos em amido, celulose, lignina, pectina e quitina. Foram isolados membros de Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e anamorfos. Dentre os

anamorfos, foram obtidos isolados do gênero *Penicillium*. Porém, apenas foram identificadas as espécies *P. hirsutum* e *P. janczewski*, com 51 e 20 % de frequências, respectivamente. Entretanto, ambas as espécies foram consideradas abundantes.

Gomez et al., (2007) estudaram a diversidade de fungos presentes em solos da Argentina impactados pelo desmatamento da vegetação nativa para a realização de diferentes manejos. As coletas foram realizadas durante três anos. Dentre os gêneros isolados, *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais frequentes, ocorrendo em todas as coletas, inclusive no solo controle. Do gênero *Penicillium* apenas a espécie *P. purpurogenum* foi identificada. De acordo com os autores a predominância de espécies de *Penicillium* pode estar relacionada com o antagonismo deste gênero sobre as espécies fitopatogênicas e pela sua alta capacidade competitiva por nutrientes. Kurek et al., (2007) avaliaram as comunidades de fungos filamentosos presentes em solo da tundra ártica e os caracterizaram quanto a capacidade de crescerem em baixas temperaturas. Foram obtidos isolados pertencentes a 17 gêneros, sendo a maioria das espécies representantes dos gêneros *Chrysosporium*, *Mortierella*, *Penicillium* e *Phialophora*. A metade dos isolados eram psicrófilos. Do gênero *Penicillium* foram isolados *P. lanosum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. verrucosum*, *P. cyclopium* e *P. islandicum*. De acordo com os autores, alguns isolados pertencentes a algumas espécies de *Penicillium* podem ser considerados psicrófilos. Prade (2007), avaliando a diversidade de fungos do solo de ambientes ripários com diferentes formas de manejo no Rio Grande do Sul, Brasil, isolou e identificou 28 espécies de fungos. Do gênero *Penicillium* foram identificadas *P. citrinum* e *P. digitatum*, sendo *P. citrinum* a espécie que apresentou maior número de isolados.

Grishkan et al., (2008) avaliaram as comunidades de fungos presentes em solos cultivados e não cultivados da Alta Galiléia em Israel. Os autores encontraram *P. simplicissimum* como espécie dominante em ambos os solos e concluíram que a atividade agrícola prolongada na região pode diminuir a diversidade de fungos. Asan et al., (2010) isolaram fungos filamentosos do ar e do solo com intervalos sazonais, na cidade de Luleburgaz, na província turca de Kirklareli. Dos fungos isolados do ar, o gênero mais representativo foi *Alternaria* e do solo, *Penicillium*. No caso do *Penicillium*, foram isoladas 15 espécies, sendo *P. citrinum* a espécie mais abundante no solo.

Na região do Vale do São Francisco, em Petrolina, no estado de Pernambuco, Coutinho et al., (2010) isolaram fungos filamentosos da rizosfera de meloeiros (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivados em solos ricos em compostos orgânicos. Os autores encontraram 78 espécies, sendo os gêneros mais representativos *Aspergillus* e *Penicillium*, com 15 e 13 espécies, respectivamente. Foram identificados *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. dierckxii*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum*, *P. pinophilum*, *P. waksmanii*, *P. restrictum*, *P. solitum* var. *crustosum*, *P. spinulosum* e *P. vinaceum*.

Fraga et al., (2010a) avaliaram a diversidade de espécies da família *Trichocomaceae* isoladas do solo de dois sistemas florestais (*Pinus* e *Corymbia*) situadas na cidade de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. Foram obtidos 190 isolados, pertencentes a 54 espécies. *Penicillium* foi o gênero mais representativo com 32 espécies, tanto para a área de *Pinus* quanto para a área de *Corymbia*. *P. decumbens* foi a espécie mais abundante, identificada em todas as amostragens nas diferentes condições de temperatura e umidade, independente da cobertura vegetal. Também em 2010, Fraga e colaboradores avaliaram a micobiota do solo de uma duna localizada na Restinga da Marambaia, no Rio de Janeiro, Brasil. Os gêneros mais frequentes foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. Do gênero *Penicillium*, foram identificadas *P. arenicola*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. echinulatum*, *P. javanicum*, *P. miczynskii*, *P. paxilli*, *P. purpurogenum*, *P. sclerotiorum* e *P. simplicissimum*. De acordo com os autores, duas espécies pertencentes a este gênero não foram puderem ser identificadas com base na morfologia (Fraga et al., 2010b).

Em 2012, Fraga e colaboradores avaliaram a diversidade e a sucessão de *Trichocomaceae* em áreas de Mata Atlântica com diferentes níveis de antropização, localizadas no Parque Natural Municipal do Curió, Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil. As áreas foram denominadas pelos autores como área mais impactada e área menos impactada. Os autores isolaram 87 amostras de fungos distribuídos em quatro gêneros e 22 espécies. Foram identificadas 16 espécies de *Penicillium*, sendo este o gênero mais representativo nas duas áreas estudadas.

2.8. Tanase

A tanino acil hidrolase (TAH) (EC 3.1.1.20) é uma enzima induzível que catalisa a hidrólise de ligações éster e do depsídeo em taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico (Figura 18). Como os taninos são produzidos pelos vegetais com finalidade de defesa, vários micro-organismos produzem tanase como forma de contra ataque aos vegetais (Pinto et al., 2005b).

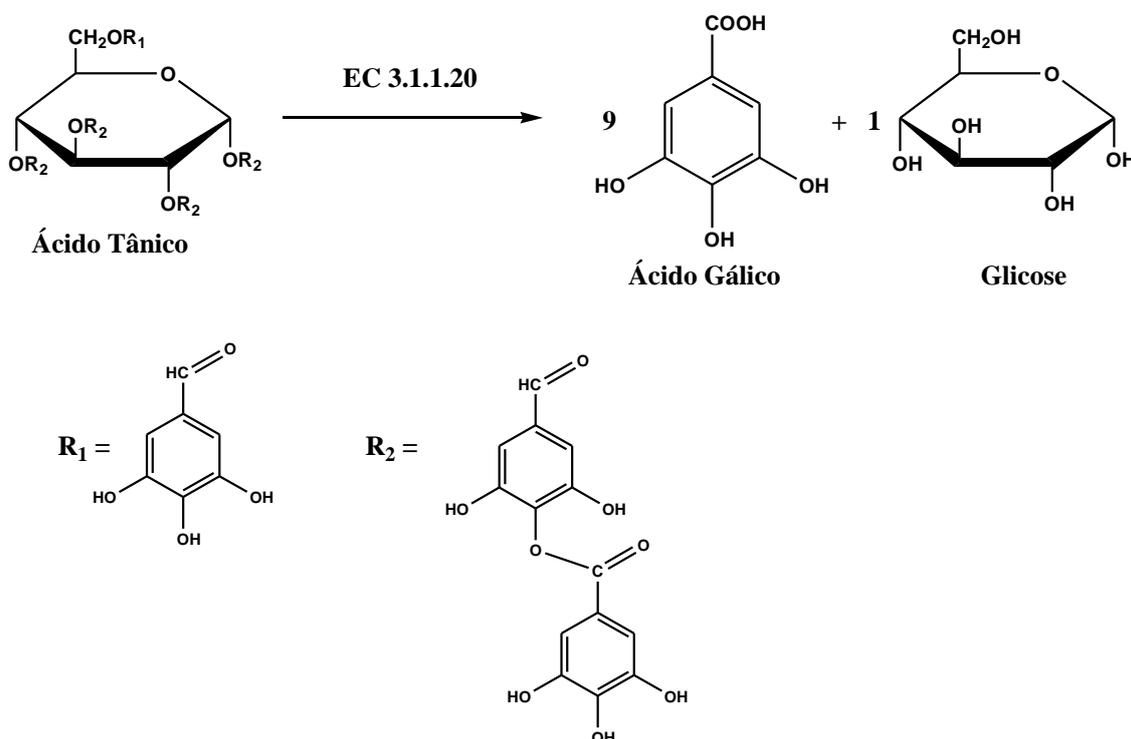


Figura 18: Hidrólise do ácido tânico (tanino hidrolisável) pela tanase. Adaptado

A tanase foi descoberta acidentalmente por Tieghem em 1967, em uma experiência de formação de ácido gálico em uma solução aquosa de taninos, onde cresceram duas espécies de fungos filamentosos, identificadas posteriormente como *Penicillium glaucum* e *Aspergillus niger*. De acordo com Pinto et al., (2005b) o mecanismo de ação da tanase para degradação do ácido tânico, consiste na hidrólise de todas as ligações depsídicas do ácido tânico, ocorrendo a liberação da 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose e do ácido gálico. Em seguida, os demais resíduos galoil são sequencialmente removidos até a completa liberação da molécula de glicose (Figura 19).

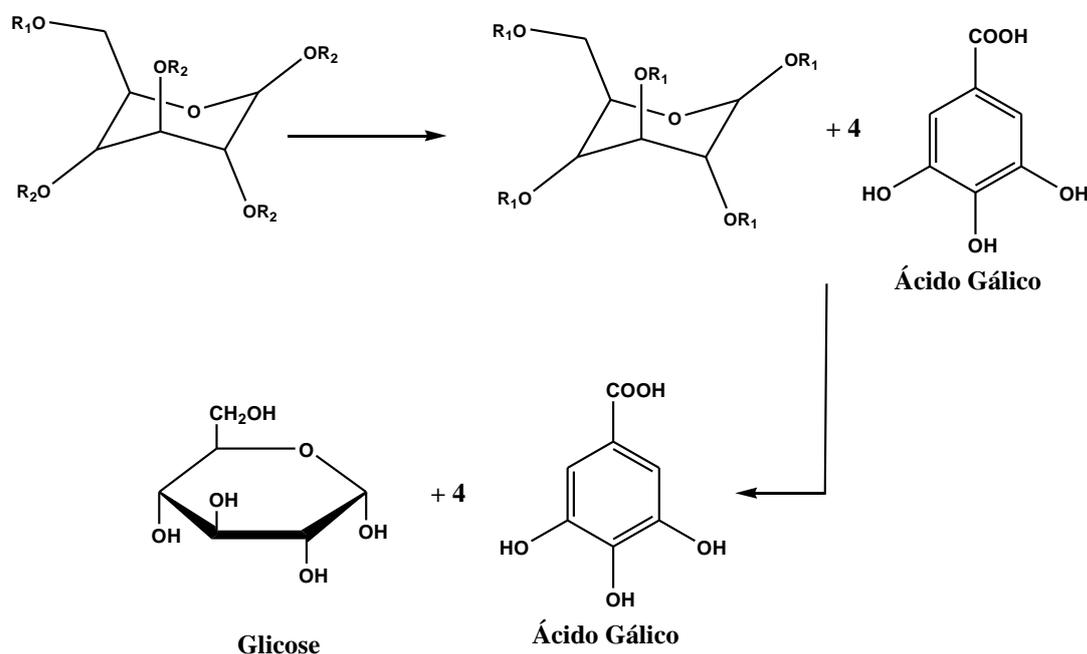


Figura 19: Mecanismo de ação da tanase durante a degradação do ácido tânico. Fonte: Adaptado de Pinto et al., (2005b).

Os taninos são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário de vegetais. Podem ser encontrados em todas as partes da planta, desde vacúolos celulares, folhas, casca, frutos, semente até à seiva. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Da. Possuem a capacidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides. Esses compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoprotéínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (Monteiro et al., 2005). Os taninos representam o quarto constituinte vegetal mais abundante, depois da celulose, da hemicelulose e da lignina. Atuam como parte do mecanismo de defesa dos vegetais contra micro-organismos, herbívoros e condições ambientais hostis. Os vegetais que contêm altos níveis de taninos apresentam uma vantagem evolucionária significativa sobre os seus predadores e sobre as outras espécies vegetais, que competem pelo mesmo nicho. Altas quantidades de taninos estão, neste caso, intimamente associadas com a resistência ao ataque microbiano (Scalbert, 1991).

Para degradação de taninos, alguns animais, vegetais e micro-organismos produzem tanase. Porém, para a indústria a tanase produzida por micro-organismos é

mais interessante, por ser mais estável, além de poder ser produzida em grandes quantidades. Dentre os fungos filamentosos, espécies de *Penicillium* apresentam-se com elevado potencial para produção de tanase (Belmares et al., 2004).

Na natureza, os micro-organismos produzem tanase para atuar diretamente na invasão da planta hospedeira ou para decompô-la. Os micro-organismos do solo como as espécies de *Penicillium*, podem produzir tanase durante o processo de decomposição, atuando diretamente na ciclagem de matéria orgânica (Belmares et al., 2004; Pinto et al., 2005b).

2.8.1. Tanase produzida por espécies de *Penicillium*

Vários micro-organismos têm sido relatados como produtores de tanase, dentre os quais, os fungos filamentosos têm-se destacado. Tanto na FES, quanto na FMS, o gênero *Aspergillus* é considerado o melhor produtor desta enzima, seguido do gênero *Penicillium* (Aguillar et al., 2007). Embora seja comprovado o potencial de espécies do gênero *Penicillium* para produção de tanase, trabalhos experimentais que comprovem esse potencial ainda são escassos. Em um levantamento bibliográfico realizado por Aguillar et al., (2007), entre os anos de 1969 à 2007, apenas cinco trabalhos com este objetivo são citados. Mais recentemente, um levantamento similar foi realizado por Belur; Mugeraya (2011). Os autores afirmaram que não houve alteração no número de trabalhos sobre produção de tanase por espécies de *Penicillium* de 2007 à 2011 (Tabela 4).

Tabela 4: Espécies de *Penicillium* relatadas como produtoras de tanase entre os anos de 1969 à 2011. Fontes: Aguillar et al., (2007) e Belur; Mugeraya (2011).

Espécies	Referência
<i>Penicillium notatum</i> e <i>P. islandicum</i>	Ganga et al., (1977)
<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>P. acrellanum</i> , <i>P. carylophilum</i> , <i>P. citrinum</i> e <i>P. charlessi</i>	Bradoo et al., (1996)
<i>P. glaucum</i>	Lekha; Lonsane (1997)
<i>P. variable</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. restrictum</i>	Batra; Saxena (2005)

Apesar de não constar nas listas de publicações dos levantamentos bibliográficos realizados tanto por Aguillar et al., (2007), quanto por Belur; Mugeraya (2011), outros trabalhos com produção de tanase por outras espécies de *Penicillium* foram publicados no período de 1969 a 2011. Rajakumar; Nandy (1989) purificaram a tanase produzida por *P. chrysogenum* e obtiveram uma atividade enzimática ótima quando a purificação foi realizada em uma temperatura entre 30 e 40 °C, em uma faixa de pH entre 5,0 e 6,0. A enzima foi estável a 30 °C, dentro de uma faixa de pH de 4,0 a 6,5. Também, Selwal; Selwal (2011) isolaram uma linhagem de *P. atramentosum* de um efluente de curtume e avaliaram a capacidade de produção de tanase desse isolado. Os ensaios ocorreram através da FMS, usando folhas de vegetais típicos da Índia como substratos: *Phyllanthus emblica*, *Zyzyphus mauritiana*, *Eugenia cuspidate*, *Syzygium cumini* e *Acacia nilotica*, sem adição de ácido tânico. Em folhas de *Phyllanthus emblica* e *Acacia nilotica*, através de incubação a 30 °C durante 72 h foram obtidas as maiores atividades enzimáticas, 32,8 e 34,7 U mL⁻¹, respectivamente. Os autores concluíram que as folhas de *P. emblica* e *A. nilotica* podem ser ótimos subtratos e indutores da produção de tanase por espécies de *Penicillium*. Selwal et al., (2011) avaliaram a produção de tanase por *Penicillium atramentosum* através da FES, usando como substrato folhas de vegetais típicos da Índia, nomeadamente: *Phyllanthus emblica*, *Zyzyphus mauritiana*, *Eugenia cuspidate*, *Syzygium cumini* e *Acacia nilotica*. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas em folhas de *A. nilotica* e *P. emblica*, 24,4 e 26,5 U mL⁻¹, respectivamente, após 96h de fermentação a 28 °C. O substrato foi suplementado com Nitrato de Sódio como fonte de nitrogênio.

2.8.2. Aplicações da tanase

A tanase apresenta uma vasta aplicação na indústria de alimentos, sucos, cervejas, cosméticos, farmacêutica e indústria química. Ela é principalmente utilizada para produção de ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da cor do vinho, refrigerantes a base de café, detanificação de alimentos e para tratamento de efluentes na indústria de couros (Battestin et al, 2004; Belur; Mugeraya, 2011).

2.8.2.1. Fabricação de chás instantâneos

Uma das bebidas mais consumidas mundialmente é o chá. Esta bebida torna-se bastante atrativa, pelo aroma, sabor e principalmente, pelos vários efeitos medicinais. O processo de manufatura de chás consiste nas etapas de murchamento, maceração, fermentação e secagem. A solubilidade em água fria constitui requisito fundamental para o chá instantâneo, pois são frequentemente utilizados como chás gelados (Boadi; Neufeld, 2001; Rout; Banerjee, 2006). A tanase adicionada ao processo de manufatura, em diferentes etapas, catalisa a quebra das ligações éster nos galatos presentes nas folhas. A adição da tanase promove a diminuição da turbidez e o aumento da extratibilidade de compostos fenólicos e de compostos voláteis, de modo que a bebida final (quente ou fria) apresenta uma qualidade superior à obtida pelo processo de extração a quente (Takino, 1976; Tsai, 1987). As amostras tratadas com tanase podem apresentar redução de até 82% no teor de sólidos não dissolvidos (Lekha; Lonsane, 1997).

2.8.2.2. Produção de compostos antioxidantes

A tanase é também aplicada na indústria de alimentos contra a auto-oxidação de lipídios. O método comumente usado para inibir as reações de oxidação lipídica é a aplicação de antioxidantes sintéticos. Os alimentos que devem ser estabilizados contra a oxidação são, por exemplo, óleos de fritura, gorduras, flocos de batata, produtos de panificação, emulsões cárneas, cereais pré-cozidos, leite de soja, produtos de frango, produtos emulsionados, pizza congelada, queijos e alimentos para animais (Mai et al., 1990).

2.8.2.3. Indústria de bebidas

Na indústria de bebidas, a tanase pode ser utilizada para reduzir a formação de turbidez em bebidas cuja composição contém compostos fenólicos. Sucos de frutas ricas em taninos são clarificados e têm a adstringência diminuída pela ação da tanase (Rout; Banerjee, 2005). Outro exemplo de aplicação da tanase é na fabricação de cerveja, que quando armazenada pode apresentar turbidez, neste caso a tanase atuará quebrando os polifenóis presentes no malte. De forma similar, a tanase é aplicada na estabilização de

vinhos, removendo substâncias fenólicas, bem como no tratamento de suco de uva, atuando na ruptura de compostos fenólicos (Lekha; Lonsane, 1997).

2.8.2.4. Aditivo para ração animal

A tanase é empregada em ração animal, sobretudo para animais jovens. Como as rações animais são frequentemente à base de vegetais ricos em taninos, a tanase atua aumentando a digestibilidade e conseqüente assimilação de nutrientes contidos na formulação, constituindo esses que o animal, por imaturidade, não conseguiria digerir completamente (Meschonat et al., 2001).

2.8.2.5. Produção de ácido gálico

A tanase é aplicada na produção de ácido gálico e propil galato, utilizados como antioxidante em alimentos, cosméticos, produtos de cabelo, adesivos e na indústria de lubrificantes (Sharma; Gupta, 2003).

2.8.2.6. Tratamento de efluentes

De acordo com Aguilar; Gutiérrez-Sanches (2001), a tanase produzida por fungos é uma excelente alternativa para o tratamento de efluentes de curtumes que contém elevadas quantidades de polifenóis que atuam como poluentes ambientais. Além do tratamento de efluentes de curtumes, a tanase pode ser empregada no tratamento de efluentes da indústria sucroalcooleira. Esses efluentes são ricos em polifenóis, o que impossibilita os seus lançamentos em corpos de água sem o tratamento prévio. A tanase, degrada esses polifenóis que são tóxicos para animais e vegetais, e é por isso uma excelente alternativa para a preservação dos ambientes que recebem esses efluentes industriais (Perovano Filho et al., 2011). Devido à elevada importância da aplicação da tanase microbiana em várias indústrias, torna-se necessária a busca por processos de produção que venham minimizar seus custos, elevar a produção e contribuir diretamente para o equilíbrio ambiental. Resíduos agroindustriais, que são comumente descartados no meio ambiente sem tratamento prévio, são excelentes fontes de substrato para a produção de tanase. Neste contexto, a FES apresenta-se como excelente alternativa para produção de tanase por fungos.

2.9. Fermentação em Estado Sólido (FES)

Ao setor produtivo é inerente à produção de resíduos. Entretanto, o aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para os próximos Séculos é o de equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (Pinto et al., 2005a). Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos quanto sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente. Também, representam, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. No passado, os resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo. Atualmente, os conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de resíduos e bioconversão de resíduos, são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (Laufenberg et al., 2003).

A bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo uma crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos utilizáveis na síntese de produtos úteis. Neste contexto, a FES desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos. Na FES, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado (Pinto et al., 2005a; Martins et al., 2011).

2.10. Potenciais resíduos a serem utilizados como substratos para produção de tanase por FES

Assim, como foi referido anteriormente, os setores agroindustrial e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos quanto sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente. Os resíduos gerados pelas indústrias produtoras de polpas de frutas é um exemplo desta problemática. Tais resíduos podem ser uma alternativa para a produção de enzimas através da FES, como por exemplo, a tanase (Pinto et al., 2005a). A seguir são apresentados alguns dos resíduos produzidos pela indústria brasileira que são alternativas à produção de tanase.

2.10.1. Cajá, fruto da cajazeira (*Spondias lutea* L.)

O cajá é o fruto da cajazeira (*Spondias lutea* L.), originária da América Tropical e pertence à família Anarcadiaceae. Esse fruto apresenta uma grande aceitação no mercado, sendo considerado bastante saboroso e nutritivo (Figura 20). A cajazeira é uma espécie que sobrevive de forma silvestre, cuja exploração é feita de modo extrativista. Além da importância regional, o cajá vem ganhando papel de destaque no agronegócio brasileiro, com o desenvolvimento de novos produtos e a comercialização em maior escala da sua polpa (Bosco et al., 2000; Sacramento; Souza, 2000).

O cajá apresenta elevado teor de carotenóides, que dão à polpa uma intensa coloração amarela (Mattietto 2005). O cajá também é um fruto rico em taninos. A elevada associação entre o consumo de alimentos vegetais ricos em taninos e a menor incidência de determinados tipos de doenças crônico-degenerativas, observados em vários grupos populacionais, tem estimulado a comunidade científica a explorar possíveis propriedades funcionais dessas substâncias. É devido ao elevado teor de taninos presentes no cajá que os resíduos (casca e sementes) gerados pela indústria de polpas de frutas e de sucos, podem ser utilizados como potencial substrato para produção de tanase por FES (Tirapegui; Castro 2001).



Figura 20: Cajá, fruto da cajazeira. Foto: Roberta Cruz.

2.10.2. Manga, fruto da mangueira (*Mangifera indica* L.)

A manga, fruto da mangueira (*Mangifera indica* L.), árvore frutífera pertencente à família Anarcadiace, é uma das mais importantes frutas tropicais. Esta fruta é muito apreciada pelo sabor, aroma e coloração característicos e atraentes (Figura 21). A mangueira é originária da Índia e foi introduzida no Brasil no século XVI (Pinto, 2011). Em 2009 o Brasil produziu 1.197.694 toneladas de manga. O estado de Pernambuco é o segundo maior produtor, com 196.908 toneladas, perdendo apenas para a Bahia. O Nordeste é, portanto, a principal região produtora do país (EMBRAPA, 2011).

A composição química da manga varia de acordo com as condições da cultura, variedade, estágio de maturação e outros fatores, sendo constituída principalmente por água, carboidratos, ácidos orgânicos, sais mineirais, proteínas, vitaminas (A, C e do Complexo B) e pigmentos, além de taninos. Os taninos constituem de 12 a 18% dos caroços da manga (Rozane et al., 2004). Os resíduos do processamento da manga, pelas agroindústrias como as de polpa de frutas e sucos, são ricos em aminoácidos e taninos e podem representar uma excelente fonte de carbono para a produção de tanase por FES.



Figura 21: Manga, fruto da mangueira. Foto: Roberta Cruz.

2.10.3. Umbu-cajá, fruto da umbu-cajazeira (*Spondias tuberosa* x *Spondias mombin*)

O umbu-cajá é o fruto da umbu-cajazeira (*Spondias tuberosa* x *Spondias mombin*), uma árvore frutífera nativa do Nordeste brasileiro e pertencente à família Anacardiaceae. Trata-se de uma espécie nativa do Nordeste brasileiro ainda em fase de domesticação e originada por possíveis cruzamentos naturais entre a cajazeira e o umbuzeiro. (Figura 22) Trata-se de um fruto com elevado teor nutricional, rico em vitamina C, glicídios e taninos. Este fruto é amplamente utilizado pela indústria de polpas de frutas, geléias, néctares e sorvetes (Santos et al., 2010). Os resíduos (cascas e sementes) do umbu-cajá, gerados pela indústria de polpas de frutas e de sucos, por conterem alto teor de taninos, também podem ser utilizado como potencial substrato para produção de tanase por FES (Santos et al., 2010).



Figura 22: Umbu-cajá, fruto da umbu-cajazeira. Foto: Roberta Cruz

3. Capítulo 1

Diversidade de *Penicillium* em solo de áreas da Caatinga e Mata Atlântica Pernambuco, Brasil: uma abordagem ecológica¹

Lidiane Roberta Cruz da Silva¹, Cledir Santos², Juliana Silva de Lima¹, Maria José Fernandes dos Santos¹; Keila Aparecida Moreira³, Cristina Maria de Souza-Motta¹

¹Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-420, Brasil

²Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, 5292-270, Brasil.

³IBB-Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Micoteca da Universidade do Minho, Campos de Gualtar, Braga, Portugal

⁴Centro de Pesquisas Cereal, Agricultura e agroalimentos do Canadá, 195 Dafoe Road, Winnipeg MB, Canada R3T 2M9.

Autor para correspondência: smotta@ufpe.br

Com 5 figuras e 1 tabela

¹ Trabalho aceito para publicação como Cruz, R., Santos, C., Lima, J.S., Fernandes, M.J.S., Moreira, K.A., Souza-Motta, C.M. (2013): Diversity of *Penicillium* in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas of Pernambuco, Brazil: an ecological approach. Nova Hedwigia.

Resumo

A Caatinga é reconhecida por ser o único bioma exclusivamente brasileiro. Caracteriza-se principalmente por seu solo pobre em minerais e nutrientes orgânicos e baixa atividade de água. Por outro lado, a Mata Atlântica é caracterizada principalmente pelo seu solo rico em nutrientes, e sua alta atividade de água. Os fungos são componentes importantes de ambos os biomas. Entre os fungos frequentemente isolados do solo de dos biomas Caatinga e Mata Atlântica, espécies de *Penicillium* são proeminentes. A riqueza, abundância, equitabilidade e dominância de espécies de *Penicillium* em solos da Caatinga e áreas de Mata Atlântica em Pernambuco, Brasil, foram analisadas. A influência da sazonalidade (estações chuvosa e seca) sobre as comunidades de espécies de *Penicillium* em cada bioma e sua distribuição foi avaliada. Um total de 815 isolados de *Penicillium* foi encontrado. Do total, 370 isolados foram encontrados no solo Caatinga, enquanto que 445 foram encontrados no solo de Mata Atlântica. Trinta e uma espécies foram identificadas morfolologicamente, sendo 23 provenientes do solo da Caatinga e 17 do solo da Mata Atlântica. Além disso, três isolados de solo Caatinga só foram identificados até gênero. O presente estudo revelou que os solos de Caatinga e Mata Atlântica apresentam alta diversidade de espécies de *Penicillium*, com a Caatinga apresentando espécies raras. Além disso, as comunidades de espécies de *Penicillium* são muito diferentes, mas bem distribuídas em cada bioma. Na estação seca, houve uma maior riqueza de espécies em áreas dos dois biomas, o que indica que estas espécies podem ser bem adaptadas à baixa disponibilidade de água do solo para o desenvolvimento e manutenção de comunidades equilibradas.

Palavras-chaves: ecologia de fungos, clima, *Penicillium adametzii*, *Penicillium lanosum*, fungos do solo

1. Introdução

De acordo com Hawksworth (1991), a magnitude da diversidade de fungos na Terra foi estimada em cerca de 1,5 milhões de espécies. Esta estimativa baseou-se nas extrapolações de diversos conjuntos de dados independentes, nomeadamente: os números de fungos (que crescem em uma seção transversal de plantas nativas) versus essas plantas nativas que são originárias de uma região particular da Grã-Bretanha e da Irlanda e, também, o número de espécies descobertas em uma comunidade específica de alpinos dessa região britânica. Por outro lado, de acordo com O'Brien et al., (2005) a magnitude da diversidade de fungos na Terra situa-se entre 3,5 a 5,1 milhões de espécies. Neste caso, os autores avaliaram a diversidade de fungos de solo em dois locais de uma floresta temperada (Duck Forest, Durham, NC, EUA). Para essas estimativas, os autores usaram o isolamento direto da subunidade ribossomal pequena (srRNA) do espaçador interno transcrito (ITS), através do sequenciamento por PCR e através da análise dos fragmentos clonados por sequenciamento em sistema de high-throughput.

Levando em consideração as estimativas da Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), o Brasil abriga entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial. É o país com o maior número de espécies endêmicas e sua biodiversidade pode ser uma fonte de importantes compostos biologicamente ativos. Além disso, uma enorme diversidade de fungos, com muitas espécies raras ou mesmo desconhecidas é estimada para o Brasil (Barreiro, 2009; Lewinsonhn; Prado, 2002). Fungos que habitam solos da Mata Atlântica brasileira e da Caatinga, podem ser particularmente de interesse biotecnológico.

A Caatinga abrange cerca de 800.000 km², ocupando cerca de 10% do território brasileiro e é relatado para ser único bioma das regiões semi-áridas e exclusivo do Brasil (Rodal et al., 2008). O solo nessa área é caracterizado por apresentar 0,7-1,1% de matéria orgânica e pH 5,4. O clima é semi-árido quente, com um verão seco, altas temperaturas diurnas (30 a 40 °C) e baixas temperaturas noturnas (15 °C). Além disso, a precipitação média anual é de 610 mm (Goto et. al., 2009). A vegetação da Caatinga é principalmente representada por espécies de Euphorbiaceae, Caesalpiniaceae, Malpighiaceae, Myrtaceae, Mimosaceae, Fabaceae e Cactaceae, por exemplo, *Cnidocolus obtusifolius* Pohl, *Caesalpinia microphylla* Mart., *Byrsonima gardneriana* A. Juss., *Eugenia biflora* (L.) DC., *Acacia bahiensis* Benth, *Bocoa mollis* (Benth)

Cowa, e *Pilosocereus tuberculatus* (Werdermann) Byles & Rowley), entre muitas outras espécies. Este importante patrimônio biológico não pode ser encontrado em qualquer outro lugar do planeta (Kennedy; Smith, 1995).

Em contraste, a Mata Atlântica brasileira é caracterizada principalmente pelo ambiente altamente úmido, com formação vegetal costeira. É considerado o ecossistema mais raro no Brasil e abrange cerca de 98.800 km² de extensão, representando 1,3% do território nacional brasileiro (Morellato, 2000). Atualmente, representa cerca de 9% de sua área original (Durigan et al., 2000). Esta área é composta por três tipos de florestas: florestas ombrófilas densas, florestas estacionais semidecíduais e decíduais da região Sul e florestas ombrófilas mistas, também conhecidas como florestas de araucárias do sul do Brasil (Colombo; Joly, 2010). Embora sofra de déficit de conservação, este bioma é um dos 25 hotspots com a maior biodiversidade do mundo (Myers et al, 2000; Tabarelli et al., 2005).

Entre os fungos comumente isolados do solo, espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* são notáveis. A maioria delas é saprofítica com poucas exigências nutricionais. Além disso, o gênero *Penicillium* é extremamente importante na natureza, porque algumas de espécies são altamente ativas na reciclagem de matéria orgânica (Kirk et al, 2008; Pitt, 1991; Samson; Frisvad, 2004). Algumas espécies também são produtoras de antibióticos (Harris et al., 2009), ácidos orgânicos, e as enzimas com interesse industrial (Soccol et al., 2006).

Estudos sobre as comunidades de fungos saprofíticos como as do gênero *Penicillium*, presentes no solo de Caatinga e Mata Atlântica são escassos e precisam ser realizados para se conhecer não apenas os indivíduos e suas respectivas funções, mas também os efeitos dos distúrbios ou estresses ambientais sobre tais comunidades, sendo que para isso a ecologia numérica possui vários índices que auxiliam nessa compreensão. Diante destas premissas, este trabalho teve como objetivo conhecer a riqueza, abundância, equitabilidade, frequência e dominância de espécies de *Penicillium* presentes em solos de área de Caatinga e Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil; assim como verificar a influência da sazonalidade (períodos chuvoso e seco) sobre as populações destas espécies em cada bioma e a distribuição entre os subgêneros de *Penicillium*.

2. Material e métodos

2.1. Área de estudo, índices pluviométricos e coleta das amostras

Foram realizadas seis coletas de amostras de solo em áreas do bioma Caatinga e do bioma Mata Atlântica. Na área de Caatinga, as amostras foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau no município de Buíque, Estado de Pernambuco, Brasil (S 08° 04'25 "W e 37° 15 '52"). Neste caso, três coletas foram realizadas nos meses de seca (junho, julho e agosto de 2009), quando a precipitação foi de 0,0, 11,0 e 0,0 mm, respectivamente. Outras três coletas foram realizadas durante a estação chuvosa em fevereiro, março e abril de 2010, quando a precipitação foi de 109,0, 120,0 e de 236,0 mm, respectivamente. Por outro lado, as coletas das amostras da Mata Atlântica foram realizadas no Parque de Dois Irmãos. Este parque é mantido pelo Estado de Pernambuco e está localizado na região Noroeste do município do Recife (S 8 ° 15'30 "e W 35 ° 57'00"). As coletas referentes ao período chuvoso foram realizadas nos meses de junho, julho e agosto de 2009, quando a precipitação foi de 115,0; 117,7 e 115,0 mm, respectivamente. No período seco, as coletas foram realizadas em fevereiro, março e abril de 2010, quando a precipitação foi de 0,0; 11,3 e 0,0, mm respectivamente. As amostras coletadas em ambos os casos foram mantidas acondicionadas em sacos de polietileno esterilizados e mantidas à temperatura ambiente durante o transporte para o laboratório de pesquisa da Coleção de culturas Micoteca URM.

Em ambos os casos, as amostras de solo foram coletadas dentro de três transectos de 4x25 m, na profundidade de 0-20 cm, perfazendo um total de três amostras compostas por área, formadas por dez subamostras cada. De acordo com o número de transectos estabelecidos neste estudo foram obtidas 36 amostras.

2.2. Isolamento e purificação

O isolamento dos fungos foi realizado através do método de suspensão de acordo com Clark (1965). Todas as 36 amostras de solo compostas foram suspensas em água destilada esterilizada e diluições sucessivas foram realizadas. Foram obtidas suspensões na concentração de 1:10000 g · mL⁻¹. Cada uma das amostras de solo em suspensão aquosa composta foi inoculada em 5 diferentes placas de Petri contendo ágar Sabouraud suplementado com 50 mg L⁻¹. Cloranfenicol (SA-C), e 5 placas de Petri contendo ágar Dicloran com Rosa de Bengala suplementado com 50 mg L⁻¹.

Cloranfenicol (DRB-C). No geral, 180 placas de Petri para a Caatinga e 180 para a Mata Atlântica foram obtidas. As placas foram mantidas a 28 °C (± 2 °C) durante 72 h.

A fim de purificar isolados fúngicos, fragmentos de colônias de fungos foram transferidos para placas de Petri contendo meio SA-C. Após confirmação da pureza, as culturas de fungos foram mantidas em Ágar de Extrato de Malte (MEA), a 25 °C (± 2 °C).

2.3. Identificação das Espécies

A metodologia utilizada para identificação foi de acordo com Pitt (1991). Os esporos dos isolados de *Penicillium* foram suspensos em 1,0 mL de uma solução contendo 0,2 % de ágar e 0,05 % de Tween 80. Desta suspensão, 2,0 μ L foram utilizados para inoculação em três pontos das placas de Petri contendo 25 mL dos meios de cultura ágar Czapek levedura (CYA), ágar extrato de malte (MEA) e 25% ágar glicerol (G25N). A incubação ocorreu a 5°C, 25°C e 37°C para CYA e a 25°C para MEA e G25N. Para a identificação das espécies foram observadas características macroscópicas e microscópicas (Pitt, 1991; Samson; Frisvad, 2004).

As características microscópicas de cada espécie foram registradas através de fotografias em microscopia de luz (Carl Zeiss Axiostar Plus) e microscopia eletrônica de varredura (SNOM alpha300 S/WITec) no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE, Recife, Brasil). Por fim, um representante de cada espécie foi adicionado ao Catálogo de Micoteca-URM (WDCM604).

2.4. Análise dos dados ecológicos

A análise estatística da diversidade de espécies de *Penicillium* em ambos biomas foi realizada utilizando o índice de Shannon. A abundância foi calculada de acordo com Magurran (1988) e equitabilidade foi quantificada pelo índice de Pielou (Pinto-Coelho, 2002). Dominância relativa foi dada pela equação $DA = NA / NA + NB + NC \dots NN \times 100$, onde DA significa dominância das espécies, e $NA + NB + NC \dots NN$ significa o número de indivíduos de espécies A, B, C.... N. São consideradas dominantes as espécies cujos percentuais foram superiores a 50% (Magurran,1988). A frequência das espécies durante as estações seca e chuvosa foi calculada pela equação $FA = PA / P \times 100$, onde F significa frequência de espécies A; PA significa o número de amostras em que a espécie A está presente e P significa o número total de amostras. De acordo com

Magurran (1988), $F \geq 50\%$ = espécies constantes, $10\% < 49\% F \leq$ = espécies comuns e $F \leq 10\%$ = espécies raras.

A similaridade-dissimilaridade de espécies de *Penicillium* entre as amostras de solo dos biomas e entre os períodos chuvoso e seco foi testada com base na distância de Bray-Curtis que varia de 0 (similaridade) a 1 (dissimilaridade), utilizando-se a matriz de densidade das espécies (Pinto-Coelho, 2002). A análise foi realizada entre coletas e transectos. O método de ligação do dendrograma foi o do peso proporcional (WPGMA – Weight Pair Group Mathematical Average) (Rohlf; Fisher, 1968). Estes cálculos foram realizados utilizando o programa computacional NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) da Exeter Software – USA.

3. Resultados

No presente estudo, foram obtidos 802 isolados de *Penicillium*. Destes 357 provenientes do solo da Caatinga e 445 da Mata Atlântica. Trinta e uma espécies foram identificadas, morfologicamente, sendo 23 ocorrendo na Caatinga e 17 na Mata Atlântica. Algumas destas espécies foram comuns a ambos os biomas estudados. No entanto, 23 delas foram encontradas ocorrendo apenas no solo Caatinga e 17 apenas no solo da Mata Atlântica (Tabela 1). Além disso, três isolados de solo Caatinga só foram identificados em nível de gênero. Estes três isolados apresentaram diferenças quanto à ornamentação da parede dos conídios, quando comparadas com as espécies descritas na literatura descritas na literatura (Raper; Thom, 1949; Pitt, 1991; Samson; Frisvad, 2004). No presente trabalho, a identificação dos fungos foi realizada utilizando microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. A maioria das descrições de “*Penicillia*” na literatura não incluem microscopia eletrônica de varredura.

Em relação à similaridade de espécies de *Penicillium* entre amostras de solo dos biomas e períodos, a análise cofenética obtida a partir do índice de Bray e Curtis, gerou valor $>0,8$, indicando dados bem ajustados, que podem ser evidenciados nos dendrogramas gerados (Figuras 1 e 2). A partir desta análise, observamos a ocorrência de dois grandes distintos grupos de espécies de *Penicillium*, muito bem definidos, no solo dos biomas estudados. Não houve diferenças entre transectos, em nenhuma área analisada (Figura 1). Tanto na Caatinga quanto na Mata Atlântica, observa-se que durante as três primeiras coletas, realizadas no período seco, há ocorrência de um grupo

de espécies bem definido. Já nas três últimas coletas, realizadas no período chuvoso, outro grupo de espécies é formado, muito bem associado e diferente do grupo encontrado no período seco (Figura 2).

De acordo com a taxa de frequência de espécies de *Penicillium* na Caatinga durante o período chuvoso, 10 espécies foram classificadas como constantes com a frequência $\geq 50\%$, e seis espécies foram comuns, com a frequência $> 10\% \leq 49\%$. Durante o período seco, seguindo o mesmo critério de classificação, 21 foram espécies constantes e três foram comuns (Figura 3). Na Mata Atlântica, durante o período chuvoso, 11 foram constantes e quatro foram comuns. Neste mesmo bioma, durante o período seco, 17 espécies foram classificadas como constantes (Figura 4).

Comparando a taxa de frequência apenas das espécies de *Penicillium* que ocorreram nos dois períodos, chuvoso e seco, foi observado que na área da Caatinga, a maioria das espécies foram constantes, com exceção de *P. aurantiogriseum*, que foi constante no período chuvoso e comum no seco e, *P. citreonigrum*, *P. pinophilum* e *P. spinulosum*, que foram comuns no período chuvoso e constantes no seco (Figura 3). Este fato também foi observado na área da Mata Atlântica, onde apenas *P. canescens*, *P. brevicompactum* e *P. sclerotiorum* foram comuns no período chuvoso e constantes no período seco (Figura 4).

A análise de diversidade de espécies de acordo com o Índice de Shannon-Wiener, revelou resultados maiores que 3,0 bits.ind⁻¹, indicando que em ambos os biomas a diversidade foi alta (Figura 5). O índice de equitabilidade de Pielou foi superior a 0,5 em ambos os biomas, indicando que as espécies estão bem distribuídas nas áreas estudadas.

As espécies mais abundantes, de acordo com o índice de Magurran (1988), foram *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. glabrum*, *P. implicatum*, *P. janczewskii*, *P. lividum*, *P. oxalicum*, *P. pinophilum*, *P. simplicissimum* e *P. waksmanii* para a área da Caatinga e *P. fellutanum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum* e *P. janthinellum*, para a área da Mata Atlântica (Tabela 1).

De acordo com o percentual de dominância relativa, no solo de área do bioma Caatinga as espécies dominantes *Penicillium aurantiogriseum* (18%), *P. glabrum* (17%), *P. lividum* (13%), *P. waksmanii* (11%) e *P. implicatum* (9%), no período chuvoso. Em contraste, no período seco as espécies dominantes foram *Penicillium janczewskii* (10%), *P. citrinum* (8%), *P. lividum* (7%), *P. minioluteum* (7%), *P.*

oxalicum (7%), *simplicissimum* (7%), *P. waksmanii* (7%) e *P. citreonigrum* (5%). Por outro lado, as espécies dominantes durante o período chuvoso no solo de Mata Atlântica foram *Penicillium griseofulvum* (16%), *P. aurantiogriseum* (12%), *P. simplicissimum* (12%), *P. janthinellum*, *P. fellutanum* (9%) e *P. glabrum* (9%). Neste bioma, durante o período seco as espécies dominantes foram *Penicillium fellutanum* (14%), *P. griseofulvum* (13%), *P. glabrum* (12%), *P. janthinellum* (11%) e *P. restrictum* (9%).

No presente estudo, 17 espécies ocorreram exclusivamente no bioma Caatinga (*Penicillium adametzii*, *P. citrinum*, *P. implicatum*, *P. janczewskii*, *P. lanosum*, *P. lapidosum*, *P. melinii*, *P. minioluteum*, *P. oxalicum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. spinulosum*, *P. verruculosum*, *P. waksmanii*, *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2 e *Penicillium* sp. 3. No entanto, oito espécies de *Penicillium* foram exclusivas do bioma Mata Atlântica (*Penicillium brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. corylophilum*, *P. digitatum*, *P. fellutanum*, *P. janthinellum* e *P. sclerotiorum*). Além disso, oito espécies ocorreram nos dois biomas (*Penicillium aurantiogriseum*, *P. canescens*, *P. citreonigrum*, *P. decumbens*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. lividum*, e *P. simplicissimum* (Tabela 1).

De acordo com a dominância relativa durante a estação chuvosa, as espécies dominantes no solo da caatinga foram *Penicillium aurantiogriseum* (18%), *P. glabrum* (17%), *P. lividum* (13%), *P. waksmanii* (11%) e *P. implicatum* (9%). Em contraste, no período seco as espécies dominantes no solo Caatinga foram *Penicillium janczewskii* (10%), *P. implicatum* (9%), *P. citrinum* (8%), *P. lividum* (7%), *P. minioluteum* (7%), *P. oxalicum* (7%), *P. simplicissimum* (7%), *P. waksmanii* (7%) e *P. citreonigrum* (5%). Por outro lado, as espécies dominantes durante a estação chuvosa no solo da Mata Atlântica foram *P. griseofulvum* (16%), *P. aurantiogriseum* (12%), *P. simplicissimum* (12%), *P. janthinellum* (11%), *P. fellutanum* (9%) e *P. glabrum* (9%). Neste bioma, durante a estação seca, as espécies dominantes foram *P. fellutanum* (14%), *P. griseofulvum* (13%), *P. glabrum* (12%), *P. janthinellum* (11%) e *P. restrictum* (9 %) (Tabela 1).

Neste estudo 14 espécies de *Penicillium* foram exclusivamente encontradas no bioma Caatinga (*P. adametzii*, *P. citrinum*, *P. implicatum*, *P. janczewskii*, *P. lanosum*, *P. lapidosum*, *P. melinii*, *P. minioluteum*, *P. oxalicum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. spinulosum*, *P. verruculosum* e *P. waksmanii*). Enquanto que oito espécies de *Penicillium* foram encontradas exclusivamente no bioma Mata Atlântica (*P.*

brevicomactum, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. corylophilum*, *P. digitatum*, *P. fellutanum*, *P. janthinellum* e *P. sclerotiorum*). Oito espécies de *Penicillium* ocorreram em ambos os biomas (*P. aurantiogriseum*, *P. canescens*, *P. citreonigrum*, *P. decumbens*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. lividum*, e *P. simplicissimum*) (Tabela 1).

4. Discussão

Penicillium é um gênero cosmopolita, com pouca exigência nutricional pelas suas espécies. Toleram ambientes secos e quentes, bem como úmidos e frios (Pitt, 1991). Atualmente, esse gênero compreende 304 espécies descritas (Kirk et al., 2008). No entanto, os estudos sobre as comunidades de *Penicillium* presente no solo no Brasil são escassos devido à falta de especialistas taxonômicos neste gênero.

De acordo com o índice de Shannon para a diversidade (Shannon; Weaver, 1948), amostras do solo de Caatinga e Mata Atlântica apresentaram alta diversidade de espécies de *Penicillium*. O mais elevado índice de Shannon foi obtido para a amostra 2 obtida a partir de solo de Caatinga. Esta amostra foi coletada durante a estação seca e apresentou uma taxa de 4,10 bits.ind⁻¹.

O bioma Caatinga é caracterizado por apresentar longos períodos de estiagem, fato que pode justificar a alta diversidade e riqueza de espécies de *Penicillium* no solo de área deste bioma, sobretudo no período seco, pois, de acordo com a teoria da estabilidade climática de Sanders (1968), quanto mais estáveis são os fatores ambientais, mais espécies estão presentes graças a um maior acomodamento biológico.

Espécies de *Penicillium* por apresentarem alta capacidade de adaptação a diversos tipos de ambientes, inclusive a escassez e diminuição da disponibilidade de água, são mais diversas em solos do bioma Caatinga. *Penicillium adametzii* e *P. lapidosum*, isoladas apenas na Caatinga, são consideradas por Raper; Thom (1949) espécies raras, indicando que este bioma pode abrigar espécies raras e possivelmente novas, para este gênero.

Solo de Mata Atlântica apresenta elevada disponibilidade de nutrientes na camada superficial, entre 10 e 20 cm de profundidade (Tabarelli et al., 2005). De acordo com Begon et al., (1990) o aumento da disponibilidade de nutrientes em determinado ambiente, eleva não apenas a diversidade de espécies, mas sim o número de indivíduos por espécie, o que pode justificar o fato do solo da área de Mata Atlântica em estudo ser menos rico em espécies de *Penicillium*, embora apresente populações maiores destas.

Penicillium aurantiogriseum, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. lividum*, *P. restrictum* e *P. simplicissimum* foram as espécies mais abundantes em ambos os biomas estudados. Entretanto, *P. implicatum* e *P. janczewskii* ocorreram apenas em solo Caatinga, enquanto *P. fellutanum* e *P. janthinellum* ocorreram apenas no bioma Mata Atlântica. Estes resultados corroboram os dados apresentados por Domsch et al., (2007). Segundo esses autores, *P. implicatum* e *P. janczewskii* são considerados espécies cosmopolitas distribuídas em diferentes habitats do Alasca à África e América do Sul, justificando a presença destas espécies no solo Caatinga. Por outro lado, *P. janthinellum* é uma espécie comum em solo de floresta (Pitt, 1991). Em contraste, *P. fellutanum* é considerado como uma espécie xerofílica. No entanto, no presente estudo, estas espécies foram encontradas apenas no solo da Mata Atlântica. Do ponto de vista ecológico, *P. implicatum* é muito semelhante a *P. janthinellum*, sugerindo que eles ocupam nichos ecológicos similares. As populações das comunidades das duas áreas estudadas estão ecologicamente equilibradas, de acordo com o índice de equitabilidade de Pielou.

A distância de Bray-Curtis é uma excelente alternativa quando se quer medir similaridade-dissimilaridade entre áreas (Pinto-Coelho, 2002). Comparando as espécies de *Penicillium* nos biomas Caatinga e Mata Atlântica, utilizando-se esta distância, observa-se que há dissimilaridade entre as espécies, através da formação de dois grandes e distintos grupos de espécies de *Penicillium*, muito bem definidos, sendo um ocorrendo na Caatinga e outro na Mata Atlântica. Dentro de cada grande grupo, formaram-se dois subgrupos que se associam de acordo com a pluviometria. Tanto no agrupamento das espécies de *Penicillium* presentes no bioma Caatinga, quanto na Mata Atlântica, há dois subgrupos relacionados com a pluviometria, ou seja, as espécies características dos períodos chuvoso e seco. Este fator ambiental parece influenciar diretamente na sucessão ecológica das espécies de *Penicillium*, onde permanecerão viáveis e equilibradas em cada período apenas as espécies que se adaptem fisiologicamente às condições de cada ambiente. Fato que pode ser explicado pela hipótese do equilíbrio dinâmico de Menge; Sutherland (1987), a qual diz que as espécies que não apresentam competência fisiológica para sobreviverem às alterações ambientais, como por exemplo, às variações pluviométricas, desaparecem por um período, até que as condições ambientais voltem a ser propícias. No caso do gênero *Penicillium*, os esporos presentes no solo podem permanecer latentes até que as condições ambientais favoreçam o desenvolvimento.

Coutinho et al., (2010), isolaram fungos da rizosfera de *Cucumis melo* (meloeiros) cultivados em solo com compostos orgânicos, em região semiárida de Petrolina, Pernambuco, Brasil. Os autores obtiveram 25 gêneros e 75 espécies, sendo *Penicillium* o segundo gênero mais representativo, com 13 espécies (*P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. dierkxii*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum*, *P. pinophilum*, *P. restrictum*, *P. solitum*, *P. spinulosum*, *P. vinaceum* e *P. waksmanii*). Esses resultados foram similares aos obtidos no presente trabalho, pois *P. citrinum*, *P. pinophilum*, *P. spinulosum* e *P. waksmanii* foram isoladas apenas em solo de Caatinga, o que indica que se trata de espécies bem adaptadas à escassez de água e nutrientes, dominando as comunidades destes ecossistemas.

Recentemente no Brasil, Fraga et al., (2010) avaliaram a diversidade de Trichocomaceae em solos de dois ecossistemas florestais brasileiros durante dois anos. Os autores isolaram 32 espécies de *Penicillium*, sendo *P. decumbens* a mais abundante. Estes resultados são corroborados pelos obtidos no presente estudo, pois *P. decumbens* foi isolado apenas de solo de Mata Atlântica, sendo freqüente em todas as coletas em ambos os períodos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, a Prof^a Dr^a Sigrid Newman (UFPE) e Francisco Rangel (CETENE) pelo apoio técnico. Este trabalho é a primeira contribuição como um artigo científico a partir da histórica amizade entre a Micoteca da Universidade do Minho (MUM, Portugal) e URM (Brasil). Cledir Santos reconhece todo o apoio e entusiástica discussão com o professor Nelson Lima, diretor da MUM que está a fomentar essa relação internacional.

Tabela 1 (Cont.). Número de isolados de espécies de *Penicillium* por coleta, nos períodos chuvoso e seco, nos biomas Caatinga e Mata Atlântica e Dominância Relativa, de acordo com Magurran (1988).

Nº URM	Espécie	Caatinga										Mata Atlântica										TOTAL
		Período Chuvoso					Período Seco					Período Chuvoso					Período Seco					
		C1	C2	C3	T	DR %	C1	C2	C3	T	DR %	C1	C2	C3	T	DR %	C1	C2	C3	T	DR %	
*	<i>Penicillium</i> sp. 2	0	0	0	0	0	1	2	2	5	1.80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
*	<i>Penicillium</i> sp. 3	0	0	0	0	0	1	1	2	4	1.43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	TOTAL = 34	37	31	23	91	100	89	85	105	279	100	43	36	28	107	100	105	107	126	338	100	815

(C1) = coleta 1; (C2)= coleta 2; (C3)= coleta 3; (T) = total de isolados; (DR%) = percentual de dominância relativa.

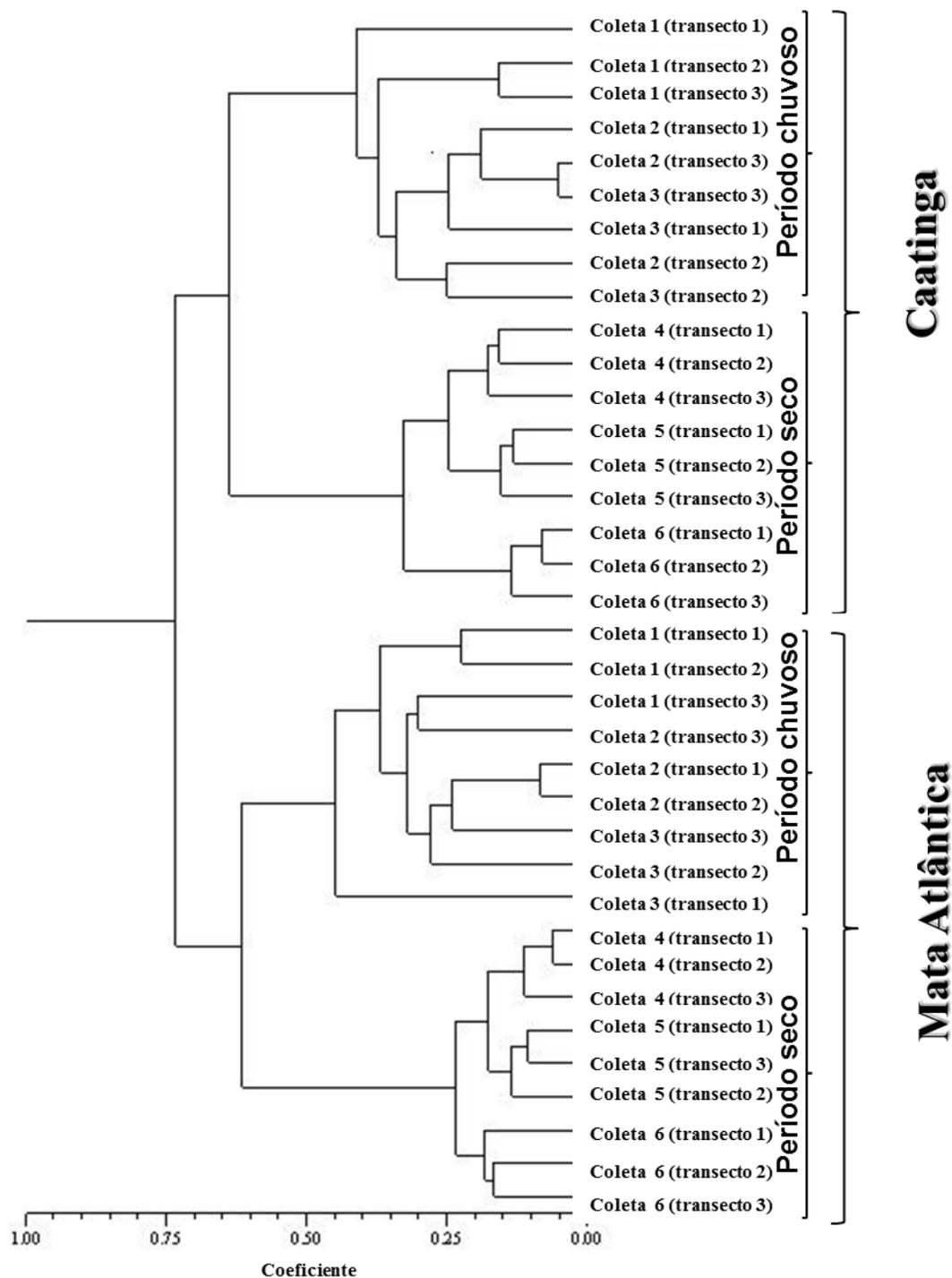


Figura 1. Dendrograma de relação entre as amostras de fungos de solo provenientes de da Caatinga e Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil, coletadas em período chuvoso nos meses de junho, julho e agosto de 2009 e em período seco, durante os meses de fevereiro, março e abril de 2010. Índice de Bray-Curtis; método de ligação WPGM (peso proporcional). Análise cofenética: $r > 0,8$.

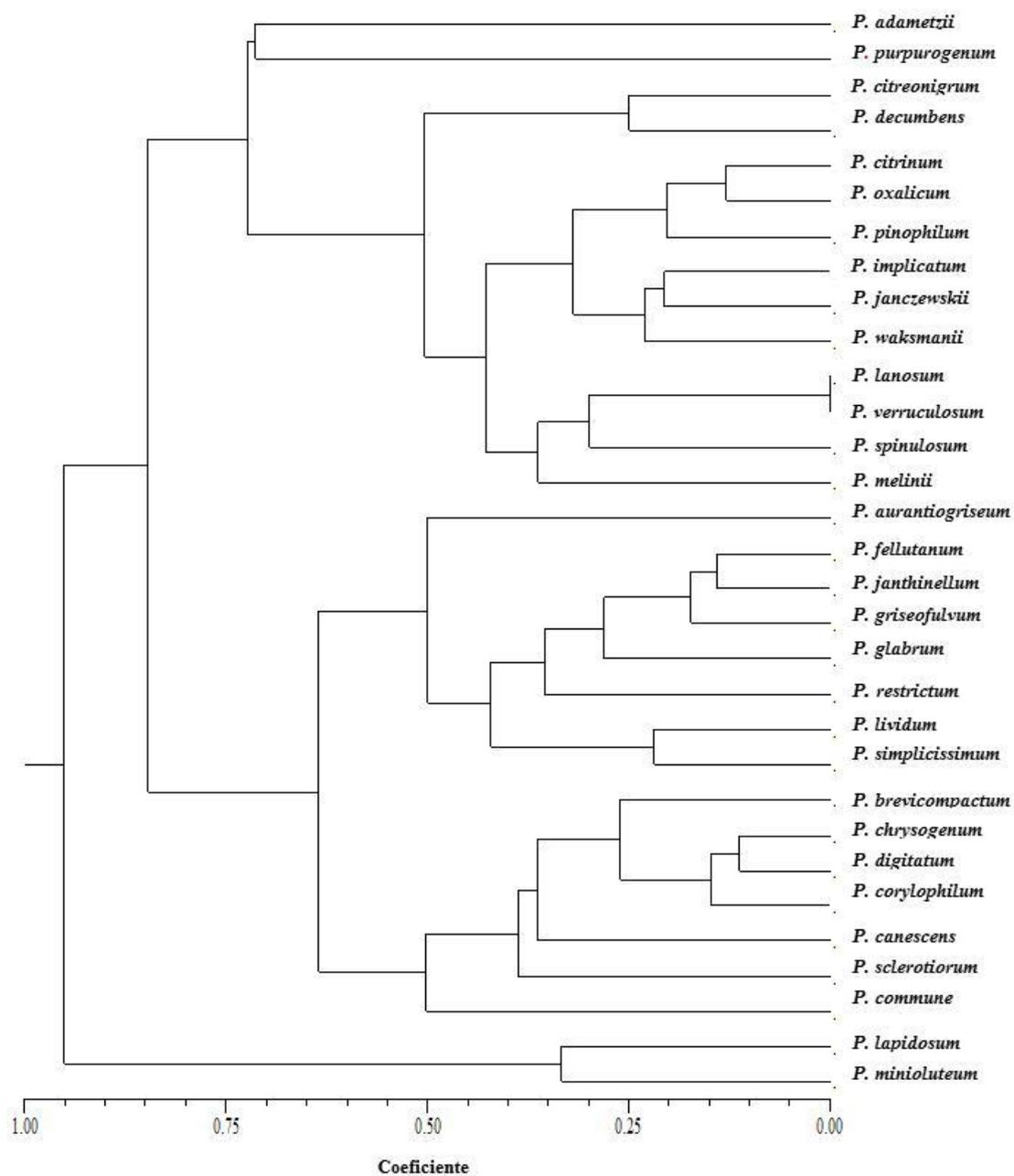


Figura 2. Dendrograma de proximidade entre as espécies de *Penicillium* provenientes de solo de Caatinga e Mata Atlântica, de Pernambuco, Brasil. As amostras foram coletadas em período chuvoso nos meses de junho, julho e agosto de 2009 e em período seco, durante os meses de fevereiro, março e abril de 2010. A análise estatística com base no índice de Bray-Curtis; método de ligação do peso proporcional (WPGM, Weighted Pair-Group Method, Arithmetic Average). Análise cofenética: $r > 0,8$.

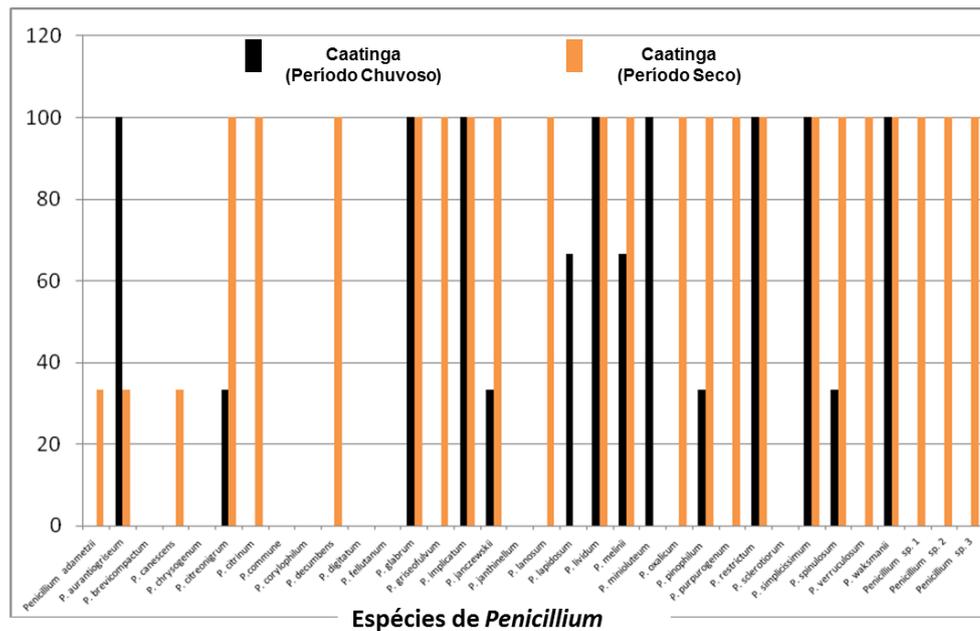


Figura 3. Frequência (%) das espécies de *Penicillium*, nos períodos chuvoso e seco, em área do bioma Caatinga, Pernambuco, Brasil.

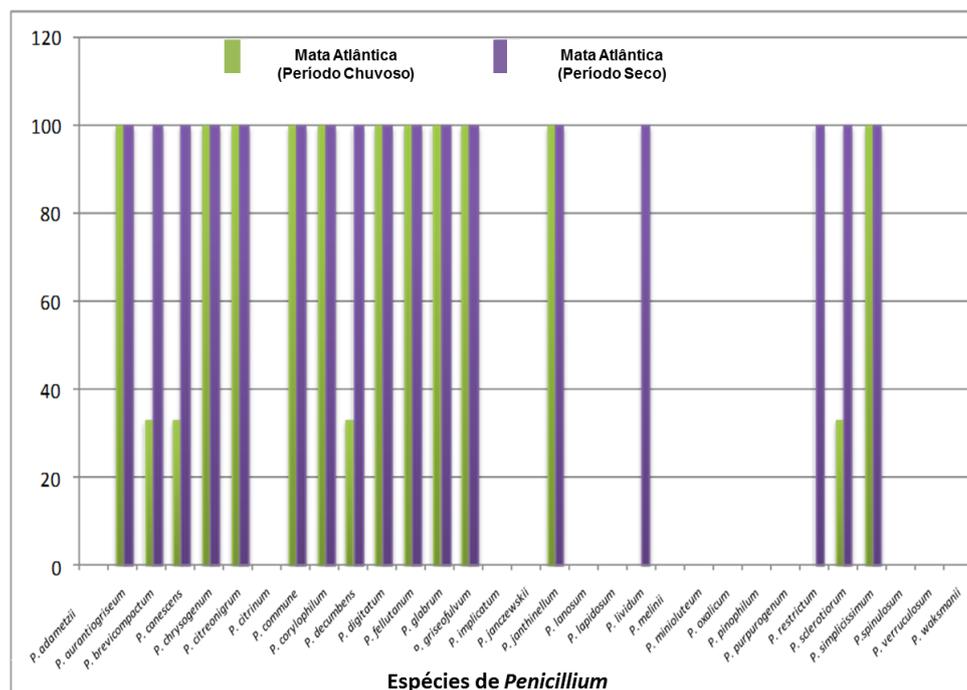


Figura 4. Frequência (%) das espécies de *Penicillium*, nos períodos chuvoso e seco, em área do bioma Mata Atlântica, Pernambuco, Brasil.

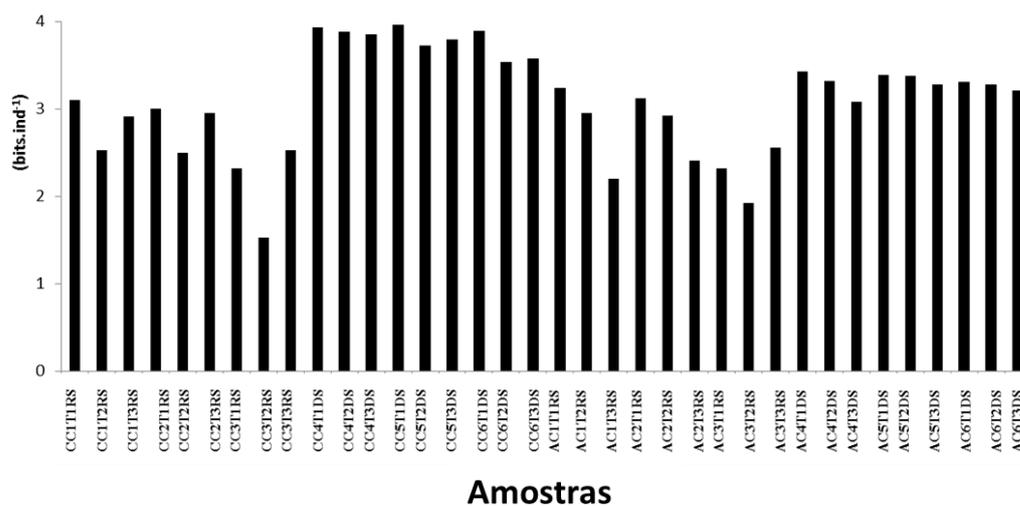


Figura 5. Diversidade (bits.ind^{-1}) das espécies de *Penicillium* na Caatinga (C) e na Mata Atlântica (A), nos períodos, chuvoso (PC) e seco (PS) em três coletas (C1, C2, C3). Análise estatística com base no índice de Shannon.

4. Capítulo 2.

Talaromyces pernambucanus, nova espécie isolada de solo do bioma Caatinga, Brasil²

Roberta Cruz¹, Gladstone Alves da Silva¹, Mariele Porto Carneiro¹, Maria José dos Santos Fernandes¹, Neiva Tinti de Oliveira¹, Keila Aparecida Moreira², Nelson Lima³, Cledir Santos^{3,4}, & Cristina Maria de Souza-Motta^{1*}

¹Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-420, Brasil

²Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, 5292-270, Brasil.

³IBB-Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Micoteca da Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal

Autor para correspondência: smotta@ufpe.br

²Trabalho a ser submetido à PlosOne

Resumo

Talaromyces pernambucanus é descrita como nova espécie. Este táxon foi isolado de solo de área do bioma Caatinga em Pernambuco, Brasil. A caatinga é um bioma é exclusivo do Brasil e caracterizado por apresentar condições ambientais semi-áridas, com clima quente e baixa pluviosidade, entre 200 e 800 mm anuais. Os solos, com raras exceções, apresentam fraca capacidade de retenção de água. Foram analisadas as características morfológicas, bem como a filogenia da espécie a partir de sequências da região ITS do rDNA e do gene da beta tubulina. Morfologicamente, *T. pernambucanus* apresenta conidióforos biverticilados, simétricos, fiálides acerosas e conídios espinulosos. Baseado no sistema de classificação morfológica proposto por Pitt, essa espécie seria acomodada no subgênero *Biverticillium* do gênero *Penicillium stricto sensu*. Entretanto, com a recente segregação entre espécies pertencentes ao subgênero *Biverticillium* do gênero *Penicillium stricto sensu* e ao gênero *Talaromyces*, não há dúvidas de que essa nova espécie pertença ao gênero *Talaromyces*. Após estudos filogenéticos *T. pernambucanus* mostrou-se relacionada com *P. rubrum* e *T. Erythromellis*. Porém, *P. rubrum* foi colocado na sinonímia de *Talaromyces purpurogenus*. No entanto mostrou-se distante filogeneticamente de *Talaromyces pernambucanus* neste trabalho. Com base na distância filogenética entre *T. purpurogenum*, *T. pernambucanus* e *T. erythromellis* fica claro que as três espécies são distintas.

1. Introdução

O gênero *Talaromyces* foi descrito por Benjamin em 1965 e durante cinco décadas este gênero acomodou exclusivamente espécies teleomorfas de *Penicillium* que apresentavam relação com espécies do subgênero *Biverticillium*. Tais espécies foram reconhecidas por apresentar ascomas do tipo gimnotécio de coloração amarela ou branca. A parede do gimnotécio é frouxa e abriga múltiplas camadas de hifas entrelaçadas e amadurece rapidamente quando cultivado em meio contendo ágar. Os conidióforos de *Talaromyces* são biverticilados simétricos e apresentam fiálides geralmente acerosas. Os ascósporos são formados em cadeias. (Pitt, 1991; Samson et al., 2011).

Recentemente em 2011, a classificação de *Talaromyces* foi revista por Samson e colaboradores, com base na avaliação da relação filogenética entre as espécies teleomorfas atribuídas a esse gênero e as espécies anamorfas atribuídas ao subgênero *Biverticillium* do gênero *Penicillium*. Os autores realizaram o sequenciamento da SSU e/ou LSU rDNA, bem como da região ITS do rDNA das espécies tipos, ou representantes disponíveis de *Talaromyces* e *Biverticillium*. As linhagens avaliadas estão mantidas na Coleção de Culturas CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) Baar- Delft, Holanda. De acordo com esses autores, espécies pertencentes ao subgênero *Biverticillium* e ao gênero *Talaromyces* formam um grupo monofilético distante das espécies pertencentes a outros subgêneros de *Penicillium*. Seguindo o conceito de nomenclatura única para uma espécie, os autores transferiram as espécies presentes no subgênero *Biverticillium* para o gênero *Talaromyces*, mesmo que para algumas, ainda não seja conhecida a fase teleomorfa.

Ecologicamente, espécies de *Talaromyces* são referidas como primitivas, sendo a maioria típicas de solos inabitados e capazes de crescer em elevadas temperaturas (Pitt, 1991).

Avaliando a diversidade de espécies de *Penicillium* em solo do bioma Caatinga no Brasil, isolou-se e identificou-se, morfológicamente, linhagens de *Penicillium*, algumas consideradas de rara ocorrência. Algumas destas linhagens foram inicialmente identificadas como pertencentes ao subgênero *Biverticillium*, porém, com características não descritas anteriormente para nenhuma das espécies deste subgênero, sendo consideradas como possível espécie nova. O objetivo deste trabalho é descrever uma nova espécie pertencente ao gênero *Talaromyces*.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo, índices pluviométricos e coleta das amostras

Seis coletas de amostras de solo foram realizadas em região do bioma Caatinga, situada no Parque Nacional do Catimbau no município de Buíque, Estado de Pernambuco, Brasil (S 08° 04'25 "W e 37° 15 '52"). Três foram realizadas nos meses de seca (junho, julho e agosto de 2009), quando a precipitação foi de 0,0, 11,0 e 0,0 mm, respectivamente. Outras três coletas foram realizadas durante a estação chuvosa em fevereiro, março e abril de 2010, quando a precipitação foi de 109,0, 120,0 e de 236,0 mm, respectivamente. Tais amostras foram coletadas dentro de três transectos de 4x25 m, na profundidade de 0-20 cm do solo, perfazendo um total de três amostras compostas por área, formadas por dez subamostras cada. Ao todo foram obtidas 18 amostras compostas, sendo 9 para o período seco e 9 para o chuvoso. As amostras obtidas foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, mantidas à temperatura ambiente e transportadas para o laboratório da Coleção de Culturas – Micoteca URM, do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

2.2. Isolamento e purificação

O isolamento dos fungos foi realizado através do método de suspensão de acordo com Clark (1965). As 18 amostras de solo compostas foram suspensas em água destilada estéril e diluições sucessivas foram realizadas. Foram obtidas suspensões na concentração de 1:10000 g · mL⁻¹. Cada uma das amostras de solo em suspensão aquosa composta foi inoculada em 5 diferentes placas de Petri contendo Ágar Sabouraud suplementado com 50 mg L⁻¹. Cloranfenicol (SA-C), e Ágar Dicloran com Rosa de Bengala suplementado com 50 mg L⁻¹. Cloranfenicol (DRB-C). No geral, 90 placas de Petri foram inoculadas. As placas foram mantidas a 28 °C (± 2 ° C) durante 72 h. A fim de purificar isolados fúngicos, fragmentos de colônias foram transferidos para placas de Petri contendo meio SA-C. Após confirmação da pureza, as culturas de fungos foram mantidas em Ágar de Extrato de Malte (MEA), a 25 ° C (± 2 ° C) (Cruz et al., 2013, no prelo).

2.3. Morfologia

Para identificação dos isolados foi utilizada a metodologia descrita por Pitt (1991). Os esporos de cada isolado de *Penicillium* foram suspensos em 1,0 mL de uma

solução contendo 0,2 % de ágar e 0,05 % de Tween 80. Desta suspensão, 2,0 µL foram utilizados para inoculação em três pontos nas placas de Petri contendo 25 mL dos meios de cultura Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), MEA e Ágar suplementado com 25% Glicerol (G25N), incubadas a 5, 25 e 37 °C para CYA e a 25 °C para MEA e G25N. Para a identificação das espécies foram observadas características macroscópicas e microscópicas (Pitt, 1991; Samson; Frisvad, 2004).

As características microscópicas de cada isolado foram registradas através de fotografias em microscopia de luz (Carl Zeiss Axiostar Plus) e microscopia eletrônica de varredura (SNOM alpha300 S/WITec), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE, Recife, Pernambuco, Brasil). Por fim, todos os isolados foram incorporados ao acervo da Micoteca URM (WDCM604).

2.4. Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

O DNA das amostras foi extraído conforme o protocolo estabelecido por Griffithset et al. (2000). O DNA alvo foi amplificado por PCR e sequenciado com os seguintes *primers*: ITS1, ITS4 (White et al., 1990; Hong et al., 2005), Bt2a e Bt2b (Glass e Donaldson, 1995). As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 25µL nas seguintes condições para ambos os *primers*: Tampão (Tris- HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50mM), MgCl₂ 0,75 mM, dNTP 0,25 mM, 0,25 µM do iniciador, *Taq* DNA polimerase 0,1 U (Operon Technologies CA) e 25 ng de DNA. Os ciclos de amplificação para a região ITS constituíram da seguinte programação: uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 2 min a 72 °C, seguidos por uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os ciclos de amplificação para β-tubulina consistiram de um protocolo *touchdown* com a seguinte programação: 5 ciclos de 1 min de desnaturação a 94 °C, 90 s de anelamento a 68 °C, e 2 min de extensão a 72 °C, com um decréscimo na temperatura de anelamento de 1°C/ciclo e, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min., anelamento a 64 °C por 90 s, e extensão a 72 °C por 2 min., e uma extensão final de 10 min a 72 °C.

2.5. Análise filogenética

A filogenia do gênero *Talaromyces* foi reconstruída a partir de seqüências da região ITS do rDNA e do gene da β-tubulina. As seqüências foram então alinhadas no programa ClustalX (Larkin et al., 2007) e editadas com BioEdit (Hall, 1999). As

espécies *Sagenomella striatispora* e *S. diversispora* foram utilizadas como grupo externo para a análise da região ITS, enquanto *Trichocoma paradoxa* foi selecionada como grupo externo na análise do gene da β -tubulina. Antes da análise filogenética, o modelo de substituição nucleotídica foi estimado utilizando Topali 2,5 (Milne et al., 2004). A análise Bayesiana (1×10^6 gerações com um valor de 'burnin' de 2500) foi realizada em MrBayes 3.1.2 (Ronquist; Huelsenbeck, 2003), a partir do programa Topali 2.5, utilizando os modelos GTR + G e K80 + I + G para gerar as árvores da região ITS e do gene da β -tubulina, respectivamente. As análises de neighbor-joining e máxima parcimônia foram realizadas utilizando PAUP * 4b10 (Swofford, 2003) com 1000 *bootstraps*.

3. Resultados

Várias espécies de *Penicillium* foram isoladas do solo de áreas do bioma Caatinga, Brasil. Detalhes sobre o isolamento de todas as espécies estão sendo publicados em outro artigo (Cruz et al. 2013, no prelo). Dentre as espécies encontradas, *Talaromyces pernambucanus* sp. nov. foi isolada no período seco, quando a precipitação variou de 0,0 a 11,0 mm. As árvores filogenéticas geradas no presente estudo mostram com clareza a natureza monofilética do gênero *Talaromyces*. *Talaromyces pernambucanus* agrupou próximo a *Penicillium rubrum* Stoll e *Talaromyces erythromellis* Hocking com valores de 100% de suporte em ambas as árvores (Figuras 1 e 2). Embora na árvore da região ITS *T. pernambucanus* tenha ficado mais próximo a *P. rubrum*, em análise de blastn dessa região, a nova espécie mostrou maior percentual de identidade máxima (96%) com *T. erythromellis*. A nova espécie também apresentou maior identidade máxima (94%) com *T. erythromellis* no gene da β -tubulina. Apesar de próximas na análise filogenética e na comparação das sequências, essas espécies são distintas morfologicamente, conforme apresentado na Tabela 1.

Taxonomia

Talaromyces pernambucanus R. Cruz, G. Silva, N. Lima, C. Souza-Motta, sp. nov.

Etimologia: Latim *pernambucanus* refere-se ao estado de Pernambuco (Brasil), local do isolamento da espécie.

Tipo. Holótipo: aqui designado, crescido sobre MEA durante 7 dias a 25 °C; isolado a partir de amostra de solo de área do bioma Caatinga, situada no Vale do Catimbau, município de Buíque, Pernambuco, Brasil (S 08° 04'25 "W e 37° 15 '52"), coletada em período seco, durante os meses de junho, julho e agosto de 2009. Depositado na Micoteca URM (URM6894) e uma cultura ex-tipo na Micoteca da Universidade do Minho (MUM12.14).

Descrição. Colônias sobre CYA medindo 17-25 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 2 A e D), plana, velutínea a levemente flocosa; micélio cinza esverdeado; conidiogênese moderada a intensa; conídios azuis em massa; exudato de coloração vinácea; pigmento solúvel ausente; reverso marrom escuro à vináceo; esclerócio ausente. Cresce a 37 °C, não cresce a 5°C. Colônias sobre MEA medindo 32-35 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 3 B e E), plana, funiculosa, micélio amarelo, com área central elevada e de cor laranja, bordos brancos; conidiogênese moderada a intensa, conídios azuis em massa; exudato e pigmento solúvel ausentes; reverso de cor laranja; esclerócios ausentes. Não cresce sobre G25N (Figura 3 C e F).

Conidióforos similares em ambos os meios, biverticilados simétricos (Figura 3 G e H); estipes medindo 50-130 µm de comprimento, parede lisa; métulas geralmente em número de cinco, medindo 10.0-15.0 µm de comprimento; fiálides acerosas medindo 10.0-21.0 µm de comprimento; conídios espinulosos, subglobosos a globosos, medindo 2.3-2.7 µm de diâmetro (Figura 3 I, J e K).

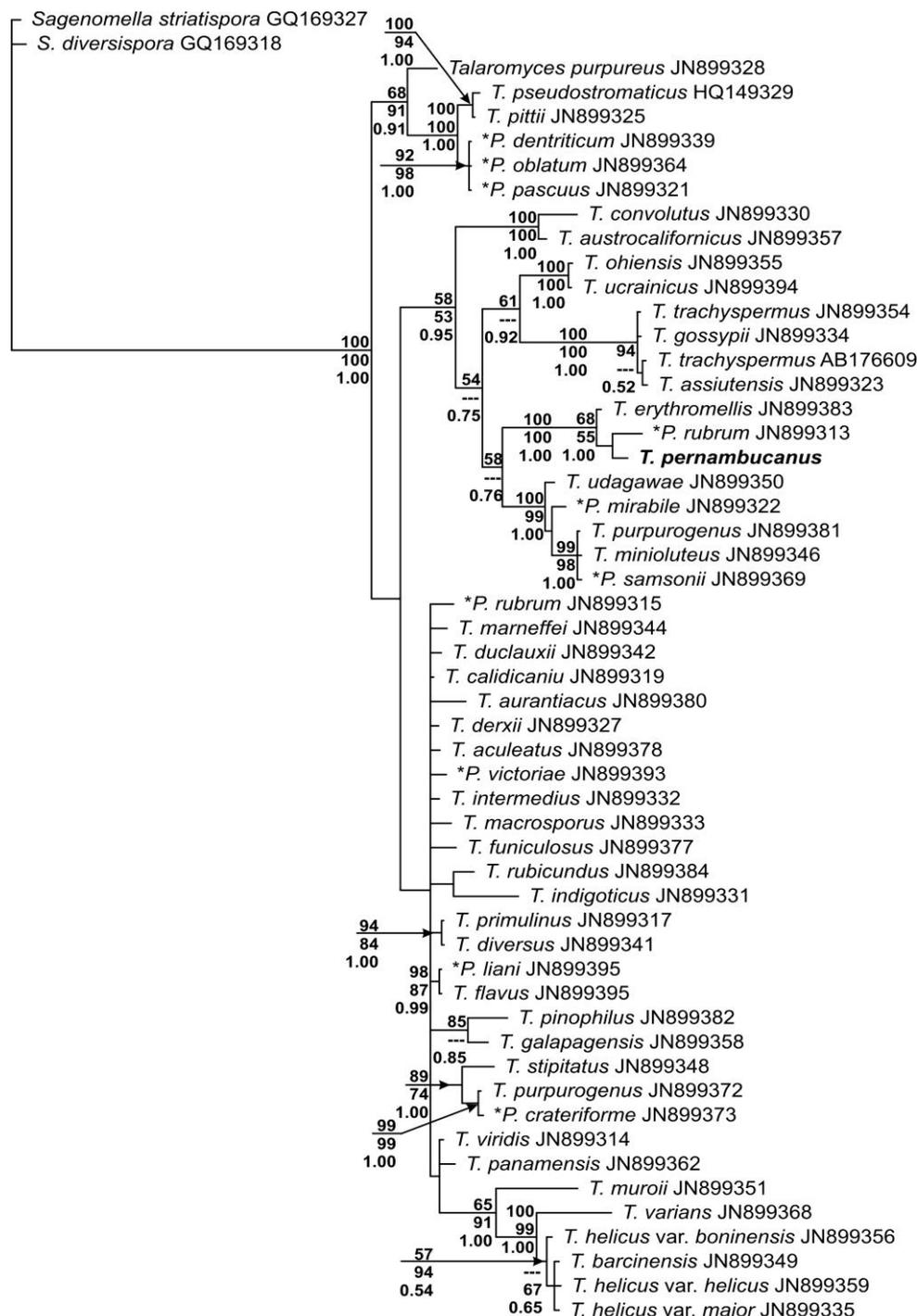


Figura 1. Árvore filogenética de espécies do gênero *Talaromyces* baseada em análises das sequências da região ITS do rDNA. Os valores de *bootstrap* são de neighbor-joining (acima dos ramos), máxima parcimônia e análise Bayesiana (abaixo dos ramos respectivamente). As sequências são seguidas pelo número de acesso do GenBank. O isolado utilizado neste estudo está em negrito. São mostrados apenas os valores de *bootstrap* acima de 50% (Índice de Consistência = 0.48; Índice de retenção = 0.73).

* Taxa que precisam de um estudo taxonômico adicional de acordo com Samson et al., (2011).

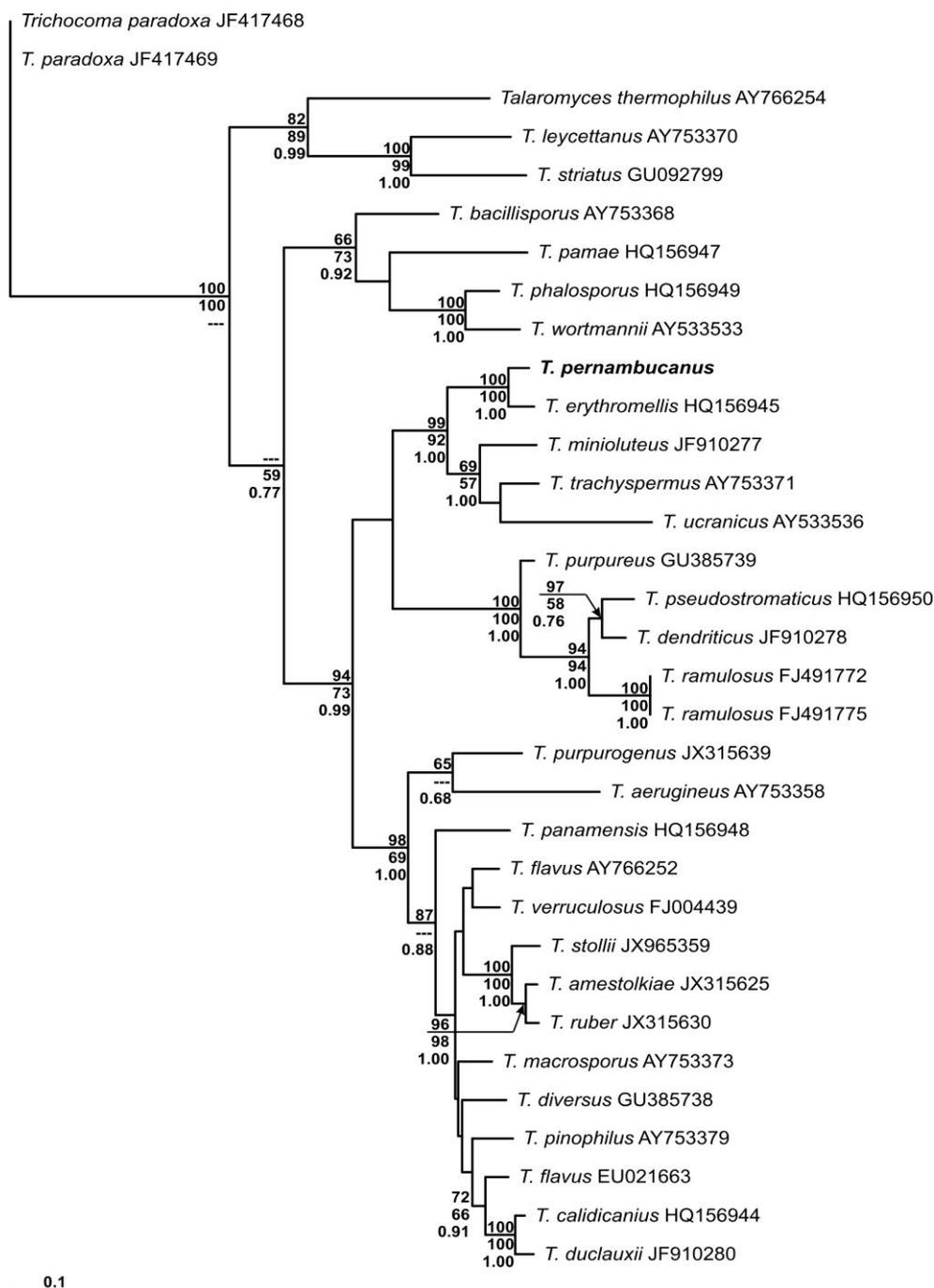


Figura 2. Árvore filogenética de espécies do gênero *Talaromyces* baseada em análises das sequências do gene da β -tubulina. Os valores de *bootstrap* são de neighbor-joining (acima dos ramos), máxima parcimônia e análise Bayesiana (abaixo dos ramos respectivamente). As sequências são seguidas pelo número de acesso do GenBank. O isolado utilizado neste estudo está em negrito. São mostrados apenas os valores de *bootstrap* acima de 50% (Índice de Consistência = 0.41; Índice de retenção = 0.56).

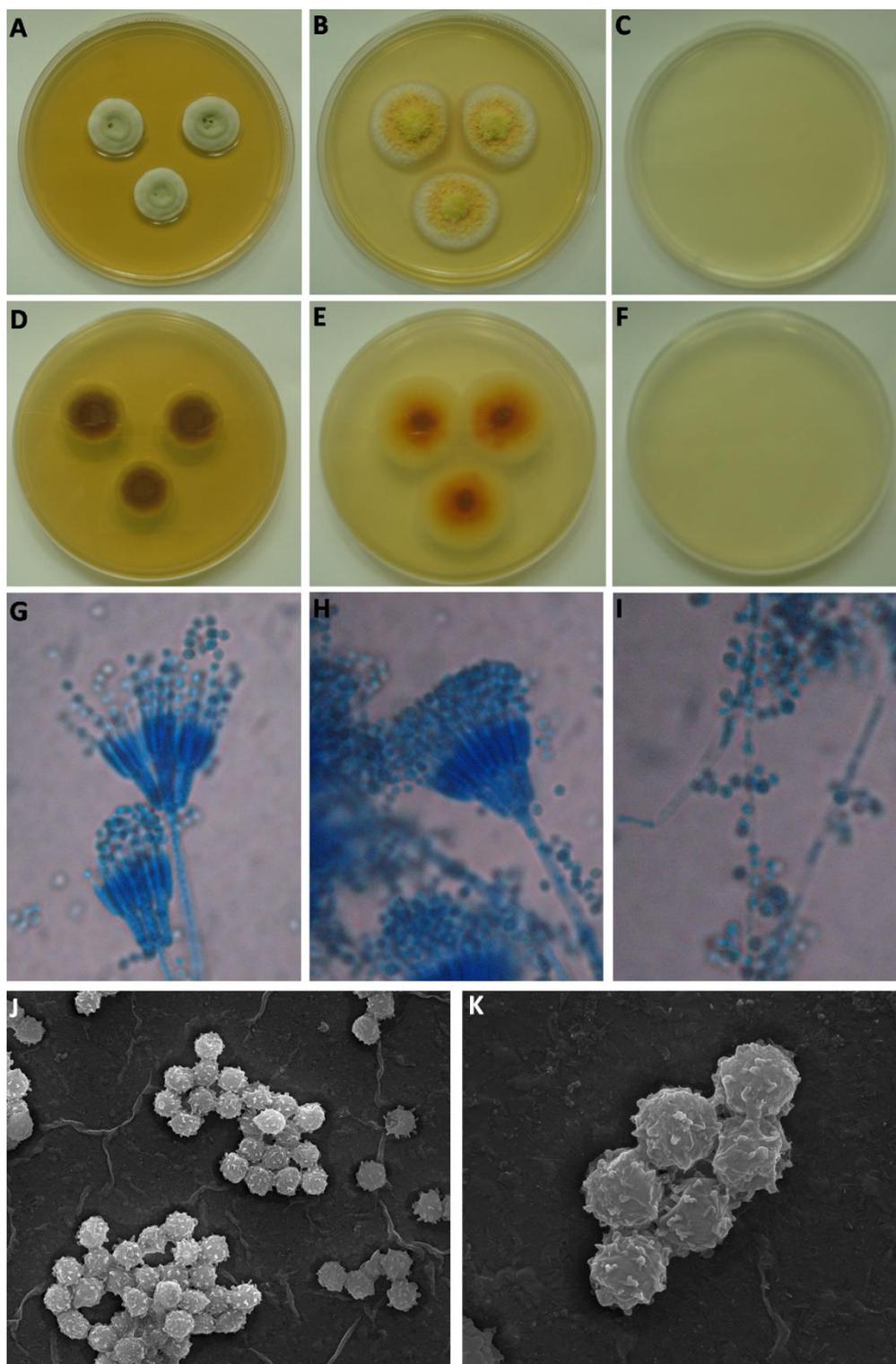


Figura 3. *Talaromyces pernambucanus*. Culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C. A. Verso sobre ágar extrato de levedura Czapek (CYA); B. Verso sobre ágar extrato de malte (MEA); C. Verso sobre ágar suplementado com 25% de glicerol (G25N); D. Reverso sobre CYA; E. Reverso sobre MEA; F. Reverso sobre G25N; G e H.

Conidióforos biverticilados simétricos; I. Conídios; J e K. Conídios em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), 10.000 X e 30.000 X, respectivamente.

3. Discussão

A partir da segunda década do século XX, Whemer (1914) reconheceu as espécies hoje pertencentes ao subgênero *Biverticillium* como um subgrupo informal ao qual denominou de "Verticillatae". Tal denominação referia-se a notória simetria dos conidióforos apresentadas por algumas espécies de *Penicillium*.

Posteriormente, a partir da terceira década do século XX Thom (1930), Raper; Thom (1949), Pitt (1980), e Ramírez (1982), em suas monografias reconheceram e classificaram o subgrupo informal designado por Whemer, como subgênero *Biverticillium*. Pitt (1980) reconhecia quatro subgêneros para *Penicillium*: *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* e *Penicillium*.

Baseado em avaliações morfológicas, ecológicas, bem como na relação entre anamorfo-teleomorfo, Malloch (1985) provavelmente foi o primeiro taxonomista a sugerir a segregação entre o gênero *Penicillium* e o subgênero *Biverticillium*, formando assim dois gêneros distintos (Samson et al., 2011).

A partir de década de 80 do século passado, surgiram estudos filogenéticos acerca de *Penicillium sensu stricto* e *Talaromyces*. Alguns destes estudos basearam-se na análise de sequências da região ITS do rDNA (Peterson 2000), outros avaliaram o gene da calmodulina (Ogawa et al., 1997; Ogawa; Sugiyama, 2000; Wang; Zhuang, 2007). Tais estudos comprovavam que *Penicillium sensu stricto* e *Talaromyces* formam clados distintos dentro de Trichocomaceae.

A segregação entre *Biverticillium* e *Penicillium sensu stricto* se tornou ainda mais clara quando Houbraken; Samson (2011) realizaram estudo filogenético através de análises multigênicas de representantes da família Trichocomaceae. Porém, a nova classificação para a maioria das espécies pertencentes ao subgênero *Biverticillium*, agora inclusas no gênero *Talaromyces* é atribuída à Samson et al., (2011). Estes autores reconhecem 44 espécies acomodadas no gênero *Talaromyces*. Nossos dados corroboram os resultados obtidos por Samson et al., (2011), demonstrando que *Talaromyces* é um gênero monofilético, incluindo várias espécies que pertenciam ao gênero *Penicillium* (Figuras 1 e 2).

Segundo Pitt (1991), espécies pertencentes ao gênero *Talaromyces* suportam elevadas temperaturas ambientais e geralmente são isoladas em solos de áreas não antropizadas. O presente estudo corrobora a afirmação de Pitt, pois *Talaromyces*

pernambucanus foi isolado de solo do bioma Caatinga reconhecido por apresentar condições ambientais semi-áridas, com clima quente e baixa pluviosidade, entre 200 e 800 mm anuais. Os solos, com raras exceções, são mineralmente ricos, pedregosos e com fraca capacidade de retenção da água (Alves et al., 2009).

Comentários

Talaromyces pernambucanus está filogeneticamente relacionado com *Penicillium rubrum* e *Talaromyces erythromellis* (Figura 3). Em 1979, Pitt colocou *P. rubrum* em sinonímia com *P. purpurogenum* (Pitt, 1991). Em 2011, Samson e colaboradores colocaram *P. purpurogenum* em basionímia com *T. purpurogenus*. Portanto, *P. rubrum* seria atualmente *T. purpurogenus*. Entretanto, claramente é possível observar na árvore da região ITS (Figura 1) que *P. rubrum* ocupa posição filogenética diferente de *T. purpurogenus*. Com base na descrição elaborada por Pitt (1991), *T. purpurogenus* e *Talaromyces pernambucanus* apresentam relevantes diferenças morfológicas (Tabela 1), como o diâmetro e textura das colônias, coloração do micélio e dos conídios, tamanho do estipe, ornamentação dos conídios, além de estarem separados filogeneticamente, pois *T. purpurogenus* está mais próximo de *T. minioluteus* e *P. samsonii* (Figura 1). Em relação ao percentual máximo de identidade para a região ITS e o gene da β -tubulina, *T. pernambucanus* está mais próximo de *T. erythromellis* com 96% e 94% de identidade máxima, respectivamente, entretanto, várias espécies de *Talaromyces* apresentam, para a região ITS, valores de identidade máxima com outros táxons mais altos que o mostrado nesse estudo, como *T. minioluteus* e *P. samsonii* com 99%; *T. minioluteus* e *T. mirabile* com 97%. Relevantes diferenças morfológicas entre *Talaromyces pernambucanus* e *T. erythromellis* também foram observadas (Tabela 1). Dessa forma os resultados do presente estudo comprovam que *Talaromyces pernambucanus* é uma espécie distinta no gênero *Talaromyces*, sendo aqui descrita como nova espécie, com base na taxonomia clássica e em estudos filogenéticos.

Tabela 1. Comparação morfológica entre *Talaromyces pernambucanus* URM6894 e os taxa relacionados.

	<i>T. pernambucanus</i>	<i>T. purpurogenus</i>	<i>T. erythromellis</i>
CYA			
Diâmetro da colônia (mm)	17-25	15-30	19-22
Textura	Velutínea, à levemente flocosa	Velutínea	Flocosa com o centro enrugado
Coloração do micélio	Cinza esverdeado	Amarelo brilhante ou vermelho profundo	Pálido ao vermelho rosado
Coloração do reverso	Vináceo	Vermelho profundo	Marrom violeta ou vermelho acinzentado ao violeta castanho ou vermelho acastanhado
Exudato	Vináceo	Laranja à vermelho	Laranja avermelhado ao laranja alaranjado
Pigmento Solúvel	Ausente	Vermelho vívido	Rosado à branco alaranjado
MEA- diâmetro da colônia (mm)	32-35	22-35	21-24
G25N- diâmetro da colônia (mm)	Não apresenta crescimento	0-6	Não apresenta crescimento
Estipe (comprimento μm)	50-130	700-300	136-384
Parede do conídio	Espinulosa	Lisa à finamente rugosa	Lisa à finamente rugosa
Fiálides	10-21 μm / acerosas	10-14 μm / acerosas	8,8-13,6 μm /acerosas

5. Capítulo 3

Epitificação de *Penicillium bilaiae* Chalabuda³

Roberta Cruz¹, Gladstone Alves da Silva¹, Nelson Lima³, Keila Moreira², Cledir Santos³, Cristina Souza-Motta^{1*}

¹Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-420, Brasil

²IBB-Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Micoteca da Universidade do Minho, Campos de Gualtar, Braga, Portugal

³Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, 52920-270, Brasil

*Autor correspondente: smotta@ufpe.br

³Trabalho a ser submetido à Research in Microbiology

Resumo

Neste trabalho a epitipificação da espécie *Penicillium bilaiiae* é proposta para que seja incluída a produção de esclerócio por alguns isolados da espécie em sua descrição. Este é o primeiro registro da ocorrência de *Penicillium bilaiiae* no solo de áreas do bioma da Caatinga, que é um bioma exclusivamente brasileiro. Três isolados desta espécie foram encontrados no solo da região do Vale do Catimbau, localizado no Estado de Pernambuco (Brasil), durante a estação seca, com pluviosidade média de 4 mm e temperatura média do solo de 40 °C. Os isolados foram identificados como *P. bilaiiae* por análises taxonômicas e através das sequências da região do ITS do rDNA e de parte do gene da β -tubulina. De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que os isolados de *Penicillium bilaiiae* produziram esclerócios para garantir sua sobrevivência no ambiente extremo, a Caatinga.

Palavras-chave: *Penicillium bilaiiae*, redescrição, semi-árido brasileiro, esclerócios.

1. Introdução

A espécie *Penicillium bilaiae* foi descrita em 1950 por Chalabuda como espécie rara, típica do solo e com distribuição mundial (Pitt, 1991). Seu holótipo está mantido na ATTC sob o número 22348 e seus ex-epítipos estão mantidos em diversas coleções microbianas. De acordo com a classificação de Pitt (1991), esta espécie está acomodada no subgênero *Aspergilloides*, por apresentar conidióforos estritamente monoverticilados e vesiculados. Pitt (1991) corrobora a descrição de Chalabuda (1950), que não relata a produção de esclerócios por linhagens desta espécie. Os esclerócios são considerados caracteres de importância taxonômica para algumas das espécies de *Penicillium* que os produzem (Pitt 1991).

A taxonomia desse gênero é complexa, pois suas espécies apresentam elevada variabilidade genética e fenotípica. Para a identificação de espécies de *Penicillium*, há a necessidade de análises moleculares aliadas à taxonomia clássica, visando resultados precisos (Samson; Frisvard, 2004). As espécies desse gênero são excelentes decompositoras; participam ativamente em ciclos biogeoquímicos e possuem uma elevada capacidade de adaptação as condições extremas (Pitt, 1991). Para isso, algumas linhagens de diferentes espécies de *Penicillium* produzem estruturas de resistência como esclerócios (Pitt, 1991).

No presente estudo, várias linhagens pertencentes a espécies diferentes do gênero *Penicillium* foram isoladas do solo de áreas do bioma Caatinga no estado de Pernambuco (Brasil), e identificadas pela morfologia clássica, como já publicado anteriormente por Cruz et al. (2013 no prelo). Três destas linhagens foram identificadas morfológicamente como *Penicillium bilaiae* produtoras de esclerócios. No presente trabalho são apresentadas as análises morfológicas detalhadas, bem como as análises das sequências da região do ITS do rDNA e do gene da β -tubulina para os 3 isolados.

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Código de Viena) (McNeill et al., 2006), um epítipo é um espécime ou ilustração selecionada para servir como tipo de interpretação quando o holótipo, o lectótipo ou o neótipo previamente designado é comprovadamente ambíguo. No presente caso, o holótipo de *P. bilaiae* não é ambíguo, porém não menciona a capacidade de produzir esclerócios por isolados dessa espécie. Torna-se por isso necessária a epitipificação desta espécie a partir das linhagens aqui apresentadas, que são produtoras de esclerócios. Estas linhagens estão mantidas em duas Coleções de Culturas, nomeadamente: na Micoteca

URM da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil), bem como na Micoteca da Universidade do Minho (Braga, Portugal).

2. Material e Métodos

As amostras de solo foram obtidas de áreas abertas da Caatinga no Parque Nacional Vale do Catimbau (S 08° 04'25 ", W37° 15'52"). Seis coletas foram realizadas, três no período seco (junho, julho e agosto de 2009), com precipitações de 0,0, 11,0 e 0,0 mm, respectivamente, e três no período chuvoso (fevereiro, março e abril de 2010), com precipitações de 109,0, 120,0 e 236,0 milímetros, respectivamente. As amostras foram coletadas dentro de três transectos de 4x25 m, com uma profundidade entre 0 e 20 cm da superfície do solo, perfazendo um total de três amostras compostas por área, formadas por dez subamostras cada. A temperatura do solo foi medida com um termômetro digital (UT325 Contemp-São Paulo, Brasil). As coletas foram realizadas com auxílio de uma pá de jardinagem, e então acondicionadas em sacos plásticos esterilizados (Cruz et al., 2013, no prelo). Em seguida, as amostras foram encaminhadas para manipulação no laboratório de pesquisas da Coleção de Culturas Micoteca URM, sediada no Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

O isolamento dos fungos foi realizado de acordo com o método descrito por Clarck (1965) e modificado como segue: 25 g de cada amostra do solo foi suspenso em 225 mL de água destilada esterilizada e o sistema foi agitado manualmente durante 10 minutos. Desta suspensão, 10 mL foram transferidos para um recipiente contendo 90 mL de água destilada esterilizada, para a obtenção das diluições na ordem de 1:10000. Um mililitro desta diluição foi espalhado na superfície dos meios 1) ágar Sabouraud suplementado com Cloranfenicol (ASC, 50 mg/L) e 2) ágar Dicloran Rosa de Bengala suplementado com Cloranfenicol (DRBC, 50 mg/L), contidos em placas de Petri. As placas foram mantidas à temperatura ambiente ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por até 72 horas. Para a purificação dos isolados de fungos filamentosos, fragmentos das colônias foram transferidos para placas de Petri contendo o referido meio, como descrito acima, e o crescimento foi acompanhado por 72 horas. Após confirmada a pureza, as culturas foram transferidas para tubos de ensaio (18 x 180 mm) contendo Ágar Extrato de Malte (MEA), para posterior identificação.

2.2 Morfologia

Para identificação dos isolados foi utilizada a metodologia descrita por Cruz et al., (2013 no prelo). Resumidamente, os esporos de cada isolado de *Penicillium* foram suspensos em 1,0 mL de uma solução contendo 0,2% de ágar e 0,05% de Tween 80. Desta suspensão, 2,0 µL foram utilizados para inoculação em três pontos nas placas de Petri contendo 25 mL dos meios de cultura ágar extrato de levedura Czapek (CYA), MEA e ágar suplementado com 25% de glicerol (G25N). A incubação ocorreu a 5, 25 e 37 °C para CYA e a 25 °C para MEA e para G25N. Para a identificação das espécies foram observadas características macroscópicas e microscópicas (Pitt, 1991; Samson; Frisvad, 2004; Cruz et al., 2013, no prelo). As análises microscópicas foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE, Recife, Brasil), através de fotografias em microscopia de luz (Carl Zeiss Axiostar Plus) e microscopia eletrônica de varredura (SNOM alpha300 S/WITec). Todos os isolados foram depositados na Micoteca-URM (WDCM604) e na Micoteca da Universidade do Minho (WDCM816).

2.3 Extração de DNA, amplificação de PCR e sequenciamento de DNA

O DNA das amostras foi extraído conforme o protocolo estabelecido por Griffithset et al. (2000). O DNA alvo foi amplificado por PCR e sequenciado com os seguintes *primers*: BEN A (Bt2a e Bt2b) (Glass; Donaldson, 1995) e ITS (ITS1 e ITS4) (White et al., 1990; Hong et al., 2005). Para ambos os *primers*, as reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 25µL nas seguintes condições: Tampão (solução contendo: Tris-HCl a 20 mM e pH 8,4; KCl a 50 mM), solução contendo: MgCl₂ a 0,75 mM, dNTP a 0,25 mM, iniciador a 0,25 µM, *Taq* DNA polimerase a 0,1 U (Operon Technologies CA) e 25 ng de DNA.

Os ciclos de amplificação para a β -tubulina consistiram de um protocolo *touch down* com a seguinte programação: 5 ciclos de 1 min de desnaturação a 94 °C, 90 s de anelamento a 68 °C, e 2 min de extensão a 72 °C; decréscimo na temperatura de anelamento de 1 °C/ciclo, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min; anelamento a 64 °C por 90 s, extensão a 72 °C por 2 min e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os ciclos de amplificação para a região ITS constituíram da seguinte programação: uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 2 min a 72 °C, seguidos por uma extensão final de 10 minutos a

72 °C.

2.4 Análise filogenética

A análise filogenética do gênero *Penicillium* seção *Sclerotiora* foi reconstruída a partir de sequências da região do ITS e de parte do gene da β -tubulina. As sequências foram então alinhadas em ClustalX (Larkin et al. 2007) e editadas no programa BioEdit (Hall 1999). *P. chermesinum* e *P. fellutanum* foram usadas como grupos externos nos agrupamentos filogenéticos. As análises de *neighbor-joining* (NJ) e máxima parcimônia (MP) foram realizadas no programa PAUP*4b10 (Swofford 2003) com 1.000 *bootstraps*.

3. Resultados

Neste estudo, 3 isolados de fungos filamentosos foram identificados como *Penicillium bilaiae* através da taxonomia clássica e por análises moleculares a partir de sequências da região ITS e de parte do gene da β -tubulina. Estes 3 isolados foram obtidos em uma coleta no mês de junho de 2009, durante a estação seca, que gerou o isolamento e identificação de 370 culturas de *Penicillium*, distribuídas entre 26 espécies deste gênero, como descrito previamente (Cruz et al., 2013, no prelo). Durante a coleta, a temperatura do solo foi de 40 °C. Quando incubados a 5 °C sobre CYA, nenhum dos 3 isolados se desenvolveu. Quando crescidos sobre CYA a 37 °C e sobre G25N a 25 °C, estes 3 isolados apresentaram morfologia macroscópica e microscópica características de *P. bilaiae* (Figuras 1 e 2). Por outro lado, quando mantidos sobre MEA a 25 °C, após o 60º dia de incubação estes 3 isolados de *P. bilaiae* apresentaram produção de esclerócios de coloração pálida a marrom, globosos ou irregulares, medindo de 200 a 300 μ m de comprimento (Figura 2).

Pela reconstrução filogenética, obtida a partir de sequências da região do ITS do rDNA e do gene da β -tubulina, foi observado que os 3 isolados agruparam-se com sequências de *P. bilaiae* presentes no GenBank (Tabelas 1 e 2). As sequências obtidas no presente trabalho agruparam, inclusive, com a sequência do holótipo de *P. bilaiae* com valores de *bootstrap* superiores a 99% em todas as análises (Figuras 2 e 3).

4. Descrição

Penicillium bilaiiae Chalabuda. Syst. Crypt. Inst. Bot. Acad. Sci. USSR. 6: 161-169 (1950).

Holótipo: USSR, 1950, JI Pitt. (ATCC22348; CBSH-7472 (isotipo); IMI113677 (neótipo).

Epítipo: BRASIL, Pernambuco, Buíque, agosto de 2009. Espécime preservado nas técnicas de óleo mineral, liofilização e de criopreservação a -80 °C na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil (URM 6893); ex-epítipo preservado na Micoteca da Universidade Minho (MUM), Braga, Portugal (MUM12.14).

Descrição. As colônias sobre CYA a 25 °C podem atingir entre 22 e 28 mm de diâmetro, podendo ser planas ou sulcadas, com sulcos moderadamente profundos a profundas, apresentando textura flocosa a funiculosa com micélio branco. Alguns isolados podem apresentar textura velutínea. A conidiogênese varia de leve à moderada com a massa de conídios apresentando coloração verde escuro. Alguns isolados podem produzir exudato claro ou marrom e pigmento de coloração marrom solúvel em água. Geralmente, o reverso das colônias é marrom avermelhado. Em MEA a 25 °C, as colônias podem atingir entre 18 e 25 mm de diâmetro, podendo ser planas ou levemente sulcadas, apresentando textura velutínea ou nitidamente funiculosa, com algumas linhagens apresentando micélio branco. A conidiogênese varia de leve a moderada, com a massa de conídios apresentando coloração verde escuro, sem a produção de exudato. Alguns isolados podem produzir pigmentos de coloração marrom a marrom escuro, solúveis em água. Geralmente, o reverso das colônias apresenta coloração pálida, variando de marrom claro a marrom escuro. Sobre G25N a 25 °C, as colônias podem atingir entre 13 e 17 mm de diâmetro, podendo ser planas ou sulcadas, variando de flocosas à funiculosas com micélio variando de branco a creme, sem exudato. Um pigmento marrom, solúvel em água, pode ser produzido por algumas linhagens desta espécie. O reverso da colônia pode apresentar uma coloração variando de pálida a amarelo amarronzado. As colônias não apresentam crescimento a 5 °C, porém quase todas as linhagens conhecidas crescem a 37 °C. Alguns isolados podem produzir esclerócios de coloração pálida a marrom, globosos ou irregulares, medindo 200 a 350 µm de comprimento, geralmente após 60 dias de incubação sobre MEA. Microscopicamente, esta espécie caracteriza-se por apresentar conidióforos estritamente monoverticilados, com um estipe liso, reto ou sinuoso, com comprimento variando entre 30 a 100 µm, apresentando vesícula terminal de até 6 µm de diâmetro, conídios

subesferoidais a elipsoidais variando entre 2.5 a 3.0 μm de diâmetro, com parede finamente rugosa.

5. Discussão

As condições extremas apresentadas pelo bioma da Caatinga, como temperaturas elevadas, alta radiação solar, baixos índices pluviométricos e solos com pouca capacidade de retenção de água, favorecem o desenvolvimento de fungos com elevada capacidade de adaptação a estas condições extremas (Cruz et al., 2013, no prelo). Para resistir a tais condições adversas, alguns isolados pertencentes a diferentes espécies de fungos podem produzir esclerócios que germinam quando as condições se tornam favoráveis. Este é o caso de alguns isolados pertencentes a algumas espécies de *Penicillium*, como é o caso de *P. bilaiiae*. No presente estudo, a temperatura do solo na área avaliada durante o período seco chegou a 40 °C, provavelmente estimulando a produção de tal estrutura.

De acordo com Pitt (1991), *P. bilaiiae* está incluído no subgênero *Aspergilloides*, seção *Aspergilloides*, por ser estritamente monoverticilado e por suas estipes apresentarem ápice nitidamente vesiculado, conforme a taxonomia clássica do gênero, fundamentada em características morfológicas. Peterson (2000), baseado em análises moleculares, estabeleceu a seção *Sclerotiora*, composta por espécies monoverticiladas e biverticiladas, produtoras ou não de esclerócios, incluindo o *P. bilaiiae* neste grupo taxonômico. Contudo, para esta espécie não há relato da produção de esclerócios. Houbraken; Samson (2011), por sua vez, estudaram a filogenia das espécies de *Penicillium* e segregaram a família Trichocomaceae em três grupos, nomeadamente: Aspergillaceae, Thermoascaceae e Trichocomaceae. Estes autores avaliaram a relação de espécies de *Penicillium* com outros gêneros incluídos na família. Tal estudo foi baseado na análise das sequências parciais dos genes RPB1, RPB2 (genes para a RNA polimerase II), Tsr1 (proteína relacionada à biogênese do ribossomo) e Cct8 (possível componente do complexo caperonina TCP-1). Com base nos resultados obtidos através das sequências do gene RPB2, os autores evidenciaram que *P. bilaiiae* é idêntico a *P. nodositatum* e que, entretanto, mais estudos precisam ser realizados, pois *P. bilaiiae* é estritamente monoverticilado, ao passo que *P. nodositatum* é biverticilado.

A seção *Sclerotiora* foi estabelecida por Peterson (2000) e revista por Houbraken; Samson (2011). Recentemente, Rivera; Seifert (2011) apresentaram uma nova revisão para esta seção, que atualmente possui 13 espécies identificadas com base em análises morfológicas e filogenéticas de cinco regiões do DNA: gene da β -tubulina, subunidade 1 do citocromo c oxidase, calmodulina, região do ITS do rDNA e do fator de alongamento de tradução 1- α . Os resultados obtidos permitiram aos autores estabelecer o complexo *sclerotiorum* (subgênero *Aspergilloides*), tendo *Penicillium sclerotiorum* como espécie tipo. Este complexo é constituído por sete espécies: *Penicillium sclerotiorum*, *P. guanacastense*, *P. mallochii*, *P. viticola*, *P. cainii*, *P. jacksoni*, e *P. johnkrugii*, tendo sido as três últimas espécies descritas por Rivera; Seifert (2011). Tais táxons são morfológicamente semelhantes, porém filogeneticamente diferentes, e alguns produzem esclerócios. As espécies *Penicillium adametzioides*, *P. bilaiae* e *P. multicolor* não foram incluídas no complexo *Sclerotiorum*, sobretudo por apresentarem características morfológicas diferentes das espécies deste complexo inclusive a não produção de esclerócio. No entanto, de acordo com aproximações filogenéticas, estas espécies pertencem a seção *Sclerotiora*.

Baseado em exemplos de taxóns que precisaram ser epitipificados, Hyde; Zhang (2008) relatam que Shoemaker; LeClair (1975) avaliaram a sistemática da família Massariaceae e examinaram o isolado *Massaria inquinans* CLXX, depositado na coleção microbiana da Universidade de Upsália (Upsália, Suécia). Posteriormente, Shoemaker; Kokko (1977) relataram que este taxon apresenta 8 ascósporos no asco sem constricção em cada septo, diferentemente de Hyde; Zhang (2008), que examinaram, o mesmo isolado (*Massaria inquinans* CLXX), observando que esta linhagem apresenta ascos com 4 ascósporos constrictos em cada septo. De acordo os autores, esta espécie precisaria de ser epitipificada para a correção destes dados em sua descrição.

Ainda, de acordo com Hyde; Zhang (2008), a epitipificação pode resolver muitos problemas taxonômicos e estabilizar a compreensão de espécies, gêneros ou ordens. É o caso do *Penicillium bilaiae*, que no presente trabalho é proposto ser epitipificado. Neste sentido, propõe-se a inclusão da produção de esclerócios por algumas linhagens, na descrição desta espécie. Alguns isolados de *P. bilaiae* são capazes de produzir esclerócios para garantir a sua sobrevivência em ambientes extremos. Quando em cultura, de um modo geral, após 60 dias esses isolados começam a produzir esclerócios.

6. Conclusões

Neste trabalho os autores propõem a epitipificação de *P. bilaiiae* para incluir a produção de esclerócios na descrição da espécie. É provável que condições extremas como a escassez de água e as temperaturas elevadas, como às apresentadas pelo bioma da Caatinga, possam induzir a produção de esclerócios por alguns isolados de *P. bilaiiae*. Estes resultados contribuem para ampliar o conhecimento desta espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, bem como aos técnicos Luan Amim da UFPE e Francisco Rangel do CETENE, por todo o apoio durante as análises.

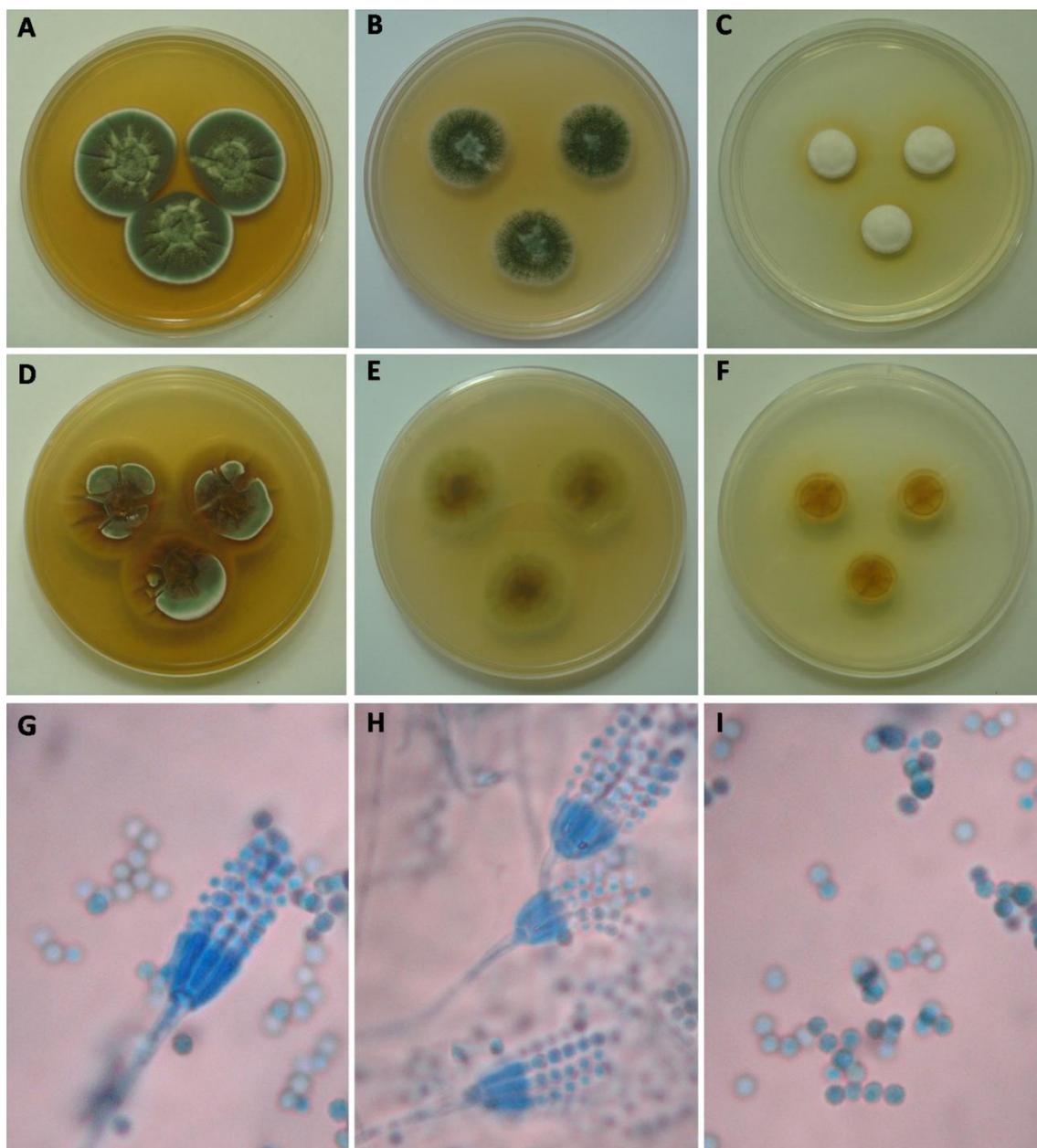


Figura 1. *Penicillium bilaiae* Chalab., culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), B. Verso sobre Ágar de Extrato de Malte (MEA), C. Verso sobre Ágar suplementado com 25% Glicerol (G25N). D. Reverso sobre CYA, E. Reverso sobre MEA, F. Reverso sobre G25N. G e H. Conidióforos monoverticilados, I. Conídios..

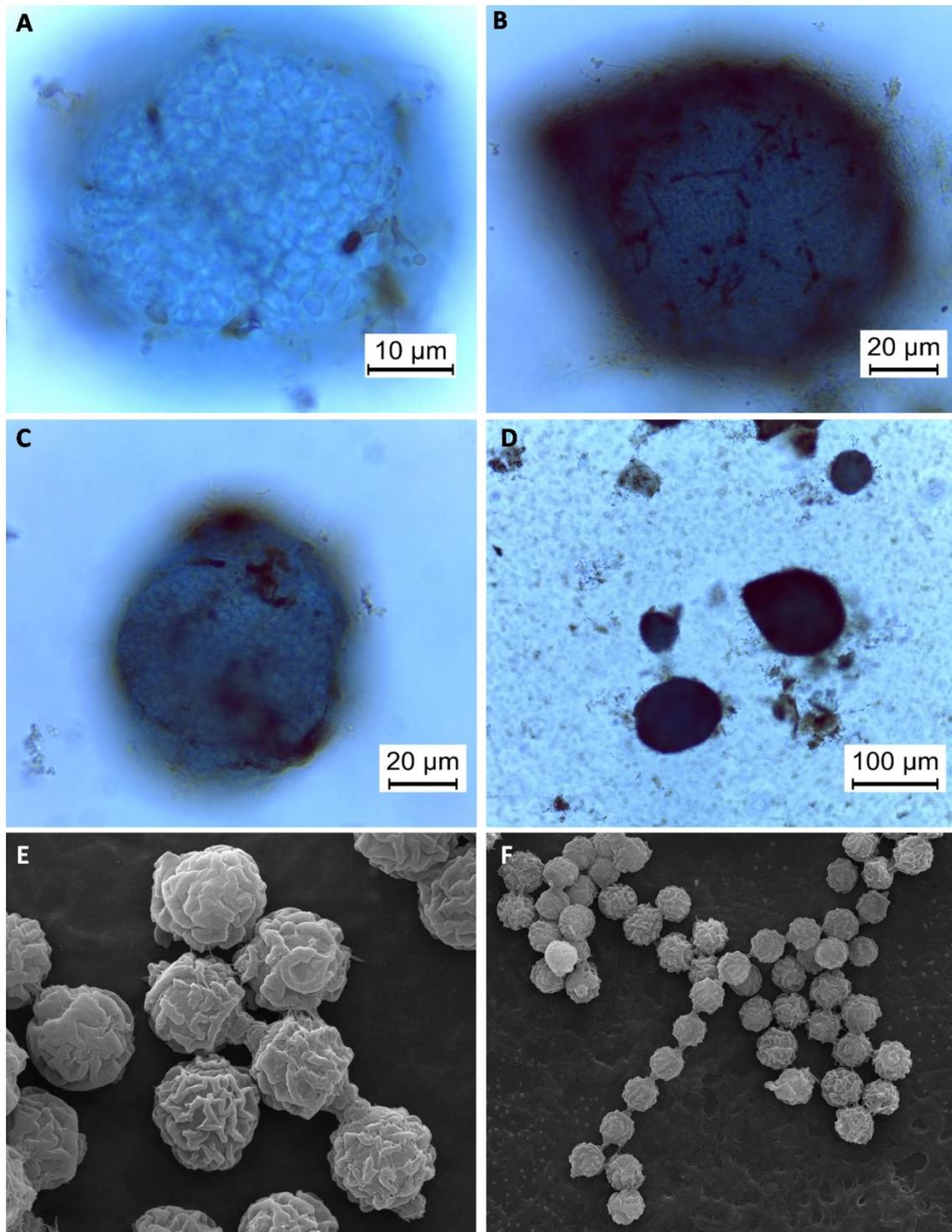


Figura 2. *Penicillium bilaiae* Chalab., A-D. Esclerócios formados sobre Ágar de Extrato de Malte (MEA) a 25 °C, após 60 dias de incubação. E e F. Conídios, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), 30.000 X e 10.000 X, respectivamente.

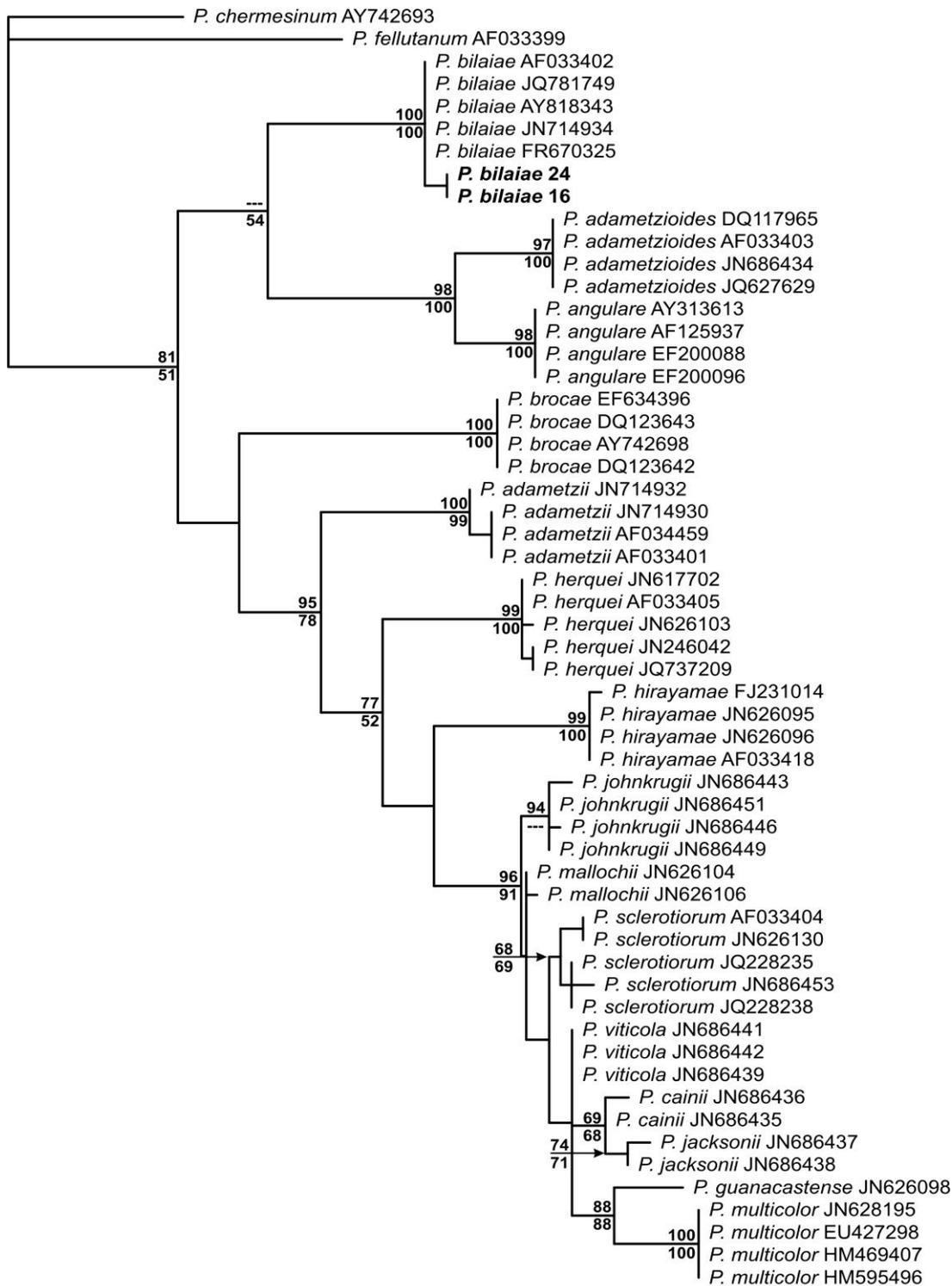


Figura 3. Árvore filogenética de *Penicillium* – seção *Sclerotiora*, baseada em análises de seqüências da região ITS do rDNA. Valores de bootstrap são de neighbor-joining (acima dos ramos) e máxima parcimônia (abaixo dos ramos). As seqüências são seguidas pelo número de acesso no GanBank. Os isolados utilizados nesse estudo estão em negrito. São mostrados apenas os valores de bootstrap acima de 50% (Índice de Consistência = 0.56; Índice de retenção = 0.90).

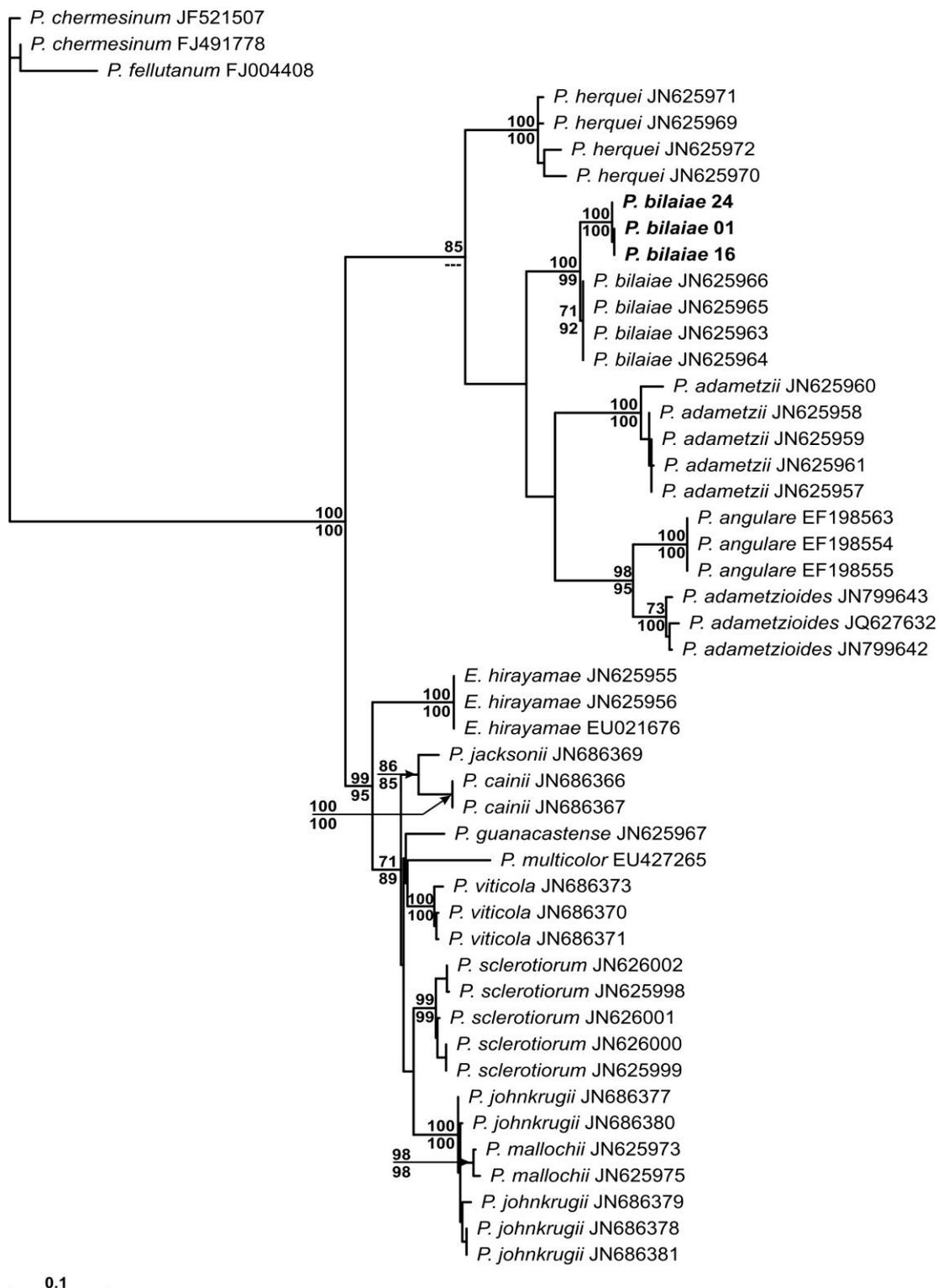


Figura 4. Árvore filogenética de *Penicillium* – seção Sclerotiora, baseada em análises de seqüências parciais do gene da β -tubulin. Valores de bootstrap são de neighbor-joining (acima dos ramos) e máxima parcimônia (abaixo dos ramos). As seqüências são seguidas pelo número de acesso no GanBank. Os isolados utilizados nesse estudo estão em negrito. São mostrados apenas os valores de bootstrap acima de 50% (Índice de Consistência = 0.59; Índice de retenção = 0.88).

Tabela 1. Fontes dos isolados de *Penicillium bilaiae* utilizados no presente estudo filogenético e as sequências da região ITS do rDNA utilizadas na análise, obtidas a partir do GenBank.

Coleção de Culturas/Nº de acesso	GenBank/Nº de acesso	ITS	Isolado/Fonte	Localização	Hospedeiro
NRRL 3391	AF033402	AF033402	NRRL 3391/ Chalabuda (1950); Rivera; Seifert (2011)	Kiev, USSR	Solo
-	JQ781749	JQ781749.1	A28D/ Lima; Portugal (2012), não publicado.	Coimbra, Portugal	Artrópode
-	AY818343	AY818343	DAOM197974/ Sholberg et al.,(2004), não publicado.	Canadá	-
ATCC 20851	JN144934	JN144934	PSMO98/ Kucey (1991); Rivera; Seifert (2011)	Southern Alberta, Canadá	Solo
-	FR670325	FR670325	IFV M06/002/ Diguta et al., (2011)	Borgonha, França	Uva
URM 6893	*	*	24/ Cruz et al., (2013b), não publicado	Pernambuco, Brasil	Solo
-	*	*	16/ Cruz et al., (2013b), não publicado	Pernambuco, Brasil	Solo

(-): Não está mantido em Coleção de Culturas; (*): aguardando o número de acesso no GenBank.

Tabela 2. Fontes dos isolados de *Penicillium bilaiae* utilizados no presente estudo filogenético e as sequências parciais do gene da β -tubulina utilizadas na análise, obtidas a partir de GenBank.

Coleção de Culturas/Nº de acesso	GenBank/Nº de acesso	β -tubulina	Isolado/Fonte	Localização	Hospedeiro
NRRL 3391	JN625966	JN625966	NRRL 3391/ Chalabuda (1950); Rivera; Seifert (2011)	Kiev, USSR	Solo
-	JN625965	JN625965	LEQ 1878/ Rivera; Seifert (2011)	Saskatchewan, Canadá	Solo
-	JN625963	JN625963	LEQ 1643/ Rivera; Seifert (2011)	Saskatchewan, Canadá	Solo
-	JN625964	JN625964	LEQ 1644/ Rivera; Seifert (2011)	Saskatchewan, Canadá	Solo
URM 6893	*	*	24/ Cruz et al., (2013b), não publicado	Pernambuco, Brasil	Solo
-	*	*	1/ Cruz et al., (2013b), não publicado	Pernambuco, Brasil	Solo
-	*	*	16/ Cruz et al., (2013b), não publicado	Pernambuco, Brasil	Solo

(-): Não está mantido em Coleção de Culturas; (*): aguardando o número de acesso no GenBank.

6. Capítulo 4

Resíduo de manga como potencial substrato para produção de tanase por espécies de *Penicillium* através de FES⁴

Roberta Cruz^{*1}, Cledir Santos^{3,4}, Keila Aparecida Moreira² & Cristina Maria de Souza-Motta^{1*}

¹Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
Pernambuco,
50670-420, Brasil

²Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Garanhuns, Pernambuco, 5292-270, Brasil.

³IBB-Instituto de Biotechnology e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica,
Micoteca da Universidade do Minho, Campos de Gualtar, Braga, Portugal

⁴Centro de Pesquisas Cereal, Agricultura e agroalimentos do Canadá, 195 Dafoe Road,
Winnipeg MB, Canada R3T 2M9

*Autor correspondente: smotta@ufpe.br

⁴Trabalho submetido para publicação como Cruz, R., Santos, C., Moreira, K.A., Souza-Motta, C.M. (2013): Mango residue as a potential substrate for tannase production by *Penicillium* species through SSF. International Biodeterioration & Biodegradation.

Resumo

Este é o primeiro estudo sobre diversidade do gênero *Penicillium* em solos de Caatinga e Mata Atlântica e avaliação do potencial de produção de tanase através de FES utilizando resíduos de cajá e manga gerados por indústria de polpa de frutas. Tais resíduos são frequentemente descartados no meio ambiente tornando-se poluentes. Foram obtidos 802 isolados de *Penicillium*, 357 provenientes de solos da Caatinga e 445 de solos da Mata Atlântica. Um representante de cada espécie identificada foi incorporado ao acervo da Coleção de Culturas Micoteca URM, sendo estes testados quantitativamente quanto à produção de tanase por FES utilizando resíduos de cajá e manga. *Penicillium rolfsii* foi selecionado para a otimização da produção de tanase por SSF, utilizando resíduo de manga como substrato. Máxima atividade de tanase foi produzida em resíduo de manga ($96,22 \text{ U ml}^{-1}$) suplementado com 2% de ácido tânico, umidade de 50%, incubado a 30 °C, durante 72 h. Solos do bioma Caatinga tem uma alta diversidade de espécies de *Penicillium* com potencial biotecnológico para a produção de tanase por FES. Resíduos de manga gerados pela indústria de polpa de frutas apresenta-se como um excelente substrato para ser utilizado pela indústria para minimizar os custos e aumentar a produção de tanase utilizando *Penicillium*.

Palavras chave: *Penicillium rolfsii* URM 6216, Caatinga, Mata Atlântica, resíduo agroindustrial

1. Introdução

O Brasil é considerado o país de maior biodiversidade do Planeta (Lejon et al., 2005). Devido a sua dimensão continental, à grande variação geomorfológica e climática, este país abriga sete biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Costeiros, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos, sendo estes portadores de diversas espécies de animais, vegetais e micro-organismos, com destaque para os fungos (Lejon et al., 2005; Carvalho et al., 2010).

O solo é considerado um dos principais habitats para população de micro-organismos e dentre estes, encontram-se os fungos (Cavalcanti et al., 2006). Dos fungos comumente isolados de solo, destacam-se espécies de *Penicillium*. Além da relevante importância ambiental na ciclagem de matéria orgânica, espécies de *Penicillium* possuem amplo potencial biotecnológico, sendo utilizadas para a produção de enzimas de interesse industrial, ambiental, farmacêutico, alimentício, etc (Bon et al., 2008). Dentre as várias enzimas produzidas por espécies de *Penicillium*, destaca-se a tanase (Belur; Mugeraya, 2011).

Tanase, ou Tanino acil hidrolase (TAH) (EC 3.1.1.20) é uma enzima induzível que catalisa a hidrólise de ligações éster e depsídeo em taninos hidrolisáveis, como ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico (Selwal et al., 2011; Madeira Jr. et al., 2012). Como os taninos são produzidos pelos vegetais com finalidade de defesa, estes compostos podem ser encontrados em todas as partes da planta, desde vacúolos celulares, folhas, casca, frutos, semente à seiva (Monteiro et al., 2005). Vários micro-organismos produzem tanase como forma de contra ataque aos vegetais (Pinto et al., 2005b).

A tanase pode ter vasta aplicação nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e de bebidas, principalmente na produção de cervejas. Outra importante aplicação da tanase ocorre na fabricação de sucos cujos frutos apresentem alto teor de taninos. Esta enzima é ainda aplicada na produção de ácido gálico, na estabilização da coloração dos vinhos, refrigerantes a base de café, processo de tratamento do couro, detanificação de alimentos e para tratamento de efluentes na indústria de couros (Madeira Jr. et al., 2012). Os micro-organismos do solo produtores de tanase desempenham papel ativo na decomposição e reciclagem de materiais vegetais ricos em taninos e evitam problemas de poluição ambiental (Battestin et al., 2004).

Dentre os fungos filamentosos, *Aspergillus* é considerado o gênero melhor produtor de tanase, seguido de *Penicillium*, seja por Fermentação Submersa (FSm), ou através de Fermentação em Estado Sólido (FES) (Aguillar et al., 2007; Renovato et al., 2011; Chávez-González et al., 2012). Entretanto, embora seja comprovado o potencial de espécies do gênero *Penicillium* para produção de tanase, trabalhos ainda são escassos.

Devido à elevada importância da aplicação da tanase microbiana em várias indústrias, torna-se necessária a busca por processos de produção que venham minimizar seus custos, elevar a produção e contribuir diretamente para o equilíbrio ambiental, através do aproveitamento de resíduos agroindustriais que são comumente descartados no meio ambiente sem tratamento prévio. Neste contexto, a FES apresenta-se como excelente alternativa para produção de tanase por fungos (Pinto et al., 2005a).

A fermentação em estado sólido é o processo no qual o micro-organismo cresce em substratos sólidos ou úmidos, geralmente resíduos vegetais, na ausência de água livre (Pandey, 2003). Os setores agroindustrial e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor, como é o caso dos resíduos gerados pelas indústrias produtoras de polpas de frutas, como resíduos de cajá (*Spondias lutea* L.) e manga (*Mangifera indica* L.).

Estima-se que anualmente no Brasil, tanto para cajá quanto para manga, sejam produzidos cerca de 35 toneladas de resíduos, por indústria de polpas. Tais resíduos, por conterem elevado teor de taninos, podem ser uma alternativa viável para a produção de tanase através de FES, utilizando fungos (Pinto et al., 2005a; Chávez-González et al., 2012).

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram isolar e identificar espécies de *Penicillium* presentes em solo de Caatinga e Mata Atlântica em Pernambuco, Brasil, bem como avaliar a capacidade de produção de tanase através de FES por estas espécies, utilizando resíduos de cajá (*Spondias lutea* L.) e manga (*Mangifera indica* L.), gerados por indústria de polpa de frutas em Pernambuco, Brasil.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo, precipitação e coleta de amostras

Amostras da Caatinga foram coletadas em áreas abertas localizadas no Parque Nacional do Catimbau, Cidade de Buíque-Pernambuco, Brasil (08 °04'25 "S e 37 °15 '52" W). Na Mata Atlântica brasileira as amostras foram coletadas no Parque de Dois Irmãos. Este parque é mantido pelo Estado de Pernambuco e está localizado na área norte-ocidental da cidade do Recife (S 8 °15'30 "e W 35° 57'00"). Foram realizadas seis coletas em cada área, três no período chuvoso e três durante o período seco. As amostras foram coletadas em três transectos de 4x25 m, 20 cm de profundidade, num total de três amostras compostas por área, consistindo de 10 subamostras cada. As amostras foram coletadas com o auxílio de uma pá de jardinagem, armazenadas em sacos plásticos e, em seguida, encaminhadas para o laboratório de pesquisa da Coleção de Culturas Micoteca- URM, do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a manipulação.

2.2. Isolamento e identificação e purificação das espécies

Para isolamento dos fungos, foi realizada uma suspensão de solo, seguindo o método de Clark (1965), modificado pelo seguinte procedimento: 25 g de cada amostra de solo foram suspensos em 225 mL de água destilada estéril e o sistema foi agitado manualmente durante 10 minutos. Dez mL desta suspensão foi adicionado a 90 mL de água destilada estéril (1:100), e o procedimento foi repetido para obtenção das diluições de 1:1000 e 1:10000. De cada diluição, 1 mL foi espalhado sobre a superfície de Ágar Sabouraud contendo cloranfenicol (50 mg/L⁻¹) e Ágar Dicloran e Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) em placas de Petri. As placas permaneceram à temperatura ambiente (28 ° C ± 2 ° C) durante 72 horas. Para purificar amostras de fungos, fragmentos de colônias foram transferidos para placas de Petri contendo o mesmo meio usado antes e cultivadas durante 72 horas. Depois de confirmar a pureza, as culturas foram transferidas para o meio Ágar Extrato de Malte (MEA) contido em tubos de ensaio (18 x 180 mm) para posterior identificação (Cruz et al., 2013, no prelo).

A metodologia utilizada para a identificação foi descrita por Pitt (1991). Os esporos de *Penicillium* isolados foram suspensos em 1,0 mL de uma solução contendo 0,2% de ágar e 0,05% de Tween 80. Desta suspensão, 2,0 µL foram usadas para inoculação em cada uma de três placas de Petri contendo 25 ml dos meios de cultura Ágar levedura Czapek (CYA), Ágar Extrato de Malte (MEA) e Ágar Glicerol 25% (G25N). As placas de Petri foram incubadas a 5 °C, 25 °C e 37 °C para CYA e a 25 °C

para a MEA e G25N. Características macroscópicas e microscópicas foram observadas para identificar as espécies (Pitt, 1991; Samson; Frisvad, 2004).

2.3. Detecção da capacidade taninolítica das espécies de *Penicillium*

Um representante de cada espécie de *Penicillium* foi inoculado no centro do meio Ágar Czapek ($C_{12}H_{22}O_{11}$, 30 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; KCl, 0.5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g; KH_2PO_4 , 1.0 g; $NaNO_3$, 3.0 g; Ágar, 16 g; H_2O destilada, 1000 mL) modificado pela substituição da sacarose por 5 g L^{-1} de ácido tânico ($C_{76}H_{42}O_{56}$) e esterilizado durante 15 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$. O ácido tânico foi esterilizado separadamente através da filtração com membrana $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (TPP – 99722), em seguida misturado ao meio de cultura e distribuído em placas de Petri. Os esporos de cada isolado testado foram suspensos em 1,0 mL de uma solução contendo 0,2% de ágar e 0,05% de Tween 80. Desta suspensão, $2,0 \text{ }\mu\text{L}$ foram retirados para inoculação no centro do meio Ágar Czapek modificado e inoculados em triplicata. As placas de Petri foram mantidas em incubadora refrigerada-BOD (Tecnal, TE331) a 30°C durante 72h. Após o período de incubação o halo formado ao redor da colônia foi mensurado (Murugan et al., 2007).

2.4. Avaliação da diversidade

A análise da diversidade de espécies de *Penicillium* nos dois biomas foi realizada através do índice de Shannon-Wiener. Estes cálculos foram realizados utilizando o programa de computador (NTSYS Taxonomia Numérica e Sistema de Análise Multivariada) Software de Exeter - EUA.

2.5. Substratos

Resíduos de cajá (*Spondias lutea* L.) e manga (*Mangifera indica* L.) foram obtidos de indústria de polpa de frutas em Recife-PE, Brasil. Os resíduos foram lavados com água destilada esterilizada e secos em estufa (Tecnal, TE 392/1) a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48h.

2.6. Micro-organismos

Um representante de cada espécie de *Penicillium* isolado foi utilizado neste estudo. Cada isolado foi inoculado em Ágar Extrato de Malte (MEA), contido em tubo de ensaio e incubado a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o crescimento, as culturas foram mantidas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$

para utilização a curto prazo. Em seguida, esporos de cada cultura foram transferidos para tubo de ensaio contendo 10 ml de água destilada estéril com 0,1% de Tween-80. A suspensão de esporos, assim obtida, foi utilizada como inóculo. Os esporos viáveis foram determinados pela técnica de contagem em placa (Sabu et al., 2005).

2.7. Produção de tanase por Fermentação em Estado Sólido

Para umedecer o meio para FES foi preparada solução de sais na composição: 0,5% w/v de NH_4NO_3 , 0,1% w/v de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1% w/v de NaCl. O pH final foi ajustado para 5,0, em seguida a solução foi esterilizada a 121 °C, durante 15 min (Sabu et al., 2005). Cinco gramas de resíduo de cajá e manga foram adicionados separadamente a frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL e esterilizados a 121 °C, durante 30 min em vapor fluente. O substrato foi umedecido com 5 mL de solução salina e inoculado com 1 mL da solução de esporos de fungos na concentração de 5×10^8 esporos mL^{-1} . O conteúdo foi misturado e incubado a 30 °C durante 96h (Sabu et al., 2005).

2.8. Extração da enzima

Após fermentação, em cada frasco de Erlenmeyer foram adicionados 50 mL de água destilada contendo 0,01% de Tween 80, previamente esterilizada. Em seguida, os frascos foram agitados em agitador (Tecnal TE421, São Paulo, Brasil), a 150 rpm durante 10 min para mistura dos conteúdos. Em seguida, o extrato bruto foi obtido por filtração através de papel Whatman # 1 de filtro. O filtrado foi acondicionado em frascos tipo Falcon de 50 mL e preservados a 4 °C para posterior análise (Sabu et al., 2005).

2.9. Desenho Experimental e Análise Estatística

A influência das variáveis: quantidade de substrato, umidade inicial, teor de ácido tânico e temperatura na produção de tanase; foi avaliada a partir dos resultados das experiências realizadas de acordo com um planejamento fatorial 2^4 (Tabela 1). A escolha dessas variáveis foi realizada de acordo com Sabu et al., (2005). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008).

2.10. Técnicas Analíticas

O teor de proteína foi determinado de acordo com Bradford (1976) a 595 nm, utilizando Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão. Para cada amostra, as determinações foram realizadas em triplicata.

A atividade enzimática foi estimada por meio da formação de um cromôgeno entre o ácido gálico (libertado pela ação de tanase em metil galato) e a rodanina (2-tio-4-ketothiazolidine). A cor rosa desenvolvida foi lida a 520 nm usando um espectrofotômetro (Hitachi-U5100). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de ácido gálico por minuto sob as condições de reação definidas. O rendimento da enzima foi expresso em $U\ mL^{-1}\ min^{-1}$ (Sharma et al., 2000). As atividades foram estimadas em triplicata.

3. Resultados

No total, 802 isolados de *Penicillium* foram obtidos, 357 provenientes de solo de Caatinga e 445 de Mata Atlântica. 31 espécies foram identificadas. Um representante de cada espécie foi incorporado ao acervo da Coleção de Culturas - Micoteca URM (Tabela 1), sob os métodos de preservação sob óleo mineral, liofilização e ultracongelamento a $-80^{\circ}C$ (Sherf, 1943; Raper; Alexander; 1945; Kirsop; Doyle, 1991).

De acordo com o índice de diversidade de Shannon-Wiener (1948), ambos os biomas apresentam alta diversidade de espécies de *Penicillium* (Figura 1). Entretanto, resultados mais elevados do índice foram obtidos para a Caatinga no período seco (4,10 bits.ind⁻¹).

Das 31 espécies testadas quanto à capacidade taninolítica em meio sólido, apenas *Penicillium janthinellum* e *P. lanosum*, não produziram halo de degradação (Tabela 2). *Penicillium lapidosum* não apresentou crescimento na presença de ácido tânico. Devido ao baixo número de culturas que não apresentaram capacidade qualitativa de produção de tanase, todas as espécies foram submetidas para avaliação quantitativa por FES, a partir da utilização de resíduos de cajá (*Spondias lutea* L.) e manga (*Mangifera indica* L.) provenientes de indústria de polpas de frutas.

Através de FES, todas as espécies analisadas produziram tanase nos dois resíduos testados (Tabela 2). *Penicillium adametzi*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. canescens*, *P. citreonigrum*, *P. commune*, *P. decumbens*, *P. fellutanum*, *P. janczewskii*, *P. janthinellum*, *P. lapidosum*, *P. lividum*, *P. melinii*, *P.*

minioluteum, *P. oxalicum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. rolfsii*, *P. sclerotiorum*, *P. simplicissimum*, *P. spinulosum*, *P. verruculosum* e *P. waksmanii*, estão sendo relatados pela primeira vez como produtores desta enzima.

A produção de tanase variou de acordo com o micro-organismo e o resíduo avaliado, sendo o resíduo, um importante estimulante para que o micro-organismo produza a enzima. O resíduo de manga apresentou-se como melhor indutor da produção de tanase por espécies de *Penicillium*, tendo a maioria das espécies apresentado elevada atividade de tanase, variando de 14,48 e 89,48 U mL⁻¹, sendo os três melhores produtores *Penicillium rolfsii* URM 6216 com 89,49 U mL⁻¹, *P. janthinellum* URM 5993 com 85,93 U mL⁻¹ e *P. glabrum* URM 6092, 59,26 U mL⁻¹. No resíduo de cajá, a mínima atividade foi de 4,16 U mL⁻¹ e a máxima, 19,54 U mL⁻¹, sendo os três melhores produtores, *P. simplicissimum* URM 6138, *P. brevicompactum* URM 5994 e *P. commune* URM 6147, com 19,54, 18,60 e 18,07 U mL⁻¹, respectivamente (Tabela 2). Portanto, *P. rolfsii* URM 6216 está sendo indicado para otimização da produção de tanase, através de FES, utilizando resíduo de manga como substrato, representado no ensaio 20 (Tabela 3).

Após delineamento experimental, *Penicillium rolfsii* URM 6216 produziu máxima atividade de tanase de 96,22 U mL⁻¹ em 7,5 g de resíduo de manga, suplementado com 2% de ácido tânico, 50% de umidade inicial, incubado a 30 °C durante 72h, representado no ensaio 20 (Tabela 3).

4. Discussão

Estudos sobre a diversidade de espécies de *Penicillium* em solos dos biomas presentes no Brasil são raros (Fraga et al., 2010; Cruz et al., 2013, no prelo). No presente estudo, observa-se que os biomas Caatinga e Mata Atlântica abrigam elevada diversidade de espécies pertencentes a este gênero, principalmente no bioma Caatinga durante o período seco, fato que indica a elevada capacidade de adaptação destas espécies a ambientes extremos.

A tanase foi descoberta acidentalmente por Tieghem em 1967, em uma experiência de formação de ácido gálico em uma solução aquosa de taninos, onde cresceram duas espécies de fungos filamentosos, identificadas posteriormente como *Penicillium glaucum* e *Aspergillus niger* (Aguillar et al., 2007). Posteriormente, vários

micro-organismos como bactérias, leveduras e outros fungos filamentosos, têm sido relatados como produtores de tanase.

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam o potencial de espécies de *Penicillium* para a produção de tanase. Entretanto, trabalhos com produção de tanase por espécies desse gênero ainda são escassos. Em levantamento bibliográfico realizado por Aguillar et al., (2007) entre os anos de 1969 à 2007, apenas cinco trabalhos são citados. Levantamento similar foi realizado em 2011 por Belur; Mugeraya. Os autores afirmaram que não houve alteração no número de trabalhos sobre produção de tanase por espécies de *Penicillium* de 2007 à 2011.

Batra; Saxena (2005) testaram 24 espécies de *Penicillium* quanto à detecção da capacidade de produzir tanase em meio sólido contendo sais, adicionado de 1% de ácido tânico. Conforme resultados obtidos neste trabalho os autores constataram que *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. corylophilum* e *P. restrictum* apresentaram zona de hidrólise do ácido tânico, indicando a produção de tanase. A detecção da tanase por *P. oxalicum* URM 6223 no presente estudo contradiz os resultados de Batra; Saxena (2005). Este fato indica que a capacidade de produção da tanase, não é inerente à espécie, mas sim a linhagem (Tabela 1).

A FES para a produção de enzimas oferece vantagens sobre o método de fermentação submersa convencional (Pinto et al., 2011). O meio de produção é simples, podem-se utilizar resíduos agroindustriais, sendo os mais comumente utilizados casca de uva, bagaço de caju, casca de café ou farelo de trigo, arroz e aveia, acrescido de ácido tânico (Battestin et al., 2004). Entretanto, alguns frutos ricos em taninos e cultivados no Brasil, ainda não tinham sido estudados para a produção de tanase, dentre esses destacamos cajá (*Spondias lutea* L.) e manga (*Mangifera indica* L.).

O cajá, fruto da cajazeira, originária da América Tropical, pertence à família Anacardiaceae e apresenta grande aceitação no mercado brasileiro, sendo considerado bastante saboroso e nutritivo (Bosco et al., 2000). Além da importância regional, o cajá vem ganhando papel de destaque no agronegócio brasileiro, com o desenvolvimento de novos produtos e a comercialização em maior escala sob a forma de polpa (Sacramento; Sousa, 2000).

Também pertencente à família Anacardiaceae, originária da Índia, a mangueira, cujo fruto é a manga, foi introduzida no Brasil pelos portugueses no século XVI (Pinto, 2011). A manga é composta principalmente de água, hidratos de carbono, ácidos

orgânicos, minerais, proteínas, vitaminas (A, C e complexo B) e pigmentos, além de taninos. O teor de taninos é de cerca de 12% a 18% de sementes de manga. Esse fruto amplamente utilizado para a produção de polpa de fruta por várias indústrias brasileiras (Rozane et al., 2004).

Os resíduos do processamento do cajá e da manga, pelas agroindústrias como as de polpa de frutas e sucos, são ricos em aminoácidos e taninos, podendo representar uma excelente fonte de carbono para a produção de tanase via FES, visto que são comumente descartados, sem tratamento prévio, poluindo o meio ambiente. O interesse na fermentação sólida para a produção de compostos de importância comercial é uma consequência da demanda por insumos de menor custo (Chávez-González et al., 2012).

De acordo Chávez-González et al., (2012), a espécie *Penicillium rolsfii* ainda não foi relatada como produtora de tanase, sendo esta a primeira constatação deste fato. Além disso, no presente estudo foi observado que *P. rolfssi* URM 6216 é capaz de produzir valores elevados de tanase, ultrapassando os valores mencionados na literatura para outras espécies de *Penicillium* (cf. referências).

Apesar de ser um método tradicional, a detecção qualitativa da produção de enzimas utilizando micro-organismos inoculados em meios sólidos específicos, para a produção da enzima desejada é um método falho. No presente estudo, *P. janthinelum*, *P. lanosum* e *P. lapidosum* não hidrolisaram ácido tânico, entretanto, por FES utilizando resíduo de manga como substrato, produziram 85,93; 18,84 e 30,99 U mL⁻¹ de tanase, respectivamente, fato que comprova a falha do método qualitativo.

Em 2005, Banerjee et al., avaliaram a produção de tanase por consórcio entre *Rhizopus oryzae* (ROIITRB-13, NRRL21498) e *Aspergillus foetidus* (GMRB013 MTCC), através de FES, sendo obtido rendimento máximo de 41,3 U mL⁻¹. De acordo com os autores, o consórcio entre micro-organismos potencializa a produção da enzima. No presente estudo, no qual espécies de *Penicillium* foram testadas separadamente, foi observado um rendimento de tanase superior a *R. oryzae* e *A. foetidus* com cinco espécies de *Penicillium*, indicando que o gênero *Penicillium* pode ser potencialmente superior a outros gêneros de fungos na produção de tanase.

Avaliando a produção de tanase por *Aspergillus tamarii*, através de FSM, Costa et al., (2008) utilizaram três meios contendo sais com adição de ácido tânico, ácido gálico e metil galato, como indutores de tanase. Os autores verificaram que a linhagem produziu tanase a partir de 48h de fermentação, nos três meios indutores. Entretanto, a

produção máxima foi observada quando o ácido gálico foi utilizado como indutor (20,6 U mL⁻¹). Embora, *Aspergillus* seja referenciado como o gênero melhor produtor de tanase, no presente estudo foram testadas apenas espécies de *Penicillium* e o resultado apresenta-se superior ao de Costa et al., (2008), como o obtido por *Penicillium rolfssii* URM 6216 de 89,48 U mL⁻¹, com resíduo de manga como substrato, antes do delineamento experimental.

Selwal; Selwal (2011) avaliaram a produção de tanase por um isolado de *Penicillium atramentosum*, proveniente de efluente de curtume, através de fermentação submersa, utilizando folhas de *Phyllanthus emblica*, *Zyzyphus mauritiana*, *Eugenia cuspidate*, *Syzygium cumini* e *Acacia nilotica*, em pó. Os autores observaram máxima atividade de tanase de 32,8 e 34,7 U mL⁻¹, a partir de folhas de *Phyllanthus emblica* (2% w/v) e *Acacia nilotica* (3% w/v), respectivamente, incubadas a 30 °C durante 72 h. Comparando com o presente estudo, ambos, o micro-organismo testado (*Penicillium rolfssii* URM 6216), bem como o resíduo agroindustrial (resíduo de manga), foram mais promissores para a produção de tanase, com atividade máxima de 89,48 U mL⁻¹ e após delineamento experimental, com 96,22 U mL⁻¹, a 30 °C durante 72 h. Além disso, de acordo com Pinto et al., (2005a), a fermentação em estado sólido apresenta-se mais vantajosa que a submersa, principalmente pela economia de água e simplicidade do meio de cultura.

O Brasil é um país reconhecido mundialmente por sua prática agrícola. Entretanto o acúmulo de resíduos ricos em taninos e seus derivados, como os de manga, constituem um sério problema ambiental. Neste contexto, *Penicillium rolfssii* URM 6216, micro-organismo não relatado como patogênico, é capaz de produzir tanase através de FES utilizando resíduo de manga e está sendo indicado como excelente ferramenta a ser utilizada por indústrias alimentícias ou farmacêuticas para a produção de tanase. Trata-se do primeiro estudo com o referido resíduo para produção de tanase.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, bem como a Professora Sigrid Newman (UFPE), Paulo Freitas e Francisco Rangel (CETENE) pelo apoio técnico.

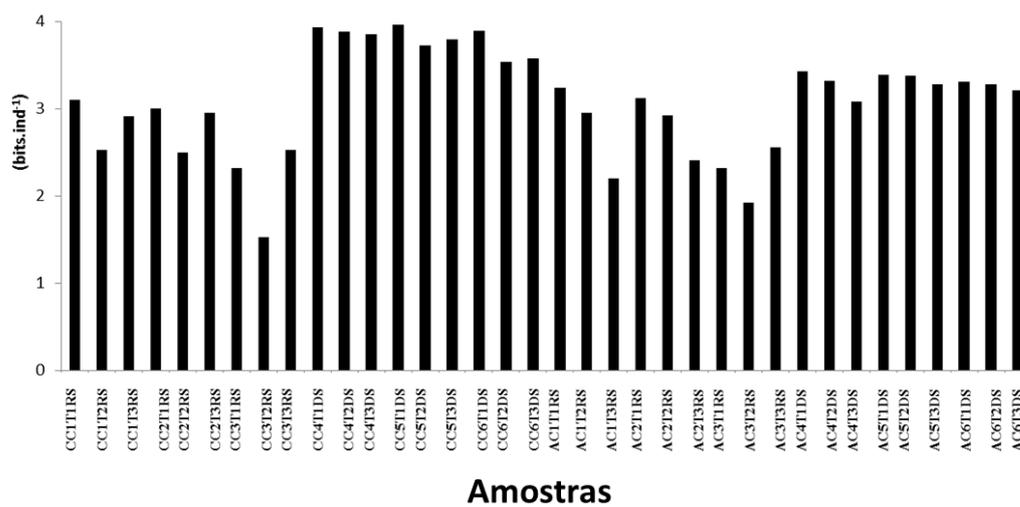


Fig. 1. Diversidade (bits.ind⁻¹) das espécies *Penicillium* na Caatinga (C) e Mata Atlântica (A) na estação chuvosa (RS) e estação seca (DS) em três transectos (T1, T2, T3) e amostras (C1, C2, C3). Análise estatística com base no índice de Shannon.

Tabela 1. Variáveis e níveis do delineamento experimental 2^4 para a produção de tanase pela espécie melhor produtora.

Variáveis	Níveis		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
Qs (g)	5.0	7.5	10.0
UI (%)	40	50	60
AT (%)	0	4	2
T (°C)	24	30	36

Qs)-Quantidade do substrato, (Ui)-Umidade inicial, (AT)-Ácido Tânico, (T)-temperatura.

Tabela 2. Seleção qualitativa e quantitativa quanto a produção de tanase por espécies de *Penicillium* isoladas de solos de Caatinga e Mata Atlântica, procedentes da Micoteca URM, utilizando resíduos de cajá (*Spondias lutea* L.) e manga (*Mangifera indica* L.).

Nº URM	Espécie	Zona de Hidrólise (mm)	Resíduo cajá U mL ⁻¹	Resíduo manga U mL ⁻¹
6275	<i>Penicillium adametzii</i> K.M. Zalesky	9,0	6,12	28,09
6026	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx	5,0	5,57	36,46
5994	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	8,0	18,60	23,43
6044	<i>P. canescens</i> Sopp	9,0	4,95	29,46
6020	<i>P. citreonigrum</i> Thom	5,0	5,20	39,99
6224	<i>P. citrinum</i> Sopp	3,5	6,73	13,50
6022	<i>P. chrysogenum</i> Thom	5,0	9,71	14,48
6147	<i>P. commune</i> Thom	4,0	18,07	29,48
5967	<i>P. corylophilum</i> Dierckx	5,0	5,01	37,21
6018	<i>P. decumbens</i> Thom	4,0	15,27	28,84
6137	<i>P. fellutanum</i> Biourge	7,0	7,15	33,60
6092	<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	4,0	4,86	59,26
6150	<i>P. griseofulvum</i> Dierckx	7,0	8,28	37,36
6223	<i>P. implicatum</i> Biourge	3,0	13,39	39,84
6041	<i>P. janczewskii</i> Zaleski	4,0	11,70	19,37
5993	<i>P. janthinellum</i> Biourge	0,0	4,71	85,93
6288	<i>P. lanosum</i> Westling	0,0	5,37	18,84
6042	<i>P. lapidosum</i> Raper & Fennell	-	6,63	30,99
6090	<i>P. lividum</i> Westling	7,0	4,63	19,35
6215	<i>P. melinii</i> Thom	4,0	5,67	29,07
6046	<i>P. minioluteum</i> Dierckx	4,0	4,16	10,29
6223	<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom	5,0	4,65	20,05
6159	<i>P. pinophilum</i> Thom	5,0	5,12	16,96
6277	<i>P. purpurogenum</i> Fleroff	7,0	4,71	28,47
6135	<i>P. restrictum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbott	3,0	5,67	33,02
6216	<i>P. rolfsii</i> Thom	5,0	5,76	89,48
6154	<i>P. sclerotiorum</i> J.F.H. Beyma	4,0	5,12	41,59
6138	<i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	5,0	19,54	28,90
6298	<i>P. spinulosum</i> Thom	6,0	5,35	39,88
6222	<i>P. verruculosum</i> Peyronel	3,0	5,37	42,32
6159	<i>P. waksmanii</i> K.M. Zalesky	4,0	5,05	35,33

(-): não cresceu sobre Ágar Czapek modificado pela substituição da sacarose por 5 g L⁻¹ de ácido tânico.

Tabela 3. Resultados do delineamento experimental 2^4 para produção de tanase através de FES por *Penicillium rolfsii* URM 6216.

Ensaio	Qs (g)	Ui (%)	AT (%)	T (°C)	U mL ⁻¹ Atividade de tanase				
					24h	48h	72h	96h	120h
1	5,0	40	0	24	19,87	6,33	2,94	23,45	6,17
2	5,0	40	0	36	1,38	11,92	8,93	7,24	0,31
3	5,0	60	0	24	9,97	44,35	1,27	13,10	0,21
4	5,0	60	0	36	9,61	0,62	13,62	16,29	13,81
5	10,0	40	0	24	27,68	35,49	11,12	19,22	13,80
6	10,0	40	0	36	18,23	18,36	9,82	9,42	11,56
7	10,0	60	0	24	31,69	7,99	3,07	1,14	12,72
8	10,0	60	0	36	8,80	23,07	16,59	7,18	5,54
9	5,0	40	4	24	36,66	12,76	2,08	0,23	14,06
10	5,0	40	4	36	7,94	7,76	5,21	7,34	1,04
11	5,0	60	4	24	70,44	22,84	2,65	14,19	12,83
12	5,0	60	4	36	6,92	12,65	14,19	2,73	13,23
13	10,0	40	4	24	31,90	8,02	5,62	6,17	19,92
14	10,0	40	4	36	7,71	13,80	18,10	11,72	19,63
15	10,0	60	4	24	14,97	19,61	7,91	14,82	18,83
16	10,0	60	4	36	28,38	24,76	5,65	9,09	14,32
17 (C)	7,5	50	2	30	58,99	79,03	91,49	71,25	58,11
18 (C)	7,5	50	2	30	61,25	79,13	96,14	71,21	59,97
19 (C)	7,5	50	2	30	61,01	78,02	96,18	70,74	56,76
20 (C)	7,5	50	2	30	61,0	78,15	96,22	71,00	57,00

Qs)-Quantidade do substrato, (Ui)-Umidade inicial, (AT)-Ácido Tânico, (T)-temperatura, C) ponto central.

7. Capítulo 5

Produção de tanase por linhagens de *Penicillium* de solos da Caatinga e da Mata Atlântica, no Estado de Pernambuco (Brasil) e avaliação dos seus perfis micotoxigênicos⁵

Roberta Cruz^{1,2}, Cledir Santos², Héctor Morales-Vale², Keila Aparecida Moreira³, Cristina Maria de Souza-Motta¹

¹Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-420, Brasil

²IBB-Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Micoteca da Universidade do Minho, Campos de Gualtar, Braga, Portugal

³Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, 52920-270, Brasil

Autor para correspondência: smotta@ufpe.br

⁵ Trabalho a ser submetido à Food Chemistry

Resumo

Trinta e cinco culturas pertencentes a diferentes espécies de *Penicillium* isoladas de solos da Caatinga e da Mata Atlântica, no Estado de Pernambuco (Brasil), foram avaliadas quanto às suas capacidades produtivas de tanase através da FES. A detecção da produção da citrinina, ocratoxina A e da patulina por cada isolado foi avaliada através da utilização das técnicas de CLAE e MALDI-TOF MS. Os 3 isolados melhores produtores de tanase foram *P. minioluteum* URM 6056, *P. griseofulvum* URM 6150 e *P. purpurogenum* URM 6277, com 69,43, 54,26 e 51,16 U mL⁻¹, respectivamente. Contudo, os isolados *P. minioluteum* URM 6046 e *P. purpurogenum* URM 6277 são indicados para estudos posteriores de otimização da produção de tanase. Ambos os isolados são excelentes produtores desta enzima e não produziram nenhum metabólito que a) absorva radiação na região do UV quando avaliado por CLAE e b) possua peso molecular para uma das 3 micotoxinas avaliadas por MALDI-TOF MS.

Palavras chave: Ocratoxina A, Patulina, Citrinina, *Penicillium*, Tanase, Fermentação em Estado Sólido

1. Introdução

A tanino acil hidrolase, mais conhecida como tanase (EC 3.1.1.20) é uma enzima envolvida na biodegradação de taninos. Esta enzima tem aplicações importantes, especialmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Essas aplicações devem-se, sobretudo, à capacidade da tanase em catalisar a hidrólise das ligações éster presentes nos galotaninos, elagitaninos e taninos complexos (Chávez-González et al., 2012).

Diferentes espécies de fungos filamentosos têm sido usadas para a produção de várias enzimas de importância biotecnológica, tais como a tanase (Chávez-González et al., 2012; El-Tanash et al., 2012; Selwal; Selwal, 2011). A tanase também é produzida por animais e vegetais. Porém, as tanases microbianas são mais estáveis e por isso são geralmente as mais utilizadas na produção industrial. O processo industrial de produção de tanase foi, durante muitos anos, através da Fermentação Submersa (FS) (Chávez-González et al., 2012). Por outro lado, a Fermentação em Estado Sólido (FES) tem sido referida como mais vantajosa para a indústria. Isto se deve, sobretudo, à economia no consumo de água e de energia, além da possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais (Pandey, 1992; Soccol, 1994).

O Brasil é globalmente reconhecido pelo progresso substancial na melhoria da qualidade e da segurança dos alimentos de origem agrícola que produz e na atenção que tem dado ao longo das últimas décadas à sustentabilidade ambiental. É um dos três maiores produtores e exportadores de açúcar, café, suco de laranja, soja, carne, tabaco, álcool, e de frangos de corte do mundo. Tem uma das maiores reservas de biodiversidade do mundo, e um grande número de agricultores com forte capacidade empreendedora. Além disso, tem uma grande disponibilidade de terra e água, contendo 13,5% do potencial da terra arável e 15,2% do potencial de recursos hídricos renováveis do mundo (Pereira et al., 2012).

No Brasil, os resíduos agroindustriais ricos em taninos, tais como os do umbu-cajá, fruto da umbu-cajazeira (*Spondias tuberosa* x *Spondias mombin*), são gerados em grandes quantidades pelas indústrias de polpas de frutas. Com o desenvolvimento sustentado deste país, esta demanda deve aumentar ainda mais nos próximos anos. Esses resíduos agroindustriais são considerados poluentes ambientais, mas podem servir como fontes de carbono e de nitrogênio para o micro-organismo na produção de tanase. Essa prática minimiza os custos de produção, agrega valor aos resíduos da agroindústria

e contribui para o equilíbrio ambiental (Soccol; Vandenberghe, 2003; Selwal; Selwal, 2011). Em países cuja economia tem um grande aporte na agricultura, como é o caso do Brasil, é de extrema importância ambiental o reaproveitamento de resíduos agroindústrias ricos em taninos. Tais resíduos podem ser úteis para a produção de tanase por indústrias alimentícias e farmacêuticas, contribuindo direta e positivamente no produto interno bruto do país (Sabu et al., 2005).

Dentre os gêneros de fungos, *Penicillium* é reconhecido como o segundo melhor produtor de tanase (Belur; Mugeraya, 2011). Porém, além de produzirem enzimas com aplicações em diversos setores da indústria, alguns isolados pertencentes a algumas espécies desse gênero, podem produzir micotoxinas (Samson; Frisvard, 2004). As micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidas por diversos gêneros de fungos filamentosos. Alguns desses compostos apresentam-se como potenciais agentes nefrotóxicos e carcinogênicos para os humanos e outros animais (Abrunhosa, 2008; Hoeltz et al., 2009; Abrunhosa et al., 2010).

A citrinina (CIT), a ocratoxina A (OTA) e a patulina (PAT) são as micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* que apresentam maior relevância para a indústria biotecnológica. A CIT é um poliquetídeo com peso molecular de 250,25 Da. Trata-se de uma micotoxina que apresenta ação nefrotóxica e é produzida principalmente por *Penicillium citrinum*. Porém, outras espécies de *Penicillium* mostraram-se também capazes de produzirem esta toxina (Frisvad et al., 2004; 2005).

A OTA é uma micotoxina termoestável que apresenta um peso molecular de 403,81 Da. Este metabólito é considerado citotóxico, nefrotóxico, carcinogênico, teratogênico e imunossupressor (Abrunhosa, 2008). As espécies de *Penicillium* que possuem isolados associados à produção da OTA são *P. verrucosum* e *P. nordicum*. A PAT é uma hidroxifuropiranona que apresenta um peso molecular de 154,12 Da. Trata-se de um metabólito secundário com potencial teratogênico e genotóxico (Morales et al., 2010). Alguns isolados de *Penicillium expansum* são reconhecidos como produtores de PAT.

As indústrias de produtos alimentícios que utilizam enzimas derivadas de culturas de fungos precisam que tais micro-organismos sejam classificados como “considerado geralmente como seguro” (do inglês: *Generally Regarded as Safe*, GRAS), ou seja, não produtores de micotoxinas (Pariza; Foster, 1983). Se algumas espécies de *Penicillium* podem possuir isolados capazes de produzirem tais micotoxinas,

faz-se necessária a utilização de metodologias de detecção desses metabólitos, antes da seleção das linhagens para à sua utilização nos processos industriais.

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta é uma ferramenta comumente utilizada para detectar as micotoxinas produzidas por fungos. Também, a espectrometria de massas pela técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight*, MALDI-TOF MS), permite a análise de biomoléculas de baixo peso molecular de forma rápida e econômica, com um sistema de preparação da amostra relativamente simples. O MALDI-TOF MS pode ser, por isso, uma alternativa moderna e eficiente para a detecção de micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* (Blechová et al., 2006; Kemptner et al., 2009).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram detectar e quantificar a produção de tanase através da FES, com o uso de resíduos de umbu-cajá como substrato, por 35 linhagens pertencentes a 35 espécies de *Penicillium* isoladas de solos da Caatinga e da Mata Atlântica, no Estado de Pernambuco (Brasil), bem como detectara produção da CIT, OTA e PAT por estas espécies, através da utilização das técnicas de CLAE e MALDI-TOF MS.

2. Material e Metodos

2.1. Micro-organismos

Neste trabalho foram isoladas 35 culturas, pertencentes a 35 espécies diferentes do gênero *Penicillium*, das quais 22 foram provenientes de solos da Caatinga enquanto que 13 foram isoladas dos solos da Mata Atlântica no Estado de Pernambuco (Brasil) (Tabela 1). Todos os isolados estavam preservados há no máximo dois anos nos métodos sob óleo mineral e de liofilização na coleção de culturas Micoteca URM (Recife, Pernambuco, Brasil). A identificação de todos os isolados foi realizada por taxonomia clássica e baseou-se na observação das características macroscópicas (coloração, consistência e diâmetro) e microscópicas (estruturas somáticas, esporos e esporóforos) das colônias, como descrito em detalhes por Cruz et al., (2013, no prelo).

2.2. Reativação das Culturas

Todos os isolados das espécies de *Penicillium* preservados sob óleo mineral, foram inoculados em Caldo Glicosado contido em tubos de ensaio (Lacaz et al., 2002),

incubados por 7 dias a 28 °C (± 2 °C). Após o crescimento, os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo o meio Ágar Extrato de Malte (MEA, extrato de malte 20 g/L, peptona 1 g/L, glicose 20 g/L, ágar 20 g/L) e incubados por até 7 dias a 28 °C (± 2 °C).

2.3. *Produção de tanase por FES*

Os resíduos de umbu-cajá foram obtidos de uma indústria de polpa de frutas na cidade do Recife (Pernambuco, Brasil). Os resíduos foram lavados com água destilada esterilizada e secos em estufa a 55 °C durante 48h. O material seco foi triturado em um processador de alimentos (Mallory Maggiore PRÓ 14580-01, Maranguape, Ceará, Brasil) até a obtenção de partículas com cerca de 50 μm . Em seguida, o material obtido foi armazenado em recipiente escuro à 28 °C (± 2 °C) até o momento da fermentação (Treviño-Cueto et al., 2007; Maciel et al., 2013).

Cada isolado foi crescido e mantido em MEA a 30 °C durante 7 dias. Em seguida, esporos de cada cultura foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 ml de água destilada estéril, suplementada com 0,1% de Tween-80. Os esporos viáveis foram determinados pela técnica de contagem em placa e a suspensão de esporos na concentração de 5×10^8 esporos/mL, foi inoculado para os ensaios da FES (Sabu et al., 2005). A estimativa do teor de taninos, presentes nos resíduos de umbú-cajá, foi procedida de acordo com o método de precipitação de proteínas descrito por Haggerman; Butler (1978).

Uma solução aquosa de sais [0,5% de solução aquosa de NH_4NO_3 (p/v), 0,1% de solução aquosa de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p/v) e 0,1% de solução aquosa de NaCl (p/v)] foi utilizada para umedecer o meio para a FES. O pH final do meio foi ajustado a 5,0 e em seguida a solução foi esterilizada durante 15 min a 121 °C (Sabu et al., 2005). Cinco gramas de resíduo de umbu-cajá foram adicionados a frascos tipo Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, previamente esterilizados durante 30 min a 121 °C. O substrato foi umedecido com 5 ml da solução salina descrita acima e inoculado com 1 ml da solução de esporos de fungos na concentração previamente descrita. O conteúdo foi misturado e incubado em agitador (Tecnal TE421, São Paulo, Brasil) a 150 rpm, durante 96h a 30 °C (Sabu et al., 2005).

Após a incubação, a cada frasco de Erlenmeyer foram adicionados 50 mL de água destilada esterilizada, suplementada com 0,01% de Tween 80. Em seguida, os

frascos foram mantidos sob agitação em um agitador Tecnal TE421 (São Paulo, Brasil), a 150 rpm por 10 min. Os extratos brutos foram então filtrados através de papel de filtro Whatman N° 1 e os filtrados foram acondicionados e conservados em frascos ambarinos a 4 °C para posterior análise (Sabu et al., 2005).

2.4. Atividade da tanase

A atividade enzimática foi determinada pelo método de Sharma et al., (2000). As amostras foram lidas em um espectrofotômetro Hitachi-U5100 (Tóquio, Japão) a 520 nm e a atividade enzimática foi expressa em U mL⁻¹. Uma unidade da tanase foi definida como a quantidade da enzima necessária para libertar um µmol de ácido gálico por minuto, nas condições definidas da reação. O rendimento da enzima foi expresso em U/mL/min.

2.5. Preparação das amostras de micotoxinas padrão

Todos os reagentes usados nas preparações das amostras de micotoxinas padrão foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os padrões da CIT, OTA e PAT foram diluídos em acetonitrila para concentração de 1mg/mL e posterior análise por CLEA (Morales et al., 2008).

2.6. Extração da CIT e PAT produzidas por espécies de Penicillium e detecção por CLAE

Para a produção da CIT e da PAT, os isolados foram inoculados em MEA contidos em placas de Petri, incubadas a 25 °C (\pm 2,0 °C), no escuro, durante 7 dias. Em seguida, três fragmentos de 5 mm foram removidos a partir do centro para a borda de cada colônia. Os fragmentos foram então transferidos para frascos de vidro ambarino de 4 mL de capacidade, aos quais foram adicionados 2 mL de acetato de etilo, e agitados durante 1 minuto. Em seguida, mantidos em repouso durante 1 hora a 25 °C (\pm 2,0 °C). Após o repouso, os frascos foram agitados mais uma vez por 1 minuto e os sobrenadantes foram transferidos para frascos ambarinos de 4 mL de capacidade com o auxílio de uma seringa. O solvente foi evaporado sob uma corrente de nitrogênio e o sedimento foi ressuspenso em 2 mL de água com o pH previamente ajustado a 4 pela adição de ácido acético glacial. Esta suspensão foi filtrada através de filtros de seringa

PFTE de 0,45 μm e transferida para um frasco de CLAE (Morales et al., 2008). De cada amostra, foram reservados 0,2 mL para realização das análises por MALDI-TOF MS.

Os conteúdos da CIT e da PAT foram determinados por CLAE de fase reversa. A fase móvel foi composta pela solução acetonitrila:água (5:95 v/v) e a coluna utilizada foi uma Water Spherisorb ODS2 (4.6 x 250 mm; 5 μm). Para a CIT as amostras foram analisadas utilizando-se um cromatógrafo equipado com um detector de fluorescência Jasco FP-920 ($\lambda_{\text{ex}} = 331 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$). Enquanto a PAT foi detectada sob UV a 276 nm (Morales, et al. 2008). As amostras foram consideradas positivas quando um pico foi produzido no tempo de retenção semelhante ao do padrão, com uma altura cinco vezes superior ao ruído da linha de base.

2.7. Extração da OTA produzida por espécies de *Penicillium* e detecção por CLAE

Para a produção da OTA, os isolados de *Penicillium* foram inoculados no meio de indução Extrato de Levedura Sacarose (YES, extrato de levedura 20 g/L, sacarose 150 g/L, ágar 20 g/L). As placas foram incubadas a 25 °C durante 7 dias no escuro. Em seguida, três fragmentos de 5 mm foram inoculados como descrito anteriormente. Estes materiais foram transferidos para frascos de vidro ambarino de 4 mL de capacidade, aos quais foram adicionados 2 mL de metanol (Santos et al., 2002). Após 60 minutos, os extratos foram filtrados através de filtros de seringa PFTE de 0,45 μm , mantidos a 4 °C e, em seguida, analisados por CLAE (Bragulat et al., 2008). De cada amostra, foram reservados 0,2 mL para realização das análises por MALDI-TOF MS. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna C18 Pack ODS-AQ (YMC, 4.6 mm x 250 mm, 5 μm), equipada com uma pré-coluna de mesma fase estacionária (Bragulat et al., 2001).

As amostras foram analisadas utilizando-se um cromatógrafo equipado com um detector de fluorescência Jasco FP-920 ($\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$). Na execução dos ensaios, o volume de injeção foi de 50,0 μL e a coluna foi mantida a uma temperatura constante de 28 °C. A fase móvel foi constituída da solução acetonitrila:água:ácido acético (99:99:2, v/v/v) e a eluição ocorreu com uma vazão de 0,8 mL/minuto. O padrão de OTA utilizado foi injetado em uma concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ (p/v). As amostras foram consideradas positivas quando um pico foi produzido no tempo de retenção semelhante ao do padrão, com uma altura cinco vezes superior ao ruído da linha de base.

2.8. Detecção da CIT, OTA e da PAT por MALDI-TOF-MS

Cada amostra de crude (0,5 μL), separada previamente para as análises por espectrometria de massas, foi aplicada na placa de MALDI-TOF MS (Flexi- Mass™, ShimadzuBiotech,UK). Em seguida, 0,5 μL da solução matriz do ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA, Fluka, Buchs, Suíça, CHCA saturado em 33% de etanol, 33% acetonitrila, 31% de água e 3% de ácido trifluoro-acético) foi adicionada sobre cada amostra e misturada suavemente com a ponteira da micropipeta. A placa foi mantida 25 °C ($\pm 2,0$ °C) até a evaporação da fase líquida. Todas as amostras foram analisadas em triplicata (Elosta et al., 2007).

De acordo com o método analítico desenvolvido neste trabalho, a calibração externa do equipamento foi realizada pela utilização de uma mistura dos padrões de Angiotencina, P14R e Bradiquinina (ProteoMass™ MALDI Calibration Kit, Sophia-Antipolis, França) em matriz de CHCA, de acordo com as instruções do fornecedor. Os espectros foram gerados em um espectrômetro de MALDI-TOF MS, modelo Axima LNR system (Kratos Analytical, Shimadzu, Manchester, Reino Unido), equipado com um laser de nitrogênio que opera a 337 nm. Os espectros foram adquiridos em modo positivo linear, com uma voltagem de aceleração de + 20 kV, em uma faixa de massas de 100 - 500 (m/z).

3.0 Resultados

Todos os isolados de *Penicillium* preservados sob o método de óleo mineral por um período de até 2 anos, estavam viáveis e apresentaram características macroscópicas e microscópicas típicas das respectivas espécies. O teor de taninos nos resíduos secos de umbú-cajá foi de 12,20 U/g. Todos os isolados produziram tanase através da FES com resíduos de umbu-cajá como substrato (Tabela 2). Nas condições de análise avaliadas neste trabalho, dos 35 isolados de *Penicillium* utilizados no ensaio, 22 isolados (*c.a.* 65%) foram capazes de produzir tanase entre cerca de 10 e 69 U mL⁻¹. Cerca de 69% (13 em 22 isolados) provenientes da Caatinga produziram tanase com uma atividade acima de 10 U mL⁻¹. Uma relação muito próxima a estes valores também foi encontrada para os isolados provenientes da Mata Atlântica, onde 59% (9 em 13 isolados) produziram tanase com uma atividade acima de 10 U mL⁻¹. Dentre os isolados pertencentes às

diferentes espécies de *Penicillium* avaliadas neste trabalho, os três melhores produtores de tanase foram *Penicillium minioluteum* URM 6056, *P. griseofulvum* URM 6150 e *P. purpurogenum* URM 6277, com 69,43, 54,26 e 51,16 U mL⁻¹, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos pela técnica de CLAE, não foram detectadas produções da CIT e/ou da OTA por nenhum dos isolados avaliados neste trabalho. Contudo, a PAT foi detectada através desta técnica cromatográfica apenas para o isolado *Penicillium brasilianum* URM 6892 (Tabela 1). Para a CIT e OTA, os tempos de retenção nas melhores condições de operação foram 10,8 e 13,4 min, respectivamente, e o tempo total da eluição foi de 20 min. Para a PAT, o tempo de retenção foi de 12 min e o tempo total da eluição foi de 20 min. No caso do único isolado que apresentou resultado positivo para a PAT, o perfil cromatográfico foi usado para confirmar a identidade desse metabólito e para a quantificação dessa micotoxina através da área do pico.

De acordo com as análises por MALDI-TOF MS, não foram observados picos com valores de massas moleculares equivalentes à massa molecular da CIT em nenhuma das amostras dos isolados avaliados neste estudo. Por outro lado, através desta técnica espectrométrica foram detectados picos com os valores das massas moleculares da OTA e da PAT para 1 e 11 isolados de *Penicillium*, respectivamente, como apresentado na Tabela 1.

4.0 Discussão

Trabalhos relacionados com produção de tanase através da FES, utilizando resíduos agroindustriais são escassos. Sabu et al., (2005) propuseram o uso de resíduos de tamarindo, fruto da tamarineira (*Tamarindus indica* L) e do dendê, fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*) como dois agrorresíduos com potencial para a produção da tanase por fungos. Nesse estudo os autores obtiveram 6,44 U/g e 13,03 U/g da tanase, pelo uso de cada resíduo, respectivamente.

Nos últimos anos, alguns autores têm utilizado folhas de diferentes plantas como substratos agrofloretais para indução da produção da enzima (Kumar et al., 2007; Manjit et al., 2008; Selwal; Selwal, 2011). Kumar et al. (2007), por exemplo, avaliaram o uso de folhas da jameloeira (*Syzygium cumini*), árvore tropical que tem as folhas ricas em taninos, como substrato para a produção de tanase por *Aspergillus ruber*. Nesse

estudo, os autores obtiveram 69 U/g como atividade máxima de tanase, após 96h de ensaio, a 30°C e a pH 5,5.

Manjit et al., (2008) avaliaram folhas de árvores frutíferas diferentes, nomeadamente: *Phyllanthus emblica*, *Zizyphus mauritiana*, *Diospyros montana*, *Prosopis juliflora* e de *Syzygium cumini*, como substratos para produção de tanase. De acordo com os autores, os melhores parâmetros foram estabelecidos para produção de tanase através da FES, pelo uso do *Aspergillus fumigatus*. Após a otimização do processo, uma produção máxima de tanase na ordem dos 174,32 U/g foi obtida, ao fim de 96 h, a 25 °C e a pH 5. Neste caso, as folhas de *S. cumini* apresentaram-se como os melhores substratos para produção da enzima. Selwal; Selwal (2012), por sua vez, avaliaram a produção de tanase pelo isolado *Penicillium atramentosum* KM proveniente de efluentes de curtume. Esse estudo foi realizado através da FS, utilizando folhas de *P. emblica*, *Z. mauritiana*, *D. montana*, *S. cumini* e *P. juliflora* como substratos.

Os ensaios fermentativos foram realizados a 30 °C por 72 h. De acordo com os autores, os melhores substratos foram as folhas de *P. emblica*, que apresentaram uma atividade máxima de tanase na ordem dos 32,8 U mL⁻¹, quando as folhas trituradas foram usadas em uma concentração de 2% (p/v), bem como as folhas de *P. juliflora* que apresentaram uma atividade máxima de tanase na ordem dos 34,7 U mL⁻¹, quando as folhas trituradas foram usadas em uma concentração de 3% (p/v).

Esses dados da literatura comprovam que a utilização de resíduos agroindustriais e agrofloretais como substratos para a produção de tanase potencializam a produção desta enzima pelos micro-organismos. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, verificam-se que as condições utilizadas tais como a temperatura, o modo de fermentação (FES), o resíduo de umbu-cajá e cada isolado de *Penicillium* avaliado apresentaram-se como variáveis que conduziram a uma produção de tanase bastante expressiva e diferenciada dos dados obtidos por outros autores e apresentados na literatura (Kumar et al., 2007; Manjit et al., 2008; Selwal; Selwal, 2011).

De acordo com os dados obtidos neste trabalho sobre a capacidade produtiva de tanase por estes isolados de *Penicillium*, não houve nenhuma relação direta entre a produção da enzima e a origem geográfica e climática, como é o caso do ambiente extremo e pobre em nutrientes orgânicos e minerais que é o solo da Caatinga, ou do ambiente rico em nutrientes orgânicos e minerais que é o solo Mata Atlântica (Cruz et al., 2013, no prelo). Entre cerca de 59 e 69% dos isolados provenientes dos solos da

Mata Atlântica e da Caatinga, respectivamente, apresentaram perfis de produção da enzima a cima dos 10 U mL⁻¹.

A distribuição estatística dos isolados de *Penicillium* que apresentaram melhores perfis de produção enzimática esteve de acordo com a distribuição estatística da origem dos isolados. Ou seja, cerca de 1/3 da população total em estudo foi isolada no solo da Caatinga, enquanto que 2/3 desses fungos são provenientes do solo da Mata Atlântica. Neste caso, dos 3 isolados melhores produtores da enzima, 2 foram provenientes do solo da Caatinga (*P. minioluteum* URM 6046 e *P. purpurogenum* URM 6277), enquanto que 1 foi proveniente do solo da Mata Atlântica (*P. griseofulvum* URM 6150).

Os isolados microbianos, o agrorresíduo escolhido e as condições de fermentação usadas conduziram à obtenção de atividades enzimáticas muito promissoras, quando comparadas às descritas na literatura em condições similares às aqui usadas. Quando comparado com os dados da literatura, mesmo o isolado que apresentou a menor atividade de tanase, na orde dos 2,64 U mL⁻¹ (*Penicillium adametzii* URM 6275), também teve um perfil promissor de produção da enzima (Kumar et al., 2007; Manjit et al., 2008; Selwal; Selwal, 2011).

Segundo Paterson; Lima (2010), as condições do ambiente, tais como: a quantidade de nutrientes disponíveis, a temperatura, a atividade da água e do oxigênio, são fatores cruciais para o desenvolvimento de fungos produtores, ou não, desses metabólitos tóxicos. Contudo, a produção de micotoxinas é um fator dependente da linhagem e não da espécie, de modo que, dentro de uma determinada espécie podem haver isolados produtores, ou não, de uma determinada micotoxina. No presente trabalho não foi observada uma relação clara e direta entre a origem geográfica e climática dos isolados de *Penicillium* avaliados e a produção desses metabólitos tóxicos (Tabela 1).

Algumas linhagens de *Penicillium verrucosum* e *P. citrinum* têm sido frequentemente relatadas como produtoras de CIT (Bragulat et al., 2008; Greenhill et al., 2008). Tal situação não pôde ser evidenciada no presente estudo, onde produção desta micotoxina não foi detectada por CLAE ou MALDI-TOF MS para *P. citrinum* URM 6224, nem para os outros 34 isolados avaliados. De um modo geral, as linhagens de *Penicillium* relatadas como produtoras de CIT têm sido isoladas de grãos como os de aveia, cevada, milho e trigo ou diretamente de culturas, como a de arroz (Freire et al.,

2007). São raros os estudos da avaliação do potencial micotoxigênico de fungos provenientes de solos, como os utilizados no presente estudo.

De acordo com a relação clara entre o nicho ecológico e a produção da CIT por espécies de *Penicillium* apresentada na literatura, a não detecção dessa micotoxina nos isolados avaliados no presente estudo pode-se dever ao fato dessas culturas terem sido isoladas diretamente do solo onde as condições e estímulos para a produção desses compostos não são metabolicamente favoráveis.

As linhagens de espécies de *Penicillium* relatadas como produtoras de OTA têm sido frequentemente isoladas de grãos (Lund; Frisvad, 2003). De acordo com Cabañas et al., (2009), apenas as espécies *P. verrucosum* e *P. nordicum* são reconhecidamente produtores de OTA. Porém, Vega; Posada, (2006) observaram a produção desta toxina, através da técnica de CLAE, por linhagens pertencentes a *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* e *P. oxalicum*, obtidas como endofíticas de *Coffea arabica*. No presente estudo, ressaltamos o primeiro relato de uma linhagem de *P. rolfsii* URM 6216 como produtora de OTA, detectada através de MALDI TOF-MS.

As linhagens das espécies de *Penicillium* produtoras de PAT têm sido isoladas em frutos frescos tais como: maçã (Morales et al., 2010; Reddy et al., 2010; Tolaini et al., 2010), uva (Caldas et al., 2008), ameixa, kiwi, pêssigo e damasco (Reddy et al., 2010), bem como em sucos não fermentados de maçã (Celli et al., 2009). Assim como no caso da produção de CIT por linhagens de espécies de *Penicillium*, há aqui uma relação entre a produção da PAT e o ambiente e/ou substrato onde o fungo cresce. A maioria das referências da literatura sobre a detecção da produção PAT de fungos isolados tanto de frutos quanto de sucos fermentados de maçã, apontam apenas para *P. expansum* como produtor exclusivo desta toxina (Caldas et al., 2008; Celli et al., 2009; Morales et al., 2010; Reddy et al., 2010; Tolaine et al., 2010).

A detecção de algumas micotoxinas por CLAE com detector de UV pode não ser precisa. Isto deve-se à falta de absorção da luz de UV por estas moléculas (Elosta et al., 2007). De fato, no presente estudo para os resultados obtidos por CLAE, a PAT foi detectada apenas para o isolado *P. brasilianum* URM 6892. Entretanto, quando analisada por MALDI-TOF MS não foi detectada a produção de nenhum composto com o peso molecular da PAT para esta amostra. Isto é um indicativo de que o pico observado pelo CLAE pode corresponder a outro metabólito do fungo que absorve na

mesma região do UV para a PAT, porém tem um peso molecular diferente desta micotoxina.

Através das análises por MALDI-TOF MS, foram observados a presença de um metabólito com peso molecular equivalente ao da PAT (154,12 Da) para 11 linhagens pertencentes a 11 espécies diferentes de *Penicillium* (Tabela 1). Este é o primeiro relato da produção desta toxina por estas espécies de *Penicillium*. Tais resultados podem ser justificados pela alta sensibilidade atribuída à espectrometria de massas por MALDI-TOF MS, que é capaz de analisar um analito até à concentração de 10^{-18} Da (1,0 attomol); ou por se tratar de outro metabólito produzido por linhagens de espécies de *Penicillium* que apresenta a mesma massa molecular da PAT. Para uma resposta rápida às empresas do agronegócio, o uso de novas técnicas que permitam uma análise direta de micotoxinas em matérias-primas como grãos ou extratos fúngicos é fundamental. Por isso, a aplicação de métodos rápidos e mais sensíveis que a técnica de CLAE, como é o caso do MALDI-TOF MS, faz-se necessária.

5.0 Conclusões

Todos os 35 isolados de *Penicillium* são produtores de de tanase, variando entre 2,64 e 69,43 U mL⁻¹, com destaque para *Penicillium minioluteum* URM 6056, *P. griseofulvum* URM 6150 e *P. purpurogenum* URM 6277, com 69,43, 54,26 e 51,16 U mL⁻¹, respectivamente. Não foi observada nenhuma relação direta entre a produção de tanase e de micotoxinas e a origem geográfica e climáticas dos isolados.

A técnica de CLAE não foi tão eficiente quanto a técnica de MALDI-TOF MS para a análise e detecção de micotoxinas. Contudo, análises adicionais tais como por ressonância magnética nuclear, seriam necessárias para a identificação efetiva desse metabólito secundário.

Os dois isolados *Penicillium minioluteum* URM 6046 e *P. purpurogenum* URM 6277 são recomendados para estudos de otimização da produção de tanase. Ambos os isolados são excelentes produtores desta enzima e não produziram nenhum metabólito que a) absorva radiação na região do UV quando avaliado por CLAE e b) possua peso molecular compatível com uma das 3 micotoxinas avaliadas por MALDI-TOF MS.

Finalmente, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que espécies de *Penicillium* presentes em, solos da Caatinga e da Mata

Atlântica no Estado de Pernambuco (Brasil) são importantes recursos biológicos capazes de produzir biocompostos com elevadíssimo interesse para o desenvolvimento econômico.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE, PE, Brasil) pelo apoio financeiro. Roberta Cruz agradece à Marília Maciel e à Fabiana Couto por toda a atenção e apoio dispensados durante as análises experimentais, bem como aos professores Nelson Lima e Armando Venâncio do Grupo de Micologia Aplicada da Universidade do Minho (Braga, Portugal) pelas frutíferas discussões científicas durante seu estágio em Portugal.

Tabela 1. Detecção da produção das micotoxinas Citrinina, Ocratoxina A e Patulina, através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectrometria de massa MALDI-TOF por espécies de *Penicillium* isoladas de solos de Caatinga e Mata Atlântica, mantidas na Micoteca URM.

Nº URM	Espécie	Local de Isolamento	CLAE			MALDI-TOF		
			CIT	OTA	PAT	CIT	OTA	PAT
6275	<i>Penicillium adametzii</i> K.M. Zalesky	C	-	-	-	-	-	+
6026	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx	C	-	-	-	-	-	+
5994	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	MA	-	-	-	-	-	-
6892	<i>P. brasilianum</i> Bat.	C	-	-	+	-	-	-
6044	<i>P. canescens</i> Sopp	MA	-	-	-	-	-	-
6020	<i>P. citreonigrum</i> Thom	MA	-	-	-	-	-	-
6224	<i>P. chrysogenum</i> Thom	MA	-	-	-	-	-	-
6224	<i>P. citrinum</i> Sopp	C	-	-	-	-	-	-
6147	<i>P. commune</i> Thom	MA	-	-	-	-	-	-
5967	<i>P. corylophilum</i> Dierckx	MA	-	-	-	-	-	-
6018	<i>P. decumbens</i> Thom	MA	-	-	-	-	-	-
6137	<i>P. fellutanum</i> Biourge	MA	-	-	-	-	-	-
6289	<i>P. funiculosum</i> Thom	C	-	-	-	-	-	-
6092	<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	C	-	-	-	-	-	-
6150	<i>P. griseofulvum</i> Dierckx	MA	-	-	-	-	-	+
6223	<i>P. implicatum</i> Biourge	C	-	-	-	-	-	+
6041	<i>P. janczewskii</i> Zaleski	C	-	-	-	-	-	-
5993	<i>P. janthinellum</i> Biourge	MA	-	-	-	-	-	-
6288	<i>P. lanosum</i> Westling	C	-	-	-	-	-	-
6042	<i>P. lapidosum</i> Raper & Fennell	C	-	-	-	-	-	-

Tabela 1. Cont. Detecção da produção das micotoxinas Citrinina, Ocratoxina A e Patulina, através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectrometria de massa MALDI-TOF por espécies de *Penicillium* isoladas de solos de Caatinga e Mata Atlântica, mantidas na Micoteca URM.

Nº URM	Espécie	Local de Isolamento	CLAE			MALDI-TOF		
			CIT	OTA	PAT	CIT	OTA	PAT
6090	<i>P. lividum</i> Westling	C	-	-	-	-	-	-
6215	<i>P. melinii</i> Thom	C	-	-	-	-	-	-
6046	<i>P. minioluteum</i> Dierckx	C	-	-	-	-	-	-
6286	<i>P. montanense</i> M. Chr. & Backus	C	-	-	-	-	-	-
6233	<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom	C	-	-	-	-	-	+
6159	<i>P. pinophilum</i> Thom	C	-	-	-	-	-	+
6	<i>P. purpurogenum</i> Fleroff	C	-	-	-	-	-	-
277								
6135	<i>P. restrictum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbott	C	-	-	-	-	-	+
6216	<i>P. rolfsii</i> (Pers.) Sacc	C	-	-	-	-	+	-
6154	<i>P. sclerotiorum</i> J.F.H. Beyma	MA	-	-	-	-	-	+
6138	<i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	MA	-	-	-	-	-	+
6298	<i>P. spinulosum</i> Thom	C	-	-	-	-	-	+
6222	<i>P. verruculosum</i> Peyronel	C	-	-	-	-	-	+
6287	<i>P. vulpinum</i> (Cooke & Masse) Seifert & Samson	C	-	-	-	-	-	-
6158	<i>P. waksmanii</i> K.M. Zalessky	MA	-	-	-	-	-	-

(-) = não produtor da micotoxina; (+) = provável produtor da micotoxina; (C)= Solo de área de Caatinga; (MA)= Solo de área de Mata Atlântica.

Tabela 2. Atividade de tanase produzida por espécies de *Penicillium*, através de FES utilizando resíduo de sementes de umbu-cajá (*Spondias* spp.).

Nº URM	Espécie	Local do isolamento	Atividade da tanase U mL ⁻¹
6275	<i>Penicillium adametzii</i> K.M. Zalessky	CG	2,64
6026	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx	CG	19,97
5994	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	MA	3,77
6892	<i>P. brasilianum</i> Bat.	CG	15,63
6044	<i>P. canescens</i> Sopp	MA	10,67
6020	<i>P. citreonigrum</i> Thom	MA	12,70
6022	<i>P. chrysogenum</i> Thom	MA	13,13
6224	<i>P. citrinum</i> Sopp	CG	3,66
6147	<i>P. commune</i> Thom	MA	11,91
5967	<i>P. corylophilum</i> Dierckx	MA	5,14
6018	<i>P. decumbens</i> Thom	MA	18,94
6137	<i>P. fellutanum</i> Biourge	MA	9,67
6289	<i>P. funiculosum</i> Thom	CG	17,20
6092	<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	CG	7,70
6150	<i>P. griseofulvum</i> Dierckx	MA	54,26
6223	<i>P. implicatum</i> Biourge	CG	13,88
6041	<i>P. janczewskii</i> Zaleski	CG	6,49
5993	<i>P. janthinellum</i> Biourge	MA	15,12
6288	<i>P. lanosum</i> Westling	CG	8,22
6042	<i>P. lapidosum</i> Raper & Fennell	CG	21,66
6090	<i>P. lividum</i> Westling	CG	8,13
6215	<i>P. melinii</i> Thom	CG	21,59
6046	<i>P. minioluteum</i> Dierckx	CG	69,43
6286	<i>P. montanense</i> M. Chr. & Backus	CG	15,70
6223	<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom	CG	16,27
6159	<i>P. pinophilum</i> Thom	CG	2,96
6277	<i>P. purpurogenum</i> Fleroff	CG	51,16
6135	<i>P. restrictum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbott	CG	20,03
6216	<i>P. rolfsii</i> (Pers.) Sacc	CG	18,94
6154	<i>P. sclerotiorum</i> J.F.H. Beyma	MA	18,22
6138	<i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	MA	10,18
6298	<i>P. spinulosum</i> Thom	CG	3,75
6222	<i>P. verruculosum</i> Peyronel	CG	7,66
6287	<i>P. vulpinum</i> (Cooke & Masee) Seifert & Samson	CG	13,35
6159	<i>P. waksmanii</i> K.M. Zalessky	MA	4,82

(CG)= solo de Caatinga; (MA)= solo da Mata Atlântica.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os solos de áreas de ambos os biomas Caatinga e Mata Atlântica representam um significativo reservatório de comunidades de *Penicillium*. Tais comunidades são muito distintas, porém bem distribuídas em cada bioma. Contudo, os solos da Caatinga apresentam uma maior riqueza de espécies deste gênero em comparação aos solos da Mata Atlântica, e abriga ainda espécies raras como *Penicillium adametzii*, *P. biliaiae* e *P. lapidosum*, bem como espécie nova deste gênero.

Em período seco, existe uma maior riqueza de espécies de *Penicillium* nas áreas dos dois biomas, indicando que as espécies deste gênero são bem adaptadas a solos com baixa disponibilidade de água. Todas as linhagens das espécies de *Penicillium* isoladas de solos dos biomas Caatinga e Mata Atlântica apresentaram potencial biotecnológico para a produção de tanase através da FES, utilizando, como fonte de carbono, resíduos agroindustriais gerados por indústrias de polpas de frutas. A produção de tanase variou de acordo com o micro-organismo e com o resíduo avaliados, sendo o resíduo um importante estimulante para que o micro-organismo produza a enzima.

O resíduo de manga apresentou-se como o melhor indutor da produção de tanase. Os resíduos de cajá e umbu-cajá também estimularam a produção de tanase pelas linhagens avaliadas, porém em concentrações mais baixas do que no caso do resíduo de manga. As linhagens que destacaram-se pela produção de tanase através do uso de resíduos de cajá foram: *Penicillium simplicissimum* URM 6138, *P. brevicompactum* URM 5994 e *P. commune* URM 6147. Pelo uso de resíduos de umbu-cajá as linhagens que se destacaram foram: *P. minioluteum* URM 6056, *P. janthinellum* URM 5993 e *P. purpurogenum* URM 6277. De todas as linhagens testadas, as que destacaram-se na produção de tanase, utilizando resíduos de manga como fonte de carbono foram: *Penicillium rolfsii* URM 6216, *P. griseofulvum* URM 6150 e *P. glabrum* URM 6092, com 89,49 U mL⁻¹, 85,93 U mL⁻¹, 59,26 U mL⁻¹, respectivamente. Tais resultados superam os já relatados pela literatura para atividades da tanase produzidas por linhagens de *Penicillium*.

Penicillium adametzii, *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. canescens*, *P. citreonigrum*, *P. commune*, *P. decumbens*, *P. fellutanum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. janczewskii*, *P. janthinellum*, *P. lanosum*, *P. lapidosum*, *P. lividum*, *P. melinii*, *P. minioluteum*, *P. oxalicum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. rolfsii*, *P.*

sclerotiorum, *P. simplicissimum*, *P. spinulosum*, *P. verruculosum* e *P. waksmanii* estão sendo relatadas pela primeira vez como produtoras de tanase. Dentre estas, *P. rolfsii* de destaca nas seguintes condições: 7,5 g de resíduos de manga, suplementado com 2% de ácido tânico, 50% de umidade e incubação a 30 °C, durante 72 h. Os resíduos de manga e umbu-cajá gerados por indústrias de polpa de frutas podem ser uma matéria-prima importante para produção de tanase através de FES, visando aumentar a produção, reduzir os custos da produção e minimizar os impactos ambientais.

Quando avaliadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e por espectrometria de massas pela técnica de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight* (MALDI-TOF MS), nenhuma das linhagens de *Penicillium* avaliadas nesta tese apresentou potencial para a produção de CIT. Por outro lado, a linhagem *Penicillium rolfsii* URM 6216 apresentou-se como produtora de OTA. Apenas as linhagens *P. aurantiogriseum* URM 6026, *P. brasilianum* URM 6892, *P. implicatum* URM 6223, *P. oxalicum* URM 6233, *P. pinophilum* URM 6159, *P. restrictum* URM 6135, *P. sclerotiorum* URM 6154, *P. simplicissimum* URM 6138, *P. spinulosum* URM 6298 e *P. verruculosum* URM 6222, foram caracterizadas nesta tese como produtoras de PAT.

Os solos dos biomas Caatinga e Mata Atlântica abrigam uma alta diversidade de espécies de *Penicillium*, sendo que a Caatinga é um reservatório de espécies raras e também de espécies novas deste gênero. As linhagens de *Penicillium* provenientes de solos desses biomas apresentam um elevado potencial para a produção de tanase através da FES e poucas se apresentaram como produtoras de micotoxinas, fato que limitaria a utilização de tais linhagens por determinados setores industriais para produção de tanase. As origens geográficas e climáticas não estão diretamente relacionadas com a produção de tanase nem de micotoxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrunhosa, L.; Paterson, R.R.M., Venâncio, A. Biodegradation of ochratoxin A 2010. for food and feed decontamination. *Toxins* 2: 1078-1099.
- Abrunhosa, L.J. Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.
- Aguilar, C.N. Rodríguez, R.; Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L.A., Ramírez-Coronel, A., Contreras-Esquivel, J.C. 2007. Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 47–59.
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E.; Viniegra-González, G. 2001a. Induction and repression patterns of fangal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry* 36: 565-570.
- Aguilar, C.N., Gutiérrez-Sanches, G. 2001. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolases. *Food Science Technology International* 7 (5): 373-382.
- Aguilar, C.N.; Augur, C.; Favela-Torres, E., Viniegra-González, G. 2001b. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in influence of glucose and tannic acid. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* 20: 612-614.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.
- Alves, J.J.A., Araújo, M.A., Nascimento, S.S. 2009. Degradação da caatinga: uma investigação ecogeográfica. *Caminhos de Geografia* 9 (27): 143–155.
- Anvisa. 2013. Anvisa estabelece limites para presença de micotoxinas em alimentos. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 de janeiro 2013.
- Asan, A. 2000. Check List of *Aspergillus* and *Penicillium* Species Reported From Turkey. *Turkish Journal of Botany* 24: 151-167.
- Asan, A. 2004. *Aspergillus*, *Penicillium*, and Related Species Reported from Turkey. *Mycotaxon* 89 (1): 155-157.
- Asan, A.; Okten, S.S., Sen, B. 2010. Airborne and soilborne microfungi in the vicinity Hamitabat Thermic Power Plant in Kirklareli City (Turkey), their seasonal distributions and relations with climatological factors. *Environmental Monitoring and Assessment* 164: 221–231.
- Atlas, R.M., Bartha, R. 1993. *Microbial Ecology Fundamentals and Applications*. United States, Benjamin/Cummings Publishing.
- Bandoh, S., Takeuchi, M., Ohsawa, K., Higashihara, K., Kawamoto, Y., Gotoa, T. 2009. Patulin distribution in decayed apple and its reduction. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 379–382.

- Banerjee, R., Mukherjee, G., Patra, K.C. 2005. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. *Bioresource Technology* 96 (8): 949-953.
- Barbosa, M.R., Thomas, W. 2002. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Mata Atlântica no Nordeste. In: Araújo, E.L. et al., (eds.) *Biodiversidade, conservação e uso sustentável da florada Brasil*. Recife: UFRPE, Brasil/Imprensa Universitária, pp. 19 – 22.
- Barreiro, E. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. 2009. *Química Nova* 32 (3): 679-688.
- Barreta, E. 2001. Ecophysiology and management response of the subtropical grasslands of Southern America. In: Gomide, J.A.; Mattos, W.R.S.; Silva, S.C. da (eds.) *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, EDIPUCRS.
- Batra, A., Saxena, R.K. 2005. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process Biochemistry* 40: 1553-1557.
- Battestin, V., Matsuda, L.K., Macedo, G.A. 2004. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alimentos e nutrição* 15 (1): 63-72.
- Begon, M.; Harper, J.L.; Townsend, C.R. 1990. *Ecology: Individuals, Population and Communities*. Inglaterra, Blackwell Sci Publ.
- Belmares, R., Contreras-Esquivela, J.C., Rodriguez-Herreraa, R., Coronelb, A.R., Aguilar, C.N. 2004. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensm Wiss u Technology* 37: 857-864.
- Belur, P.D., Mugeraya, G. 2011. Microbial Production of Tannase: State of the Art. *Research of Microbiology* 6 (1): 25-40.
- Biourge, P. 1923. Les moisissures du groupe *Penicillium* Link. *Cellule* 33: 7-331.
- Blechová, P., Havlová, P., Gajdo,ová D., Havel, J. 2006. New possibilities of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry to analyze barley malt quality. Highly sensitive detection of mycotoxins. *Environmental Toxicology* 4: 403-408.
- Boadi, D.K., Neufeld, R.J. 2001. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 590-595.
- Bon, E.P.S., Ferrara, M.A., Corvo, M.L. 2008. *Enzimas em Biotecnologia Produção, aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro, Editora Interciência.
- Bosco, J., Soares, K.T., Aguiar Filho, S.P., Barros, R.V. 2000. A cultura da cajazeira. João Pessoa: EMEPA, pp.29.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

- Bradoo, S., Gupta, R., Saxena, R.K. 1996. Screening of extracellular tannase producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. *Journal of General and Applied Microbiology* 42: 325-329.
- Bragulat, M.R., Martínez, E., Castellá, G., Cabañes, F.J. 2008. Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *International Journal of Food Microbiology* 126: 43-48.
- Brandon, K., Fonseca, G.A.B., Rylands, A.B., Silva, J.C.M. 2005. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. *Megadiversidade* 1 (1): 7-13.
- Brock, T.D. 1985. Life at high temperatures. *Science* 230: 132-138.
- Cabañas, R., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 2009. Comparison of methods to detect resistance of *Penicillium expansum* to thiabendazole. *Letters in Applied Microbiology* 48: 241-246.
- Caldas, G.M.M., Oliveira, R.C., Tessmann, D.J., Júnior, M.M. 2008. Ocorrência de patulina em uva fina (*Vitis vinífera* L. cv. "Rubi") com sinais de podridão ácida. *Ciência Rural* 38; 14-18.
- Câmara, I.G. 1996. *Plano de ação para a Mata Atlântica. Roteiro para a conservação e sua biodiversidade*. Séries Cadernos da Reserva da Biosfera.
- Carvalho, J.L.N., Avanzi, J.C., Silva, M.L.N., Mello, C.R., Cerri, C.E.P., 2010. Potencial de sequestro de carbono em diferentes biomas do Brasil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34 (2), 277-289. 109.
- Cavalcanti, M.A.Q., Oliveira, L.G., Fernandes, M.A., Lima, D.M. 2006. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 20 (4): 831-837.
- Celli, M.G., Coelho, A.R., Wosiacki, G., Boscolo, M., Cruz, C.H.G. 2009. Patulin determination in apples with rotten areas. *World Mycotoxin Journal* 2 (3): 279-283.
- Chalabuda, T.V. 1950. Species novae e genere *Penicillium* Link. Syst. Crypt. Inst. Bot. Acad. Sci. USSR 6, 161-169.
- Chávez-González M., Rodríguez-Durán, L.V., Balagurusamy, N., Prado-Barragán, A., Rodríguez, R., Contreras, J.C., Aguilar, C.N., 2012. Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. *Food Bioprocess Technology* 5, 445-459.
- Chen, J.L., Yen, J.H., Lin, W.S., Ku, W.L. 2002. A new synnematosus species of *Penicillium* from soil in Taiwan. *Mycologia* 94 (5): 866-872.
- Clark, F.E. 1965. Ágar-plate method for total microbial count. In. Black C.A.; Evans; D.D.; White J.L.; Ensminger, L.E.; Clark, F.E.; Dinaver, R.C. (eds.). *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties*. New York, Madson Inc. pp. 1460-1466.

- Colombo, A.F., JOLY, C.A. 2010. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology* 70 (3): 697-708.
- Costa, A.M., Ribeiro, W.X., Kato, E., Monteiro, A.R.G., Peralta, R.M. 2008. Production of tannase by *Aspergillus tamaritii* in Submerged Cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51: 399-404.
- Coutinho, F.P., Cavalcanti, M.A.Q., Yano-Melo, A.M. 2010. Filamentous fungi isolated from the rhizosphere of melon plants (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivated in soil with organic amendments. *Acta Botânica Brasílica* 24 (1): 292-298.
- Coutinho, L.M. 2006. O conceito de bioma. *Acta Botânica Brasílica* 20 (1): 13-23.
- Cruz, C.B.M., Vicens, R.S., Seabra, V.S., Reis, B.R., Faber, O.A., Richter, M., Arnaut, P.K.E., Araújo, M. 2007. Classificação orientada a objetos no mapeamento dos remanescentes da cobertura vegetal do bioma Mata Atlântica, na escala 1:250.000. In: *Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Florianópolis, Brasil, pp. 5691-5698.
- Cruz, R., Santos, C., Lima, J.S., Fernandes, M.J.S., Moreira, K.A., Souza-Motta, C.M. 2013. Diversity of *Penicillium* in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas of Pernambuco, Brazil: an ecological approach. *Nova Hedwigia* (no prelo).
- Deacon, L.J., Pryce-Miller, E.J., Frankland, J.C., Bainbridge, P.D.M., Robinson, C.H. 2006. Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 7-20.
- Domsch, K.H., Gams, W. Traute-Heidi, A. 2007. Compendium of soil fungi. 2nd ed. – IHW-Verlag, Eching.
- Durigan, G., Franco, G.A.D.C., Saito, M., Baitello, J.B. 2000. Estrutura e diversidade do componente arbóreo da floresta na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 23 (3): 361-373.
- Edwards, K.J. 1990. Fire and the Scottish Mesolithic: evidence from microscopic charcoal. In: Vermeersch, P. M.; Van Peer, P. (eds) *Contributions to the Mesolithic in Europe*. Leuven University Press.
- Edwards, S.G., O'callaghan, J., Dobson, A.D.W. 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research* 106: 1005-1025.
- Elosta, S., Gajdošová, D., Hégrová, B., Havel, J. 2007. MALDI TOF mass spectrometry of selected mycotoxins in barley. *Journal of Applied Biomedicine* 5: 39-47.
- El-Tanash, A.B., Sherief, A.A., Nour, A. 2012. Optimization the hydrolysis process of tannic acid for gallic acid production by tannase of *Aspergillus awamori* using response surface methodology. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 10: 9-17.
- Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). 2008. conhecimento e uso sustentável da biodiversidade brasileira: o programa biota-fapesp. FAPESP, São Paulo, SP. 204 p.

- Fonseca, H. 2013. Micotoxinas on line. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 05 de janeiro de 2013.
- Fraga, M.E., Pereira, M.G. 2012. Diversidade de Trichocomaceae Isolada de Solo e Serrapilheira de Floresta Atlântica. *Floresta e Ambiente*. 19 (4): 405-413.
- Fraga, M.E., Pereira, M.G., Barbosa, D.J., Melo, M.P. 2010. Diversity of isolated *Trichocomaceae* from soil in two forest ecosystems. *Ciência Florestal* 20 (1): 167-175.
- Fraga, M.E., Pereira, M.G., Souza, F.A. 2010. Micobiota do Solo de uma Área de Duna na Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, RJ. *Floresta e Ambiente* 17 (1): 1-7.
- Franca-Rocha, W., Silva, A.B., Nolasco, M.C., Lobão, J., Britto, D., Chaves, J.M., Rocha, C.C. 2007. Levantamento da cobertura vegetal e do uso do solo do Bioma Caatinga. In: *Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Florianópolis, Brasil, pp. 2629-2636.
- Freire, F.C.O., Vieira, I.G.P., Guedes, M.I.F., Mendes, F.N.P. 2007. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE.
- Frisvad, J.C., Lund, F., Elmholt, S. 2005. Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. *Journal of Applied Microbiology* 98: 684-692.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus. *Studies in Mycology* 49: 201-242.
- Ganga, P.S., Suchila, G., Nandy, S.C.; Santappa, M. 1977. Effect of environmental factors on the production of fungal tannase. *Leather Sci* 24: 8-12.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology* 61 (4): 1323-1330.
- Gomez, E.R., Pioli, R., Conti, M. 2007. Fungal abundance and distribution as influenced by clearing and land use in a vertic soil of Argentina. *Biology and Fertility Soils* 43: 373-377.
- Goto, B.T., Maia, L.C., Silva, G.A., OEHL, F. 2009. *Racocetra intraornata*, a new species in the Glomeromycetes with a unique spore wall structure. *Mycotaxon* 109: 483-491.
- Gould, G.W., Corry, J.E. 1980. *Microbial Growth and survival in Extremes of environment*. New York, Academic Press.
- Greenhill, A.R., Blaney, B.J., Shipton, W.A., Frisvad, J.C., Pue, A., Warner, J.M. 2008. Mycotoxins and toxigenic fungi in sago starch from Papua New Guinea. *Letters in Applied Microbiology* 47 (4): 342-347.

- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied Environmental Microbiology* 66: 5488-5491.
- Grishkan, I., Nevo, E. 2008. Soil microfungus communities of 'Evolution Canyons' in Israel – extreme differences on a regional scale. *Biological Journal of the Linnean Society* 93 (1): 157-163.
- Grishkan, I., Tsatskin, A., Nevo, E. 2008. Diversity of cultured microfungus communities in surface horizons of soils on different lithologies in Upper Galilee, Israel. *European Journal of Soil Biology* 44 (2): 180-190.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 809-812.
- Hall, T.A. 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Harris, D.M., Westerlaken, I., Van der Krog, Z.A., Gombert, A.K., Sutherland, J., Raamsdonk, L.M., Van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A.L., Pronk, J.T., Daran, J.M. 2009. Engineering of *Penicillium chrysogenum* for fermentative production of a novel carbamoylated cephem antibiotic precursor. *Metabolic Engineering* 11 (2): 125–137.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycology Research* 95: 641-655.
- Hoeltz, M., Fagundes, C.A., Alcayaga, E.A.L., Noll, I.B. 2009. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento *Ciência Rural* 39 (3) 803-808.
- Hong, S.B. Go, S.J., Shin, H.D., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97: 1316–1329.
- Houbraken, J.; Samson, R.A. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology* 70: 1–51.
- Houbraken, J.A.M.P., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2010. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity* 44: 117–133.
- Huang, B.C., Liu, R. 2007. Comparison of mRNA-display-based selections using synthetic peptide and natural protein libraries. *Biochemistry* 46: 10102-10112.
- Hyde, K.D., Zhang, Y. 2008. Epitypification: should we epitypify? *Journal of Zhejiang University* 9 (10): 842-846.
- Kemptner, J., Marchetti-Deschmann, M., Mach, R., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Allmaier, G. 2009. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization

- (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23(6): 877-84.
- Kennedy, A.C., Smith, K.L. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170: 75-86.
- Kirk, P.M., Cannon, F.P., Minter, D.W., Oliveira, J.A. 2008. Dictionary of the Fungi. 10th ed. – CAB International, Wallingford.
- Kirsop, B.E., Doyle, A. 1991. *Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures-A Manual of Laboratory Methods*. London, 2nd ed., Academic Press.
- Klink, C.A., Machado, R.B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1 (1): 147-155.
- Krebs, C.J. 1989. *Ecological Methodology*. New York, Harper & Row.
- Kumar, R., Sharma, J., Singh, R. 2007. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. *Microbiological Research* 162: 384-390.
- Kurek, E., Kornilowicz-Kowalska, T., Slomka, A., Melke, J. 2007. Characteristics of soil filamentous fungi communities isolated from various micro-relief forms in the high Arctic tundra (Bellsund region, Spitsbergen). *Polish Polar Research* 28 (1): 57-73.
- Lagemaat, J.V., Pyle, D.L. 2001. Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. *Chemical Engineers Journal* 84: 15-123.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Laufenberg, G., Kunz, B., Nystrom, M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. *Bioresource Technology* 87 (2): 167-198.
- Leal, I.L., Silva J.M.C., Tabarelli, M., Lacher JR, T.E. 2005. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *Megadiversidade* 1 (1): 139-146.
- Lejon, D.P.H., Chaussod, R., Ranger, J., Ranjard, L. 2005. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest (Morvan, France). *Microbiology Ecology*, 50: 614-625, 2005.
- Lekha, P.K., Lonsane, B.K. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in Applied Microbiology* 44: 215-260.

- Lewinsonhn, T.M., Prado, P.I. 2002. Biodiversidade Brasileira – Síntese do Estado Atual do Conhecimento. 1^a. ed. – Ed. Pinsky: São Paulo.
- Lund, F., Frisvad, J.C. 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology* 95: 1117–1123.
- Macedo, G.A., Matsuda, L.K., Battestin, V. 2005. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. *Ciência e Agrotecnologia* 29 (4): 833–838.
- Maciel, M., Ottoni, C., Santos, C., Lima, N., Moreira, K., Souza-Motta, C. 2013. Production of Polygalacturonases by *Aspergillus* Section Nigri Strains in a Fixed Bed Reactor. *Molecules* 18: 1660-1671.
- Madeira, Jr. J.V., Macedo, J.A., Macedo, G.A., 2012. A new process for simultaneous production of tannase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange pomace. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 477–482.
- Magalef, R. 1970. *Ecologia*. Barcelona, Ômega.
- Magurran, M.E. 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton, University Press.
- Mai, J., Chambers, L.J., McDonald, R.E. 1990. Process for inhibiting lipid oxidation in food and composition thereby. U.S. Patent 4.925.681. Malloch, D. 1985.
- Manjit, E.Y., Aggarwal, N.K., Kumar, K., Kumar, A. 2008. Tannase production by *Aspergillus fumigatus* MA under solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 3023–3030.
- Markovina, A.L., Pitt, J.I., Hocking, A.D., Carter, D.A., McGee, P.A. 2005. Diversity of the Trichocomaceae in the Katandra Nature Reserve, Central Coast, NSW, Australia. *Mycological Research* 109 (9): 964–973.
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* 29 (3): 365-73.
- Mattietto, R.A. 2005. *Technological study of a mixed nectar of caja (Spondias lutea L.) and umbu (Spondias tuberosa, Arruda Câmara)*. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, pp. 299.
- Menge, B.A., Sutherland, J.P. 1987. Community regulation: variation in disturbance, competition and predation in relation to environmental stress and recruitment. *American Naturalist* 130 (5): 730-757.
- Meschonat, B., Herrmann, H.A., Spannagel, R., Sander, V., Konieczny-Janda, G., Sommer, M. 2001. Enzyme pre-granules for granular fodder. U.S. Patent 6.221.406.

- Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshal, D.F., Husmeier, D., McGuire, G. 2004. TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics* 20: 1806–1807.
- Monteiro, J.M.M., Albuquerque, U.P., Araujo, E.L., Amorim, E.L.C. 2005. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova* 28 (5): 892-896.
- Morales, H., Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2010. Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. *Food Control* 21: 953-962.
- Morales, H., Sanchis, V., Coromines, J., Ramos, A.J., Marin, S. 2008. Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Food Microbiology* 25: 378–385.
- Morelato, L.P.C. 2000. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32 (4b): 786-792.
- Moss, M.O. 1987. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: Peberdy, J.F. (ed.) *Biotechnology Handbooks 1 Penicillium and Acremonium*. New York and London, Plenum Press, pp. 37-71.
- Murugan, K.S., Saravanababu, M., Arunachalam, M., 2007. Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. *Bioresource Technology* 98: 946-949.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, K. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-845.
- Nonaka, K., Masuma, R., Iwatsuki, M., Shiomi, K., Otaguro, K., Omura, S. 2011. *Penicillium viticola*, a new species isolated from a grape in Japan. *Mycoscience* 52 (5): 338-343.
- O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J.M., Vilgalys, R. 2005. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 5544-5550.
- Odum, E.P. 1985. *Ecologia*. Rio de Janeiro, Interamericana.
- Ogawa, H., Sugiyama, J. 2000. Evolutionary relationships of the cleistothecial genera with *Penicillium*, *Geosmithia*, *Merimbla* and *Sarophorum* anamorphs as inferred from 18S rDNA sequence divergence. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification (Samson R.A., Pitt, J.I. eds) Plenum Press, New York: 149–161.
- Ogawa, H., Yoshimura, A., Sugiyama, J. 1997. Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: Evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. *Mycologia* 89: 756–771.

- Onions, A.H.S., Brady, B.L. 1987. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: Peberdy, J.F. (Ed.) *Biotechnology Handbooks 1 Penicillium and Acremonium*. New York and London, Plenum Press, pp. 1-36.
- Pandey A. 1992. Recent Process Developments in Solid-State Fermentation. *Proceedings Biochemistry* 27: 109-117.
- Pandey, A. 2003. Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13 (2): 81-84.
- Pariza, M.W., Foster, E.M. 1983. Determining the safety of enzymes used in food processing. *Journal of Food Protection* 46: 453-458.
- Paterson, R.R.M., Lima, N. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International* 43: 1902–1914.
- Pereira, I.M., Andrade, L.A., Costa, J.R.M., Dias, J.M. 2001. Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. *Acta Botânica Brasílica* 15 (3): 413-426.
- Pereira, P.A.A., Martha Jr., G.B. Santana, C.A.M., Alves, E. 2012. The development of Brazilian agriculture: future technological challenges and opportunities. *Agriculture & Food Security* 1: 1-12.
- Perovano Filho, N., Silva, K.F.S., López, A.M.K. 2011. Decomposição fúngica de ácido tânico e outros compostos em efluente agroindustrial. *Acta Scientiarum. Technology* 33 (2): 145-153.
- Peterson, S.W. 2000. Phylogenetic analyses of *Penicillium* species based on ITS and LSU -rDNA nucleotide sequences. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus*. (Samson, R.A., Pitt, J.I., Eds). Hardwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 163–178.
- Peterson, S.W., Vega, F.E., Posada, F., Nagai, C. 2005. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia* 97(3): 659–666.
- Pinto, A.C.Q., Neto, F.P., Guimarães, T.G. 2011. Estratégias do melhoramento genético da manga visando atender a dinâmica de mercado. *Revista Brasileira de Fruticultura* Volume Especial, E. 64-72.
- Pinto, G.A.S., Brito, E.S. Andrade, A.M.R., Fraga, S.L.P., Teixeira, R.B. 2005a. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. *EMBRAPA Comunicado técnico online* 1:5.
- Pinto, G.A.S., Couri, S., Leite, S.G.F., Brito, E.S. 2005b. Tanase: conceitos, produção e aplicação. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamentos* 23 (2): 435-462.
- Pinto-Coelho, R.M. 2002. *Fundamentos em Ecologia*. São Paulo, Artmed.

- Pitt, J.I. 1979. *The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. London, Academic Press.
- Pitt, J.I. 1980. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Pitt, J.I. 1991. *A laboratory Guide to Common Penicillium Species*. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing.
- Pitt, J.I., Samson, R.A., Frisvad, J.C. 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: Samson, R.A.; Pitt, J.I. (eds). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Amsterdam, Harwood Academic Publishers, pp. 9-47.
- Prade, C.A. 2007. Aspectos ecológicos de comunidades fúngicas de solo em ambientes ripários com diferentes formas de manejo. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Prado, D. 2003. As caatingas da América do Sul. In: Leal, I.R.; Tabarelli, M.; Silva, J.M.C (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife, Brasil, Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, pp. 3-73.
- Rajakumar, G.S., Nandy, S.C. 1989. Isolation, Purification, and Some Properties of *Penicillium chrysogenum* Tannase. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (2): 525-527.
- Ramirez, C. 1982. *Manual and Atlas of the Penicillia*. Amsterdam, Elsevier Biomedical.
- Raper, K.B., Alexander, D.F., 1945. Preservation of molds by lyophil process. *Mycology* 37 (4), 499-525.
- Raper, K.B., Thom, C. 1949. *A manual of the Penicillia*. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Reddy, K.R.N., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M.L., Garibaldi, A. 2010. Potential of patulin production by *Penicillium expansum* strains on various fruits. *Mycotoxin Research* 26: 257–265.
- Renovato, J., Gutiérrez-Sánchez, G., Rodríguez-Durán, L.V., Bergman, C., Rodríguez, R., Aguilar, C.N., 2011. Differential Properties of *Aspergillus niger* Tannase Produced Under Solid-State and Submerged Fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165; 382–395.
- Resende, M., Lani, J.L., Rezende, S.B. 2002. Pedossistemas da Mata Atlântica: considerações pertinentes sobre sustentabilidade. *Revista Árvore* 26 (3): 261-269.
- Rivera, K.G., Seifert, K.A. 2011. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. *Studies in Mycology* 70: 139–158
- Rivera, K.G.; Díaz, J., Chavarría-Díaz, F., Garcia, M., Urb, M., Thorn, R.G., Louis-Seize, G., Janzen, D.H., Seifert, K.A. *Penicillium mallochii* and *P. guanacastense*,

- two new species isolated from Costa Rican caterpillars. 2012. *Mycotaxon* 119:315-328.
- Rizza, V., Kornfeld, J.M. 1969. Components of conidial and hiphal walls of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology* 58: 307-315.
- Rodal, M.J.N., Martins, F.R., Sampaio, E.V.S.B. 2008. Levantamento quantitativo das plantas lenhosas em trechos de vegetação de Caatinga em Pernambuco. *Revista Caatinga* 21(3): 192-205.
- Rohlf, F.J., Fisher, D.L. 1968. Test for hierarchical structure in random data sets. *Systematic Zoology* 17: 407-412.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rout, S., Banerjee, R. 2006. Production of tannase under solid state fermentation and its application in fruit juice debittering. *Indian Journal of Biotechnology* 5: 346-350.
- Rozane, D.E., Darezzo, R.J., Aguiar, R.L., Aguilera, G.H.A., Zambolim, L. 2004. *Manga, produção integrada, industrialização e comercialização*. Suprema Gráfica e Editora, pp. 604.
- Sabu, A., Pandey, A., Daud, M.J., Szakacs, G. 2005. Tamarind seed powder and palm kernel cake: Two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Bioresource Technology* 96: 1223-1228.
- Sacramento, C. K., Souza, F.X. 2000. Cajá (*Spondias mombin* L.). Jaboticabal: Funep pp. 42.
- Samson R.A. 2000. *Integration of Modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers. Singapore.
- Samson, R.A., Frisvad, J.C. 2004. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. *Studies in Mycology* 49: 1-260.
- Samson, R.A., Seifert, K.A., Kujipers, A.F.A., Houbraken, J.A.M.P., Frisvad, J.C. 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology* 49: 175-200.
- Samson, R.A., Varga, J., Witiak, S.M., Geiser, D.M. 2007. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Studies in Mycology* 59: 71-73.
- Samson, R.A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K.A., Peterson, S.W., Varga, J., Frisvad, J.C. 2011. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology* 70: 159–183.
- Sanders, H.L. 1968. Marine benthic diversity: a comparative study. *American Naturalist* 102: 243-282.

- Santos, I.M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., Lima, N. 2002. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. *Letters in applied microbiology* 35 (4): 272-275.
- Santos, M.B., Cardoso, R.L., Fonseca, A.U.O., Conceição, M.N. 2010. Caracterização e qualidade de frutos de umbu-cajá (*Spondias tuberosa* x *S. mombin*) provenientes do recôncavo sul da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32 (4): 1089-1097.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 12: 3875-3883.
- Schmidt-Heydt, M., Bode, H., Raupp, F., Geisen, R. 2010. Influence of light on ochratoxin biosynthesis by *Penicillium*. *Mycotoxin Research* 26: 1–8.
- Selwal, M.K., Selwal, K.K. 2011. High-level tannase production by *Penicillium atramentosum* KM using agro residues under submerged fermentation. *Annals Microbiology* 1-10.
- Selwal, M.K., Yadav, A., Selwal, K.K., Aggarwal, N.K., Gupta, R., Gautam, S.K. 2011. Tannase production by *Penicillium atramentosum* km under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 374-387.
- Sestini, M.F., Santos, C.P.F., Valles, G.F., Valeriano, D.M. 2007. Avaliação da Acurácia Do Mapeamento Temático Para o Bioma Amazônia Por Meio de Videografia. In: *XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, Brasil*, pág. 6957-6959.
- Shannon, C.E., Weaver, W. 1948. The mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27: 379–423.
- Sharma, S., Bhat, T.K., Dawra, R.K. 2000. A Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine. *Analytical Biochemistry* 279: 85–89.
- Sharma, S., Gupta, M.N. 2003. Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* van Teighem in nonaqueous media. *Bioorganic Medicinal Chemical Letters* 13: 395-397.
- Sherf, A.F. 1943. A method for maintaining *Phytophthora septentrionalis* in culture for long periods without transfer. *Phytopathology* 33: 330-332.
- Silva, J.S.V., Abdon, M.M., Miranda, J.I., Silva, M.P. 2005. Proposta para quantificar os remanescentes da vegetação do Pantanal brasileiro. In: *XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil*, pp. 1663-1665.

- Soccol, C.R. 1994. Contribuição ao estudo de fermentação no estado sólido em relação à produção do ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomicetos do gênero *Pleurotus*. Tese. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba (PR).
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Pandey, A. 2006. New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technology and Biotechnology* 44 (2): 141–149.
- Souto, P.C., Souto, J.C., Miranda, J.R.P., Santos, R.V., Alves, A.P. 2008. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 32: 1015-1020.
- Souza-Motta, C.M., Cavalcanti, M.A.Q., Fernandes, M.J.S., Lima, D.M.M., Nascimento, J.P., Laranjeira, D. 2003. Identification and Characterization of filamentous fungi isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 273-280.
- Statsoft, 2008. Inc. Statistica (data analysis software systems) version 8.0.
- Stotz, H.U., Long, S.R. 1999. Expression of the pea (*Pisum sativum* L) alpha-tubulin gene is correlated with cell division activity. *Plant Molecular Biology* 41: 1-14.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C., Hirota, M.M., Bedê, L.C. 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade* 1 (1): 132-138.
- Takino, Y. 1976. Enzymatic solubilization of tea cream. U.S. patent 3. 959. 496.
- The Trichocomaceae: relationships with other Ascomycetes. In: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics (Samson RA, Pitt JI, eds) Plenum Press, New York: 365–382.
- Thom, C. 1930. The Penicillia. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1–644.
- Tirapegui, J., Castro, I.A. 2001. Tannins in human diets: functional aspects, p.253-265. In: De Angelis, R.C. *Importance of plant foods in the protection of health: nutrition physiology of protective and preventive degenerative diseases*. Editora Atheneu, São Paulo.

- Tolaini, V., Zjalic, S., Reverberi, F.M., Fabbri, M.M., Del Fiore, A., De Rossi, P., Ricelli, A. 2010. *Lentinula edodes* enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits. *International Journal of Food Microbiology* 138: 243–249.
- Treviño-Cueto B., Luis, M., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez, R., Aguilera, A., Aguilar, C.N. 2007. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.) *Bioresouce Technology* 98: 721-724.
- Trindade, M.B.; Figueira, S.B.; Silva, H.P.; Silva, A.C.B.L.; Schessl, M. 2005. Uso de sensoriamento remoto na análise da fragmentação de Mata Atlântica no litoral norte de Pernambuco, Brasil. In: *XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Goiânia, Brasil, pp. 705-712.
- Tsai, C.H. 1987. Enzymatic treatment of black tea leaf. U.S. Patent 4.639.375.
- Tuszynski, J.A.; Carpenter, E.J.; Huzil, J.T.; Malinski, W.; Luchko, T.; Ludueña, R.F. 2006. The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *Developmental Biology*, 50: 341-358.
- Valentin, J.L. 2000. *Ecologia Numérica. Uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos*. Rio de Janeiro, Interciência.
- Van de Lagemaat, J., Pyle, D.L. 2004. Solid-state fermentation: A continuous process for fungal tannase production. *Biotechnology and Bioengineering* 87 (7): 924-929.
- Vega, F.E., Posada, F. 2006. *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia* 98(1): 31–42.
- Wang, L., Zhuang, W.Y. 2007. Phylogenetic analyses of penicillia based on partial calmodulin gene sequences. *BioSystems* 88: 113–126.
- Wehmer, C. 1914. *Coremium silvaticum* n. sp. nebst Bemerkungen zur Systematik der Gattung *Penicillium*. *Berichte deutsche Botanische Gesellschaft* 32: 373-384.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego.
- Wicklow, D.T., Horn, B.W. 1982. Sclerotium production by *Aspergillus flavus* on corn kernels. *Mycologia* 74: 398-403.

Zhou, S., Jiang, L., Geng, C., Cao, J., Zhong, L. 2010. Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. *Toxicon* 55: 390–395.

Endereços Eletrônicos:

<[http:// www.plantasyhongos.es](http://www.plantasyhongos.es)> Acesso em 01 junho 2011.

<http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp> Acesso em 20 maio de 2011.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) 2011. Disponível em <http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Manga_Brasil_2009.pdf.> Acesso em 04 junho 2011.

Fonseca, H. 2013. *Micotoxinas online*. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 05 janeiro 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 29 maio 2011.

McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Hawksworth, D.L., Marhold, K., Nicolson, D.H., Prado, J., Silva, P.C., Skog, J.E.. 2006. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). Disponível em <<http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm>>. Acesso em: 30 dezembro 2012.

Pinto, A.C.Q. A produção, o consumo e a qualidade da manga no Brasil. Matéria. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/>. Acesso em 04 junho 2011.

Sampaio, E., Rodal, M.J. 2000. Fitofisionomias da Caatinga. Documentos para discussão no GT de Botânica. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/caatinga/relatorios/fitofisionomias.pdf> Acesso em 29 janeiro 2013.

SOS Mata Atlântica. 2011. Disponível em: <http://www.sosmatatlantica.org.br/observatorio/plmataatlantica.html>. Acesso em: 29 maio 2011.

ANEXOS

Diversity of *Penicillium* in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas of Pernambuco, Brazil: an ecological approach

Lidiane Roberta Cruz da Silva^{*1}, Cledir Santos^{2,3}, Juliana Silva de Lima¹, Maria José dos Santos Fernandes¹, Keila Aparecida Moreira³ & Cristina Maria de Souza-Motta¹

¹lilaroberta_cruz@hotmail.com

Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-420, Brazil.

*Corresponding author

^{2,3}cledir.santos@deb.uminho.pt

IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Micoteca da Universidade do Minho, Campus of Gualtar, Braga, Portugal
Cereal Research Centre, Agriculture and Agrifood Canada, 195 Dafoe Road, Winnipeg MB, Canada R3T 2M9

³moreiralab@yahoo.com.br

Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, 5292-270, Brazil.

With 5 figures and 1 table

Abstract

Caatinga is characterised as being a unique semi-arid biome only found in Brazil. It is characterised mainly for its soil poor in mineral and organic nutrients, and low water activity. On the other hand, Atlantic Forest is mainly characterised by its nutrient-rich soil, and its high water activity. Fungi are important constituents of both biomes. Among the fungi frequently isolated from soil of both Caatinga and Atlantic Forest, species of *Penicillium* are prominent. The richness, abundance, evenness, and dominance of species of *Penicillium* in soils of the Caatinga and Atlantic Forest areas in Pernambuco, Brazil, were analyzed. The influence of seasonality (rainy and dry seasons) on the communities of species of *Penicillium* in each biome and their distribution was assessed. A total of 815 *Penicillium* isolates was found. From this total amount, 370 isolates were found in the Caatinga soil, whereas 445 were found in the Atlantic Forest soil. Thirty-one species were morphologically identified, with 23 of them in the Caatinga soil and 17 in the Atlantic Forest soil. In addition, three isolates from Caatinga soil were only identified to genus. The present study revealed that soils from Caatinga and Atlantic Forest have a high diversity of species of *Penicillium*, with the Caatinga presenting rare species. Furthermore, the communities of *Penicillium* species are very different, but well distributed in each biome. In the dry season, there was greater species richness in areas of the two biomes, indicating that the species may be well adapted to low soil water availability for the development and maintenance of balanced communities.

Keywords: fungal ecology, clima, *Penicillium adametzii*, *Penicillium lanosum*, soil fungi

Introduction

According to Hawksworth (1991) the magnitude of fungal diversity on Earth was estimated to be about 1,5 million species. This estimate was based on extrapolations from several independent data sets, namely: the numbers of fungi vs native plants growing in a particular region on a cross-section of native plants in Great Britain and Ireland, and the numbers of species discovered in a particular alpine community. On the other hand, according to O'Brien et al. (2005) the magnitude of fungal diversity on Earth was estimated ranging from 3,5 to 5,1 million species. In this case authors have evaluated soil fungal diversity at two sites in a temperate forest (Duck Forest, Durham, NC, USA). For these estimations authors used direct isolation of small-subunit and internal transcribed spacer (ITS) rRNA genes by PCR and high-throughput sequencing of cloned fragments.

Taking into consideration the estimates by the Convention on Biological Diversity (CBD), Brazil is home to between 15 and 20% of all global biodiversity. It is the country with the largest number of endemic species and its biodiversity can be a source of important biologically active compounds. Moreover, a huge diversity of fungi, with many rare or even unknown species is expected to be hosted in Brazil (Barreiro & Bolzani, 2009; Lewinsonhn & Prado, 2002). Fungi inhabiting soils of the Brazilian Atlantic Forest and semi-arid regions vegetation, such as Caatinga, can particularly be of biotechnological interest.

Caatinga covers approximately 800,000 km² that is c. 10% of the Brazilian national territory and it is reported to be only exclusively endemic biome from the Brazilian semi-arid regions (Rodal et al., 2008). The soil in this area is characterised by 0.7–1.1% organic matter and pH 5.4. Climate is semi-arid hot with a dry summer, high daytime temperatures (c. 30 to 40°C) and lower nighttime temperatures (c. 15°C). Furthermore, the mean annual precipitation is 610 mm (Goto et. al., 2009). In this semi-arid area, Caatinga vegetation is mainly represented by species of Euphorbiaceae, Caesalpiniaceae, Malpighiaceae, Myrtaceae, Mimosaceae, Fabaceae, and Cactaceae (e.g. *Cnidoscolus obtusifolius* Pohl, *Caesalpinia microphylla* Mart., *Byrsonima gardneriana* A. Juss., *Eugenia biflora* (L.) Dc., *Acacia bahiensis* Benth., *Bocoa mollis* (Benth) Cova, and *Pilosocereus tuberculatus* (Werdermann) Byles & Rowley), among others. This important biological heritage cannot be found anywhere else on the planet (Kennedy & Smith, 1995).

In contrast, Brazilian Atlantic Forest is mainly characterised by highly humid environment with coastal plant formation. It is considered the rarest ecosystem in Brazil and covers about 98,800 km² of extension (Morellato, 2000) that is c. 1.3% of the Brazilian national territory. Currently, it represents approximately 9% of its original area (Durigan et al., 2000). This area comprises three types of forests: Ombrophilous Dense forests, Semideciduous and Deciduous Stationary forests from the South and Southern regions, and Ombrophylus Mist forest, also known as *Araucaria* forest from Southern Brazil (Colombo & Joly, 2010). Although it suffers from conservation deficit, this biome is one of the 25 hotspot with the greatest biodiversity in the world (Myers et al., 2000; Tabarelli et al., 2005).

Among fungi commonly isolated from soil, species belonging to genus *Penicillium* are notable. Most of them are saprotrophic with few nutritional requirements. In addition, the genus *Penicillium* is extremely important in nature because some of its c. 300 species are highly active in the recycling of organic matter (Kirk et al., 2008; Pitt, 1991; Samson & Frisvad, 2004). Some of them are also producers of antibiotics (Harris et al., 2009), organic acids, and enzymes with industrial interest (Soccol et al., 2006).

Studies on the fungal communities of saprotrophic *Penicillia* as a genus present in the soil of Brazilian Atlantic Forest and Caatinga are scarce. It is, however, important to determine not only the individual fungal members and their functions, but also the effects of disturbance or environmental stress on these communities. This last parameter can be measured by several numerical indices. The aim of this study was to determine the richness, abundance, evenness, dominance and frequency of species of *Penicillium* in soils of Atlantic Forest and Caatinga in the State of Pernambuco, Brazil, as well as the influence of seasonality (rainy or dry) in each biome on the communities of these species.

Materials and methods

Area of study, rainfall and sample collection

Six sample collections were conducted in soil of both Caatinga vegetation and Brazilian Atlantic Forest regions. In the area of Caatinga, sample collections were performed at the Catimbau National Park at the City of Buíque, State of Pernambuco, Brazil (S 08° 04'25" and W 37° 15' 52"). In this case, three sample collections were conducted in the dry months of June, July and August 2009, when rainfall was 0.0, 11.0 and 0.0 mm, respectively. The sample collections during the rainy season were performed in February, March and April 2010, when rainfall was 109.0, 120.0 and 236.0 mm, respectively. On the other hand,

sample collections in the Brazilian Atlantic Forest were performed at the Park of Dois Irmãos. This park is maintained by the State of Pernambuco and is located at the north-western City of Recife (S 8° 15'30" and W 35° 57'00"). In this last case, sample collections during the rainy season were conducted in June, July and August 2009, which had rainfall of 115.0, 117.7 and 115.0 mm, respectively. In the dry period, collections were made in February, March and April 2010, with rainfall of 0.0, 0.0 and 11.3, mm, respectively. Samples collected in both cases were maintained at room temperature while being transported into sterilised thin polyethylene plastic bags to the research laboratory of URM culture collection.

In both case, soil samples were collected in three transects of 4x25 m at a depth of 00-20 cm. A total of ten samples from each transect were combined to give a single composed sample. According to the number of transects established in this study 36 samples were obtained.

Isolation and purification

Isolation of fungi was performed by suspension methods according to Clark (1965). All of the 36 composed soil samples were suspended in sterile distilled water and successive dilutions were performed. Composed soil aqueous suspensions at a concentration 1:10000 g·mL⁻¹ were obtained. Each aqueous suspension sample of composed soil was inoculated in 5 different Petri dishes containing Sabouraud agar supplemented with 50 mg·L⁻¹ chloranphenicol (SA-C), and dichloran agar with rose bengal supplemented with 50 mg·L⁻¹ chloranphenicol (DARB-C). Overall, 180 Petri dishes for Caatinga soil and 180 Petri dishes for Brazilian Atlantic Forest soil were obtained. The plates were kept at 28°C (± 2°C) for 72 h.

In order to purify fungal isolates, fragments of fungal colonies were transferred to Petri dishes containing SA-C medium. After confirmation of purity the fungal cultures were maintained on malt extract agar (MEA) at 25°C (± 2°C).

Identification of Species

The methodology used for identification was described by Pitt (1991). Spores of *Penicillium* isolates were suspended in 1.0 mL of an aqueous solution containing 0.2% agar and 0.05% Tween 80. Petri dishes containing 25 mL Czapek Yeast Agar (CYA), MEA and 25% Glycerol Agar medium (G25N) were inoculated in triplicate with 2 µL of the suspension containing *Penicillium* spores described above. Petri dishes were incubated at 5°C, 25°C and 37°C for CYA and at 25°C for MEA and G25N. Macro- and microscopic traits were observed to identify each species. Identification followed the taxonomic keys and guides available for *Penicillium* species (Kozakiewicz, 1989; Pitt, 1991; Samson and Frisvad, 2004). The microscopic traits of each species were recorded in photographs using light microscopy (Carl Zeiss Axiostar Plus) and scanning microscopy (SNOM alpha300 S/Witec) at the Centre for Strategic Technology in the Northeast (CETENE, Recife, Brazil). After morphological identification, one isolate of each species was preserved under mineral oil, freeze-drying ampoules and frozen at -80°C. Finally, all of the isolates were added to the Catalogue of Micoteca URM Culture Collection (WDCM604).

Statistical analysis

Statistical analysis of the diversity of species of *Penicillium* on both biomes was performed using the

Shannon's index. The abundance was calculated according to Magurran (1988) and equitability was quantified by the Pielou's index (Pinto-Coelho, 2002). Relative dominance was given by the equation $DA = NA / NA + NB + NC \dots NN \times 100$, where DA means dominance of the species, and NA + NB + NC ... NN means number of individuals of species A, B, C... N. Species are considered to be dominant species if its presence percentages are above 50% (Magurran, 1988). Frequency of species during the rainy and dry seasons was calculated by the equation $FA = PA / P \times 100$, where F means frequency of species A; PA means number of samples in which species A is present and P means the total number of samples. According to Magurran (1988), $F \geq 50\%$ = constant species; $10\% < F \leq 49\%$ = common species and $F \leq 10\%$ = rare species.

The similarity-dissimilarity of *Penicillium* species from soil samples of both biomes between rainy and dry seasons was tested based on the Bray-Curtis distance. In this case, it ranged from 0 (similarity) to 1 (dissimilarity) using the matrix density of species (Pinto-Coelho, 2002). The analysis was carried out between collections and transects. The connection method used for the statistical grouping was proportional to the weighted average (WPGMA - Weight Pair Group Mathematical Average) (Rohlf and Fisher, 1968). These calculations were performed using the Software Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS, Exeter - USA).

Results

In this study a total of 815 isolates belonging to genus *Penicillium* were obtained. From this total amount, 370 isolates from Caatinga soil and 445 samples from Atlantic Forest soil were obtained. Thirty-one species were morphologically identified. Some of these species were common to both biomes studied. However, 23 of them were found occurring only in the Caatinga soil and 17 of them occurring only in the Atlantic Forest soil. In addition, 3 isolates from Caatinga soil were only identified at genus level. These 3 isolates presented differences between their microscopic features (ornamentation of the wall of the conidia) and those features described in the literature (Raper and Thom, 1949; Pitt, 1991; Samson and Frisvad, 2004). However, as described above in the present work, the fungal identification was achieved using both light microscopy and scanning microscopy. Most descriptions of *Penicillia* in the literature did not include scanning electron microscopy.

Soil samples from Atlantic Forest yielded a greater number of isolates. In contrast, soil samples from Caatinga presented a greater species richness. Comparing the species richness during the rainy and dry seasons of the two biomes studied, the dry period had the greater number of species (Table 1). Regarding the similarity of species of *Penicillium* from different soil samples and periods of biomes, the phenetic analysis obtained from the index of Bray and Curtis generated a value > 0.8 . This value indicates

a well-adjusted statistical data, which is shown in Figures 1 and 2. In this statistical analysis, the occurrence of two major groups of species of *Penicillium* in both soil biomes is observed. Furthermore, there were no differences between transects in any area examined (Figure 1). For the first three samplings (sampling 1, 2 and 3, Figure 1) performed during the dry season in both Caatinga and Atlantic Forest biomes, a well-defined group of species was observed. In addition, for the last three samplings (sampling 4, 5 and 6, Figure 1) performed during the rainy season, another well-defined group of species was obtained. Species found in this last group were very different from those found in the dry season (Figure 2).

According to the frequency rate of *Penicillium* species in the Caatinga soil during the rainy season, 10 species were classified as constant with a frequency $\geq 50\%$. Furthermore, 6 species were common with a frequency $> 10\% \leq 49\%$. On the other hand, during the dry season 18 species of *Penicillium* were found constant and 3 species were common (Figure 3). Samples collected from the Atlantic Forest soil during the rainy season presented 11 constant species, where 4 of them were common. In this biome, during the dry period 17 species were classified as constant. Comparing the frequency rates of those *Penicillium* species that occurred in both rainy and dry periods in the Caatinga soil, it was observed that most species were constant in both seasons. Exceptions were found for *P. aurantiogriseum*, which was constant during the rainy season but common in the dry season, and *P. citreonigrum*, *P. pinophilum* and *P. spinulosum*, which were common during the rainy season and constant in the dry season. For the Atlantic Forest soil it was also observed that only *P. canescens*, *P. brevicompactum* and *P. sclerotiorum* were common during the rainy season and constant in the dry season (Figure 4).

The analysis of species diversity according to the Shannon's index showed results greater than 3.0 bits.ind⁻¹. This value indicates high species diversity in both biomes (Figure 5). Moreover, according to the Pielou's index, the fungal evenness found in this study was greater than 0.5 in both biomes. This value indicates that the fungal species are well distributed in the areas studied. According to the rate of Magurran (1988), in the present study, the most abundant *Penicillium* species in Caatinga soil were *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. glabrum*, *P. implicatum*, *P. janczewskii*, *P. lividum*, *P. oxalicum*, *P. pinophilum*, *P. simplicissimum* and *P. waksmanii*. In contrast, the most abundant fungal species in Atlantic Forest soil were *P. fellutanum*, *P. glabrum*, *P.*

griseofulvum and *P. janthinellum* (Table 1).

According to the relative dominance during the rainy season, the dominant species in the Caatinga soil were *Penicillium aurantiogriseum* (18%), *P. glabrum* (17%), *P. lividum* (13%), *P. waksmanii* (11%) and *P. implicatum* (9%). In contrast, in the dry season the dominant species in the Caatinga soil were *Penicillium janczewskii* (10%), *P. implicatum* (9%), *P. citrinum* (8%), *P. lividum* (7%), *P. minioluteum* (7%), *P. oxalicum* (7%), *P. simplicissimum* (7%), *P. waksmanii* (7%) and *P. citreonigrum* (5%). On the other hand, the dominant species during the rainy season in the Atlantic Forest soil were *P. griseofulvum* (16%), *P. aurantiogriseum* (12 %), *P. simplicissimum* (12%), *P. janthinellum* (11%), *P. fellutanum* (9%) and *P. glabrum* (9%). In this biome, during the dry season, the dominant species were *P. fellutanum* (14%), *P. griseofulvum* (13%), *P. glabrum* (12%), *P. janthinellum* (11%) and *P. restrictum* (9%) (Table 1).

In this study 14 species of *Penicillium* were exclusively found in the Caatinga biome (*P. adametzii*, *P. citrinum*, *P. implicatum*, *P. janczewskii*, *P. lanosum*, *P. lapidosum*, *P. melinii*, *P. minioluteum*, *P. oxalicum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. spinulosum*, *P. verruculosum* and *P. waksmanii*). However, 8 species of *Penicillium* were exclusive found in the Atlantic Forest biome (*P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. corylophilum*, *P. digitatum*, *P. fellutanum*, *P. janthinellum* and *P. sclerotiorum*). In addition, 8 species of *Penicillium* occurred in both biomes (*P. aurantiogriseum*, *P. canescens*, *P. citreonigrum*, *P. decumbens*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. lividum*, and *P. simplicissimum*) (Table 1).

Discussion

Penicillium is a cosmopolitan genus with few nutritional requirements of its species. They tolerate dry and hot as well as humid and cold environments (Pitt, 1991). Currently, this genus comprises 304 described species (Kirk et al., 2008). However, studies on communities of *Penicillium* present in soil in Brazil are scarce due to the lack of taxonomic experts in this genus. Furthermore, according to the Shannon's index for diversity (Shannon, 1948), soil samples from Caatinga and Atlantic Forest have a large diversity of species of *Penicillium*. In fact, in the present study the highest Shannon's index was achieved for the sampling 2 obtained from Caatinga soil. This sample was collected during the dry season and presented a rate of 4.10 bits.ind⁻¹.

The Caatinga biome is characterised by a long drought period, which may explain the great diversity and richness of species of *Penicillium* in this ecosystem, especially during the dry season. It agrees with the theory of climate stability by Sanders (1968). According to this theory, due to a greater biological complacency more species will be present when environmental factors are stable. Indeed, *Penicillium* species are highly adaptable to different type of environments, including low water availability (Pitt, 1991). As described above, in this work these species were more diverse in the Caatinga biome than in the Atlantic Forest one. According to Raper & Thom (1949), *P. adametzii* and *P. lapidosum*, isolated only in the Caatinga biome, are considered to be rare species. It indicates that this biome may harbour rare species that were not described yet for the science.

Atlantic Forest soil has a high availability of nutrients in the topsoil at between 10 and 20 cm depth (Tabarelli et al., 2005). According to Begon et al. (1990), the increase of nutrient availability in a given environment does not increase the diversity of fungal species. However, it rather increases the number of individuals per species, which may explain the fact that the soil from the Atlantic Forest in this study is less rich in species of *Penicillium*, although the populations are larger.

Penicillium aurantiogriseum, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. lividum*, *P. restrictum* and *P. simplicissimum* were the most abundant species in both biomes studied. However, *P. implicatum* and *P. janczewskii* occurred only in Caatinga soil, whereas *P. fellutanum* and *P. janthinellum* occurred only in the Atlantic Forest biome. These results corroborate with those data presented Domsch et al. (2007). According to these authors, *P. implicatum* and *P. janczewskii* are considered as cosmopolitan species distributed in different habitats from Alaska to Africa and South America. It justifies the presence of these species in the Caatinga soil. On the other hand, *P. janthinellum* is a common species in forest soil (Pitt, 1991). In contrast, *P. fellutanum* is considered to be a xerophilic species. Nevertheless, in the present study this fungal species was found only in the Atlantic Forest soil. At the ecological point of view, this species is closely similar to *P. janthinellum*, suggesting that they occupy similar ecological niches. Similar results were found for both *P. implicatum* and *P. janczewskii* species which are also ecologically similar species. Based on the data obtained in this study and according to Pielou's evenness index, the fungal populations from both studied areas are ecologically balanced.

The Bray-Curtis distance is an alternative to measure the similarity-dissimilarity between areas (Pinto-Coelho, 2002). Based on the geographical distance of both biomes, dissimilarity between the species found is observed through the formation of two major distinct groups of species of *Penicillium*; one group for each biome. Within each major group, the two subgroups formed were associated with the rainfall. In other words, the species differ between the rainy and dry seasons in both Caatinga and Atlantic Forest soils. This environmental factor appears to influence directly the ecological succession of species of *Penicillium*. It means that only the species that are physiologically adapted to the conditions of each environment remain viable and balanced in each period. This balance may be explained by the hypothesis of dynamic equilibrium proposed by Menge & Sutherland (1987). According to these authors, those species that have no physiological competence to survive environmental changes, such as variations in rainfall, disappear for a time, until environmental conditions are conducive to their return. In the particular case of *Penicillium*, the spores in the soil may remain dormant until the favourable environmental conditions come up to their development.

Coutinho et al. (2010) isolated fungi from the rhizosphere of *Cucumis melo* (melon) grown in soil containing organic compounds in the semi-arid region of Petrolina, Pernambuco, Brazil. The authors found 25 genera and 75 species. *Penicillium* was the most representative genus, with 13 species (*P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. dierckxii*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum*, *P. pinophilum*, *P. restrictum*, *P. solitum*, *P. spinulosum*, *P. vinaceum* and *P. waksmanii*). Their results were similar to those obtained in this work, in which *P. citrinum*, *P. pinophilum*, *P. spinulosum* and *P. waksmanii* were isolated only in soil from Caatinga. It indicates that these species are well adapted to the scarcity of water and nutrients and dominate communities in this ecosystem.

Recently, Fraga et al (2010) evaluated Trichocomaceae diversity in soils from two different Brazilian forest ecosystems. Over two years authors isolated 32 species of *Penicillium*, where *P. decumbens* was the most abundant. These results are corroborated by those obtained in the present study, where *P. decumbens* was only isolated from the Atlantic Forest soil and was common in all collections in both periods.

Acknowledgments

The authors thank to the Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for financial support, as well as Professor Sigrid Newman (UFPE) and Francisco Rangel (CETENE) for all support. This work is the first contribution as a scientific article from the historic friendship between Micoteca da Universidade do Minho (MUM, Portugal) and URM (Brazil). Cledir Santos acknowledges all support and enthusiastic discussion with Professor Nelson Lima, Director of MUM, who is fomenting this international relationship.

References

- BARREIRO, E. & V.S. BOLZANI (2009): Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. – Quím. Nov. **32** (3): 679-688.
- BEGON, M., J.L. HARPER & C.R. TOWNSEND (1990): Ecology: Individuals, Population and Communities. – Blackwell Sci Publ., Inglaterra.
- CLARK, F.E., D.D. EVANS, J.L. WHITE, L.E. ENSMINGER, F.E. CLARK et al. (1965): Agar-plate method for total microbial count. In Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties. – Madson Inc. New York.
- COUTINHO, F.P., M.A.Q. CAVALCANTI & A.M. YANO-MELO (2010): Filamentous fungi isolated from the rhizosphere of melon plants (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivated in soil with organic amendments. – Act. Bot. Bras. **24** (1): 292-298.
- COLOMBO, A.F. & C.A. JOLY 2010: Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. – Braz. J. Biol. **70** (3): 697-708.
- DOMSCH, K.H., W. GAMS & A. TRAUTE-HEIDI (2007): Compendium of soil fungi. 2nd ed. – IHW-Verlag, Eching.
- DURIGAN, G., G.A.D.C. FRANCO, M. SAITO & J.B. BAITELLO 2000: Estrutura e diversidade do componente arbóreo da floresta na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália, SP. – Rev. Bras. Bot. **23** (3): 361-373.
- FRAGA, M.E., M.G. PEREIRA, D.J. BARBOSA & M.P. MELO 2010: Diversity of isolated *Trichocomaceae* from soil in two forest ecosystems. – Ci. Fl. **20** (1): 167-175.
- GOTO, B.T., L.C. MAIA, G.A. SILVA & F. OEHL 2009. *Racocetra intraornata*, a new species in the Glomeromycetes with a unique spore wall structure. – Mycotaxon **109**: 483-491.
- HARRIS, D.M., I. WESTERLAKEN, Z.A. VAN DER KROG, A.K. GOMBERT, J. SUTHERLAND, et al. (2009): Engineering of *Penicillium chrysogenum* for fermentative production of a novel carbamoylated cephem antibiotic precursor. – Metab. Eng. **11** (2): 125-137.
- HAWKSWORTH, D.L. (1991): The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. – Mycol. Res. **95**: 641-655.
- KENNEDY, A.C. & K.L. SMITH (1995): Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. – Pl. Soil. **170**: 75-86.
- KIRK, P.M., F.P. CANNON, D.W. MINTER & J.A. OLIVEIRA (2008): Dictionary of the Fungi. 10th ed. – CAB International, Wallingford.
- KIRSOP, B.E. & A. DOYLE (1991): Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures-A Manual of Laboratory Methods. 2nd ed. – Academic Press, London.
- KOZAKIEWICZ, Z. (1989): Ornamentation types of conidia and conidiogenous structures in fasciculate *Penicillium* species using scanning electron microscopy. – Bot. J. Linn. Soc. **99**: 273-293.
- LEWINSONHN, T.M. & P.I. PRADO (2002): Biodiversidade Brasileira – Síntese do Estado Atual do Conhecimento. 1^a. ed. – Ed. Pinsky: São Paulo.

- MAGURRAN, M.E. 1988: Ecological diversity and its measurement. University Press, Princeton.
- MENGE, B.A. & J.P. SUTHERLAND 1987: Community regulation: variation in disturbance, competition and predation in relation to environmental stress and recruitment. – Amer. Nat. **130** (5): 730-757.
- MENONCIN, S., N.M. DOMINGUES, D.M.G. FREIRE, G. TONIAZZO, R.L. CANSIAN et al. (2010): Study of the Extraction, Concentration, and Partial Characterization of Lipases Obtained from *Penicillium verrucosum* using Solid-State Fermentation of Soybean Bran. – Food. Bioproc. Technol. **3**: 537–544.
- MEYRS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G.A.B. FONSECA & K. KENT (2000): Biodiversity hotspots for conservation priorities. – Nature **403**: 853-845.
- MORELATO, L.P.C. (2000): Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. – Biotropica **32** (4b): 786-792.
- O'BRIEN, H.E., J.L. PARRENT, J.A. JACKSON, J.M. MONCALVO & R. VILGALYS (2005): Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. – Appl. Environ. Microbiol. **71** (9): 5544-5550.
- PINTO-COELHO, R.M. (2002): Fundamentos em Ecologia. – Artmed, São Paulo.
- PITT, J.I. (1991): A laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing.
- RAPER, K.B. & C. THOM (1949): A manual of the *Penicillia*. Baltimore, Williams and Wilkins.
- RAPER, K.B. & D.F. ALEXANDER (1945): Preservation of Molds by the Lyophil. – Proces. Micol. **37** (4): 499-525.
- RODAL, M.J.N., F.R. MARTINS & E.V.S.B. SAMPAIO (2008): Levantamento quantitativo das plantas lenhosas em trechos de vegetação de Caatinga em Pernambuco. – Rev. Caat. **21** (3): 192-205.
- ROHLF, F.J. & D.L. FISHER (1968): Test for hierarchical structure in random data sets. – Syst. Zool. **17**: 407-412.
- SAMSON, R.A. & J.C. FRISVAD (2004): *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. – Stud. Mycol. **49**: 1-260.
- SANDERS, H.L. (1968): Marine benthic diversity: a comparative study. – Amer. Nat. **102**: 243-282.
- SHANNON, C.E. 1948: A mathematical theory of communication. – Bell. Syst. Tech. J. **27**: 379-423
- SOCCOL, C.R., L.P.S. VANDENBERGHE, C. RODRIGUES & A. PANDEY 2006: New Perspectives for Citric Acid Production and Application. – Food Technol. Biotechnol. **44** (2): 141–149.
- TABARELLI, M., L.P. PINTO, J.M.C. SILVA, M.M. HIROTA & L.C. BEDÊ (2005): Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. – Megad. **1** (1): 132-138.

Table 1. (Cont.) Number of isolates of *Penicillium* species collected during the rainy and dry season in the Caatinga and Atlantic Forest biomes with their relative dominance, calculated according to Magurran (1988).

N° URM	Species	Caatinga										Atlantic Forest										TOTAL
		Rainy Season					Dry Season					Rainy Season					Dry Season					
		S1	S2	S3	T	RD %	S1	S2	S3	T	RD %	S1	S2	S3	T	RD %	S1	S2	S3	T	RD %	
*	<i>Penicillium</i> sp. 2	0	0	0	0	0	1	2	2	5	1.80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
*	<i>Penicillium</i> sp. 3	0	0	0	0	0	1	1	2	4	1.43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	TOTAL = 34	37	31	23	91	100	89	85	105	279	100	43	36	28	107	100	105	107	126	338	100	815

S1) = sampling 1; (S2)= sampling 2; (S3)= sampling 3; (T) = total isolates; (RD%) = percentage of relative dominance; *Although not preserved in the URM.

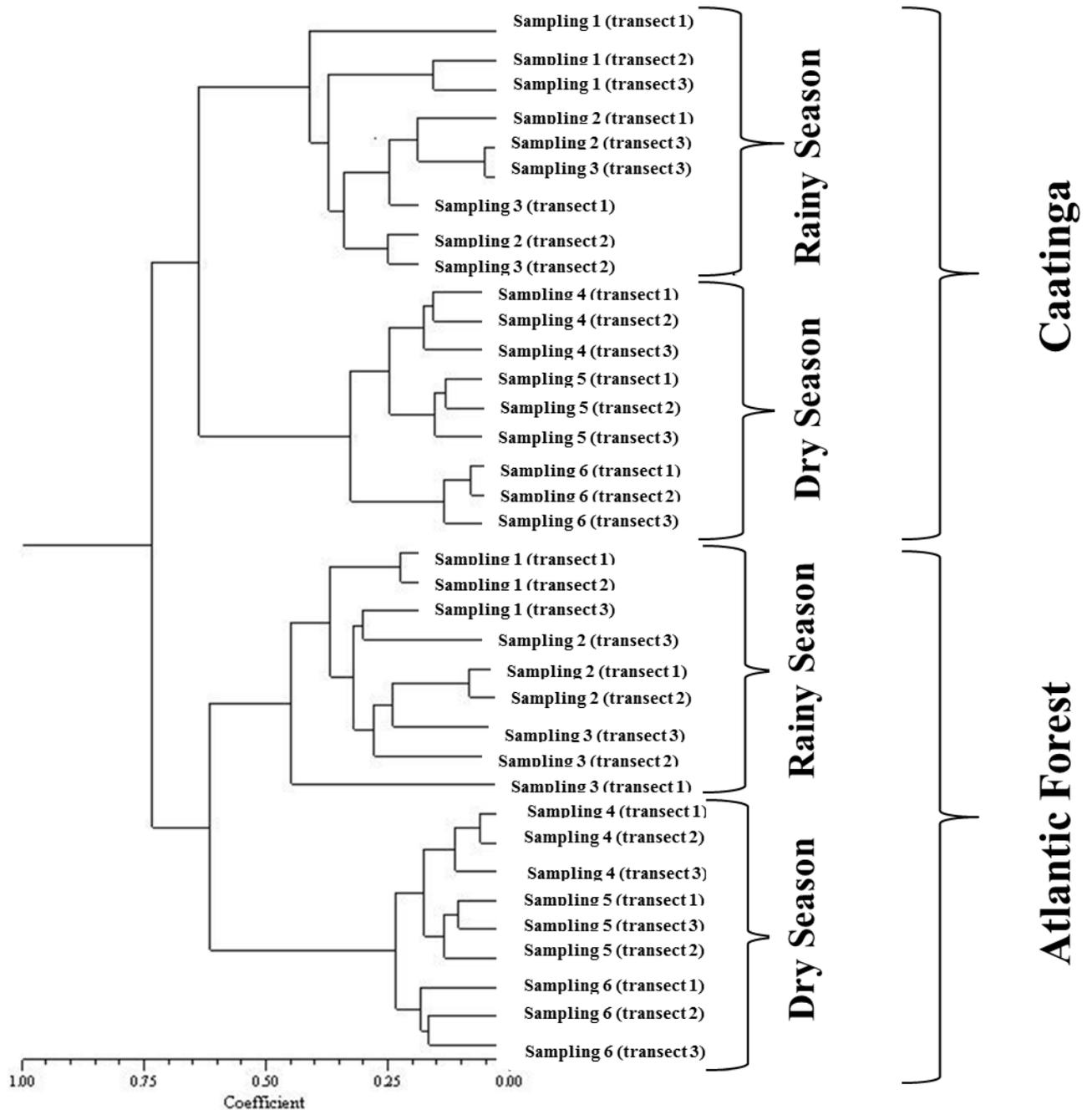


Figure 1. Dendrogram of relatedness between fungal samples from the Caatinga and Atlantic Forest soils, collected during the rainy season in June, July and August 2009 and in the dry season during the months of February, March and April 2010. Statistical analysis based on Bray-Curtis index; WPGM connection method (weight proportional). Phenetic analysis: $r > 0.8$.

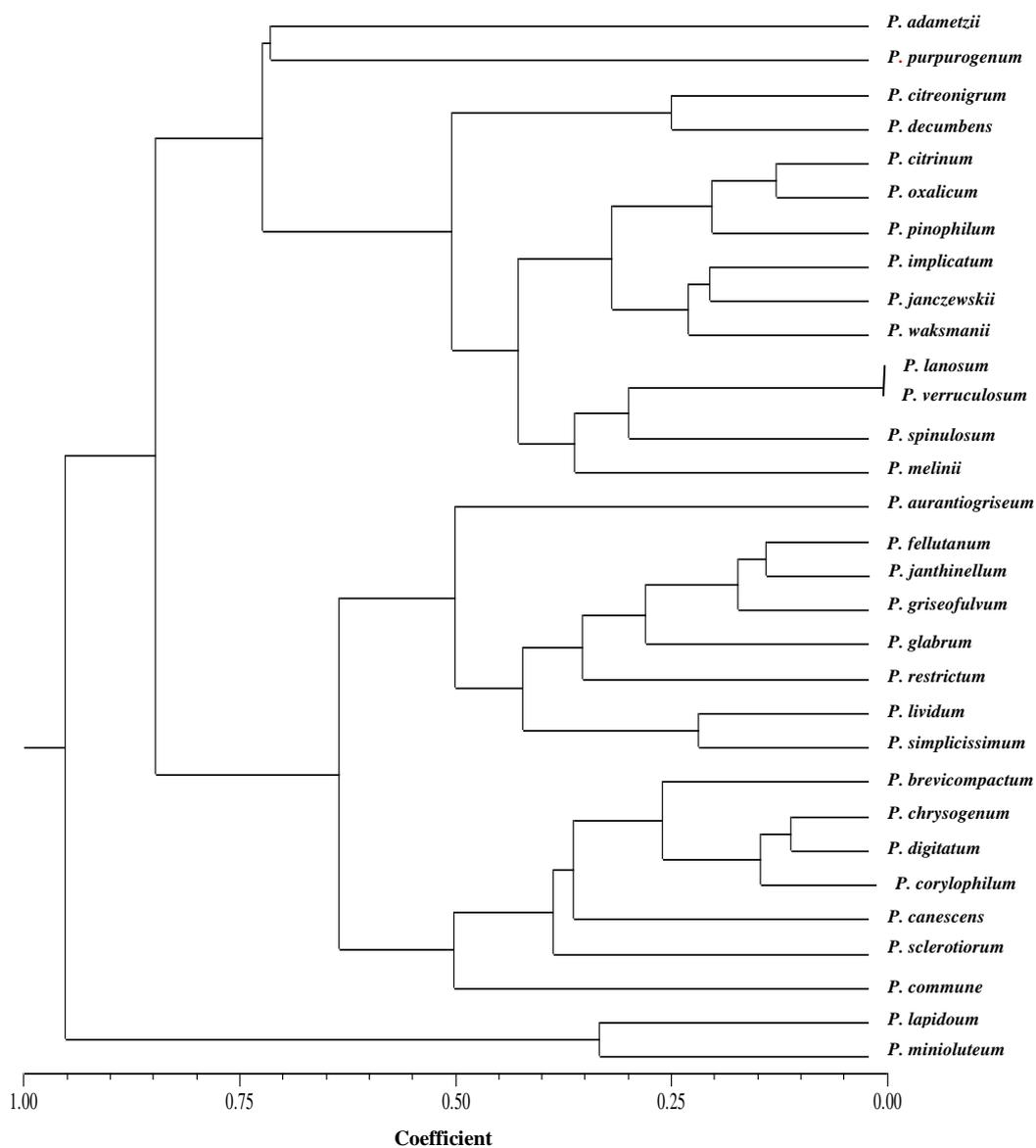


Figure 2. Dendrogram of relatedness between species of *Penicillium* from the Caatinga and Atlantic Forest soils, according to the occurrence and number of isolates. Samples were collected during the rainy season in June, July and August 2009 and in the dry season during the months of February, March and April 2010. Statistical analysis based on Bray-Curtis index; connection method of proportional weight (WPGM, Weighted Pair-Group Method, Arithmetic Average). Phenetic analysis: $r > 0,8$.

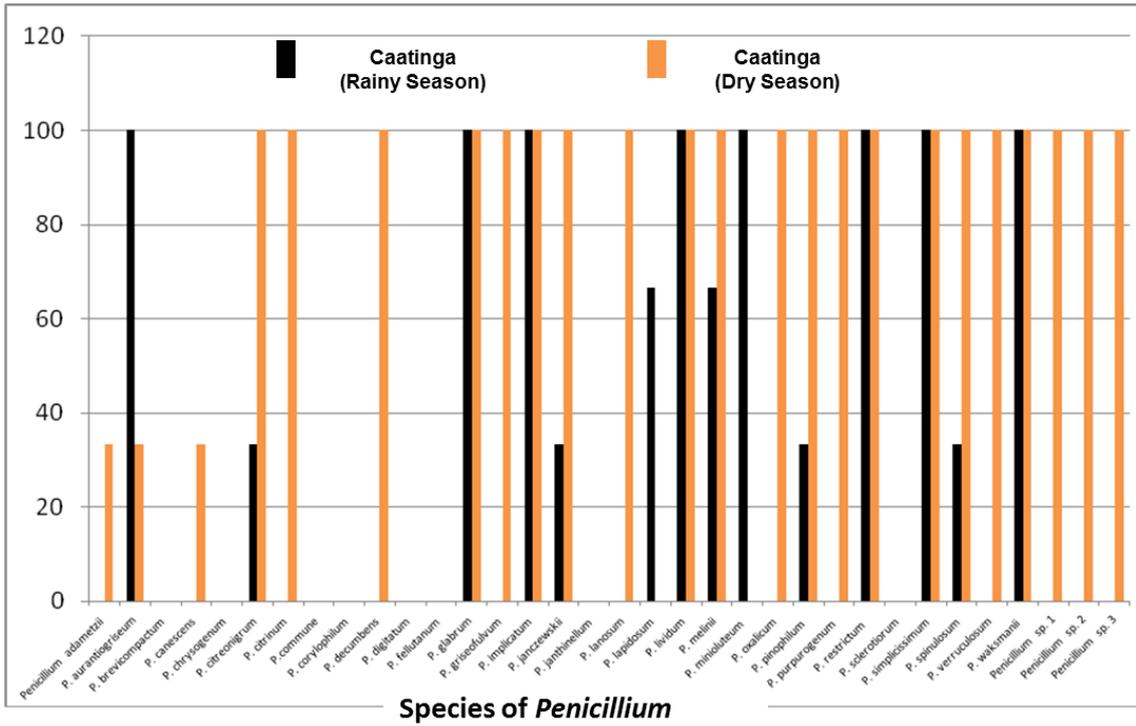


Figure 3. Frequency (%) of species of *Penicillium* in the rainy and dry seasons of the Caatinga biome.

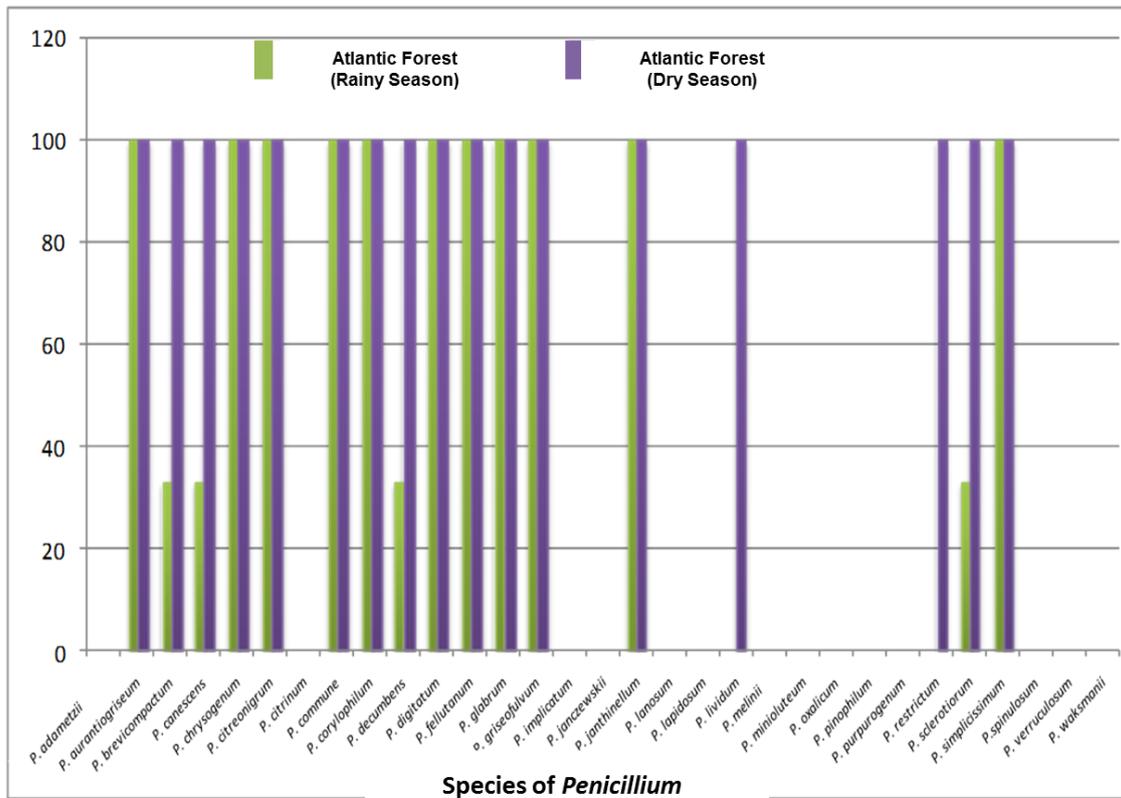


Figure 4. Frequency (%) of species of *Penicillium* in the rainy and dry seasons of the Atlantic Forest biome.

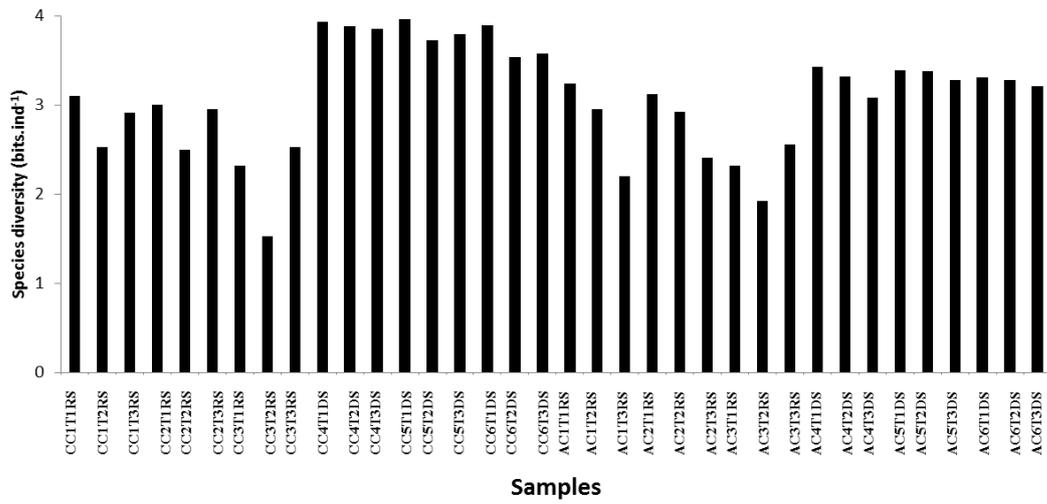


Figure 5. Diversity (bits.ind⁻¹) of *Penicillium* species in the Caatinga (C) and Atlantic Forest (A) in the rainy season (RS) and dry season (DS) in three transects (T1, T2, T3) and samples (C1, C2, C3). Statistical analysis based on Shannon index.

Mango waste as a potential substrate for tannase production by *Penicillium* species through SSF

Roberta Cruz^{*1}, Juliana Silva de Lima¹, Julyanna Cordoville Fonseca¹, José Erick Galindo Gomes², Tatiana Souza Porto², Maria José dos Santos Fernandes¹, Cledir Santos^{3,4}, Keila Aparecida Moreira² & Cristina Maria de Souza-Motta^{1*}

¹Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco,
50670-420, Brazil

²Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, 5292-
270, Brazil.

³IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Micoteca da
Universidade do Minho, Campus of Gualtar, Braga, Portugal

⁴Cereal Research Centre, Agriculture and Agrifood Canada, 195 Dafoe Road, Winnipeg MB, Canada
R3T 2M9

*Corresponding author: lilaroberta_cruz@hotmail.com
telephone and fax number: 55 81-21268948

Abstract

This is the first study on the diversity of the genus *Penicillium* in soils of the Caatinga and Atlantic Forest and evaluation of the potential for production of tannase by SSF using hog-plum (*Spondias lutea* L.) and mango residues generated by the fruit pulp industry. A total of 802 samples were isolated, 357 of which were obtained from the Caatinga and 445 from the Atlantic Forest. Thirty-one species were identified. A representative of each species was incorporated into the URM Culture Collection and all were tested for their production of tannase by Mango residue proved to be the best inducer of the production of tannase by *Penicillium* species. *Penicillium rolfsii* was selected for optimization of tannase production by SSF, using mango residue as a substrate. Produced maximum tannase activity, 96.22 U ml⁻¹ in mango residue, supplemented with 2% tannic acid, 50% moisture, incubated at 30 °C for 72h. Soil of the Caatinga biome has a high diversity of species of *Penicillium* with biotechnological potential for the production of tannase by SSF. Waste generated by mango fruit pulp industry shows up as an excellent substrate to be used by industry to minimize costs and increase the production of tannase using *Penicillium*.

Keywords: *Penicillium rolfsii* URM 6216, Caatinga, Atlantic Forest, agroindustrial wastes

1. Introduction

Brazil is considered the country with the greatest biodiversity on the planet (Lejon et al., 2005). Due to its continental size and the great geomorphological and climatic variation, this country houses seven biomes: Amazon, Caatinga, Cerrado, Coastal, Pantanal, Atlantic Forest and Campos Sulinos. These biomes are home to innumerable species of animals, plants and microorganisms, especially fungi (Lejon et al., 2005; Carvalho et al., 2010).

Soil is considered to be one of the main habitats for populations of microorganisms including fungi (Pitt, 1991). Among the fungi commonly isolated from soil are species of *Penicillium*. Most of these species are saprophytic, not very nutritionally demanding, giving them the ability to grow in any environment where there is a minimum of mineral salts or the most diverse and complex organic carbon sources (Pitt, 1991). This genus is of utmost relevance in nature, as its species participate actively in the recycling of organic matter (Samson and Frisvad, 2004). In addition to their relevant environmental importance in the recycling of organic matter, *Penicillium* species have broad biotechnological potential, being used for the production of enzymes of industrial, environmental, pharmaceutical and food interest, among others (Bon et al., 2008). Among the various enzymes produced by *Penicillium* spp., tannase is worth pointing out (Belur and Mugeraya, 2011).

Tannase, or tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) is an inducible enzyme that catalyzes the hydrolysis of ester links and depsides in hydrolyzable tannins, such as tannic acid, releasing glucose and gallic acid (Chávez-González et al., 2012). As tannins are produced by plants as a defense mechanism, these compounds can be found in all parts of the plant, from cellular vacuoles, leaves, bark, fruits and seeds to sap (Monteiro et al., 2011). Many microorganisms produce tannase as a form of counter-attack to plants (Pinto et al., 2005).

Tannase may have wide application in the pharmaceutical, cosmetic and beverage industries, mainly in the production of beer. Another important application of tannase occurs in the manufacture of juices whose fruits have high tannin content. This enzyme is still applied for the production of gallic acid in the color stabilization of wines and coffee-based soft drinks, in the treatment process of leather, food detannification and effluent treatment in the leather industry (Madeira et al., 2012). Tannase producing soil microorganisms play an active role in the decomposition and recycling of plant materials rich in tannins and avoid environmental pollution problems (Battestin et al., 2004).

Among the filamentous fungi, *Aspergillus* is considered the genus that best produces tannase, followed by the genus *Penicillium*, whether by means of submerged fermentation (SmF) or solid state fermentation (SSF) (Agillar et al., 2007; Renovato et al., 2011; Chávez-González et al., 2012). However, although the potential has been proven of species of the genus *Penicillium* to produce tannase, studies are still scarce.

Due to the high importance of application of microbial tannase in various industries, it is necessary to search for production processes that will minimize costs, increase production and contribute directly to environmental balance, through the utilization of agro-industrial wastes that are commonly disposed of in the environment without previous treatment. In this context, SSF presents itself as an excellent alternative for tannase production by fungi (Pinto et al., 2005).

Solid state fermentation is a process in which a microorganism grows in solid of damp substrates, usually vegetable waste, in the absence of free water (Pandey, 2003). Agribusiness and food industries produce large amounts of waste, both liquid and solid. These residues may present significant challenges for final disposal and have high polluting potential, in addition to often representing losses of biomass and nutrients of high value, as is the case of wastes generated by industries producing fruit pulps, such as residues of hog-plum (*Spondias lutea* L.) and mango (*Mangifera indica* L.).

It is estimated that annually in Brazil, both for hog-plum and for mango, about 35 tons of waste are produced by the fruit pulp industry (Pinto, 2011). Such waste, as it contains a high tannin content, can be a viable alternative for tannase production by SSF using fungi (Chávez-González et al., 2012).

Given the above, the objectives of the present work were to isolate and identify species of *Penicillium* present in the soil of Caatinga and Atlantic Forest in Pernambuco, Brazil, as well as to assess the production capacity of tannase through SSF of these species, using hog-plum (*S. lutea* L.) and mango (*M. indica* L.) wastes generated by the fruit pulp industry in Pernambuco, Brazil, and evaluate the production of tannase by species selected as best producer.

2. Materials and methods

2.1. Study area, rainfall and sample collection

Samples from Caatinga were collected in open areas located in Catimbau National Park, City of Buíque, Pernambuco, Brazil (08°04'25"S and 37°15'52"W). Six collections were conducted, three in the rainy season and three during the dry season. Soil samples were collected in three transects of 4x25 m at a depth of 20 cm, a total of three composite samples per area, consisting of ten replicates each. Samples were collected with the aid of a garden shovel, wrapped in plastic bags and then forwarded to the research laboratory of the URM Culture Collection, Department of Mycology, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco for manipulation.

2.2. Isolation and purification and identification of species

To isolate fungi, we performed a soil suspension following the method of Clark (1965), modified by the following procedure: 25 g of each soil sample was suspended in 225 mL of sterile distilled water and the system was shaken manually for 10 minutes. Ten milliliters of this suspension was added to 90 mL of sterile distilled water (1:100), and the procedure was repeated to obtain dilutions of 1:1000 and 1:10000. From each dilution, 1 mL was spread on the surface of Sabouraud Agar containing chloramphenicol (50 mg L⁻¹) and Dichloran Agar and Rose Bengal Chloramphenicol (DARBC) in Petri dishes. The plates remained at room temperature (28°C ± 2°C) for 72 hours. To purify fungal samples, fragments of colonies were transferred to Petri dishes containing the same medium used before and grown for 72 hours. Having confirmed the purity, the cultures were transferred to Malt Extract Agar (MEA) contained in test tubes (18 x 180 mm) for later identification.

The methodology used for identification was described by Pitt [24]. The spores of *Penicillium* isolates were suspended in 1.0 mL of a solution containing 0.2% agar and 0.05% Tween 80. Of this suspension, 2.0 mL were used for inoculation on each of three Petri dishes containing 25 mL of the culture media Czapek Yeast Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA) and 25% Glycerol Agar (G25N). The Petri dishes were incubated at 5°C, 25°C and 37°C for CYA and at 25°C for MEA and G25N. Macroscopic and microscopic characteristics were observed to identify the species (Pitt, 1991; Samson and Frisvad, 2004).

2.3. Detection of tannolytic capacity of species of *Penicillium*

A representative of each species of *Penicillium* was transferred to the center of a Petri dish containing Czapek Agar medium modified by substituting sucrose for 5 g L⁻¹ of tannic acid (C₇₆H₄₂O₅₆). The tannic acid was sterilized separately by means of filtering through a 0.22 µm. Each species was streaked in triplicate and incubated in an oven at 30 °C for 72 hours (Murugan et al., 2007).

2.4. Evaluation of diversity

The analysis of *Penicillium* species diversity in the two biomes was performed using the Shannon-Wiener index. These calculations were performed using the computer program NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) Software from Exeter – USA (Rohlf 2009).

2.5. Solid substrates, microorganism and inoculum preparation

Residues of hog-plum (*S. lutea* L.) and mango (*M. indica* L.) were obtained from the fruit pulp industry in Recife, Brazil. The waste was flushed with sterile distilled water and dried in an oven at 55 °C for 48 hours. A representative of each species of *Penicillium* isolated was used throughout this study. The strain was grown and maintained on Malt Extract Agar (MEA) at 30 °C for 7 days. Then, spores were transferred under strict aseptic conditions, para 10 mL of sterile distilled water with 0.1% Tween-80 (Sabu et al., 2005).

2.6. Tannase production by solid-state fermentation

For moisture the medium to be used in SSF a salt solution with 0.5% w/v NH₄NO₃, 0.1% w/v and MgSO₄.7H₂O 0.1% w/v NaCl was used. Final pH of the medium was adjusted to 5.0. Five grams of hog-plum and mango residue were separately added to 250 mL Erlenmeyer flasks, moisture with 5 mL of salt solution, autoclaved at 121 °C for 20 min, cooled to room temperature and Inoculated with 1 mL of the fungal spore inoculum (5x10⁸ spores mL⁻¹). The contents were thoroughly mixed and incubated at 30 °C for 96h (Sabu et al., 2005).

2.7. Experimental Design and Statistical Analysis

The influence of the substrate amount, initial moisture, tannic acid, and temperature on the tannase production was evaluated from the results of the experiments performed according to a 2⁴ factorial design (Tabela 1). The choice of variables and their levels was made according to Sabu et al. (2005). All statistical analyses were carried out using Statistica 8.0 software (Statsoft, 2008).

2.8. Enzyme extraction

After fermentation, the crude enzyme was extracted by adding 50 ml of distilled water with 0.01% Tween 80. Then each Erlenmeyer flask was mixed thoroughly by keeping the on the rotary shaker (Tecnal TE421, São Paulo, Brazil) at 150 rpm for 10 min after adding crude enzyme from the fermented matter was extracted by direct filtration using Whatman # 1 filter paper. The filtrate was collected in vials and preserved at 4 ° C for further analysis (Sabu et al., 2005).

2.9. Analytical Techniques

Protein content was determined according to Bradford (1976) at 595 nm using Bovine Serum Albumin (BSA) as standard. The determinations were done in triplicate on each sample.

Tannase activity was estimated by formation of a chromogen between gallic acid (released by the action of tannase on methyl gallate) and rhodanine (2-thio-4-ketothiazolidine). The pink color developed was read at 520 nm using a spectrophotometer (Hitachi-U5100). One unit of tannase activity was defined as the amount of enzyme required to liberate one micromole of gallic acid per minute under defined reaction conditions. Enzyme yield was expressed as U mL⁻¹ min⁻¹ (Sharma et al., 2000).

3. Results

In total, 815 isolates were obtained of *Penicillium* spp., 370 of these from the soil of Caatinga and 445 from Atlantic Forest. Thirty-one species were identified. A representative of each species was added to the Catalogue of Micoteca URM Culture Collection (WDCM604) (Table 1), using the methods of preservation under mineral oil, freeze-drying and deep-freezing to -80° C (Sherf, 1943; Raper and Alexander, 1945; Kirsop and Doyle, 1991).

According to the Shannon-Wiener diversity index (1948), both biomes exhibit high diversity of *Penicillium* species (Figure 1). However, the highest results for the index were obtained in the Caatinga during the dry season (4.10 bits. ind⁻¹).

Of the 31 species isolated, identified and tested for tannolytic ability in solid medium only *Penicillium janthinellum* and *P. lanosum* did not produce degradation halo (Table 2). *Penicillium lapidosum* did not grow in the presence of tannic acid. Due to the low number of cultures that did not present a qualitative capacity for tannase production, all species were selected for quantitative evaluation by SSF from the use of hog-plum (*S. lutea* L.) and mango (*M. indica* L.) waste resulting from the fruit pulp industry.

By means of SSF, all species analyzed produced tannase in the two residues tested (Table 1). *Penicillium adametzii*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citreonigrum*, *P. decumbens*, *P. fellutanum*, *P. janczewskii*, *P. janthinellum*, *P. lividum*, *P. melinii*, *P. minioluteum*, *P. pinophilum*, *P. rolfsii*, *P. sclerotiorum*, *P. simplicissimum*, *P. spinulosum*, *P. verruculosum* and *P. waksmanii*, for the first time, are being reported as producers of this enzyme (Table 1).

Tannase production varied according to the microorganism and residue evaluated, as the residue is an important stimulant for the microorganism to produce the enzyme. The mango residue proved to be the best inducer of tannase production by *Penicillium* species, most species presented high tannase activity, ranging from 14.48 to 89.48 U mL⁻¹. The top three producers were *Penicillium rolfsii* URM 6216 with 89.49 U mL⁻¹, *P. janthinellum* URM 5993 with 85.93 U mL⁻¹ and *P. glabrum* URM 6092 with 59.26 U mL⁻¹. In the hog-plum residue, the least activity was 4.16 U mL⁻¹ and the maximum, 18.60 U mL⁻¹, with the top three producers being *P. simplicissimum* URM 6138, *P. brevicompactum* URM 5994 and *P. commune* URM 6147, with 19.54, 18.60 and 18.07 U mL⁻¹, respectively (Table 1). Therefore, *P. rolfsii* URM 6216 was selected for evaluation of tannase production through SSF residue using mango as a substrate (Table 2).

After experimental design, *Penicillium rolsfii* URM 6216 produced maximum tannase activity, 96.22 U mL⁻¹ in 7.5 g of mango residue, supplemented with 2% tannic acid, 50% initial moisture, incubated at 30 °C for 72h

4. Discussion

Tannase was discovered accidentally by Tieghem in 1967, in an experiment aimed at creating gallic acid in an aqueous solution of tannins, where two species of filamentous fungi were growing, later identified as *Penicillium glaucum* and *Aspergillus niger* (Aguillar et al., 2007). Later, various microorganisms have been reported as producers of tannase: bacteria, yeasts and other filamentous fungi.

Although the potential of species of the genus *Penicillium* to produce tannase has been proven, studies are still scarce. In a bibliographic survey conducted by Aguillar et al. (2007), between the years 1969 to 2007, only five works are cited. A similar survey was conducted in 2011 by Belur and Mugeraya. The authors stated that there was no change in the number of works on production of tannase by *Penicillium* species from 2007 to 2011.

Solid state fermentation for the production of enzymes offers advantages over the conventional method of submerged fermentation (Pinto et al., 2011). The means of production is simple: agro-industrial by-products can be used, among the most common of which are grape skins, cashew fruit residue, coffee bean residue and bran of wheat, rice and oats, together with tannic acid (Battestin et al., 2004). However, some fruits rich in tannins and grown in Brazil, have not yet been studied for the production of tannase, among them hog-plum (*Spondias lutea* L.) and mango (*Mangifera indica* L.).

Hog-plum, a fruit originating from tropical America, belongs to the family Anacardiaceae. It has been widely accepted in the market, being considered quite tasty and nutritious (Bosco et al., 2000). In addition to its regional importance, hog-plum has been gaining a prominent role in Brazilian agribusiness, with the development of new products and larger-scale commercialization in the form of pulp (Sacramento and Souza, 2000).

Also belonging to the family Anacardiaceae and originating from India, the mango was introduced to Brazil by the Portuguese in the 16th century (Pinto, 2011). Mango is composed primarily of water, carbohydrates, organic acids, minerals, proteins, vitamins (A, C and B-complex) and pigments, in addition to tannins. Tannins constitute 12% to 18% of mango seeds. Mango is widely used for production of fruit pulp by several Brazilian industries (Rozane et al., 2004).

Wastes from the processing of hog-plum and mango produced by agribusinesses such as fruit pulp and juice, as they are rich in amino acids and tannins, may represent an excellent source of carbon for the production of tannase by SSF. Currently, such wastes are commonly disposed of in the environment, without prior treatment, and become an environmental pollutant. The interest in solid state fermentation for the production of compounds of commercial importance is a consequence of the demand for lower-cost inputs (Chávez-González et al., 2012).

According Chávez-González et al. (2012), the specie *Penicillium rolsfii* had not yet was reported as producing tannase, and this is the first report of the production of tannase to strain belonging to this specie. In addition, the present study demonstrated that *Penicillium rolsfii* URM 6216 is capable of producing high levels of tannase from, exceeding the values already mentioned in the literature for species of *Penicillium*.

Batra and Saxena (2005) tested 24 species of *Penicillium* for their ability to produce tannase in a solid medium containing salts, adding 1% tannic acid, only seven of them did not hydrolyze tannic acid. Among the species tested by Batra and Saxena (2005), *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. corylophilum*, and *P. restrictum* presented a hydrolysis zone. Similar results were obtained in the present study where the same species were also tested, degrading the said acid contained in solid medium. Already *Penicillium oxalicum*, tested by Batra; Saxena (2005), did not showed hydrolysis zone. However, *P. oxalicum* URM 6223, tested in this study showed hydrolysis zone. This fact indicates that the enzyme production capacity is not inherent in the species, but to the isolate (Table 1).

Despite being a traditional method, the *a-priori* selection for detection of enzyme production using microorganisms inoculated in solid media specific to the production of the desired enzyme in Petri dishes is a flawed method. In the present study, using a qualitative assessment, *P. janthinelum*, *P. lapidosum* and *P. lanosum* did not hydrolyze tannic acid, however, by SSF using mango residue as substrate, they produced 85.93; 18.84 and 30.99 U mL⁻¹ tannase, respectively, a fact that proves the failure of the qualitative method.

In 2005, Banerjee et al. evaluated tannase production by consortium between *Rhizopus oryzae* (RO IIT RB-13, NRRL 21498) and *Aspergillus foetidus* (GMRB013 MTCC) via solid state fermentation.

The authors observed a maximum yield of 41.3 U mL⁻¹. According to the authors, the consortium between microorganisms enhances the production of the enzyme. However, in this study, in which species of *Penicillium* were tested separately, a greater yield of tannase was observed, indicating that the genus can be the most promising for the production of the enzyme.

Evaluating the production of tannase by *Aspergillus tamaritii*, through SmF, Costa et al. (2008), using three media containing salts and either tannic acid, gallic acid or methyl gallate as inducers, verified that the culture produced tannase after 48 hours of fermentation, in the three inducer media. However, maximum production took place using gallic acid as an inducer (20.6 U mL⁻¹). Although, *Aspergillus* is referred to as the best genus for producing tannase, in the present study, where only species of *Penicillium* were tested, the results are well above those of Costa et al. (2008), as shown by *Penicillium rolsfii*, 89.48 U mL⁻¹, with mango residue as a substrate, in preliminary screening.

Selwal and Selwal (2012) evaluated the production of tannase by an isolate of *Penicillium atramentosum*, coming from tannery effluent, through submerged fermentation using leaves of "amla" (*Phyllanthus emblica*), "ber" (*Zyzyphus mauritiana*), "jamoá" (*Eugenia cuspidata*), "jamun" (*Syzygium cumini*) and "keekar" (*Acacia nilotica*) powder. The authors observed a maximum yield of tannase of 32.8 and 34.7 U mL⁻¹ from the leaves of amla (2% w/v) and "keekar" (3% w/v), respectively, incubated at 30°C for 72 h. Comparing with the present study, both the micro-organism tested (*Penicillium rolsfii* URM 6216), as the agroindustrial residue (residue mango), were more promising for the production of tannase, as it had a maximum activity of 89.48 U mL⁻¹ and after experimental design, showed maximum production of 96.22 U mL⁻¹ at 30 °C for 72 h. In addition according to Pinto et al. (2005), solid state fermentation is more advantageous than submerged fermentation, mainly because of the water savings and simplicity of culture medium.

5. Conclusions

Brazil is a country which is recognized worldwide for its agricultural practice. However the accumulation of residues rich in tannins and their derivatives, such as those of mango, constitutes a serious environmental problem. In this context, *Penicillium rolsfii* URM 6216, a microorganism not reported as pathogenic and able to produce tannase by SSF using mango waste, is being indicated as an excellent tool to be used by the food and pharmaceutical industries for the production of tannase. This is the first study to use this residue for the production of tannase.

Acknowledgments

The authors thank to the Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for financial support, as well as Professor Sigrid Newman (UFPE), Paulo Freitas and Francisco Rangel (CETENE) for all support.

References

- Aguilar, C.N., Rodríguez R., Gutiérrez-Sánchez, G, Augur C, Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L.A., Ramírez-Coronel, A., Contreras-Esquivel, J.C., 2007. Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 47–59.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Banerjee, R., Mukherjee, G., Patra, K.C., 2005. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. *Bioresource Technology* 96 (8), 949-953.
- Batra, A., Saxena, R.K., 2005. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process Biochemistry* 40, 1553-1557.
- Battestin, V., Matsuda, L.K., Macedo, G.A., 2004. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alimentos e Nutrição* 15 (1), 63-72.
- Belur, P.D., Mugeraya, G., 2011. Microbial Production of Tannase: State of the Art. *Research in Microbiology* (1), 25-40.
- Bom, E.P.S., Ferrara, M.A., Corvo, M.L., 2008. *Enzimas em Biotecnologia Produção, aplicações e Mercado*. Editora Interciência, Rio de Janeiro.

- Bosco, J., Soares, K.T., Aguiar Filho, S.P., Barros, R.V., 2000. A cultura da cajazeira. EMEPA, João Pessoa.
- Bradoo, S., Gupta, R., Saxena, R.K., 1996. Screening of extracellular tannase-producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. *The Journal of General and Applied Microbiology* 42, 325-329.
- Carvalho, J.L.N., Avanzi, J.C., Silva, M.L.N., Mello, C.R., Cerri, C.E.P., 2010. Potencial de sequestro de carbono em diferentes biomas do Brasil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34 (2), 277-289.
- Cavalcanti, M.A.Q., Oliveira, L.G., Fernandes, M.A., Lima, D.M., 2006. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20 (4), 831-837.
- Chávez-González M., Rodríguez-Durán, L.V., Balagurusamy, N., Prado-Barragán, A., Rodríguez, R., Contreras, J.C., Aguilar, C.N., 2012. Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. *Food Bioprocess Technology* 5, 445–459.
- Clark, F.E., Evans, D.D., White, J.L., Ensminger, L.E., Dinaver, R.C., Black, C.A., 1965. Agar-plate method for total microbial count. In *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties*. Madson Inc, New York.
- Costa, A.M., Ribeiro, W.X., Kato, E., Monteiro, A.R.G., Peralta, R.M., 2008. Production of tannase by *Aspergillus tamarii* in Submerged Cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51, 399-404.
- Costa, A.M., Kadowaki, M.K., Minozzo, M.C., Souza, C.G.M., Boer, C.G., Bracht, A., Peralta, R.M., 2012. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus tamari*. *African Journal of Biotechnology* 11 (2), 391-398.
- El-Tanash, A.B., Sherief, A.A., Nour, A. 2012. Optimization the hydrolysis process of tannic acid for gallic acid production by tannase of *Aspergillus awamori* using response surface methodology. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 10: 9-17.
- Kirsop, B.E., Doyle, A., 1991. *Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures-A Manual of Laboratory Methods*. 2nd ed., Academic Press, London.
- Lejon, D.P.H., Chaussod, R., Ranger, J., Ranjard, L., 2005. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest (Morvan, France). *Microbiology Ecology* 50, 614-625.
- Madeira, Jr. J.V., Macedo, J.A., Macedo, G.A., 2012. A new process for simultaneous production of tannase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange pomace. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 477–482.
- Monteiro, J.M.M., Albuquerque, U.P., Araújo, E.L., Amorim, E.L.C., 2005. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova Journal* 28 (5), 892-896.
- Murugan, K.S., Saravanababu, M., Arunachalam, M., 2007. Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. *Bioresource Technology* 98, 946-949.
- Pandey, A., 2003. Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13 (2), 81-84.
- Pinto, A.C.Q., 2011. A produção, o consumo e a qualidade da manga no Brasil. *Matéria*, online at <http://www.todafruta.com.br/>.
- Pinto, G.A.S., Brito, E.S., Andrade, A.M.R., Fraga, S.L.P., Teixeira, R.B., 2005. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. *EMBRAPA Comunicado técnico online* 1:5.
- Pitt, J.I., 1991. *A laboratory Guide to Common Penicillium Species*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing, North Wales.
- Raper, K.B., Alexander, D.F., 1945. Preservation of molds by lyophil process. *Mycology* 37 (4), 499-525.
- Renovato, J., Gutiérrez-Sánchez, G., Rodríguez-Durán, L.V., Bergman, C., Rodríguez, R., Aguilar, C.N., 2011. Differential Properties of *Aspergillus niger* Tannase Produced Under Solid-State and Submerged Fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165, 382–395.

- Rohlf, F.J., Fisher, D.L., 1968. Test for hierarchical structure in random data sets. *Systematic Zoology* 17, 407-412.
- Rozane, D.E., Darezzo, R.J., Aguiar, R.L., Aguilera, G.H.A., Zambolim, L., 2004. Manga, produção integrada, industrialização e comercialização. Suprema Gráfica e Editora, São Paulo.
- Sabu, A., Pandey, A., Jaafar, Daud, M., Szakacs, G., 2005. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agroresidues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* TCC 16620. *Bioresource Technology* 96, 1223–1228.
- Sacramento, C.K., Souza, F.X. , 2000. Cajá (*Spondias mombin* L.). Funep, Jaboticabal.
- Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2004. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomic Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. *Studies in Mycology* 49, 1-260.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1948. The mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27, 379-423.
- Selwal, M.K., Yadav, A., Selwal, K.K., Aggarwal, N.K., Gupta, R., Gautam, S.K., 2011. Tannase production by *Penicillium atramentosum* km under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 374-387.
- Selwal, M.K., Selwal, K.K., 2012. High-level tannase production by *Penicillium atramentosum* KM using agro residues under Submerged fermentation. *Annals of Microbiology* 62 (1), 139-148.
- Sharma, S., Bhat, T.K., Dawra, R.K., 2000. A Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine. *Analytical Biochemistry* 279, 85–89.
- Sherf, A.F., 1943. A method for maintaing *Phytopomonas sepedonical* in culture for long periods without transfer. *Phytopatology* 33, 330-332.
- Statsoft, 2008. Inc. Statistica (data analysis software systems) version 8.0.