



**ABORDAGEM POLIFÁSICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE
LINHAGENS DE *ASPERGILLUS* SEÇÃO *NIGRI* PRESERVADAS
NA MICOTECA URM E CARACTERIZAÇÃO QUANTO A
PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLIGALACTURONASES**

MARÍLIA DE HOLANDA CAVALCANTI MACIEL

**RECIFE
02/2013**



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

**ABORDAGEM POLIFÁSICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE
LINHAGENS DE *ASPERGILLUS* SEÇÃO *NIGRI* PRESERVADAS
NA MICOTECA URM E CARACTERIZAÇÃO QUANTO A
PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLIGALACTURONASES**

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 obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Aluna: Marília de Holanda Cavalcanti Maciel

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Maria de Souza Motta

Co-orientadores: Prof^ª. Dra. Keila Aparecida Moreira
Prof. Dr. Nelson Lima

Colaborador: Pesquisador Dr. Cledir Santos

**RECIFE
02/2013**

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

M152a Maciel, Marília de Holanda Cavalcanti

Abordagem polifásica para identificação de linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* preservadas na micoteca URM e caracterização quanto a produção e purificação de Poligalacturonases / Marília de Holanda Cavalcanti Maciel. – Recife: O Autor, 2013.

149 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Coorientadores: Keila Aparecida Moreira; Nelson Lima

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Fungos 2. Enzimas de fungos I. Motta, Cristina Maria de Souza (orientadora) II. Moreira, Keila Aparecida (coorientadora) III. Lima, Nelson IV. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-144

**ABORDAGEM POLIFÁSICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE
ASPERGILLUS SEÇÃO NIGRI PRESERVADAS NA MICOTECA URM E
CARACTERIZAÇÃO QUANTO A PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
POLIGALACTURONASES**

MARÍLIA DE HOLANDA CAVALCANTI MACIEL

Data da defesa: 27 de Fevereiro de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr.^a. Cristina Maria de Souza Motta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Cledir Santos - Examinador Externo
Universidade do Minho

Dr. Marcelo Elias Fraga - Examinador Externo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Dr.^a. Polyanna Nunes Herculano - Examinador Externo
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr.^a. Tatiana Souza Porto - Examinador Externo
Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns

MEMBROS SUPLENTEs

Dr^a. Virgínia Medeiros de Siqueira - Examinador Externo
Universidade Estadual de Campinas

Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira - Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta tese aos meus pais, que em todos os momentos estiveram do meu lado.

Agradecimentos

Início os agradecimentos por meus pais, Helcias e Lúcia Maciel, que viveram esse sonho comigo e compartilharam de cada momento ao longo de todos os anos da minha vida. Obrigada.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos pelo apoio e condições de trabalho, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o meu doutorado.

À Universidade do Minho e ao Departamento de Engenharia Biológica pela disponibilização das instalações para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa.

Ao Programa Erasmus Mundus External Cooperation Window Lote 17 pela bolsa concedida durante minha estadia na Universidade do Minho.

À minha professora e primeira orientadora de pesquisa, Prof^ª. Dr^ª. Cristina Maria de Souza-Motta, pela orientação, amizade, incentivo, disponibilidade, conselhos profissionais e científicos que me levaram a conclusão desse trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Keila Aparecida Moreira, pela amizade que foi construída, pela orientação dada e pela sua presença incentivadora.

Ao meu co-orientar, Prof. Dr. Nelson Lima, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes dois anos de trabalho. Agradeço pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao Dr. Cledir Santos, pela colaboração durante todo o desenvolvimento do trabalho, por sempre acreditar na minha capacidade, pela amizade construída e incentivo que sempre foi dado.

Um agradecimento em particular à Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Figueiredo Porto por ter disponibilizado a infraestrutura do Laboratório de Tecnologia de Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Labtecbio/UFRPE) para a realização dos experimentos.

À Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Souza Porto por sua ajuda na análise estatística dos dados e pela orientação dada durante os experimentos. Obrigada pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos da Micoteca URM, Ana Regis, Jadson, Minelle, Roberta e Odacy, agradeço pelos bons momentos no ambiente de trabalho. Agradeço em especial a Eliane pela amizade e pelo apoio dado nas horas que mais precisei.

À Polyanna que sempre me ajudou na realização dos experimentos. Obrigada pela nossa amizade e que apesar da distância nada mudou.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos amigos da Micoteca da Universidade do Minho, Cristiane, Fabiana, Francisco, Héctor, Leonel, Lúcia, Magno, Manoel, Marta, Matheus, Mônica, Nicole e Virgínia, por terem me recebido de uma forma tão carinhosa. E aos meus amigos do Departamento de Engenharia Biológica, Célia, Margarida e Mayron um obrigada pelos nossos bons momentos dentro e fora do laboratório.

Aos amigos Fabiana, Francisco, Guiomar, Iris, Lorena, Luã, Lucélia, Magno, Maria das Graças, Mariângela, Marina, Matheus, Mayron, Mônica e Virgínia, um público reconhecimento pela nossa amizade que foi construída. Agradeço a todos vocês por poder compartilhar os momentos de alegria, tristeza e angústia. Vocês sempre seram minha família portuguesa.

Meu agradecimento mais profundo é dedicado a você, Mayron de Vasconcelos. Pessoa que conheci do outro lado do oceano, em uma cidade maravilhosa chamada Braga, e que sempre estive do meu lado. Você me fez ver e descobrir coisas maravilhosas. Agradeço por ter você comigo, pela sua paciência e sobre tudo pela nossa amizade. Te amo muito.

E, por fim, agradeço a Deus por me dar a oportunidade de conviver com pessoas especiais e poder agradecê-las, neste momento, pela participação, de uma forma ou de outra, em minha vida. Agradeço a todos vocês por tudo.

RESUMO

As espécies de *Aspergillus* pertencentes à seção *Nigri* são caracterizadas pela cor negra da maioria das colônias. A identificação destas espécies é complexa devido à alta diversidade genética. As características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, moleculares e espectrais são ferramentas que podem ser utilizadas na identificação polifásica. *Aspergillus niger* é a espécie da seção *Nigri* mais utilizada na indústria. Dentre as enzimas produzidas por este fungo podemos citar as poligalacturonases (PG), que possuem aplicação tecnológica no processamento de alimentos e frutas. Neste trabalho, linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* foram avaliadas por uma abordagem polifásica baseada na análise morfológica, bioquímica e espectral por Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser Tempo-de-Vôo/Espectrômetro de Massa (MALDI-TOF MS) para sua identificação e caracterização. Os dados obtidos a partir dessa abordagem indicaram que os resultados do MALDI-TOF MS corroboraram os dados da taxonomia clássica e análises bioquímicas. Cerca de 20% e 14% das linhagens de *A. niger* foram produtoras de ocratoxina A (OTA) e fumonisina B₂ (FB₂), respectivamente. As linhagens não micotoxigênicas foram avaliadas quanto à capacidade de produzir PG, sendo *A. niger* URM 5162 que apresentou maiores valores de atividade quando imobilizada em casca de laranja e com o reator operado sem aeração. Após a produção, as PG foram purificadas pelo sistema de duas fases aquosas (SDFA) formado por polietilenoglicol e sais de fosfato (PEG/fosfato). A endopoligalacturonase (endo-PG) e a exopoligalacturonase (exo-PG) tiveram preferência pela fase superior do sistema (rica em PEG). Para as duas enzimas, os melhores resultados para o coeficiente de partição ($K=1,23$ para endo-PG e $2,40$ para exo-PG), rendimento em atividade ($Y=74,04\%$ para endo-PG e $33,33\%$ para exo-PG) e fator de purificação (FP= $8,18$ para endo-PG e $1,98$ para exo-PG), foram obtidos com $12,5\%$ (m/m) de PEG 8000 (g/mol) e concentração de fosfato de 25% (m/m) a pH 6,0, sendo esta a condição considerada como a mais adequada para a purificação das PG produzidas por *A. niger* URM 5162. A concentração de fosfato e a massa molar do PEG foram as variáveis independentes que mais influenciaram nos valores de K , Y e FP durante a purificação da endo- e exopoligalacturonase, respectivamente. Diante dos resultados obtidos, observa-se que a utilização de uma abordagem polifásica consistindo de análise morfológica, bioquímica e proteômica, permite uma identificação mais precisa das espécies da seção *Nigri*. *Aspergillus niger* URM 5162 é a linhagem promissora para

produção de PG, sendo o SDFA uma alternativa interessante e de baixo custo para a purificação destas enzimas.

Palavras-chave: *Aspergillus* negros, identificação polifásica, ocratoxina A, fumonisina B₂, poligalacturonases e sistema de duas fases aquosas.

ABSTRACT

The *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* are characterized by black color of most colonies. The identification of these species is complex due to the high genetic diversity. Morphological, physiological, biochemical, molecular and spectral tools can be used to polyphasic identification. *Aspergillus niger* is a species of section *Nigri* commonly used in industry. Polygalacturonases (PG) are among the most important enzymes produced by this fungus, which have technological applications in food processing. In this study, strains of *Aspergillus* section *Nigri* were identified and characterized using a polyphasic approach based on morphological, biochemical and spectral by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight/Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). The data obtained from this approach indicate that the results of MALDI-TOF MS corroborated with data from classical taxonomy and biochemical analyzes. Approximately 20% and 14% of *A. niger* strains were ochratoxin A (OTA) and fumonisin B₂ (FB₂) producers, respectively. Micotoxigenic strains were not evaluated for their ability to produce PG. *A. niger* URM 5162 had highest activity when immobilized on orange peel and the reactor operated without aeration. After production, PG were purified by aqueous two-phase system (ATPS) formed by polyethylene glycol and phosphate salts (PEG/phosphate). The endo-polygalacturonase (endo-PG) and exo-Polygalacturonase (exo-PG) had preference for the top phase (PEG-rich). For both enzymes, the best results for the partition coefficient ($K=1.23$ for endo-PG and 2.40 for exo-PG) activity yield ($Y=74.04\%$ for endo-PG and 33.33% for exo-PG) and purification factor ($PF=8.18$ for endo-PG and 1.98 for exo-PG) were obtained with 12.5% (w/w) PEG 8000 (g/mol) and phosphate concentration of 25% (w/w) at pH 6.0. These conditions were considered the most suitable for the purification of PG produced by *A. niger* URM 5162. The phosphate concentration and molecular weight of PEG showed to be independent variables that influenced the values of K , Y and FP during purification of endo-and exo-PG, respectively. Based on these results, it was observed that the use of a polyphasic approach consisting of morphological, biochemical and proteomics, allows a more accurate identification of species of section *Nigri*. *Aspergillus niger* URM 5162 is a promising strain for production of PG, and the ATPS are interesting and inexpensive to purify these enzymes.

Keywords: black *Aspergillus*, polyphasic identification, ochratoxin A, fumonisin B₂, polygalacturonases and aqueous two-phase system.

Lista de figuras

| Fundamentação teórica | Pág. |
|--|-------------|
| Figura 1. Formas de vesículas de <i>Aspergillus</i> : a) globosa ou esférica; b) piriforme; c) espatulada e d) clavada | 23 |
| Figura 2. a) Conidióforo uniseriado de <i>Aspergillus</i> , ou seja, apresenta apenas uma única camada de células (fiálides) que darão origem aos conídios; b) Conidióforo biseriado de <i>Aspergillus</i> , ou seja, apresenta duas camadas de células (métulas e fiálides) | 23 |
| Figura 3. Estrutura química da ocratoxina A (OTA) | 41 |
| Figura 4. Estrutura química das fumonisinas B ₁ [1], B ₂ [2] e B ₃ [3] | 47 |
| Figura 5. Representação esquemática da parede celular de vegetais | 51 |
| Figura 6. Estrutura da pectina | 52 |
| Artigo 1 | |
| Figura 1. Verso das colônias de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> em CZ e MEA a 25°C após 7 dias de crescimento. (A-B) <i>A. niger</i> URM 5207, (C-D) <i>A. carbonarius</i> URM 5012, (E-F) <i>A. japonicus</i> URM 3452, (G-H) <i>A. aculeatus</i> URM 3776, (I-J) <i>A. foetidus</i> URM 749, (K-L) <i>A. brasiliensis</i> MUM 05.10, (M-N) <i>A. ellipticus</i> MUM 03.12 e (O-P) <i>A. ibericus</i> MUM 03.49 .. | 77 |
| Figura 1. (Cont.): Verso das colônias de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> em CZ e MEA a 25°C após 7 dias de crescimento. (Q-R) <i>A. lacticoffeatus</i> MUM 06.150, (S-T) <i>A. sclerotioniger</i> MUM 06.151, (U-V) <i>A. tubingensis</i> MUM 06.152, (W-X) <i>A. vadensis</i> MUM 06.153 e (Y-Z) <i>A. uvarum</i> MUM08.01 | 78 |
| Figura 2. Características microscópicas das espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> crescidas em MEA por 7 dias no escuro a 25°C. Linhas: (A) <i>A. niger</i> URM 5959, (B) <i>A. carbonarius</i> URM 1546, (C) <i>A. japonicus</i> URM 3452, (D) <i>A. aculeatus</i> URM 4953, (E) <i>A. foetidus</i> URM 749, (F) <i>A. brasiliensis</i> MUM 05.10 e (G) <i>A. ellipticus</i> MUM 03.12 | 79 |
| Figura 2. (Cont.): Características microscópicas das espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> crescidas em MEA por 7 dias no escuro a 25°C. Linhas: (H) <i>A. ibericus</i> MUM 03.49, (I) <i>A. lacticoffeatus</i> MUM 06.150, (J) <i>A. sclerotioniger</i> MUM 06.151, (K) <i>A. tubingensis</i> MUM 06.152, (L) <i>A. vadensis</i> MUM 06.153 e (M) <i>A. uvarum</i> MUM 08.01 | 80 |
| Figura 3. Dendrograma construído com base nas análises de seriação; forma, tamanho e ornamentação dos conídios; tipo de cabeça conidial; cor da colônia em CZ e MEA; e detecção da produção de OTA e FB ₂ para as linhagens de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> | 81 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4. Dendrograma construído com base nas análises do MALDI-TOF MS entre as linhagens de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> . As distâncias são medidas como percentagem de similaridade | 84 |
| Artigo 2 | |
| Figura 1. Diagrama do reator de leito fixo utilizado no presente estudo | 93 |
| Figura 2. Atividade de endo-poligalacturonase e exo-poligalacturonase das 12 linhagens de <i>Aspergillus</i> maiores produtores em 72 horas | 95 |
| Figura 3. Produção de exo-poligalacturonase (▲) e endo-poligalacturonase (■) por <i>Aspergillus niger</i> URM 5162 em reator de leito fixo. (a) célula imobilizada sem aeração; (b) célula imobilizada com aeração; (c) célula imobilizada com aeração e adição de pectina; e (d) célula livre com aeração. Variação de pH durante a produção de poligalacturonases (●) .. | 98 |
| Figura 4. Imagens obtidas por MEV para o suporte casca de laranja (CL) colonizado por <i>Aspergillus niger</i> URM 5162: (a) suporte com 4 dias de incubação a 25°C (x 150) e (b) suporte com 7 dias de incubação a 25°C (x 300) | 99 |
| Artigo 3 | |
| Figura 1. Efeitos das variáveis concentração do PEG (C_{PEG} , % m/m) e concentração de fosfato (C_{FOS} %, m/m) sobre o fator de purificação da endo-poligalacturonase produzida por <i>Aspergillus niger</i> URM 5162 pelo SDFA | 111 |
| Figura 2. Efeitos das variáveis concentração do PEG (C_{PEG} , % m/m) e concentração de fosfato (C_{FOS} %, m/m) sobre o fator de purificação da exo-poligalacturonase produzida por <i>Aspergillus niger</i> URM 5162 pelo SDFA | 113 |

Lista de tabelas

| Fundamentação teórica | Pág. |
|---|-------------|
| Tabela 1. Subgênero e seções para o gênero <i>Aspergillus</i> segundo Peterson (2000) | 25 |
| Tabela 2. Manuais e monografias importantes para a identificação das espécies de <i>Aspergillus</i> | 26 |
| Tabela 3. Espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> aceitas por diferentes autores | 29 |
| Tabela 4. Principais micotoxinas produzidas por fungos, substratos e efeitos no homem e nos animais | 39 |
| Tabela 5. Classificação das enzimas pécticas | 54 |
| Artigo 1 | |
| Tabela 1. Caracterização fenotípica e perfis bioquímicos das linhagens de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> | 75 |
| Tabela 1. (Cont.): Caracterização fenotípica e perfis bioquímicos das linhagens de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> | 76 |
| Artigo 2 | |
| Tabela 1. Linhagens de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> avaliadas quanto à capacidade de produzir endo-poligalacturonase e exo-poligalacturonase | 90 |
| Artigo 3 | |
| Tabela 1. Níveis dos fatores utilizados no planejamento experimental do tipo 2 ⁴ selecionados para a extração e purificação das poligalacturonases (PG) utilizando o SDFA PEG/fosfato | 105 |
| Tabela 2. Condições e resultados do planejamento experimental (2 ⁴) para extração das poligalacturonases utilizando PEG/fosfato em SDFA | 109 |
| Tabela 3. Efeitos calculados a partir das respostas dos resultados obtidos do planejamento experimental (2 ⁴) para extração das poligalacturonases utilizando PEG/fosfato em SDFA | 110 |

SUMÁRIO

| | Pág. |
|---|-------------|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 19 |
| 2.1. Coleção de culturas | 19 |
| 2.2. Morfologia e classificação do gênero <i>Aspergillus</i> | 22 |
| 2.3. Taxonomia da seção <i>Nigri</i> | 26 |
| 2.3.1. Identificação das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> - uma abordagem polifásica | 30 |
| 2.3.1.1. Caracteres morfológicos | 31 |
| 2.3.1.2. Perfis de metabólitos secundários | 33 |
| 2.3.1.3. Espectrometria de massas | 34 |
| 2.4. Micotoxinas | 37 |
| 2.4.1. Ocratoxina A (OTA) | 40 |
| 2.4.1.1. Espécies ocratoxigênicas | 43 |
| 2.4.2. Fumonisinias (FBs) | 45 |
| 2.4.2.1. Fungos produtores de fumonisinias | 47 |
| 2.5. Fungos produtores de pectinases | 49 |
| 2.6. Substâncias pécticas | 50 |
| 2.7. Enzimas pectinolíticas | 52 |
| 2.7.1. Protopectinases (PPase) | 54 |
| 2.7.2. Enzimas desmetoxilantes ou desesterificantes | 54 |
| 2.7.3. Enzimas despolimerizantes | 55 |
| 2.7.3.1. Hidrolases | 55 |
| 2.7.3.2. Pectina liases | 55 |
| 2.7.4. Aplicações das pectinases | 56 |
| 2.8. Produção de pectinases por fermentação submersa (FSm) | 58 |
| 2.9. Sistema de duas fases aquosas (SDFA) | 59 |
| 3. Artigo 1 | |
| 3.1. Abordagem polifásica incluindo MALDI-TOF MS para caracterização de espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> | 63 |
| Resumo | 64 |
| Introdução | 65 |

| | |
|--|------------|
| Materiais e métodos | 67 |
| Resultados e discussão | 71 |
| Conclusões | 85 |
| Agradecimentos | 85 |
| 4. Artigo 2 | |
| Produção de poligalacturonases por linhagens de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> em reator de leito fixo | 86 |
| Resumo | 87 |
| Introdução | 88 |
| Materiais e métodos | 89 |
| Resultados e discussão | 93 |
| Conclusões | 99 |
| Agradecimentos | 99 |
| 5. Artigo 3 | |
| Separação e purificação de poligalacturonases produzidas por <i>Aspergillus niger</i> URM 5162 utilizando PEG/fosfato em um sistema de duas fases aquosas | 100 |
| Resumo | 101 |
| Introdução | 102 |
| Materiais e métodos | 103 |
| Resultados e discussão | 106 |
| Conclusões | 114 |
| Agradecimentos | 114 |
| 6. CONSIDERAÇÕES GERAIS | 115 |
| 7. REFERÊNCIAS | 117 |
| ANEXO | 148 |

1 INTRODUÇÃO

A identificação e caracterização das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, até a década de 90, eram realizadas levando em consideração apenas caracteres morfológicos como: diâmetro, cor e textura das colônias, tamanho e ornamentação do conídio e estrutura do conidióforo (Klich, 2002; Chulze *et al.*, 2006). Esta seção é considerada por muitos taxonomistas como uma das mais difíceis de identificar (Samson *et al.*, 2007a; Noonim *et al.*, 2008; Varga *et al.*, 2011) devido à alta diversidade genética, o que dificulta a identificação baseada unicamente em caracteres morfológicos (Samson *et al.*, 2007a; Somma *et al.*, 2012).

Dessa forma, diversos pesquisadores têm relatado a importância de uma abordagem polifásica, ou seja, a combinação de diferentes ferramentas de identificação, como por exemplo, características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, na delimitação de espécie do gênero *Aspergillus* (Samson; Varga, 2009; Sørensen *et al.*, 2011). A técnica do MALDI-TOF MS (Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser Tempo-de-Vôo/Espectrômetro de Massa) é uma ferramenta emergente que vem sendo utilizada na identificação de fungos (Santos *et al.*, 2010b; Simões *et al.*, 2013). Estudos fundamentados na técnica do MALDI-TOF MS têm demonstrado o potencial desta nova abordagem capaz de discriminar espécies fortemente relacionadas de forma rápida e precisa em condições bem definidas (Kallow *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2008).

A incorporação de características bioquímicas, como por exemplo, enzimas e metabólitos secundários, tem ajudado a solucionar problemas na identificação de fungos (Simões *et al.*, 2013). Espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* são bem conhecidas pela produção de vários metabólitos secundários (Sørensen *et al.*, 2011). Dentre os metabólitos produzidos, podemos citar as micotoxinas, que são metabólitos secundários tóxicos que podem induzir reações alérgicas e doenças no homem e em outros animais (Zaki *et al.*, 2012). As principais micotoxinas produzidas pelas espécies da seção *Nigri* são a ocratoxina A (OTA) e as fumonisinas (FBs), em particular a FB₂ (Nielsen, 2009).

A OTA é uma das micotoxinas mais nocivas do mundo (Palencia *et al.*, 2010), produzida por diversas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (Hermanns *et al.*, 2006; Bazin *et al.*, 2012). As espécies de *Aspergillus* estão entre as mais importantes produtoras de OTA (Frisvad *et al.*, 2006; Abrunhosa *et al.*, 2010), onde pode-se destacar as espécies pertencentes à seção *Nigri*: *A. carbonarius* e *A. sclerotioniger*, e em baixa percentagem *A. niger* e *A. awamori* (Frisvad *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2011; Storari *et al.*, 2012a).

As FBs são micotoxinas cancerígenas originalmente descritas no gênero *Fusarium* (Scott, 2012; Storari *et al.*, 2012b). *Aspergillus niger* também é considerado produtor de FBs uma vez que houve a descoberta dos genes homólogos para biossíntese das fumonisinas em seu genoma (Frisvad *et al.*, 2007; Logrieco *et al.*, 2010a). As FB₁, FB₂ e FB₃ são as mais detectadas em linhagens de fungos, sendo a FB₂ a principal produzida pelas espécies do “agregado *Niger*” (Orsi *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2012).

A utilização de fungos como produtores de enzimas é reconhecida pelo FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos, onde os produtos derivados podem ser destinados ao consumo humano (Said *et al.*, 2004). Linhagens de *A. niger* são frequentemente utilizadas na produção comercial de pectinases e são classificadas como GRAS (*Generally Regarded as Safe*), o que significa que as enzimas derivadas dessas linhagens são aceitáveis para utilização na indústria alimentar (Pariza; Foster, 1983). No entanto, uma vez que *A. niger* é considerado produtor de micotoxinas, como OTA e FBs, essas podem contaminar os compostos utilizados nos processos de fabricação de alimentos, torna-se imprescindível à prévia detecção de micotoxinas na seleção de linhagens para determinados setores industriais, bem como a identificação correta em nível de espécie (Somma *et al.*, 2012).

Diferentes classes de enzimas têm sido utilizadas para caracterização de fungos (Simões *et al.*, 2013). Entre essas substâncias catalíticas, as pectinases possuem ação desesterificantes e despolimerizantes, devido à função de degradar a pectina localizada na lamela média da parede celular primária das células vegetais e são classificadas em pectinesterase (PE), poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL) de acordo com a sua forma de ação (Dartora *et al.*, 2002). Essas enzimas têm sido utilizadas em vários processos industriais, tais como no processamento de sucos de frutas, na recuperação de óleos essenciais, na extração de óleos vegetais, na fabricação de ração para animais, na indústria de vinhos, têxtil e de papel e celulose (Uenojo; Pastore, 2007; Laaksonen *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2012). As pectinases correspondem a 25% da produção de enzimas no mercado mundial (Gomes *et al.*, 2011).

Durante o processo fermentativo, ocorre a produção de diferentes tipos de enzimas o que impede a utilização direta do extrato bruto da fermentação em aplicações industriais. Sendo assim, o desenvolvimento de técnicas e métodos para a separação e purificação de proteínas, bem como, organelas celulares e outros produtos biológicos, tem sido considerados parâmetros importantes e emergentes para o avanço da indústria biotecnológica (Mazzola *et al.*, 2008; Andrews; Asenjo, 2010). A aplicação do SDFA tem

por objetivo separar a biomolécula alvo de impurezas, de forma que esta migre para a fase de maior afinidade, seja por força iônica ou pH do meio, associado as características da molécula alvo (tamanho, carga e hidrofobicidade). Esses sistemas podem ser formados por soluções aquosas de dois polímeros (geralmente polietilenoglicol - PEG), ou um polímero e um sal (por exemplo, fosfato, sulfato ou citrato) (Asenjo; Andrews, 2011). Esse tipo de sistema é considerado um dos mais econômicos processos de recuperação e purificação, e possui vantagens como: biocompatibilidade, baixo consumo de energia e processamento rápido (Ratanapongleka, 2010).

Diante deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar por uma abordagem polifásica linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri*. Os parâmetros utilizados nesta abordagem incluíram morfologia, produção de OTA e FB₂, bem como uso da análise espectral por MALDI-TOF MS. As linhagens não produtoras de micotoxinas (OTA e FB₂) foram caracterizadas quanto à produção de poligalacturonases e as enzimas parcialmente purificadas pelo sistema de duas fases aquosas (PEG/fosfato).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Coleção de culturas

As coleções de culturas funcionam como unidades de conservação *ex-situ*, de forma que a preservação das linhagens de fungos é feita fora do seu ambiente natural por meio de diferentes métodos de preservação (Simões *et al.*, 2013). Representam uma importante fonte de recursos biológicos permitindo o conhecimento da biodiversidade e a condução de inúmeros trabalhos científicos (Figueiredo, 2001). As informações contidas nas coleções são recursos-chave para o desenvolvimento científico e tecnológico (Souza-Motta, 2007). Um exemplo da importância das coleções de culturas é a utilização de *Thermus aquaticus*, que esteve depositada na ATCC (American Type Culture Collection) por 20 anos antes de ter sido utilizada na descoberta da Taq polimerase (Boundy-Mills, 2012).

Em 1998, um grupo de trabalho envolvendo representantes da comunidade científica de diversos países foi estabelecido pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), para discutir os desafios e oportunidades associadas ao estabelecimento de uma rede global de Centro de Recursos Biológicos (CRBs) com a finalidade de fornecer serviços e serem depositários de células vivas, de genomas de organismos, e da informação relacionada com a hereditariedade e as funções biológicas dos sistemas (Lima, 2007). No Brasil, a criação de CRBs possibilita a comunicação entre as instituições que possuem coleções microbianas de referência, garantindo que o país possa oferecer um material biológico confiável e de qualidade, além de fazer a manutenção da biodiversidade dentro do território nacional (Sette *et al.*, 2007).

A primeira coleção que se tem registro é a coleção Král, estabelecida em Praga, República Tcheca, em 1890, com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas. Após a criação da coleção de Král, muitas outras importantes coleções de fungos foram estabelecidas, tais como: ATCC nos EUA; BCCM/MUCL (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Mycothèque de L'Université Catholique de Louvain) na Bélgica; CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) na Holanda; FGSC (Fungal Genetics Stock Center) nos EUA; IMI (CAB International) no Reino Unido; MUM (Micoteca da Universidade do Minho) em Portugal; NCPF (National Collection of Pathogenic Fungi) no Reino Unido; NRRL (National Center for Agricultural Utilization Research) nos EUA e a URM (University Recife Mycology) no Brasil (Simões *et al.*, 2003).

A World Federation for Culture Collections (WFCC) promove atividades de apoio aos interesses das coleções de cultura e seus usuários, e oferece informações atualizadas através do World Data Centre of Microorganisms (WDCM), que é um banco de dados desta federação (Simões *et al.*, 2013). De acordo com o WDCM atualmente estão registradas 632 coleções de culturas no WDCM, distribuídas em 72 países (World Data Center For Microorganisms, 2013). Os continentes que apresentam o maior número de coleções de culturas são a Ásia e a Europa, com, respectivamente, 219 e 218 coleções. Na Ásia, a Tailândia se destaca com 59 coleções, preservando aproximadamente 43.106 linhagens, porém o Japão, a Índia, a Coreia e a China preservam um maior número de linhagens, 246.343, 216.379, 134.698 e 94.373, respectivamente, mesmo tendo um número menor de coleções (25, 25, 21 e 25, respectivamente). Já na Europa, a França destaca-se com 39 coleções de culturas, preservando aproximadamente 69.946 linhagens de diferentes tipos de micro-organismos. Entretanto, a Holanda, a Dinamarca e o Reino Unido são os países que preservam um maior número de linhagens, 90.775, 86.951 e 84.132, em apenas 6, 3 e 19 coleções, respectivamente. Portugal possui cinco coleções de culturas, onde são preservadas 7.035 linhagens de algas, bactérias e fungos. Em toda América são encontradas 148 coleções de culturas, onde o Brasil é o país que se destaca com 63 coleções de culturas, preservando em torno de 165.000 linhagens de diversos micro-organismos como algas, protozoários, bactérias e fungos. No mundo, os cinco países que possuem maior número de linhagens preservadas são: Japão em primeiro lugar com 246.343, seguido pela Índia (216.379), Estados Unidos da América (210.276), Brasil (165.000) e Coreia (134.698) (World Data Center For Microorganisms, 2013).

No Brasil, a Micoteca URM, do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, foi fundada em 1954 pelo Prof. Augusto Chaves Batista e apresenta um acervo diversificado de fungos pertencentes aos seguintes grupos do Reino Fungi: Chytridiomycota, Mucoromycotina (anteriormente Zygomycota), Ascomycota, Basidiomycota e respectivas fases assexuadas (fungos anamorfos), além dos grupos que foram reclassificados em outros Reinos como Stramenopila. Esta coleção de culturas está registrada no Commonwealth Mycological Institute (CMI) sob a sigla URM (University Recife Mycologia) e é filiada ao WFCC sob o número 604 (Souza-Motta, 2011).

O primeiro método de preservação utilizado pela Micoteca URM foi o óleo mineral (Sherf, 1943). Em 1988, mais dois métodos foram implantados: liofilização (Raper; Alexander, 1945) e água destilada esterilizada (Castellani, 1967). O método de preservação

por ultracongelamento a -80°C foi implantado em 2009 e vem sendo utilizado na preservação de linhagens de fungos bem caracterizadas taxonomicamente, espécies raras e novas, assim como para aquelas produtoras de metabólitos de interesse econômico (Souza-Motta, 2011).

Todas as culturas preservadas na Micoteca URM estão identificadas em nível de espécie e são mantidas em duplicata em pelo menos dois métodos de preservação. Diferentes métodos de preservação devem ser utilizados para uma mesma cultura, na tentativa de minimizar os riscos de perda de viabilidade, contaminação, alterações morfológicas, fisiológicas e genéticas, resultando na perda de suas propriedades, principalmente para as linhagens de interesse industrial (Santos; Lima, 2001; Santos *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2013). O custo e a eficácia de cada método de preservação são aspectos importantes que devem ser levados em consideração durante a escolha. Os métodos mais utilizados na preservação de fungos são a subcultura, óleo mineral, água destilada, sílica gel, ultracongelamento a -80°C e a -196°C , e nitrogênio líquido (Simões *et al.*, 2013).

Além de receber amostras de fungos para compor o acervo, a Micoteca URM presta serviços de fornecimento de amostras, isolamento e identificação de culturas, treinamento de estudantes e profissionais na área de taxonomia e preservação. Os pedidos são procedentes de instituições de ensino e/ou pesquisa nacionais e internacionais, de laboratórios que utilizam amostras de micro-organismos em testes para fabricação de medicamentos, enzimas e outros metabólitos de interesse econômico. Os fungos preservados são procedentes de diversos substratos e ambientes como solo, resíduos industriais, endofíticos, sedimento de manguezal, dentre outros (Souza-Motta, 2011).

O acervo da Micoteca URM vem sendo caracterizado quanto aos aspectos taxonômicos (morfológicos, fisiológicos e moleculares), biotecnológico, tais como, produção de enzimas, antígenos, antimicrobianos, ácidos orgânicos, utilização no controle biológico de pragas e de doenças de plantas (Herculano *et al.*, 2011; Maciel *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2012; Braz *et al.*, 2009).

A Micoteca da Universidade do Minho (MUM), em Portugal, encontra-se no Centro de Engenharia Biológica desde 1996. Apesar de ser uma coleção de pequeno porte, foi construída com base em critérios bem estabelecidos, levando em consideração normas de criação e operação de coleção de culturas de micro-organismos. Os principais métodos de preservação utilizados pela MUM são o de liofilização e ultracongelamento a -80 (Santos; Lima, 2001).

A MUM encontra-se registrada no centro de dados do WDCM com o número 816, sendo membro da European Culture Collections Organization (ECCO) e da WFCC (Micoteca MUM, 2012). Recentemente, a MUM recebeu a certificação pelo seu sistema de gerenciamento da qualidade com a implantação da ISO 9001:2008, o que garante uma maior credibilidade e competitividade internacionalmente. Sendo assim, a MUM é a primeira coleção de culturas microbianas em Portugal e a 23^a no mundo a apresentar esse tipo de certificação (Escola de Engenharia – Universidade do Minho, 2012).

2.2 Morfologia e classificação do gênero *Aspergillus*

Em 1729, o padre-micologista e biólogo chamado de Pier Antonio Micheli descreveu pela primeira vez o gênero *Aspergillus*. Ao observar as estruturas desse gênero ao microscópio, Micheli percebeu a semelhança com a forma de um aspergillum (borrifador/aspergidor de água benta), sendo assim, a espécie foi nomeada de acordo com o objeto (Klich, 2002; Bennett, 2010).

O gênero *Aspergillus* representa um anamorfo de ascomiceto pertencente à ordem *Eurotiales*, caracterizado pela produção de esporos assexuais (Klich; Pitt, 1988). A taxonomia clássica do gênero baseia-se nos caracteres morfológicos e fisiológicos, bem como nas características reprodutivas observadas (Raper; Fennell, 1965; Klich, 2002). O gênero é de fácil identificação, porém a identificação em nível de espécie é considerada algumas vezes complexa. Microscopicamente, o gênero é caracterizado por apresentar a base do conidióforo em forma de “T” ou “L”, onde estão conectados com a hifa vegetativa. Esta forma é comumente denominada de “célula pé” e quando visualizada pelos taxonomistas são logo identificados como pertencente ao gênero *Aspergillus*. O conidióforo é o ramo que se desenvolve a partir da “célula pé”, podendo apresentar diferentes comprimentos. No ápice do conidióforo é formada a vesícula através da expansão do conidióforo. A vesícula pode possuir diferentes formas e tamanho dependendo da espécie (Figura 1). Os conídios são produzidos nas fiálides que saem diretamente da vesícula. As espécies que possuem essa forma (vesícula/fiálide) são denominadas de uniseriadas (Figura 2a). Nas outras espécies, há uma segunda camada de células entre a vesícula e as fiálides. Esta segunda camada de células é denominada de métulas e as espécies de *Aspergillus* que possuem métulas são denominadas de biseriadas (Figura 2b) (Klich, 2002).

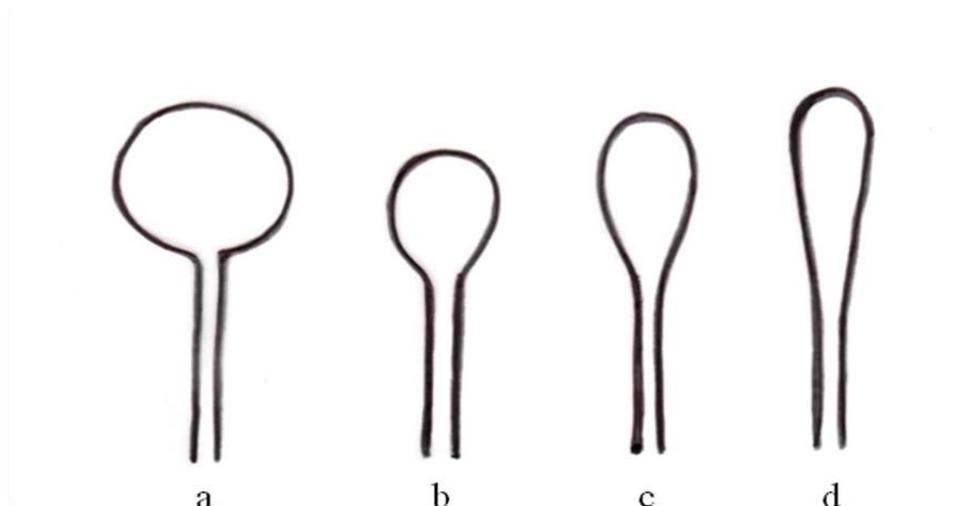


Figura 1. Formas de vesículas de *Aspergillus*: a) globosa ou esférica; b) piriforme; c) espatulada e d) clavada.

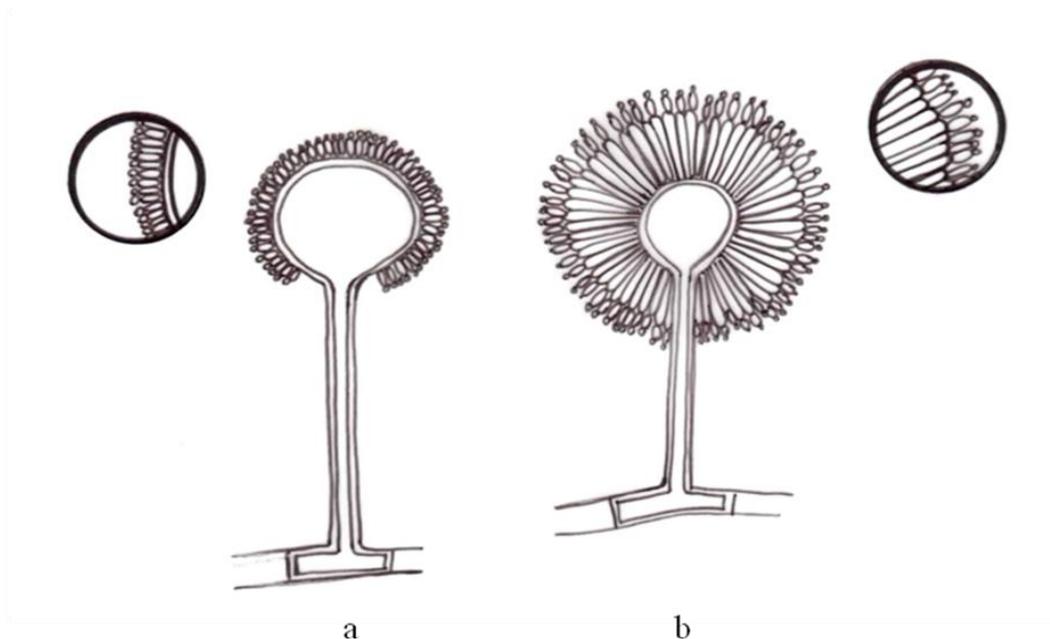


Figura 2. a) Conidióforo uniseriado de *Aspergillus*, ou seja, apresenta apenas uma única camada de células (fiálides) que darão origem aos conídios; b) Conidióforo biseriado de *Aspergillus*, ou seja, apresenta duas camadas de células (métulas e fiálides).

Algumas espécies de *Aspergillus* produzem células de Hülle, que são células de paredes muito espessas e refringentes, cuja função ainda não é completamente conhecida (Klich; Pitt, 1988). As células de Hülle por vezes são consideradas células de suporte ou de reserva nutritiva para o fungo.

O tamanho, a cor e a ornamentação da parede dos conídios são importantes características de identificação. As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* possuem conídios de cor negra, no entanto, as da seção *Fumigati*, *Nidulantes* e *Flavi* possuem conídios de cor verde (Klich, 2002; Bennett, 2010). Outras características morfológicas usadas na identificação das espécies são as cores e diâmetro da colônia, a produção de exudatos e pigmentos solúveis, taxa de crescimento, termotolerância e a presença de esclerócio e clestotécio. As seções possuem diferentes colorações para as colônias, o que torna essa característica macroscópica de grande importância na diferenciação. As cores das colônias podem variar de vários tons de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza. As características morfológicas dos esclerócios, como cor, forma e tamanho, também devem ser considerados durante a identificação (Klich, 2002). As linhagens de *Aspergillus* devem ser crescidas em meios de cultura específicos (Samson *et al.*, 2007a), uma vez que alterações morfológicas podem surgir de acordo com o meio utilizado.

Após a primeira descrição do gênero *Aspergillus* feita Micheli (1729), muitas outras espécies começaram a ser descritas por Thom e Church (1926). Thom e Church (1926), baseados em caracteres morfológicos, aceitaram 69 espécies de *Aspergillus*, onde foram divididas em 11 grupos. Thom e Raper (1945) estabeleceram 77 espécies para o gênero, com 10 variedades em 14 grupos. Raper e Fennell (1965) descreveram 132 espécies pertencentes ao gênero e as subdividiram em 18 grupos, com base em características culturais e morfológicas. Em 1985, Gams *et al.* reorganizaram os grupos em seções pertencentes a seis subgêneros: *Aspergillus*, *Circumdati*, *Clavati*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Ornati*.

Em 2000, Pitt *et al.* publicaram uma lista com os nomes das espécies aceitas e sinônimos na família *Trichocomaceae*. Duzentas e quatro espécies foram aceitas para o gênero *Aspergillus* e teleomorfos associados. Peterson (2000) em um estudo filogenético com o rDNA de 215 *Aspergillus*, sugeriu uma alteração na nomenclatura, onde as espécies estariam em três subgêneros e 16 seções (Tabela 1).

Tabela 1. Subgêneros e seções para o gênero *Aspergillus* segundo Peterson (2000).

| Subgênero | Seção |
|--------------------|--|
| <i>Aspergillus</i> | <i>Aspergillus, Candidi, Cervini, Circundati, Cremei, Flavi, Flavipedis, Nigri, Restricti, Terrei e Wentii</i> |
| <i>Fumigati</i> | <i>Clavati e Fumigati</i> |
| <i>Nidulantes</i> | <i>Nidulantes, Ornati e Sparci</i> |

Houbraken e Samson (2011) através de um estudo filogenético de sequenciamento de quarto *locus* (RPB1, RPB2, Cct8 e Tsr1) dividiram a família *Trichocomaceae* em três famílias, as quais foram denominadas de *Aspergillaceae*, *Thermoascaceae* e *Trichocomaceae*. *Aspergillaceae* foi dividida em sete grupos, onde o grupo denominado de *Aspergillus stricto sensu* foi formado por espécies de *Aspergillus*, *Cristaspora*, *Phialosimplex*, *Polypaecilum* e os teleomorfos de *Aspergillus* (*Dichotomyces*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fennellia*, *Neocarpenteles*, *Neosartorya* e *Sclerocleista*). Este grupo foi subdividido em seis subgrupos denominados de subgêneros *Aspergillus*, *Aspergillus* seção *Cremei*, *Circundati*, *Fumigati*, *Nidulantes* e um subgrupo formado pelos gêneros *Phialosimplex* e *Polypaecilum*. Os quatro subgêneros apresentados por Houbraken e Samson (2011) corroboram os dados apresentados por Peterson (2008). Ao utilizar uma análise multigênica, Peterson (2008) aceitou cinco subgêneros (*Aspergillus*, *Circundati*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Ornati*) e 16 seções, sendo as seções *Clavati*, *Cervini* e *Fumigati* colocadas no subgênero *Fumigati*. Houbraken e Samson (2011) mostraram que as espécies estudadas para seção *Cremei* estiveram estreitamente relacionadas com as espécies pertencentes ao subgênero *Aspergillus* do que com o subgênero *Circundati* como relatado por Peterson (2008). O subgênero *Nidulantes* é constituído pelas seções *Nidulantes*, *Ochraceorosei*, *Usti*, *Sparsi* e *Aeni* (Peterson, 2008; Varga *et al.*, 2010a). A seção *Aeni* não foi confirmada por Houbraken e Samson (2011), pois não houve representantes inclusos no trabalho, e a seção *Ornati*, pertencente ao subgênero *Ornati*, não esteve agrupada em *Aspergillus stricto sensu*.

Segundo Geiser *et al.* (2007) são conhecidas aproximadamente 250 espécies de *Aspergillus*. No entanto, muitas espécies de *Aspergillus* estão sendo identificadas com base em caracteres morfológicos, fisiológicos e moleculares. Se considerarmos que as espécies de fungos são estimadas para variar de 0,5 a 9,9 milhões (Hawksworth, 2001), muitas

espécies ainda estão por ser descritas. Na Tabela 2 são listados manuais e monografias importantes para a identificação das espécies de *Aspergillus*.

Tabela 2. Manuais e monografias importantes para a identificação das espécies de *Aspergillus*.

| Ano | Autor | Trabalho |
|-------|-----------------------------|--|
| 1926 | Thom, C & Church, M. | The Aspergilli (Baltimore: Williams & Wilkins) |
| 1945 | Thom, C. & Raper, K.B. | A Manual of the Aspergilli (Baltimore: Williams & Wilkins) |
| 1965 | Raper, K.B. & Fennell, D.I. | The Genus <i>Aspergillus</i> (Baltimore: Williams & Wilkins) |
| 1980 | Al-Musallam, A. | Revision of the black <i>Aspergillus</i> species |
| 1985 | Samson, R.A. & Pitt, J.I. | Advances in <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> Systematics (New York: Plenum). |
| 1988 | Klich, M.A. & Pitt, J.I. | A Laboratory Guide to Common <i>Aspergillus</i> Species and Their Teleomorphs (North Ryde, Australia: Division of Food Processing). |
| 1989 | Kozakiewicz, A. | <i>Aspergillus</i> Species on Stored Products (Wallingford: CAB International). |
| 1990 | Samson, R.A & Pitt, J.I. | Modern Concepts in <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> Classification (New York: Plenum Press). |
| 2000 | Samson, R.A, & Pitt, J.I. | Integration of Modern Taxonomic Methods for <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> classification (Amsterdam: Harwood Academic Publications). |
| 2002 | Klich, M.A. | Identification of Common <i>Aspergillus</i> Species (Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures). |
| 2007 | Geiser <i>et al.</i> | The current status os species recognition and identification in <i>Aspergillus</i> . |
| 2007 | Pitt, J.I. & Samson, R.A. | Nomenclatural considerations in naming species of <i>Aspergillus</i> and its teleomorphs. |
| 2007b | Samson <i>et al.</i> | The species concept in <i>Aspergillus</i> : recommendations of an international panel. |
| 2007 | Samson, R.A. & Varga, J. | <i>Aspergillus</i> systematics in the genomic era (Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre). |
| 2010a | Varga <i>et al.</i> | <i>Aspergillus</i> sect. <i>Aeni</i> sect. nov., a new section of the genus for <i>A. karnatakaensis</i> sp. nov. and some allied fungi |
| 2011 | Varga <i>et al.</i> | New and revisited species in <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> |
| 2012 | Jurjević <i>et al.</i> | Two novel species of <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> from indoor air |

2.3 Taxonomia da seção *Nigri*

A identificação dos *Aspergillus* seção *Nigri* é considerada uma das mais complexas do gênero, tendo como principais características, conídios de coloração marrom-escura a negros, conidióforo hialino ou levemente pigmentado próximo ao ápice, esterigma uniseriado ou biseriado, e vesícula globosa (Raper; Fennell, 1965; Klich, 2002).

Em 1926, Thom e Church baseados em características morfológicas agruparam as espécies de *Aspergillus* e descreveram 13 espécies, para o que chamaram de Grupo *Aspergillus niger*. Em 1934, Mosseray descreveu 35 espécies de *Aspergillus* negros, onde

25 foram consideradas novas espécies ou novas combinações. Thom e Raper (1945) reduziram esse número proposto para 15 espécies e baseado no tamanho do conídio e na presença ou ausência de métulas subdividiu o Grupo *Aspergillus niger*.

No manual de classificação de Raper e Fennell publicado em 1965 são descritas 12 espécies e 2 variedades dentro do Grupo *Aspergillus niger* (*A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. ficuum*, *A. heteromorphus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. phoenicis*, *A. pulverulentus*, *A. turingensis*, *A. foetidus*, *A. foetidus* var. *acidus* e *A. foetidus* var. *pallidus*). Essa diferenciação das espécies foi realizada levando em consideração caracteres morfológicos como: coloração e tamanho da colônia, seriação (uni ou biseriado), forma e ornamentação dos conídios.

Al-Musallam (1980) revisou a taxonomia deste grupo de fungos usando análise de agrupamento envolvendo parâmetros morfológicos e culturais, e considerou cinco espécies para os *Aspergillus* negros (*A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. helicothrix*, *A. heteromorphus* e *A. japonicus*) e um “agregado *Niger*” constituído de duas espécies, *A. foetidus* e *A. niger*. *Aspergillus niger* nesta revisão é composto por seis variedades (*A. niger* var. *niger*, *A. niger* var. *phoenicis*, *A. niger* var. *awamori*, *A. niger* var. *nanus*, *A. niger* var. *usamii* e *A. niger* var. *intermedius*) e duas formas (*A. niger* var. *niger* f. *hennebergii* e *A. niger* var. *phoenicis* f. *pulverulentus*). Em 1988, Klich e Pitt aceitaram as mudanças propostas por Al-Musallam (1980).

Gams *et al.* (1985) reclassificaram o gênero *Aspergillus* em subgêneros e seções seguindo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica e criou a seção *Nigri* dentro do subgênero *Circundati*. Kozakiewicz (1989) baseada na ornamentação dos conídios, mediante técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), propôs uma nova classificação para as espécies de *Aspergillus* negros. Considerou dois tipos de ornamentação dos conídios: i) verrucoso, a que pertenciam os conídios do “agregado *Niger*” (*A. acidus*, *A. citricus* e *A. niger*) e *A. fonsecaeus*; ii) equinulado, a que pertenciam os conídios de *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. helicothrix*, *A. heteromorphus* e *A. japonicus*. Nessa classificação, Kozakiewicz (1989) distinguiu cinco variedades de *A. niger* e uma de *A. citricus*.

Klich (2002) descreve em seu manual de identificação apenas as espécies mais comuns de *Aspergillus*. Essa descrição foi baseada em critérios morfológicos, onde para a seção *Nigri* foram descritas cinco espécies: *A. awamori*, *A. carbonarius*, *A. foetidus*, *A. japonicus* e *A. niger*, mencionando o *status* taxonômico de *A. aculeatus* em discussão.

Através de análises filogenéticas utilizando-se de dados moleculares e apoiando-se em dados morfológicos, Varga *et al.* (2003) sugeriram que a seção *Nigri* seja formada pelas seguintes espécies: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. japonicus*, *A. niger* e *A. tubingensis*. *Aspergillus brasiliensis*, *A. foetidus*, *A. niger* e *A. tubingensis* são morfológicamente indistinguíveis e, portanto, pertencem ao denominado “agregado *Niger*”. *Aspergillus awamori*, *A. usarii*, *A. phoenicis* e *A. ficuum* foram reduzidas a sinônimos, das espécies *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis* e *A. foetidus*, respectivamente. *Aspergillus helicothrix* foi desconsiderado como espécie por se tratar de um mutante de *A. ellipticus*.

Baseados na produção de metabólitos secundários e características morfológicas como: coloração e diâmetro da colônia, presença e cor de esclerócios, tamanho e ornamentação dos conídios, e sequenciamento do gene da β -tubulina, para algumas espécies, Samson *et al.* (2004) aceitaram 15 espécies pertencentes à seção *Nigri*: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. tubingensis* e *A. vadensis*.

Samson *et al.* (2007a) aceitaram 19 espécies para a seção *Nigri*, onde foram observadas características como: coloração e diâmetro da colônia, fisiologia, produção de metabólitos secundários, e sequenciamento da região ITS, do gene da β -tubulina e calmodulina. As espécies aceitas por esses autores são: *A. aculeatinus*, *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. ibericus*, *A. japonicus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotiiicarbonarius*, *A. sclerotioniger*, *A. tubingensis*, *A. uvarum* e *A. vadensis*.

Varga *et al.* (2011) estudaram a morfologia, fisiologia, ecologia e métodos moleculares na determinação das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* e descreveram quatro novas espécies: *A. eucalypticola*, *A. fijiensis*, *A. indologenus* e *A. neoniger*. No entanto, Jurjević *et al.* (2012) e Hubka e Kolarik (2012) sugerem que *A. fijiensis* seja considerado sinônimo de *A. brunneoviolaceus* pois as sequências de multilocus analisadas são indistinguíveis. Os autores também sugerem que *A. japonicus* seja considerado sinônimo de *A. violaceofuscus*, pois os resultados filogenéticos obtidos não confirmam a separação em duas espécies diferentes. *Aspergillus violaceofuscus* foi revisada por Varga *et al.* (2011) e considerada como uma espécie devido às diferenças filogenéticas. São listadas na Tabela 3 as espécies consideradas como pertencentes à seção *Nigri* por diferentes autores.

Tabela 3. Espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* aceitas por diferentes autores.

| Espécies | Raper; Fennell (1965) | Klich (2002) | Samson et al. (2004) | Samson et al. (2007a) | Varga et al. (2011) | Hubka e Kolarik (2012) | Jurievic et al. (2012) |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Aspergillus acidus</i> | | | | | x | x | x |
| <i>A. aculeatinus</i> | | | | x | x | x | x |
| <i>A. aculeatus</i> | x | x | x | x | x | x | x |
| <i>A. awamori</i> | x | x | | | x | x | x |
| <i>A. brasiliensis</i> | | | x | x | x | x | x |
| <i>A. brunneoviolaceus</i> | | | | | | x | x |
| <i>A. carbonarius</i> | x | x | x | x | x | x | x |
| <i>A. coreanus</i> | | | | | x | x | x |
| <i>A. costaricaensis</i> | | | x | x | x | x | x |
| <i>A. ellipticus</i> | x | | x | x | x | x | x |
| <i>A. eucalypticola</i> | | | | | x | x | x |
| <i>A. ficuum</i> | x | | | | | | |
| <i>A. fijiensis</i> | | | | | x | | |
| <i>A. floridensis</i> | | | | | | | x |
| <i>A. foetidus</i> | x | x | X | x | | | |
| <i>A. foetidus var. acidus</i> | x | | | | | | |
| <i>A. foetidus var. pallidus</i> | x | | | | | | |
| <i>A. heteromorphus</i> | x | | X | x | x | x | x |
| <i>A. homomorphus</i> | | | X | x | x | x | x |
| <i>A. ibericus</i> | | | | x | x | x | x |
| <i>A. indologenus</i> | | | | | x | x | x |
| <i>A. japonicus</i> | x | x | X | x | x | | |
| <i>A. lacticoffeatus</i> | | | x | x | | | |
| <i>A. neoniger</i> | | | | | x | x | x |
| <i>A. niger</i> | x | x | x | x | x | x | x |
| <i>A. piperis</i> | | | x | x | x | x | x |
| <i>A. phoenicis</i> | x | | | | | | |
| <i>A. pulverulentus</i> | x | | | | | | |
| <i>A. saccharolyticus</i> | | | | | x | x | x |
| <i>A. sclerotii carbonarius</i> | | | | x | x | x | x |
| <i>A. sclerotioniger</i> | | | x | x | x | x | x |
| <i>A. trinidadensis</i> | | | | | | | x |
| <i>A. tubingensis</i> | x | | x | x | x | x | x |
| <i>A. uvarum</i> | | | | x | x | x | x |
| <i>A. vadensis</i> | | | x | x | x | x | x |
| <i>A. violaceofuscus</i> | | | | | x | x | x |

2.3.1 Identificação das espécies do gênero *Aspergillus* - uma abordagem polifásica

Devido a não existência de técnicas de identificação que funcionem com perfeição no reconhecimento das espécies, uma abordagem polifásica foi proposta há aproximadamente 35 anos (Samson; Varga, 2009). Essa abordagem polifásica é sugerida na separação de espécies, visando uma combinação de diferentes tipos ferramentas de identificação como, por exemplo, morfologia, dados moleculares, fisiologia, perfis bioquímicos e dados ecológicos (Samson *et al.*, 2007a; Samson; Varga, 2009). A taxonomia do gênero *Aspergillus* tem sido recentemente re-investigada utilizando dados morfológicos, produção de metabólitos secundários, fisiologia e dados moleculares baseados no sequenciamento da região ITS do rDNA, dos genes da β -tubulina e calmodulina (Varga *et al.*, 2007a, Houbraken *et al.*, 2007).

As técnicas moleculares revelaram a grande diversidade existente entre as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, confirmando que a identificação baseada unicamente em caracteres fenotípicos torna-se bastante complexa (Samson *et al.*, 2007a; Varga *et al.*, 2011). Muitas espécies pertencentes à seção *Nigri* estão sendo descritas com base em uma abordagem polifásica, por exemplo, *A. vadensis* (De Vries *et al.*, 2005), *A. ibericus* (Serra *et al.*, 2006), *A. brasiliensis* (Varga *et al.*, 2007b), *A. sclerotiiicarbonarius* (Noonim *et al.*, 2008), *A. aculeatinus* (Noonim *et al.*, 2008), *A. uvarum* (Perrone *et al.*, 2008), *A. eucalypticola* (Varga *et al.*, 2011), *A. indologenus* (Varga *et al.*, 2011), *A. neoniger* (Varga *et al.*, 2011), *A. saccharolyticus* (Sørensen *et al.*, 2011), *A. floridensis* (Jurjević *et al.*, 2012) e *A. trinidadensis* (Jurjević *et al.*, 2012).

A delimitação de espécies com base em ferramentas moleculares vem encontrando problemas relacionados aos genes parálogos. Em *Aspergillus* a β -tubulina possui dois genes parálogos denominados de *benA* e *tubC* (Feau *et al.*, 2011) que podem ser amplificados quando se utiliza iniciadores com baixa especificidade (Hubka; Kolarik, 2012). Dessa forma, Hubka e Kolarik (2012) sugerem novos estudos para testar a especificidade dos iniciadores para a β -tubulina em outras seções do gênero *Aspergillus* e em outros grupos de fungos. Várias espécies descritas recentemente são diferenciadas com base em apenas um *locus*, o que proporciona dados insuficientes. Em muitos casos é difícil determinar quais os caracteres que realmente definem uma espécie. Os critérios morfológicos são considerados insuficientes e uma série de novos metabólitos secundários estão sendo descritos (Hubka; Kolarik, 2012). Sendo assim, muitos pesquisadores têm

utilizado a taxonomia polifásica, de modo a minimizar ao máximo erros na identificação das espécies.

2.3.1.1 Caracteres morfológicos

As características macroscópicas e microscópicas são fundamentais na identificação dos fungos. A identificação morfológica, como o próprio nome diz, é baseada na observação dos caracteres morfológicos do fungo, como por exemplo, diâmetro, cor e textura da colônia, seriação (uni ou biseriada), ornamentação, forma e tamanho do conídio e tipo de cabeça conidial. O mais importante manual de identificação do gênero *Aspergillus* foi baseado em caracteres morfológicos (Raper; Fennell, 1965).

A identificação de algumas espécies tem sido feita apenas com base na morfologia. Samson *et al.* (2007a) apresentaram alguns características morfológicas para diferenciação de *A. sclerotiicarbonarius* das demais espécies da seção *Nigri*. *Aspergillus sclerotiicarbonarius* produz esclerócios de cor amarelo-alaranjado e reverso da colônia amarelo brilhante em meio YES (Extrato de Levedura Sacarose Agar). Outro meio de cultura utilizado para diferenciar *A. sclerotiicarbonarius* de espécies estreitamente relacionadas como *A. carbonarius*, *A. ibericus* e *A. sclerotioniger* é o CREA (Creatina Sacarose Agar), devido à sua incapacidade de crescimento neste meio. Os taxonomistas contemporâneos utilizam diferentes meios de cultura e temperaturas para identificar as espécies (Klich, 2006). Diversos perfis de crescimento de fungos utilizando 35 diferentes fontes de carbono, variando de monossacarídeos a biomassa vegetal bruta, encontram-se disponíveis na base de dados denominada “*Fungal Growth Database Linking Growth to Genome*”. Esses perfis podem ser utilizados na comparação do crescimento e no entendimento da especificidade do fungo diante de diferentes fontes de carbono (Fung-Growth, 2012).

Também com base na coloração dos esclerócios Silva *et al.* (2011) diferenciaram *A. tubingensis* de *A. niger* pela produção destas estruturas variando de cor branca a rosa. No entanto, Samson *et al.* (2004) relataram que a produção de esclerócios nem sempre é observada em linhagens de *A. tubingensis*. *Aspergillus aculeatinus*, *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. costaricaensis*, *A. ellipticus*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger* e *A. sclerotiicarbonarius* são espécies consideradas produtoras de esclerócios por Samson *et al.* (2004, 2007a) e *A. ibericus* não é considerado produtor (Serra *et al.*, 2006).

As características dos conídios também são importantes para identificação de algumas espécies, por exemplo, *A. homomorphus* e *A. ibericus* produzem conídios espinhosos, enquanto outras espécies produzem conídios variando de liso ou quase liso, incluindo *A. lacticoffeatus* e *A. vadensis*. As características dos conídios são consideradas fundamentais na identificação e diferenciação das espécies de fungos, pois suas características independe das condições de crescimento (Simões *et al.*, 2013). *Aspergillus carbonarius*, *A. ibericus*, *A. homomorphus*, *A. sclerotiicarbonarius* e *A. sclerotioniger* são espécies que produzem conídios grandes (Samson *et al.*, 2007a).

Klich (2002) e Silva *et al.* (2011) descreveram algumas características morfológicas capazes de diferenciar *A. foetidus* de outras espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*. Segundo esses autores, conidióforos curtos e conídios pequenos, de parede delicadamente espinhosa quando formados e, quando maduros, apresentam parede lisa são as principais características capazes de diferenciar *A. foetidus*. Segundo Samson *et al.* (2004) *A. foetidus*, *A. niger* e *A. tubingensis* continuam a ser difíceis de identificar com base em caracteres morfológicos.

Quanto às espécies uniseriadas, Klich (2002) descreve *A. aculeatus* e *A. japonicus* como espécies morfológicamente semelhantes. As principais características morfológicas utilizadas na identificação de *A. aculeatus* são vesículas grandes variando de (15) 25-55 (100) µm e conídios elipsoidais. De acordo com esta autora, *A. japonicus* é considerada como uma espécie e *A. aculeatus* como uma espécie onde o seu *status* taxonômico ainda encontra-se em questão.

Dörge *et al.* (2000) apresentaram um método automático de identificação de fungos baseado apenas na análise de imagens digitais de colônias após crescimento em meio de cultura padrão. Imagens de culturas de referência foram utilizadas como padrão para identificação. Das imagens digitais foram extraídas características como cor, diâmetro e textura da colônia. As imagens são corrigidas de forma a se obter um conjunto de imagens correspondentes no que diz respeito à iluminação. No entanto, não há um método de identificação que funcione perfeitamente, por isso muitos taxonomistas do gênero *Aspergillus* têm aderido à identificação polifásica (Geiser *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2013).

2.3.1.2 Perfis de metabólitos secundários

Características bioquímicas tais como a produção de metabólitos secundários vem sendo utilizadas por taxonomistas para auxiliar na identificação das espécies de fungos (Kozakiewicz, 1989). Através dos perfis de metabólitos secundários produzidos e da especificidade que estes apresentam com algumas espécies, pode-se ter a identificação (Frisvad *et al.*, 2007; Samson; Varga, 2009).

Muitas espécies possuem uma única combinação de compostos orgânicos e alguns compostos são exclusivamente produzidos por uma espécie. *Aspergillus heteromorphus* possui uma combinação única de metabólitos secundários, incluindo alcalóides indólicos, e nenhum deles com estrutura ainda definida. Muitos dos metabólitos secundários encontrados são ainda de estrutura desconhecida, mas são muitas vezes utilizados na identificação de uma ou mais espécies da seção *Nigri* (Samson *et al.*, 2007a). Um total de 145 metabólitos foi isolado a partir das espécies biseriadas da seção *Nigri* e tiveram suas estruturas elucidadas. As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* são consideradas excelentes produtoras de diferentes metabólitos secundários (Nielsen *et al.*, 2009).

Samson *et al.* (2007a) detectaram a produção de malformina por *A. niger* e *A. tubingensis* e Nielsen *et al.* (2009), além dessas duas espécies, também detectaram em *A. brasiliensis*. Esses autores também observaram que orlandina, kotanina e desmetil-orlandina são consistentemente produzidos por *A. niger* e *A. tubingensis* e a funalenona consistentemente produzida por *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis*. Nielsen *et al.* (2009) observaram que a produção de pirofens e tensidols é restrita em *A. niger* e *A. tubingensis*.

A asparazina pode ser usada para diferenciar *A. foetidus*, *A. tubingensis*, e *A. vadensis* de *A. brasiliensis* e *A. niger*. Em todas as espécies da seção *Nigri*, exceto *A. brasiliensis*, *A. costaricensis* e *A. vadensis*, podemos encontrar piranonigrina A. As espécies uniseriadas, com exceção de *A. japonicus*, são produtoras de ácido secalônico D, no entanto *A. homomorphus*, espécie biseriada, também é produtora desse metabólito secundário. *Aspergillus ellipticus* produz metabólitos encontrados na seção *Candidi* (terfenilina e candidusina) e seção *Usti* (austidiol) (Samson *et al.*, 2007a).

As nafto- γ -pirones (NGPs) representam a família mais abundante de metabólitos secundários da seção *Nigri*. *Aspergillus acidus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ibericus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotiiicarbonarius*, *A. sclerotioniger*, *A. tubingensis* e *A. vadensis* são consideradas produtoras de NGPs. *Aspergillus*

aculeatinus, *A. aculeatus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. japonicus* e *A. uvarum* são as não produtoras de NGPs (Nielsen *et al.*, 2009).

A principal micotoxina produzida pela seção *Nigri* tem sido a ocratoxina A (OTA) e seus precursores (ocratoxina B, α e β) (Nielsen *et al.*, 2009). A produção de OTA foi detectada em *A. carbonarius*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger* e *A. sclerotioniger*, sendo *A. carbonarius* um produtor obrigatório desta micotoxina. Em *A. niger* a produção de OTA é encontrada em aproximadamente 6% das linhagens (Samson *et al.*, 2007a) e recentemente foi descoberto que esta espécie também podem produzir fumonisina B₂ (FB₂) e fumonisina B₄ (FB₄) (Frisvad *et al.*, 2007; Noonim *et al.*, 2009).

Os perfis de metabólitos secundários produzidos por plantas, líquens, actinomicetos e fungos filamentos são utilizados como ferramentas complementares aos tradicionais métodos de identificação. Esse tipo de identificação tem sido bastante utilizado em espécies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Hypoxylon*, *Penicillium*, *Stachybotrys* e *Xylaria* (Frisvad *et al.*, 2008).

2.3.1.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas teve origem com os trabalhos realizados por J. J. Thomson e F. W. Aston (Griffiths *et al.*, 2001). O espectrômetro de massas possui alto grau de precisão e sensibilidade na determinação da massa molecular de compostos biológicos (Poland *et al.*, 2001). É no espectrômetro de massas que ocorre a ionização da molécula, passagem por um analisador de massas, onde ocorrerá a separação dos íons formados de acordo com a razão massa-carga (m/z) e registros da abundância de cada um dos íons para obtenção de um espectro de massa (Bonner *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2007).

A ionização por elétrons (IE) é o método mais comum em espectrometria de massas, onde ocorre volatilização das substâncias em alto vácuo, de forma que apenas os compostos voláteis possuem seu peso molecular determinado. Sendo assim, as biomoléculas, tais como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos não eram analisados devido à instabilidade térmica para serem volatilizadas (Tanaka *et al.*, 1988; Marques, 2006).

As técnicas de “ionização suave” foram desenvolvidas no final da década de 80 como a ionização por ESI-MS (Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray) (Whitehouse *et al.*, 1985) e a ionização por MALDI (Ionização/Dessorção de Matriz

Assistida por Laser) (Karas; Hillenkamp, 1988), tornando possível o uso da espectrometria de massas na análise de moléculas de baixa massa molecular até biomoléculas com massas acima 1 milhão de Daltons (Da) (Graham *et al.*, 2007). A técnica do MALDI foi iniciada no final da década de 80 por Karas e Hillenkamp (1988) e Tanaka (1988), cujo princípio está na adsorção/ionização da amostra juntamente com uma matriz química.

A matriz é um composto orgânico capaz de adsorver a radiação emitida pelo laser. Várias matrizes estão disponíveis no mercado e a escolha deve ser feita de acordo com o laser utilizado no MALDI-TOF MS (Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser Tempo-de-Vôo/Espectrômetro de Massa). As matrizes mais utilizadas para análise de fungos são o ácido 2,5-di-hidróxi-benzóico (DHB) e o ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) e são apropriadas para a análise de moléculas com massa variando de 2 a 20 kDa. A escolha da matriz é fundamental para obtenção de espectros de qualidade, assim como o procedimento de preparação da amostra e a preparação da amostra na placa a ser analisada (Williams *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2010b; Santos *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2013).

As funções da matriz, contendo moléculas aromáticas, é diluir a amostra e adsorver a energia do laser, seguida pela ionização da amostra (Marvin *et al.*, 2003). O analito é misturado a matriz energética, de modo a garantir o excesso da matriz com relação ao analito para que haja o processo de cristalização da amostra (Karas *et al.*, 2000; Kickman *et al.*, 2007). Um feixe de laser de nitrogênio, operando no modo pulsado, com comprimento de onda próximo ao da ultravioleta (UV) incide sobre a mistura matriz/analito ionizando suave e eficientemente, de forma a evitar a degradação das proteínas a serem analisadas (Su; Tseng, 2007; Santos *et al.*, 2010b). Após a incidência do laser, a energia recebida pela matriz é transferida, por um processo de adsorção, para as moléculas do analito tornando-as ionizadas (Krader; Emerson, 2004). Os íons formados são analisados no TOF, onde são acelerados e separados de acordo com o “tempo de voo”, considerando a distância até o detector, a velocidade que os íons se movimentam e a razão m/z (Graham *et al.*, 2007; Carbonnelle *et al.*, 2011). Os íons mais leves chegam mais rapidamente ao detector, enquanto os íons mais pesados demoram mais tempo (Krishnamurthy *et al.*, 2000; Lay, 2000; Fenselau; Demirev, 2001; Lay, 2001). O aparelho deve ser calibrado antes das análises das amostras utilizando-se células de *Escherichia coli* DH5 α e proteínas de massas moleculares (Santos *et al.*, 2010b).

No analisador de massas, dois modos podem ser utilizados: o linear e o refletor. Para moléculas de grande massa molecular (proteínas, peptídeos e polímeros) deve-se utilizar o modo linear, que abrange massas moleculares variando de <100 Da a mais de

1000 kDa, e o modo refletor oferece maior resolução de moléculas menores variando de 0 e 100 Da, podendo resolver até 5000 Da (Santos *et al.*, 2010b). Na análise de fungos por MALDI-TOF MS as moléculas analisadas são as proteínas ribossomais e estruturais, que possuem massa molecular variando de 2000 a 20000 Da, onde o modo linear é o mais adequado para esse tipo de análise (Maier *et al.*, 2006).

Os espectros gerados são analisados por comparação com outros espectros existentes em uma base de dados (Tonolla *et al.*, 2010) e para identificação de micro-organismos é necessário um programa, como por exemplo o BioTyper™ (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Germany) ou Saramis® (AnagnosTec GmbH, Potsdam-Golm, Germany), onde as proteínas desconhecidas são comparadas com massas moleculares de referência contidas no programa (Santos *et al.*, 2010b). No entanto, para a identificação correta das espécies é necessário o estabelecimento de um banco de dados espectral completo (Hettick *et al.*, 2008).

A técnica do MALDI-TOF MS baseia-se na análise de características fenotípicas, que variam de acordo com meios de cultura e tempo de incubação (Valentine *et al.*, 2005; Carbonnelle *et al.*, 2011). As condições de crescimento devem ser mantidas constantes para o desenvolvimento da base de dados (Bernardo *et al.*, 2002; Hettick *et al.*, 2008). Essa ferramenta vem sendo utilizada na detecção e identificação de proteínas através do peso molecular, chegando à identificação de micro-organismos (Barbuddhe *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2008; Vanlaere *et al.*, 2008; Wittwer *et al.*, 2011). A identificação é feita por análise de espectros, que variam entre os micro-organismos, sendo alguns específicos para determinados gêneros e espécies. Vários estudos de identificação de fungos têm aplicado esta ferramenta, considerada rápida, sensível e de pequenos custos de reagentes, onde uma boa discriminação tem sido obtida na maioria dos casos (Chen; Chen, 2005; Keller *et al.*, 2008; Marinach-Patrice *et al.*, 2009; Marklein *et al.*, 2009; De Respini *et al.*, 2010; Marinach-Patrice *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010b; Tonolla *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2011; Alanio *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Bille *et al.*, 2012; De Carolis *et al.*, 2012; Passarini *et al.*, 2012).

Biomarcadores podem ser estabelecidos através da análise com o MALDI-TOF MS. Chen e Chen (2005) analisaram conídios de seis espécies de *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum* e *P. pinophilum*) para identificar biomarcadores para essas espécies. Os conídios foram misturados com a solução matriz do MALDI e analisados. Os perfis de massa espectral foram semelhantes para as linhagens de uma mesma espécie e os íons biomarcadores foram distintos para as

diferentes espécies de *Penicillium*. Com base nesses íons biomarcadores pode-se fazer uma rápida e confiável identificação das espécies.

Kallow *et al.* (2006) compararam linhagens de *A. ibericus* com outras espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* pela técnica do MALDI-TOF MS. As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* utilizadas nesse trabalho foram: *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. phoenicis*, *A. sclerotioniger*, *A. tubingensis* e *A. vadensis*. Quando analisadas pela técnica do MALDI-TOF MS, *A. carbonarius* e *A. ibericus* formaram dois grupos distintos. *Aspergillus sclerotioniger* e *A. lacticoffeatus* também mostraram afinidade com *A. carbonarius* e *A. niger*, respectivamente. O “agregado *Niger*” é formado por espécies que são difíceis de serem identificadas devido à alta similaridade entre elas. O agregado foi composto por *A. niger*, *A. phoenicis* e *A. tubingensis*. *Aspergillus vadensis* é a espécie mais relacionada com *A. tubingensis*, porém todas as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* estão bem relacionadas. As espécies uniseriadas, *A. aculeatus* e *A. japonicus*, apresentam-se em um mesmo grupo e *A. ellipticus* aparece próximo a essas duas espécies no dendrograma. Poucos trabalhos são encontrados na literatura utilizando o MALDI-TOF MS para *Aspergillus* seção *Nigri*. Esta técnica deve ser utilizada como uma ferramenta de apoio dentro de uma abordagem polifásica no processo de identificação de fungos.

2.4 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidas por fungos e comumente contaminantes em produtos agrícolas como milho, frutas frescas e secas, cereais, sementes oleaginosas, nozes e especiarias (Bennet; Klich, 2003; Abrunhosa, 2008; Paterson; Lima, 2009, 2010b; Brera *et al.*, 2011). Esses metabólitos secundários são formados durante a fase estacionária de crescimento e não apresentam significância aparente para o crescimento ou metabolismo do fungo. A origem desses metabólitos parece ser devida ao acúmulo de precursores dos metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros. Dessa forma, a síntese das micotoxinas ocorre para que haja uma diminuição da quantidade desses precursores, os quais não são requeridos para o metabolismo (Food Ingredients Brasil, 2009).

A história das micotoxinas teve início em 1960 no Reino Unido quando houve um surto inexplicável de mortes de perus. Após investigação, chegou-se a conclusão de que o problema estava relacionado à ração produzida com amendoim importado da África e do

Brasil. Esse amendoim estava altamente contaminado com *A. flavus* e a toxina encontrada foi denominada de aflatoxina (Goldblatt, 1969; Food Ingredients Brasil, 2009). As aflatoxinas (AFs) constituem um risco à saúde humana, por apresentar efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressores e podem gerar problemas hepáticos (Cardwell, 2001; Maziero; Bersot, 2010; Brera *et al.*, 2011).

Nos países em desenvolvimento, a ocorrência de micotoxinas em alimentos e derivados é ainda mais séria uma vez que os produtos de boa qualidade são normalmente exportados e os de qualidade inferior, ou seja, os que apresentam níveis de micotoxinas superiores aos permitidos nos países importadores, são vendidos no mercado interno, colocando em risco a saúde da população (Dawson, 1991).

Estudos têm revelado a existência de 400 tipos de micotoxinas (Betina, 1984), porém as principais são AFs, deoxinivalenol (DON), fumonisinas (FBs), OTA, patulina (PAT) e zearalenona (ZON) (Rodríguez-Amaya; Sabino, 2002; Murphy *et al.*, 2006; Food Ingredients Brasil, 2009). As micotoxinas de maior importância para saúde humana e animal, bem como para o agro-negócio são as AFs, FBs, OTA, ZON, tricotecenos e toxinas tremorgênicas. Estas micotoxinas são responsáveis por perdas de milhões de dólares ao ano (Zain, 2011).

As micotoxinas que são consideradas importantes na contaminação de alimentos são produzidas principalmente por *Alternaria*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium* e *Penicillium* (Maziero; Bersot, 2010) (Tabela 4). A presença do fungo toxigênico no grão não implica necessariamente na produção de micotoxinas, uma vez que para que sejam produzidas é necessário condições favoráveis de aeração, pH, temperatura, umidade, injúria mecânica no produto, o tipo de produto, além dos fatores biológicos, como a susceptibilidade dos vegetais à infecção fúngica (Prieta *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2002; Maziero; Bersot, 2010). Muitos desses fatores aparecem durante a colheita, o processamento, a conservação e o armazenamento dos alimentos (Prieta *et al.*, 1994). Geralmente as micotoxinas são termoestáveis, resistindo a determinados tratamentos térmicos de industrialização e embalagem, os quais são apenas suficientes para remoção dos fungos (Chu, 1991; Molin; Valentini, 1999; Maziero; Bersot, 2010).

Tabela 4. Principais micotoxinas produzidas por fungos, substratos e efeitos no homem e nos animais.

| Substratos | Fungos produtores | Toxina | Efeitos |
|---------------------------------------|---|---|--|
| Amendoim e milho | <i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> | Aflatoxina B1 | Hepatóxica, nefrotóxica e carcinogênica |
| Trigo, aveia, cevada, milho e arroz | <i>Penicillium citrinum</i> | Citrinina | Nefrotóxica para suínos |
| Centeio e grãos em geral | <i>Claviceps purpurea</i> | Ergotamina | Gangrena de extremidades ou convulsões |
| Milho | <i>Fusarium verticillioides</i> | Fumonisinias | Câncer de esôfago |
| Cevada, café e vinho | <i>A. ochraceus</i> e <i>A. carbonarius</i> | Ocratoxina | Hepatóxica, nefrotóxica e carcinogênica |
| Frutas e sucos de frutas | <i>P. expansum</i> e <i>P. griseofulvum</i> | Patulina | Toxicidade vagamente estabelecida |
| Milho, cevada, aveia, trigo e centeio | <i>Fusarium</i> sp, <i>Myrothecium</i> sp <i>Stachybotrys</i> sp <i>Trichothecium</i> sp | Tricotecenos: T2, neosolanol, fusanona x, nivalenol, deoxivalenol | Hemorragias vômitos e dermatites |
| Cereais | <i>F. graminearum</i> | Zearalenona | Baixa toxicidade; síndrome de masculinização e feminização em suínos |

FONTE: Food Ingredients Brasil (2009).

As legislações referentes aos limites máximos de micotoxinas em alimentos *in natura* e processados, incluindo rações para animais de abate e de estimação, têm sido regulamentadas por muitos países na tentativa de proteger a população dos efeitos causados. Os países membros do Mercosul, englobando Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, possuem uma legislação comum para as AFs. O Uruguai possui a mais detalhada legislação da América Latina, apresentando limites de detecção para alcalóides ergóticos em ração, o que é inédito para qualquer legislação no mundo. Os alcalóides ergóticos são metabólitos secundários produzidos por fungos, cuja produção ocorre nos esclerócios de diversas espécies do gênero *Claviceps* (Embrapa, 2007). No Brasil, as AFs eram as únicas micotoxinas cujos limites máximos de detecção em alimentos estavam previstas na legislação. Em 2002, o Ministério da Saúde através da Resolução RDC nº 274, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), publicada no Diário Oficial da União, estabelece os limites admissíveis para AFs (Leite: Leite fluído – 0,5 µg/L; Leite em pó – 5

$\mu\text{g}/\text{Kg}$; Milho – 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e amendoim – 20,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em determinados produtos, porém, apenas para os destinados a exportação (Anvisa, 2002).

Em Fevereiro de 2011 a Anvisa publicou no Diário Oficial da União a Resolução RDC 07/2011 onde 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 AFs (Aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), OTA, DON, FBs (FB₁ + FB₂), PAT e ZON. Os produtores deverão seguir um cronograma que entra em vigor imediatamente e se estenderá até janeiro de 2016 (Anvisa, 2011). Até Janeiro de 2014 os limites máximos tolerados para a OTA será de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, para a DON irá variar de 1250-3000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ dependendo do alimento, FB₁ + FB₂ será de 5000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e para a ZON é de 400 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Os países da União Europeia, os Estados Unidos e o Canadá dispõem de uma legislação específica para as principais micotoxinas. Os países membros da União Europeia também dispõem de uma legislação adicional para os limites máximos de algumas micotoxinas. Através do Regulamento (UE) n° 105/2010 de 2010, publicado no Jornal Oficial da União Europeia, uma alteração foi feita no Regulamento (CE) n° 1881/2006 no que diz respeito aos limites máximos de detecção da OTA e a determinados produtos alimentícios. Algumas especiarias foram incluídas na lista como, por exemplo, pimentões, pimenta, noz-moscada, gengibre, curcuma e mistura de especiarias que contenham uma ou mais especiarias indicadas e o alcaçuz (raiz e extrato) (União Europeia, 2010). Em virtude do crescente intercâmbio de produtos entre os países é provável que ocorra uma padronização da legislação para as micotoxinas a nível global (Coker *et al.*, 1995).

2.4.1 Ocratoxina A (OTA)

Após a descoberta das aflatoxinas, as ocratoxinas foram o primeiro grupo de micotoxinas a serem identificadas. As ocratoxinas são caracterizadas por apresentarem uma estrutura molecular formada por uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina, mediante uma ligação amida (Figura 3). Em 1965, Van Der Merwe isolou e identificou a OTA a partir de uma linhagem de *A. ochraceus* K-804 isolada de grãos de sorgo contaminados (Betina, 1984). Nem todas as linhagens de *A. ochraceus* são capazes de produzir OTA. A ocratoxina B (OTB), ocratoxina C (OTC), ocratoxina α (OT α),

ocratoxina β (OT β), (4-*R*) e (4-*S*)- hidroxiocratoxina A (4*R*-OH OTA e 4*S*-OH OTA), 4-hidroxiocratoxina B (4-OH OTB) e 10-hidroxiocratoxina A (10-OH OTA) são naturalmente produzidas por fungos (Abrunhosa *et al.*, 2010).

A OTA é um composto cristalino incolor de fórmula empírica C₂₀H₁₈O₆NCl com um peso molecular de 403.822 Da, mais tóxica que as outras ocratoxinas. Caracteriza-se por apresentar fluorescência verde quando exposta a luz ultravioleta (UV=336nm) e essa propriedade é comumente utilizada para detecção e identificação pelo método de cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) pode ser empregada para detecção da OTA. Esta micotoxina é altamente solúvel em solventes orgânicos polares, solúvel em solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio e fracamente solúvel em água (Abrunhosa *et al.*, 2010). Os pontos de fusão são 94°C-96°C e 169°C quando cristalizado a partir do benzeno e xileno, respectivamente (Betina, 1989).

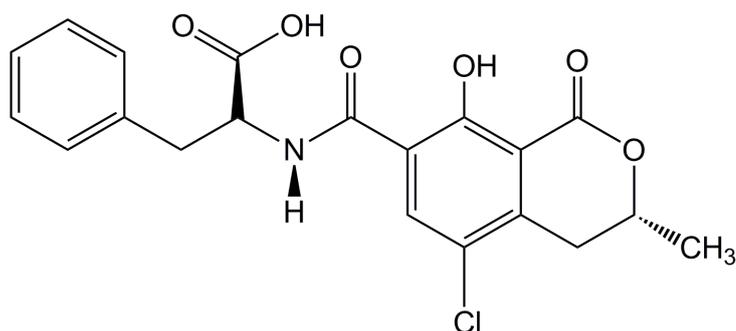


Figura 3. Estrutura química da ocratoxina A (OTA).

A OTA é considerada uma das três mais importantes micotoxinas nocivas do mundo (Palencia *et al.*, 2010) e seus efeitos hepatóxicos, nefrotóxicos e teratogênicos estão bem documentados (Boudra; Morgavi, 2006; Paterson; Lima, 2010a). A inibição da síntese protéica, indução da peroxidação de lipídios, estresse oxidativo e danos no DNA são outros efeitos que também são descritos para OTA (Al-Anati; Petzinger, 2006; Almela *et al.*, 2007). Segundo Zhang *et al.* (2009) a OTA pode contribuir para o surgimento de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer. A OTA também possui atividade imunossupressora, sendo caracterizada pela redução do tamanho de órgãos vitais

do sistema imune, tais como timo, baço e nódulos linfáticos, depressão das respostas dos anticorpos, alterações no número e funções de células do sistema imune, e modulação da produção de citocinas (Berek *et al.*, 2001). Também pode persistir no organismo por um longo período, tendo uma meia vida de 35 dias em humanos, 72-120 horas em porcos e 77 horas em animais ruminantes (Al-Anati; Petzinger, 2006).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou a OTA como carcinogênica para humanos no grupo 2B (IARC, 2002). Cereais e derivados têm sido relatados como as principais fontes de OTA, embora também já tenha sido detectada em vinho, cerveja, café, feijão e frutas secas (Visconti *et al.*, 2000; Gauchi; Leblanc, 2002; Monaci; Palmisano, 2004; Zheng *et al.*, 2005; Battilani *et al.*, 2006; Pattono *et al.*, 2011). Nos produtos de origem animal, como aves e suínos, a OTA pode estar presente diretamente no alimento ou em decorrência de uma alimentação com rações contaminadas (Bayman; Baker, 2006; Pattono *et al.*, 2011).

A biossíntese da OTA não está completamente estabelecida, embora várias vias alternativas já tenham sido propostas. Sabe-se que a parte isocumárica é um pentacédeo sintetizado através de uma via metabólica dos policetídeos e que a L-b-fenilalanina deriva da via metabólica do ácido xiquímico. Poucas informações existem sobre os genes responsáveis pelos passos da biossíntese da OTA (Abrunhosa *et al.*, 2010). O gene PKS nos fungos codifica a policetídeo sintase, uma enzima envolvida nos primeiros passos da biossíntese da OTA em espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Gallo *et al.* (2009) relataram a identificação e caracterização de parte de um novo gene PKS de *A. carbonarius* denominado de ACpks. A correlação entre a expressão gênica de ACpks e produção de OTA, sugere o provável envolvimento deste gene na biossíntese desta micotoxina pelos fungos. A partir de uma avaliação preliminar de linhagens de *Aspergillus* com iniciadores específicos para o gene ACpks, pareceram estar presentes genes homólogos a este em *A. sclerotioniger* e *A. ibericus*, duas espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, que estão estreitamente relacionadas com *A. carbonarius*.

Sendo assim, pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de encontrar métodos mais seguros de descontaminação e prevenção. A biodegradação é considerada a melhor solução para a descontaminação de alimentos. Vários trabalhos já foram realizados utilizando culturas de células ou micro-organismos, como fungos, protozoários, bactérias e culturas celulares de plantas (Abrunhosa *et al.*, 2010).

2.4.1.1 Espécies ocratoxigênicas

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados os maiores produtores de OTA (Kumar *et al.*, 2007; Varga; Samson, 2008; Milicevic *et al.*, 2010; Zain, 2011). Dentro do gênero *Aspergillus* podemos destacar as seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri* como as mais importantes produtoras (Frisvad *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2004; Frisvad *et al.*, 2006). Dentro do gênero *Penicillium* apenas *P. verrucosum* e *P. nordicum* são produtoras de OTA (Cabañes *et al.*, 2010).

Ueno *et al.* (1991) foram os primeiros a notificar a produção de OTA por uma espécie pertencente à seção *Nigri* (*A. foetidus* CBS 618.78). Esta espécie foi revisada por Kusters van Someren *et al.* (1991), Pařenicová *et al.* (1997) e Accensi *et al.* (1999) sendo reidentificada como *A. niger*.

Em 2001, Abarca *et al.* relataram o aumento no número de espécies ocratoxigênicas pertencentes à seção *Nigri*. As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* consideradas como produtoras de OTA são: *A. carbonarius*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger* e *A. sclerotioniger* (Abarca *et al.*, 2001; Samson *et al.*, 2004; Frisvad *et al.*, 2006). Outras espécies como *A. brasiliensis*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. ibericus*, *A. japonicus*, *A. tubingensis* e *A. uvarum* não são produtores de OTA, porém pertencem à seção *Nigri* (Samson *et al.*, 2006; Moslem *et al.*, 2010).

Dalcero *et al.* (2002) e Battilani *et al.* (2003) mencionaram a produção de OTA por *A. japonicus* e Ponsone *et al.* (2007) detectaram nas espécies de *A. aculeatus* e *A. japonicus*. Medina *et al.* (2005) observaram a produção desta micotoxina por *A. tubingensis*. No entanto, esses resultados não são confirmados por Samson *et al.* (2004). Varga *et al.* (2011) e Storari *et al.* (2012b) também não observaram a produção de OTA por *A. tubingensis*. Nenhuma espécie uniseriada pertencente à seção *Nigri* é considerada produtora de OTA por Perrone *et al.* (2008).

Samson *et al.* (2004) corroboraram os resultados obtidos por Abarca *et al.* (2004) onde todas as linhagens de *A. carbonarius* e algumas de *A. niger* foram produtoras de OTA. *Aspergillus lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger* também foram considerados produtores de OTA e nenhuma linhagem de *A. foetidus* foi produtora. Em 1996, Wicklow *et al.* sugeriram que a produção de metabólitos secundários por fungos produtores de esclerócios poderia levar a um aumento da toxicidade da OTA. Samson *et al.* (2004) também observaram que a produção de esclerócios por algumas linhagens não está necessariamente relacionada à produção de OTA. *Aspergillus aculeatus*, *A. costaricaensis*, *A. ellipticus* e *A.*

piperis são espécies que produzem esclerócios, mas não são produtoras de OTA. No entanto, *A. sclerotioniger* produz esclerócios em abundância e OTA.

Perrone *et al.* (2007) estudaram a biodiversidade de *Aspergillus* seção *Nigri* em uvas da Europa e grãos de café do sul da Tailândia e observaram a produção de OTA pelas espécies. Nas uvas foram isoladas as seguintes espécies: *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. tubingensis*, e outras espécies uniseriadas, *A. aculeatus* e *A. japonicus*. *Aspergillus carbonarius* foi o principal produtor de OTA. A produção de OTA foi menor pelas linhagens de *A. niger* e *A. tubingensis*. A produção de OTA não foi observada nas espécies uniseriadas da seção *Nigri*, corroborando com os resultados obtidos por Perrone *et al.* (2008). Perrone *et al.* (2007) também observaram que as amostras de café cereja e de café verde estiveram 100% e 98%, respectivamente, contaminadas com *Aspergillus* seção *Nigri*. *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* foram predominantes nos dois tipos de café. Com base nesses dados os autores concluíram que *A. carbonarius* é responsável pela produção de OTA em grãos de café do sul da Tailândia.

Perrone *et al.*, (2007) também analisaram grãos de café arábica do norte da Tailândia. As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* contaminaram 75% das amostras de café, sendo *A. niger* a espécie predominante. *Aspergillus aculeatinus*, *A. foetidus* e *A. tubingensis* também foram isoladas, porém *A. carbonarius* não foi isolado. Sendo assim, os autores concluíram que as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* são as responsáveis pela contaminação dos grãos de café dessa região com OTA. Trabalhando também com grãos de café Moslem *et al.* (2010) isolaram e identificaram fungos de grãos de café verde de diferentes mercados na Arábia Saudita. As espécies potencialmente produtoras de OTA foram isoladas, destacando-se *A. niger* e *A. ochraceus*, como as mais frequentes. As linhagens de *A. niger* apresentaram uma maior produção da OTA. De acordo com os autores, o “agregado *Niger*” e *A. carbonarius* podem ser responsáveis pela produção de OTA nas amostras de café verde. No Brasil, estudos têm demonstrado que *A. ochraceus* (seção *Circumdati*), *A. carbonarius* (seção *Nigri*) e *A. niger* (seção *Nigri*) são as principais espécies responsáveis pela presença de OTA em grãos de café (Magnani *et al.*, 2005).

Soares *et al.* (2012) isolaram de milho 270 linhagens pertencentes à seção *Nigri* e através das características morfológicas observaram que estas pertenciam ao “agregado *Niger*”. Nenhuma espécie uniseriada foi isolada, bem como *A. carbonarius* e *A. ibericus*. Das linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri*, 37 (14%) foram produtores de OTA.

Trabalhando com fungos isolados do chá verde, Storari *et al.* (2012a) observaram que em 16 das 22 amostras houve contaminação com espécies da seção *Nigri*. Das 137

linhagens, oito espécies foram identificadas, através do sequenciamento do gene da calmodulina, como pertencentes à seção *Nigri*. As espécies mais bem representadas foram *A. niger* (41 linhagens), *A. acidus* (39 linhagens), *A. awamori* (27 linhagens) e *A. tubingensis* (23 linhagens). Outras espécies também foram isoladas, porém em menor número (*A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. japonicus* e *A. uvarum*). *Aspergillus carbonarius* não foi isolado das amostras de chá. A produção de OTA foi observada em três linhagens de *A. niger* e nenhuma das linhagens de *A. awamori* foi considerada produtora.

Storari *et al.* (2012b) isolaram a partir de uvas cultivadas do norte da Itália, um total de 283 linhagens pertencentes à seção *Nigri*. Baseados no sequenciamento do gene da calmodulina, foram classificadas como *A. uvarum* (183 linhagens), *A. niger* (43 linhagens), *A. tubingensis* (54 linhagens), *A. acidus* (2 linhagens) e *A. carbonarius* (1 linhagem). Estes autores observaram a produção de OTA por *A. carbonarius* e por apenas uma linhagem de *A. niger*. As linhagens de *A. uvarum* não foram testadas quanto à produção de OTA, pois segundo Perrone *et al.* (2008) essa espécie não é produtora desta micotoxina. Também foi observada a presença do gene para a biossíntese da OTA nas linhagens de *A. niger* e em apenas uma linhagem foi observada a presença do gene *an15g07920*, um tipo de PKS, mostrando que a ausência desse gene está relacionada com a deficiência da produção de OTA. Recentemente, Storari *et al.* (2010) e Yamada *et al.* (2011) também mostraram essa relação. Storari *et al.* (2012b) concluíram que *an15g07920* é um importante marcador molecular na detecção de linhagens ocratoxigênicas de *A. niger*. Sendo assim, a correta identificação das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* é importante para que se possa avaliar os riscos de contaminação pela OTA (Nielsen *et al.*, 2009).

2.4.2 Fumonisin (FBs)

Em 1988, Gelderblom *et al.* investigadores do *South African Medical Research Council*, isolaram as fumonisin B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂) de *Fusarium verticillioides* (sinônimo de *F. moniliforme* MRC 826). As FBs são produzidas principalmente pelo gênero *Fusarium* (Lino *et al.*, 2007; Heinl *et al.*, 2010; Jurado *et al.*, 2010; Menniti *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011) e possuem a estrutura molecular de um amino poliálcool tricarboxilado altamente polar e solúvel em água (Figura 4). A similaridade estrutural entre as FBs e a parte polar da esfingosina, lipídio encontrado no cérebro, sugere uma inibição da biossíntese de esfingolipídios (Wang *et al.*, 1991; Shier, 1992; Hirooka, 2000). No entanto, essa inibição causa problemas à atividade celular, uma vez que essas substâncias são

essenciais para composição da membrana, comunicação entre células, interação intracelular e a matriz celular, e para os fatores de crescimento (Merrill *et al.*, 1993).

As FBs são hidrossolúveis, diferentemente das outras micotoxinas que são solúveis em solventes orgânicos (Murphy *et al.*, 2006). Essa característica de hidrossolubilidade das FBs dificulta seu estudo e faz com que outras micotoxinas permaneçam ainda desconhecidas (Bezuidenhout *et al.*, 1988). A termoestabilidade, apresentada pelas FBs, também é considerada como um fator de risco para a saúde humana e animal (Embrapa, 2002). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica as FBs como cancerígenas pertencentes ao grupo 2B (IARC, 2002).

O grupo das FBs é constituído de 100 diferentes tipos de isômeros e estereoisômeros. Em decorrência da similaridade estrutural entre elas, quatro grupos de FBs (A, B, C e P) foram identificadas. Os grupos A, B e P (FAs, FBs e FPs) são caracterizados por apresentar uma cadeia principal de 20 átomos de carbono, e o grupo C (FCs) com 19 átomos de carbono (Bartók *et al.*, 2006; Gelderblom *et al.*, 2007; Bartók *et al.*, 2008, 2010).

A FB₁ é um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e 2*S*-amino-12*S*,16*R*-dimetilo-3*S*,5*R*,10 *R*,14*S*,15*R* -penta-hidroxi-eicoisano, em que os grupos hidroxilos no C₁₄ e C₁₅ estão esterificados com um grupo carboxilo terminal do ácido tricarbóxico. A FB₂ não possui o grupo hidroxilo no C₁₀, enquanto que a fumonisina B₃ (FB₃) não apresenta o grupo hidroxilo no C₅ (Cole *et al.*, 2003; Lino *et al.*, 2006; Krska *et al.*, 2007).

Para detecção das FBs é necessário que haja uma modificação química da molécula, devido a ausência de um cromóforo capaz de absorver a radiação ultravioleta (UV), a fim de torná-las detectáveis usando UV ou detector de fluorescência (Wilkes; Sutherland, 1998).

Entre os tipos de FBs, a FB₁ é a mais encontrada, constitui cerca de 70-80% do total de FBs. A FB₂ e FB₃ são responsáveis por aproximadamente 15-25% e 3-8%, respectivamente, enquanto FB₄ apresenta quantidades irrelevantes (Rheeder *et al.*, 2002; Karbancioglu-Guler; Heperkan, 2009; Szécsi *et al.*, 2010; Varga *et al.*, 2010b). Animais e seres humanos podem apresentar várias doenças, devido à contaminação de alimentos e rações com FBs. Estas micotoxinas podem causar diferentes efeitos tóxicos, como por exemplo, leucoencefalomalacia em cavalos (Kellerman *et al.*, 1990), edema pulmonar em suínos (Casteel *et al.*, 1994), alterações renais e hepáticas em bovinos (Mathur *et al.*, 2001). Em humanos, o câncer de esôfago está relacionado com o consumo de produtos derivados do milho contaminados com FBs (Peraica *et al.*, 1999). O Comitê Científico em

Alimentos da Comissão Europeia determina uma ingestão diária tolerável (TDI) para FB₁, FB₂ e FB₃, isoladamente ou em conjunto, de 2µg/kg de peso corporal (SCF, 2003).

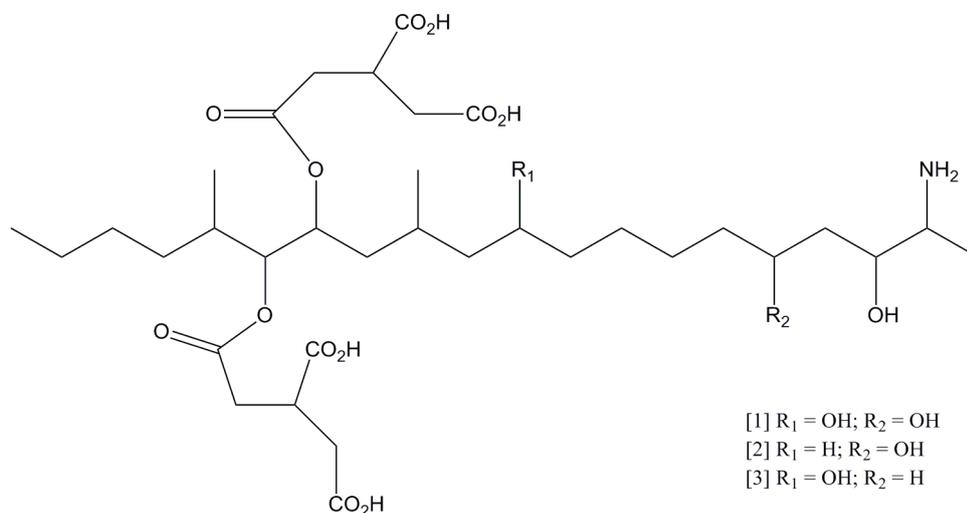


Figura 4. Estrutura química das fumonisinas B₁ [1], B₂ [2] e B₃ [3].

2.4.2.1 Fungos produtores de fumonisinas

Entre os fungos filamentosos fitopatogênicos, *F. verticillioides* (sinônimo de *F. moniliforme*) e *F. proliferatum* são as mais importantes espécies produtoras de FBs, podendo ser isoladas de alimentos e produtos alimentares para animais. Estas espécies são isoladas do milho e de produtos a base de milho (Scaff; Scussel, 2004; Karbancioglu-Güler; Heperkan, 2009; Heidl *et al.*, 2010), sendo *F. verticillioides* a mais frequente. *Fusarium proliferatum* ocorre em pinheiros, aspargos, palmeiras, trigo e cevada (Lino *et al.*, 2006; Desjardins *et al.*, 2007; Jurado *et al.*, 2010). *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (Bennett; Klich, 2003), *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. subglutinans*, *F. polyphialidicum* e *F. oxysporum* também têm sido incluídos no grupo de produtores dessas micotoxinas (Pozzi *et al.*, 2002).

As FBs haviam sido relatadas apenas por espécies de *Fusarium*, no entanto, Baker (2006) e Pel *et al.* (2007) descobriram a presença de um gene homólogo para a biossíntese das FBs em *A. niger*. O sequenciamento completo do genoma de *A. niger* ATCC 1015 (Baker, 2006) e *A. niger* CBS 513.88 (Pel *et al.*, 2007) foi feito e observado a presença de

genes homólogos aos das fumonisinas de *F. verticillioides*. No entanto, o conjunto de genes não é necessariamente expresso fenotipicamente, pois podem estar alterados ou até mesmo silenciados (Frisvad *et al.*, 2007).

A primeira confirmação da produção de FB por linhagens de *A. niger* foi feita por Frisvad *et al.* (2007). Esses autores relataram a produção de FB₂ por todas as linhagens de *A. niger* analisadas. Esses autores também verificaram a produção de FBs por *F. verticillioides* MRC 826, na qual a FB₁ foi produzida em maiores quantidades, seguida pela FB₂ e FB₃.

Mogensen *et al.* (2009) isolaram e identificaram 47 linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* de amostras de chá, onde nenhuma delas foram capazes de produzir FB₂, FB₄ e OTA. Em 2010, Mogensen *et al.* investigaram a produção de FBs em 16 linhagens de *A. acidus*, 66 de *A. niger* e quatro de *A. tubingensis*. As linhagens de *A. acidus* e *A. tubingensis* foram produtoras de FBs e 77% das linhagens de *A. niger* produziram quantidades detectáveis de FBs.

Trabalhando com 51 amostras de diferentes tipos de vinhos provenientes da Itália, Logrieco *et al.* (2010b) investigaram a presença de FBs. A fumonisina B₂ foi detectada em 17,6% das amostras, com valores variando de 0,4 a 2,4 ng/mL. A fumonisina B₄ não foi detectada em nenhuma das amostras de vinhos analisadas. A fumonisina B₁ também não foi detectada, fato esperado uma vez que *A. niger* não é considerado produtor desta micotoxina e é considerada como uma das principais espécies produtoras de FBs em uvas.

Varga *et al.* (2010b) isolaram e identificaram de amostras de passas de uvas coletadas de várias partes do mundo, fungos pertencentes à seção *Nigri*. Para produção de FBs foram testadas 30 linhagens de *A. niger/A. awamori*, 20 foram consideradas produtoras de quantidades detectáveis de isômeros de FBs. A maioria desses isômeros foi anteriormente encontrada em espécies de *Fusarium*. Para as linhagens de *A. awamori*, o teor de médio de FB foi de 3,31 mg/kg, enquanto que as linhagens de *A. niger* produziram 6,39 mg/kg de FBs em média. A produção de FB₁ foi detectada pela primeira vez em linhagens de *A. niger*. Sendo assim, *A. awamori* e *A. niger* são responsáveis pela presença de FBs em passas de uvas.

Analisando 180 linhagens de *A. niger*, Frisvad *et al.* (2011) observaram que 80% destas foram produtoras de FB₂. Recentemente, Soares *et al.* (2012) isolaram de milho 270 linhagens pertencentes ao “agregado *Niger*” e deste total, 105 (39%) foram consideradas produtoras de FB₂. Storari *et al.* (2012a) trabalhando com 137 fungos isolados do chá verde, identificaram oito fungos como pertencentes à seção *Nigri*. As espécies mais bem

representadas foram *A. niger* (41 linhagens), *A. acidus* (39 linhagens), *A. awamori* (27 linhagens) e *A. tubingensis* (23 linhagens). *Aspergillus aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. japonicus* e *A. uvarum* também foram isoladas, porém em menor número. As linhagens de *A. awamori* e *A. niger* foram testadas quanto à produção de FB₂, onde 37% e 74% das linhagens foram produtoras, respectivamente. *Aspergillus carbonarius* não foi isolado das amostras de chá.

Trabalhando com uvas cultivadas do norte da Itália, Storari *et al.* (2012b) isolaram um total de 283 linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri*. Baseados no sequenciamento do gene da calmodulina as linhagens foram identificadas como *A. uvarum* (183 linhagens), *A. niger* (43 linhagens), *A. tubingensis* (54 linhagens), *A. acidus* (2 linhagens) e *A. carbonarius* (1 linhagens). Das linhagens de *A. niger*, 91% foram consideradas produtoras de FB₂, FB₄ e FB₆. A presença do gene para a biossíntese das FBs nas linhagens de *A. niger* foi testada com os iniciadores *anfum1*, *anfum6* e *anfum8*. Com o iniciador *anfum 1* todas as linhagens foram amplificadas, independente da habilidade de produzir FBs. Cinco das nove linhagens consideradas não produtoras de FBs foram amplificadas com os iniciadores *anfum6* e *anfum8*. Em um estudo realizado por Susca *et al.* (2010) demonstraram uma correlação entre a produção de FBs e a presença de *anfum8* em linhagens de *A. niger* isolada de uvas. Entretanto, se *A. niger* é considerado produtor de FBs e métodos de detecção adequados devem ser utilizados, pois esta espécie é de grande utilização biotecnológica e apresentam grande potencial de contaminação em alimentos.

2.5 Fungos produtores de pectinases

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiana, sendo as de origem microbiana as mais utilizadas em processos biotecnológicos devido aos baixos custos de obtenção e da possibilidade de produção em larga escala (Pandey *et al.*, 2005). Muitos micro-organismos como bactérias e fungos são considerados produtores de pectinases. Alguns fungos filamentosos possuem capacidade de fermentar e produzir grandes quantidades de enzimas extracelulares e são bastante utilizados em aplicações industriais (De Vries; Visser, 2001; Aro *et al.*, 2005). Entre os fungos filamentosos descritos na literatura como produtores de pectinases temos *A. awamori* (Abassi *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012), *A. flavus* (Yadav *et al.*, 2009b) *A. foetidus* (Taşkin; Stratilová, 2008), *A. niger* (De Gregorio *et al.*, 2002; Joshi *et al.*, 2006; Yugandhar *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011; Maciel *et al.*, 2011; Mrudula; Anitharaj, 2011; Rodríguez-Fernández *et*

al., 2011; Sandri *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2012), *A. oryzae* (Sandri *et al.*, 2011), *A. sojae* (Tokatli *et al.*, 2009), *A. terricola* (Yadav *et al.*, 2008), *F. moniliforme* (Bonnin *et al.*, 2001), *P. chrysogenum* (Tariq; Reyaz, 2012), *P. viridicatum* (Silva *et al.*, 2007) e *T. viride* (De Gregorio *et al.*, 2002).

Aspergillus niger é largamente utilizado em processos biotecnológicos, como na produção de ácidos orgânicos (Goldberg *et al.*, 2006) e enzimas extracelulares (Pariza; Cook, 2010). A grande parte das preparações comerciais de pectinases é de origem fúngica (Singh *et al.*, 1999), sendo *A. niger* a espécie mais utilizada para a produção industrial dessas enzimas (Kotzekidov, 1991; Naidu; Panda, 1998). É classificado como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) devido à sua baixa toxicidade (Varga *et al.*, 1996). No entanto, quando *A. niger* foi reconhecido como GRAS à capacidade de algumas linhagens produzirem micotoxinas não era conhecida (Blumenthal, 2004).

2.6 Substâncias pécticas

As substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da parede celular e da lamela média dos vegetais (Figura 5). São um grupo bastante heterogêneo de polissacarídeos com diferentes massas moleculares e graus de esterificação (Alkorta *et al.*, 1998; Jayani *et al.*, 2005). Quimicamente, as substâncias pécticas são complexos coloidais de polissacarídeos ácidos, compostos de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4. As cadeias laterais da molécula de pectina são compostas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose. Os grupos carboxílicos dos ácidos galacturônicos são parcialmente esterificados por grupos metil ésteres e parcial ou completamente neutralizados pelo sódio, potássio ou íons de amônio (Uenojo; Pastore, 2007; Ramos *et al.*, 2010).

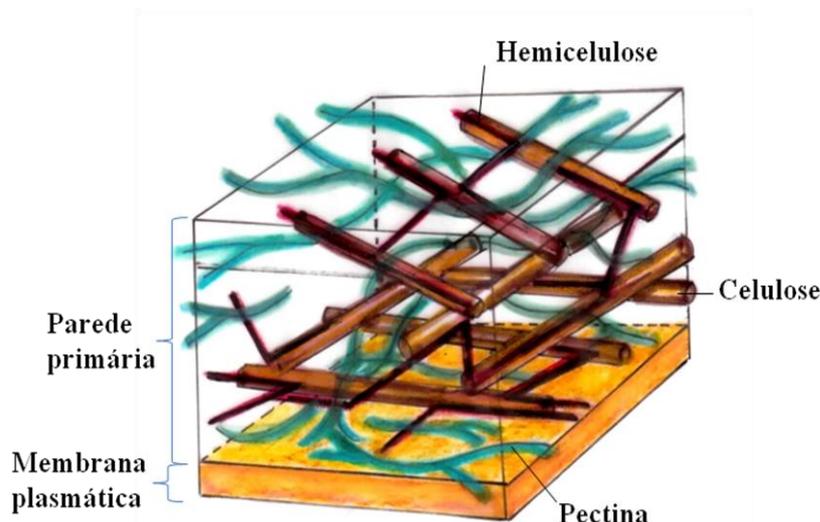


Figura 5. Representação esquemática da parede celular de vegetais.

Segundo a Sociedade Americana de Química as substâncias pécnicas são classificadas em quatro tipos:

(I) Protopectinas são insolúveis em água e estão presentes nos tecidos vegetais intactos. São compostas por unidades de ácido galacturônico ligadas ao cálcio por ligações iônicas de caráter acentuadamente forte e em condições de hidrólise restrita produzem ácidos pectínicos ou pectina (Jayani *et al.*, 2005).

(II) Ácido pécnico é um polímero solúvel composto de ácido poligalacturônico onde os grupos carboxilas estão em pequenas quantidades metoxilados por grupos metil éster (Kashyap *et al.*, 2001).

(III) Ácido pectínico é um grupo de compostos contendo ácido poligalacturônico com um número mais que pequeno de grupos carboxilas metoxilados em sua estrutura e em condições adequadas são capazes de formar géis com açúcares e ácidos (Kashyap *et al.*, 2001).

(IV) Pectina designa ácidos pectínicos solúveis em água no qual, pelo menos, 75% dos grupos carboxílicos das unidades de ácido poligalacturônico são esterificados com metanol. Apresentam grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições adequadas (Jayani *et al.*, 2005; Uenojo; Pastore, 2007) (Figura 6).

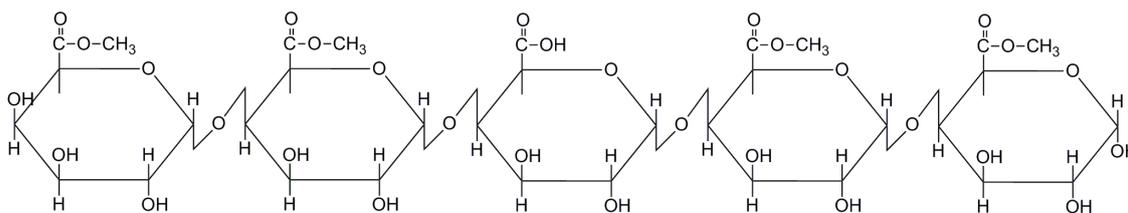


Figura 6. Estrutura da pectina.

Em frutos não maduros, a protopectina complexa-se com a celulose, conferindo rigidez à célula. Com o amadurecimento do fruto, sua estrutura é alterada, pela solubilização gradativa do vegetal resultando no amolecimento do tecido vegetal. Essa alteração se dá pela ação de enzimas ativas presentes no próprio vegetal (Kashyap *et al.*, 2001). A pectina é parte importante da biomassa dos frutos, constituindo de 4-30% da casca de frutas cítricas (Kaur *et al.*, 2004).

Durante a extração de suco, as substâncias pécicas são responsáveis pela consistência e turbidez dos sucos de fruta, causando um aumento considerável na viscosidade do suco dificultando a filtração (Fernández-González *et al.*, 2004). Porém, nas indústrias de vinhos e sucos, isso torna-se um problema dificultando as etapas de clarificação em vinhos e extração de sucos de frutas, pois a turvação dificilmente pode ser removida apenas por filtração devido à grande quantidade de partículas em suspensão, diminuindo assim, o rendimento da extração de sucos. O prévio tratamento, por enzimas pectinolíticas, de vinhos e sucos promove a degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50% o tempo de filtração (Jayani *et al.*, 2005).

2.7 Enzimas pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases são capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre monômeros de ácido galacturônico ou seu derivado metoxilado (Ramos *et al.*, 2010). A degradação da pectina é feita através da ação sinérgica de protopectinase, pectina esterase, endo-poligalacturonase (endo-PG), exo-poligalacturonase (exo-PG) e pectina liase (Rangarajan *et al.*, 2010).

Essas enzimas são produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por micro-organismos como fungos e bactérias (Da Silva *et al.*, 2005). Em escala industrial, os fungos filamentosos são preferidos, pois cerca de 90% das enzimas produzidas são extracelulares (Souza *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2011). Os fungos possuem grande potencial biotecnológico na produção de pectinases, o que vem chamando a atenção de diversos pesquisadores do mundo (Yadav *et al.*, 2009a; Gomes *et al.*, 2011). Para a produção industrial de pectinases, geralmente, são utilizadas linhagens de *A. niger* (Gummadi; Panda, 2003; Rangarajan *et al.*, 2010). No entanto, linhagens de *A. aculeatus* também estão sendo utilizadas para produção industrial de pectinases (Sigma-Aldrich, 2013). A produção de pectinases por bactérias (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Pseudomonas* spp.) também é conhecida (Bhardwaj; Garg, 2010).

As pectinases produzidas por fungos atuam na degradação das substâncias pécticas presentes na parede celular vegetal. Este processo degradativo possui papel importante nas indústrias de alimentos, como sucos de frutas, vinhos, na produção de alimentos infantis (Dartora *et al.*, 2002) e na extração de óleos vegetais (Kashyap *et al.*, 2001).

A síntese dessas enzimas sofre influência de determinados componentes do meio de cultura, particularmente da fonte de carbono, presença de indutores como a pectina e derivados (Gummadi; Panda, 2003), e das condições de cultivo, como o pH, temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação (Souza *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2011).

Baseado no mecanismo de ação, as pectinases são classificadas em três tipos (Jayani *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2011):

- (I) **Protopectinases** degradam a protopectina insolúvel dando origem à pectina solúvel.
- (II) **Pectina esterases** desesterificante ou desmetoxilante: catalisam a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metil ésteres das substâncias pécticas, dando origem ao ácido péctico.
- (III) **Despolimerases** incluem as enzimas hidrolíticas e as liases, catalisam a clivagem das ligações glicosídicas α -1,4 entre os monômeros do ácido D-galacturônico das substâncias pécticas.

Estas enzimas foram classificadas e nomeadas de acordo com a Enzyme Commission (EC), segundo as recomendações da IUPAC-IUB (IUPAC - *Union of Pure and Applied Chemistry*; IUB - *International Union of Biochemistry*) (Tabela 5).

Tabela 5. Classificação das enzimas pécnicas.

| Tipo de pectinase | | Nome na EC | Sigla | Número EC |
|-------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|-----------|
| Desesterificante | | Polimetilgalacturonase esterase | PMGE | 3.1.1.11 |
| Despolimerizantes | hidrolase | Endo-poligalacturonase | Endo-PG | 3.2.1.15 |
| | | Exo-poligalacturonase | Exo-PG | 3.2.1.67 |
| | liase | Endo poligalacturonase liase | Endo-PGL | 4.2.2.2 |
| | | Exo poligalacturonase liase | Exo-PGL | 4.2.2.9 |
| | | Endo polimetilgalacturonato liase | Endo-PMGL | 4.2.2.10 |

FONTE: Uenojo; Pastore (2007).

2.7.1 Protopectinases (PPase)

Estas enzimas solubilizam a protopectina em pectina solúvel altamente polimerizada (Kashyap *et al.*, 2001). São classificadas em dois tipos, levando em consideração o mecanismo de reação, onde o tipo A (PPase-A) reage com o sítio interno, isto é, com a região do ácido poligalacturônico da protopectina e, o tipo B (PPase-B) reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes da parede celular (Jayani *et al.*, 2005).

2.7.2 Enzimas desmetoxilantes ou desesterificantes

Pectina esterase (PE), também conhecida como pectinametil hidrolase, catalisa a desesterificação do grupo metil da pectina, liberando metanol e convertendo a pectina em pectato (polímero não esterificado). Esta enzima atua preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada (Kashyap *et al.*, 2001), apresenta valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40°C a 50°C (Jayani *et al.*, 2005). A PE está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comercializadas, podendo ser utilizada para proteger e melhorar a textura e firmeza de várias frutas processadas, bem como na extração e clarificação de sucos de frutas (Uenojo; Pastore, 2007).

2.7.3 Enzimas despolimerizantes

As enzimas despolimerizantes são classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas; mecanismos endo- de forma randômica ou exo- a partir do final da molécula de ação e preferência por ácido pectico ou pectina como substrato. Envolve as hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações α -1,4, e as liases que catalisam a β -eliminação (Alkorta *et al.*, 1998; Uenojo; Pastore, 2007).

2.7.3.1 Hidrolases

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases. As polimetilgalacturonases (PMG) hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 de polimetilgalacturonatos (Rizzato, 1999). Apesar da PMG ser citada na literatura, sua existência é questionada por alguns autores (Sakai *et al.*, 1993; Rizzato, 1999).

As poligalacturonases (PG) catalisam a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas α -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico (Mutlu *et al.*, 1999). As PG são as enzimas mais bem estudadas dentro do complexo pectinolítico (Jayani *et al.*, 2005). As PG fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e possuem pH ótimo de atividade na região levemente ácida e temperatura ótima entre 30°C e 50°C (Zheng; Shetty, 2000; Uenojo; Pastore, 2007).

2.7.3.2 Pectina liases

As pectinas liases ou transeliminases rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (Jayani *et al.*, 2005) e incluem as pectina liases e as pectato liases (Uenojo; Pastore, 2007).

A pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL) quebra as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da pectina (Karam; Belarbi, 1995) de modo endo- ou exo- (Kashyap *et al.*, 2001; Uenojo; Pastore, 2007). O pH ótimo é em torno de 5,5 (Mayans *et al.*, 1997) e temperatura ótima entre 40 e 50°C (Jayani *et al.*, 2005).

A pectato liase (poligalacturonato liase, PGL) catalisa a clivagem de ligações α -1,4 de ácido pectico de modo endo- ou exo- por transeliminação (Kashyap *et al.*, 2001) e

requer Ca^{2+} para atividade (Mayans *et al.*, 1997). Possui pH ótimo na região alcalina, entre 7,5 e 10 e temperatura ótima entre 40°C e 50°C (Mayans *et al.*, 1997; Jayani *et al.*, 2005).

2.7.4 Aplicações das pectinases

As pectinases têm sido amplamente utilizadas em processos biotecnológicos (Jayani *et al.*, 2005). Estas enzimas representam cerca de 25% da produção mundial de enzimas utilizadas na indústria de alimentos (Yadav *et al.*, 2009a). As preparações de enzimas pectinolíticas são frequentemente utilizadas na indústria de sucos de frutas devido à presença de substâncias pécticas (Gomes *et al.*, 2011). Essas substâncias são responsáveis pela consistência e turbidez dos sucos de frutas, e sua presença causa um considerável aumento na viscosidade e turbidez do suco, dificultando o processo de filtração (Fernández-González *et al.*, 2004).

A indústria de alimentos tem apresentado grande interesse em processos para clarificação de sucos (Echavarria *et al.*, 2011). A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular (Sarioglu *et al.*, 2001; De Gregorio *et al.*, 2002). Essa degradação resulta na diminuição da viscosidade, aumento do rendimento dos sucos, aparência cristalina do produto final e redução em até 50% do tempo de filtração (Souza *et al.*, 2003; Jayani *et al.*, 2005). O tratamento de polpas de frutas com enzimas pectinolíticas, contendo principalmente PG, é frequentemente utilizado para o aumento no rendimento e maior clarificação nos sucos uvas e maçãs (Kaur *et al.*, 2004; Oszmianski *et al.*, 2009; Nakkeeran *et al.*, 2011). Jayani *et al.* (2005) apresentaram a importância das endo-PG na quebra da pectina em pequenas moléculas, reduzindo a viscosidade e o tempo de filtração, aumentando a eficiência da extração do suco.

A combinação de pectinases, celulasas e hemicelulasas, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, são utilizadas na extração e clarificação de sucos de frutas. As enzimas de maceração aumentam o rendimento da extração e melhoram o processamento, sem aumento dos custos. Essas enzimas são aplicadas após o corte da matéria-prima, para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a extração dos componentes da fruta (Kaur *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2005). Pectinases comerciais, contendo predominantemente PG, têm sido utilizadas na preparação de suco de maçã para um maior rendimento, clarificação, concentração do colóide e de polifenóis (Oszmianski *et al.*, 2009).

As pectinases em conjunto com β -glucanases e hemicelulases, têm sido utilizadas na produção de vinhos. As vantagens do uso coletivo dessas três enzimas são: melhor maceração da casca e aumento da extração de pigmentos; facilita a clarificação e filtração do mosto; aumenta a qualidade e estabilidade do vinho (Fernández *et al.*, 2000; Takayanagi *et al.*, 2001).

A adição de pectinases durante o esmagamento das uvas melhora a extração do suco, reduzindo o tempo de clarificação e aumentando o conteúdo de terpenos no vinho. As preparações comerciais de pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina esterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção do vinho (Bhat, 2000). Enzimas pectinolíticas adicionadas durante a maceração das uvas para produção de vinho tinto resultam no melhoramento dos atributos sensoriais, tais como cor e turbidez, quando comparadas com vinhos não tratados (Jayani *et al.*, 2005).

As pectinases são usadas em conjunto com outras enzimas para reduzir a viscosidade da ração animal, na tentativa de aumentar a absorção e biodisponibilizar nutrientes através da hidrólise das fibras não biodegradáveis e dos nutrientes bloqueados pelas fibras (Hoondal *et al.*, 2000; Jayani *et al.*, 2005).

Nas indústrias têxteis as pectinases são utilizadas para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para o processamento (Kashyap *et al.*, 2001; Piccoli-Valle *et al.*, 2001), no tratamento do resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais (Kaur *et al.*, 2004). Pectinases alcalinas são utilizadas para maceração das fibras vegetais, como linho, cânhamo e juta, e na biopreparação de algodão (Jayani *et al.*, 2005). Em algodão cru, a remoção da pectina, da cera e de agentes de goma com a utilização de pectinases em conjunto com amilases, lipases e hemicelulases, em condições adequadas, substitui o uso da soda cáustica e gera produtos de alta qualidade. Posteriormente, um menor consumo de energia é requerido no tingimento e processo de tecelagem (Sawada; Ueda, 2001).

Na fabricação de papel, as pectinases despolimerizam as substâncias pécticas e, posteriormente, reduzem a demanda catiônica das soluções de pectina e do filtrado resultante do branqueamento com peróxido de hidrogênio (Jayani *et al.*, 2005; Uenojo; Pastore, 2007).

2.8 Produção de pectinases por fermentação submersa (FSm)

O processo de produção de pectinases pode ocorrer de duas formas: fermentação submersa (FSm), onde o cultivo do micro-organismo ocorre em meio líquido contendo nutrientes, ou pela fermentação em estado sólido (FES), que consiste no crescimento do micro-organismo em substratos sólidos úmidos na ausência de água livre (Raghavarao *et al.*, 2003; Ano *et al.*, 2009; Hashemi *et al.*, 2011). Gervais e Molin (2003) relataram que a principal diferença entre a FSm e FES está na capacidade de mistura dos sistemas. A FSm é uma reação de mistura perfeita, onde em teoria, cada parte do reator contém ao mesmo tempo, a mesma quantidade de micro-organismos e nutrientes. No entanto, na FES encontra-se um sistema de alta viscosidade, sendo que, para se chegar à homogeneidade, seria necessária excessiva agitação, o que levaria a ruptura celular. Desta forma, o sistema de cultivo em estado sólido caracteriza-se por serem meios heterogêneos, em termos de concentração do soluto (Palma, 2003).

Sendo assim, a produção industrial de enzimas é realizada principalmente por FSm (Rodríguez Couto; Toca-Herrera, 2007). A FSm apresenta facilidade de cultivo do micro-organismo, homogeneidade do meio de cultura e permite o controle dos parâmetros do processo. Uma desvantagem desse tipo de fermentação é a alta atividade de água, o que facilita a contaminação do processo (Lima *et al.*, 2001).

Muitos estudos relacionados à produção de pectinases estão sendo desenvolvidos utilizando a FSm. Recentemente, Martins *et al.* (2012) avaliaram a produção de PG por *Thermoascus aurantiacus* por FSm utilizando meios sintéticos, como Czapeck, Khanna, SR e meio Vogel contendo pectina cítrica comercial. A maior atividade da PG foi obtida nos meios SR (2,0 U/mL) e Vogel (1,9 U/mL). Essa maior atividade foi observada na fase logarítmica, que ocorreu depois de três ou quatro dias do início da fermentação. Mrudula e Anitharaj (2011) utilizaram como fonte de carbono subprodutos agroindustriais, e ao utilizar a casca de laranja, estes autores detectaram dois picos de produção: o primeiro pico ocorreu após 72 horas de fermentação, e o segundo ao fim do processo fermentativo. Para ambos os picos foi determinada uma atividade de 2,1 U/mL. Ao ser utilizada a casca de maracujá, o primeiro pico de produção ocorreu em 72 horas de fermentação (2,0 U/mL) e o segundo pico após 192 horas (3,0 U/mL). Foram também detectados dois picos em meio de cultura que apresentava em sua composição farelo de trigo, o primeiro ocorreu após as 72 horas (2,0 U/mL) do processo fermentativo e o segundo, às 168 horas de fermentação (1,8 U/mL). No entanto, esses autores obtiveram uma maior produção de PG quando utilizaram

o resíduo do processamento do suco de laranja, o que eles chamaram de “água amarela”. A maior atividade de PG ocorreu no quinto dia de fermentação (3,2 U/mL).

No entanto, a máxima atividade de pectinase obtida por Kumar *et al.* (2011) foi de 1,64 U/mL ao utilizar como fonte de carbono uma concentração de 65 g/L de uma mistura de farelo de trigo, farelo de milho e casca de laranja, em uma proporção de 2:1:2, respectivamente. A produção da enzima foi realizada por FSm utilizando *A. niger*. No trabalho realizado por Abbasi *et al.* (2011), os autores utilizaram pectina cítrica como fonte de carbono e farinha de trigo como substrato para produção de PG por FSm utilizando *A. awamori*. Inicialmente a fermentação foi realizada em batelada até o crescimento do fungo. Após o crescimento, o processo fermentativo ocorreu de forma contínua com a introdução de uma fonte de alimentação. Estes autores obtiveram uma maior produção das PG ao utilizarem uma concentração de 8 g/L de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Os valores de produção foram de 1,5 U/mL e 0,014 U/mL para exo- e endo-PG, respectivamente.

Diante dos trabalhos descritos acima, podemos observar que as pesquisas envolvendo bioprocessos estão fazendo a bioconversão de resíduos para obtenção de produtos de maior valor agregado, neste caso as enzimas pectinolíticas. No entanto, outras enzimas, proteínas, biofertilizantes, biossurfactantes, dentre outros metabólitos também estão sendo produzidos por bioconversão. A indústria alimentícia no Brasil produz grandes quantidades de resíduos como bagaços, farelos, cascas e sementes em geral, que podem ser utilizados como matéria-prima para bioprocessos, diminuindo os custos de produção das enzimas e de outros produtos (Soccol; Vandenberg, 2003; Couto; Sanroman, 2006).

2.9 Sistema de duas fases aquosas (SDFA)

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é caracterizado por apresentar uma extração líquido-líquido com duas fases. O sistema pode ser formado por dois polímeros solúveis incompatíveis (PEG, dextrana, entre outros) ou por um polímero e um sal (fosfatos, sulfatos, citratos, entre outros) (Benavides *et al.*, 2008; Aguirre *et al.*, 2010; Garza-Madrid *et al.*, 2010; Yan-Min *et al.*, 2010). A separação das fases ocorre devido às combinações de concentrações críticas entre os componentes, resultando em duas fases imiscíveis, onde o principal componente é a água (80-90%) (Antov; Pericin, 2001; Garza-Madrid *et al.*, 2010). Essa separação das fases ocorre devido à exclusão estérica (Asenjo; Andrews, 2011). O alto teor de água proporciona um ambiente favorável às biomoléculas,

evitando mudanças estruturais e perda das atividades biológicas (Antov; Pericin, 2001; Silva, 2006).

O S DFA tem sido aplicado no fracionamento, recuperação e purificação primária de biomoléculas. É considerada uma técnica simples, de baixo custo e de fácil operação (Azevedo *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2010). Determinados produtos biológicos possuem elevados custos de produção devido ao processo de purificação utilizado. Desta forma, o desenvolvimento de técnicas e métodos para a separação e purificação de proteínas é de grande importância (Malpiedi *et al.*, 2008; Porto *et al.*, 2011).

A partição das biomoléculas é controlada por uma série de parâmetros relativos às propriedades do sistema (por exemplo, o tipo de polímero, sua massa molar, concentração e o tipo, e concentração de sais, valores de pH e força iônica) e o tipo de molécula a ser analisada (por exemplo, carga, peso molecular, hidrofobicidade e características de conformação) (Antov; Pericin, 2001; Rosa *et al.*, 2010). A distribuição de proteínas entre as duas fases do sistema é caracterizada por um parâmetro denominado de coeficiente de partição (K) que é definido pela relação entre as concentrações da biomolécula nas fases superior e inferior do S DFA (Albertsson, 1986). Esta distribuição desigual da proteína entre as fases é resultado da interação entre a proteína e os componentes do sistema (polímeros, H₂O e/ou sais inorgânicos) presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (Farruggia *et al.*, 2003).

O tipo de polímero e sua massa molar influenciam diretamente na partição da biomolécula. Ao utilizar polímeros de elevado peso molecular, menor será a partição da biomolécula para a fase rica no polímero (Albertsson, 1986). No entanto, o oposto ocorre quando há diminuição do peso molecular do polímero. O “efeito de volume excluído” pode ocorrer quando são utilizados polímeros de elevada massa molar, havendo exclusão de proteínas, sem desnaturação, para a fase rica em sal. No entanto, este efeito não pode ser observado quando se utiliza moléculas de proteínas menores (Schmidt *et al.*, 1994). Sendo assim, o efeito da massa molar do polímero depende da massa molar da biomolécula a ser separada, por exemplo, proteínas de massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar (Asenjo, 1990). Polímeros de elevadas massas molares também diminuem o volume de solvente disponível no sistema, reduzindo a solubilidade das proteínas na fase rica em polímero, levando a uma diminuição do coeficiente de partição (Albertsson, 1986).

O pH também está relacionado com a partição de proteínas, alterando as cargas das mesmas e como consequência o coeficiente de partição (Da Silva; Loh, 2006). Alterações

conformacionais na estrutura das proteínas podem ser causadas por variações de pH, levando à modificação do comportamento de separação das proteínas. As proteínas podem ser desnaturadas em condições extremas de pH, no entanto, essas proteínas possuem uma partição diferente das proteínas na forma ativa. Esse fato pode ser explicado, pois as proteínas desnaturadas possuem maior área superficial e a superfície exposta muito mais hidrofóbica. As proteínas carregadas negativamente, onde o pH é superior ao ponto isoelétrico, possuem maior afinidade pela fase rica em PEG (Albertsson, 1986, Forciniti; Hall, 1991).

A composição do sal também deve ser avaliada. Em 2001, Zafarani-Moattar e Sadegui observaram a formação de fases utilizando sais de mesmo cátion e ânions de diferentes valências: Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e Na_3PO_4 . Os autores observaram que o aumento da carga do ânion diminui a concentração de sal necessária para a separação das fases. Os ânions com maiores valências são mais hidratados, diminuindo a quantidade de solvente para hidratação do PEG. Desta forma, os ânions de maior valência são considerados melhores agentes *salting-out* do que ânions com valência mais baixa.

As principais vantagens do uso do S DFA na purificação de biomoléculas são: o baixo consumo de energia e tempo, baixo custo de material e elevado rendimento (Kammoun *et al.*, 2009). Essa técnica possui diferentes aplicações, podendo ser utilizada para separação e purificação de proteínas (Salgado *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2009; Garza-Madrid *et al.*, 2010; Porto *et al.*, 2011), oligossacarídeos (Kremnicky; Biely; 2005), anticorpos humanos (Azevedo *et al.*, 2009) e síntese de enzimas (Aguirre *et al.*, 2010). A purificação de enzimas como, lipases, xilanases, xilose redutase e β -glicosidase, pelo S DFA tem demonstrado elevado grau de pureza e pouca perda de atividade durante o processo (Mayerhoff *et al.*, 2004; Gautam; Simon, 2006; Yang *et al.*, 2008; Kammoun *et al.*, 2009; Zhang; Liu, 2010).

Lima *et al.* (2002) estudaram a partição de enzimas comerciais do complexo pectinolítico (endo-PG, exo-PG, PE e PMGL) pelo S DFA composto por PEG/fosfato de potássio. Para a endo-PG os melhores resultados para o coeficiente de partição e recuperação da enzima foi PEG 10000/fosfato; para a exo-PG foi o PEG 400/fosfato com NaCl; para PE e PMGL o sistema mais adequado foi o PEG 600/fosfato. Os melhores fatores de purificação foram obtidos na fase superior, contendo PEG de alto peso molecular sem adição de NaCl. Para a endo-PG o PEG 6000 resultou em uma purificação de 5,19 vezes e para a endo-PG, PE e PL com o PEG10000 resultou em uma purificação de 16,28, 16,64 e 14,27 vezes, respectivamente.

Também estudando a partição das enzimas comerciais pertencentes ao complexo pectinolítico, Antov *et al.* (2004) utilizaram um sistema PEG 4000/sulfato de amônio, bem como sua aplicação na extração das enzimas da fase superior do sistema PEG 4000/dextrana. A endo- e exo-PG foram determinadas na fase inferior do sistema polímero/sal com concentrações de 1,73 e 3,25, respectivamente. O rendimento foi de 72,41% e 69,46% para a endo- e exo-PG, respectivamente, e foi obtido por integração do sistema de polímero/polímero. Prodanović e Antov (2008) analisaram a possibilidade da partição e purificação de pectinases pelo SDFa, utilizando polímero/polímero e polímero/sal. Os maiores valores de rendimento foram obtidos no sistema composto por 10% (v/v) de PEG 1500/5% (v/v) de dextrana 500000/85% (v/v) do extrato enzimático. Para endo-PG o coeficiente de partição foi de 2,11, seguido pelo rendimento de 85,68% para a fase PEG e fator de purificação de 1,28 vezes. Para a exo-PG, o coeficiente de partição, o rendimento na fase PEG e o fator de purificação, no mesmo sistema foi de 1,89, 84,28% e 3,82, respectivamente. No sistema com 10% (v/v) de PEG 6000/15% (v/v) de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /75% (v/v) do extrato enzimático teve como fator de purificação 37,85 para exo-PG e 19,52 para endo-PG. Os resultados descritos foram obtidos na fase inferior do sistema.

Atualmente, o desenvolvimento de métodos de extração e purificação de biomoléculas que sejam eficientes e economicamente viáveis é imprescindível (Silva, 2006). O SDFa é considerado prático e com excelentes níveis de rendimento e pureza. Este método pode ser utilizado na separação e purificação de proteínas, no entanto, o particionamento irá depender das propriedades físico-químicas das proteínas com relação à composição sistema a ser utilizado (Asenjo; Andrews, 2011).

3 ABORDAGEM POLIFÁSICA INCLUINDO MALDI-TOF MS PARA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* SEÇÃO *NIGRI*¹

Marília Maciel^{1,2}, Cledir Santos^{2,3}, Paula Rodrigues⁴, Marcelo Fraga⁵, Armando Venâncio², Nelson Lima^{2,3} e Cristina Maria Souza-Motta^{1*}

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

²IBB–Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 4710-057, Gualtar, Braga, Portugal

³Micoteca da Universidade do Minho (MUM), Universidade do Minho, 4710-057, Gualtar, Braga, Portugal

⁴Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA – Instituto Politécnico de Bragança, 5300-253, Santa Apolónia, Bragança, Portugal

⁵Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 23890-000, Brasil

*Autor para correspondência: Cristina Maria Souza-Motta. Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420, Brasil. Telefone: (+55) 81 21268948, Fax: (+55) 81 21268480, email: smotta@ufpe.br

¹Trabalho submetido para publicação como Maciel, M., Santos, C., Rodrigues, P., Fraga, M., Venâncio, A., Lima, N., Souza-Motta, C. Polyphasic approach including MALDI-TOF MS to characterization *Aspergillus* section *Nigri* species. *Brazilian Journal of Microbiology*.

Resumo

As espécies de *Aspergillus* pertencentes à seção *Nigri* são caracterizadas pela cor negra da maioria das colônias. A identificação das espécies desta seção deve ser realizada com base em uma abordagem polifásica devido à alta diversidade genética existente. As características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares são ferramentas que podem ser utilizadas na identificação polifásica. Outra ferramenta que pode ser utilizada é o MALDI-TOF MS (Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser Tempo-de-Vôo/Espectrômetro de Massa), que consiste em uma técnica espectral que analisa a massa molecular da composição proteica da célula microbiana, fornecendo dados para uma rápida e discriminatória identificação. Esta técnica agrega valor à abordagem polifásica. Este trabalho teve como objetivo realizar uma identificação polifásica baseada na análise morfológica, bioquímica e espectral por MALDI-TOF MS linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri*. Setenta e quatro linhagens depositadas na Micoteca URM e 19 linhagens compreendendo espécies tipo e de referência obtidas da Micoteca da Universidade do Minho foram analisadas. Os dados obtidos a partir de uma abordagem polifásica indicam que os resultados do MALDI-TOF MS corroboram os dados da taxonomia clássica e análises bioquímicas. Além disso, as análises bioquímicas determinaram que de todas as linhagens de *A. niger*, 20% e 14% foram caracterizadas como produtoras de ocratoxina A (OTA) e fumonisina B₂ (FB₂), respectivamente. *Aspergillus carbonarius*, *A. foetidus*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger* foram produtores de OTA. Finalmente, uma abordagem polifásica agregando diferentes tipos de dados torna a identificação das espécies da seção *Nigri* mais confiável. A técnica do MALDI-TOF MS foi considerada confiável, rápida e de baixo custo em termos de trabalho e de consumo, quando comparada a outras técnicas biológicas.

Palavras-chave: *Aspergillus* seção *Nigri*, abordagem polifásica, ocratoxina A e fumonisina B₂.

Introdução

As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* apresentam elevado potencial biotecnológico, econômico e de importância médica. Algumas espécies são conhecidas por apresentar problemas relacionados à deterioração de alimentos e infecções humanas, no entanto, outras são produtoras de importantes ácidos orgânicos e enzimas (Samson *et al.*, 2007a; Varga *et al.*, 2011).

Devido à ampla aplicação biotecnológica dos fungos da seção *Nigri*, há a necessidade de uma identificação mais precisa em nível de espécie. No entanto, devido às semelhanças morfológicas encontradas entre as espécies de fungos pertencentes a esta seção faz com que a identificação baseada apenas em caracteres fenotípicos seja complexa (Silva *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2011). Desde as últimas décadas a taxonomia da seção *Nigri* vem sendo focada principalmente nas diferenças morfológicas (Raper; Fennell, 1965; Klich; Pitt, 1988; Klich, 2002; Samson *et al.*, 2004), onde a ornamentação da parede dos conídios é uma característica importante na diferenciação das espécies. Uma vez que os caracteres morfológicos, como por exemplo, as cores das colônias, podem variar devido ao uso de diferentes meios de cultura, é necessário que haja uma padronização destes meios utilizados para identificação baseada na morfologia (Simões *et al.*, 2013). Os meios de cultura Czapek Agar Dox e Agar Extrato de Malte são geralmente utilizados para o crescimento de fungos a 25°C no escuro durante 7 dias. Após esse período, as características macroscópicas e microscópicas são observadas.

Diante da complexidade na identificação das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, dados bioquímicos, moleculares, bem como perfis proteômicos baseado em análises de proteínas ribossomais unidos à morfologia clássica tornam essa identificação mais precisa. Essa abordagem polifásica consiste na utilização de diferentes técnicas de identificação de acordo com a sistematização do conhecimento científico, sendo considerada confiável na identificação de fungos (Simões *et al.*, 2013).

Novas espécies pertencentes à seção *Nigri* estão sendo descritas para a ciência. Recentemente *A. eucalypticola*, *A. fijiensis*, *A. indologenus* e *A. neoniger* foram descritas utilizando uma abordagem polifásica com base em caracteres morfológicos, perfis bioquímicos e análise de sequências de parte dos genes da β -tubulina e calmodulina (Varga *et al.*, 2011). Jurjević *et al.* (2012) também descreveram duas novas espécies uniseriadas com base em dados fenotípicos e moleculares. As espécies foram denominadas de *A. floridensis* e *A. trinidadensis*. Sendo assim, Samson *et al.* (2007a) utilizaram diferentes

ferramentas para a identificação de fungos pertencentes à seção *Nigri* e sugeriram uma abordagem polifásica consistindo de caracteres morfológicos, perfis bioquímicos e análises moleculares após o crescimento do fungo em meios de cultura específicos a diferentes temperaturas. No entanto, os autores não incluíram a técnica do MALDI-TOF MS em sua abordagem polifásica.

A técnica do MALDI-TOF MS tem sido aplicada de forma a gerar um espectro característico para cada espécie de fungo. Essa técnica é utilizada para investigar a massa molecular dos compostos orgânicos com peso molecular elevado (Tanaka *et al.*, 1988). A reprodutibilidade notável desta técnica baseia-se na medição das proteínas expressas constantemente e altamente abundante em uma faixa de massa entre 2000 e 20000 Da, onde importantes proteínas ribossomais podem ser utilizadas como biomarcadores. Todo o processo é analisado e descrito em detalhe por Santos *et al.* (2010b). Com base nesse conhecimento, diferentes estudos têm demonstrado o elevado potencial desta técnica na identificação de espécies de fungos filamentosos (Santos *et al.*, 2010a; Dias *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Passarini *et al.*, 2012).

Algumas espécies pertencentes a esta seção são consideradas produtoras de micotoxinas, o que pode ser considerado um fator limitante na sua utilização pela indústria biotecnológica. A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por algumas espécies do gênero *Aspergillus*. As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* consideradas como produtoras de OTA são: *A. carbonarius*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger* e *A. sclerotium* (Abarca *et al.*, 2001; Samson *et al.*, 2004; Frisvad *et al.*, 2006). Outras espécies como *A. brasiliensis*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. ibericus*, *A. japonicus*, *A. tubingensis* e *A. uvarum* não são consideradas produtoras (Samson *et al.*, 2006; Moslem *et al.*, 2010). Devido ao perigo que a OTA representa para a saúde humana e animal, esta micotoxina tem recebido atenção a nível mundial.

As fumonisinas (FBs) são outra classe de micotoxinas tradicionalmente atribuída a *Fusarium verticillioides* (Marin *et al.*, 2004). São metabólitos cancerígenos e cerca de 50 diferentes fumonisinas são conhecidas, onde as mais comumente isoladas são a fumonisina B₁, B₂ e B₃ (FB₁, FB₂ e FB₃, respectivamente) (Frisvad *et al.*, 2007). No entanto, um grupo de genes putativo relacionado com a produção de fumonisinas foi encontrado no genoma de *A. niger* CBS 513.88 (Baker, 2006; Pel *et al.*, 2007), sendo assim, as fumonisinas podem ser produzidas por linhagens desta espécie. Atualmente, a OTA e as FB₁, FB₂ e FB₃ têm sido utilizadas como biomarcadores para a identificação bioquímica das espécies de fungos capazes de produzi-las.

De acordo com Simões *et al.* (2013) a primeira ferramenta comumente utilizada na abordagem polifásica para a identificação de fungos filamentosos é a morfologia, seguido do perfil bioquímico e análise molecular. Devido aos custos e tempo de resposta, a biologia molecular é normalmente utilizada como última ferramenta.

A fim de assegurar a viabilidade de cada cultura de fungo, após identificação e caracterização, às culturas devem ser preservadas em coleções de cultura, desta forma, o objetivo deste trabalho foi aplicar uma abordagem polifásica com base em caracteres morfológicos, perfis bioquímicos (OTA e FB₂) e análise espectral por MALDI-TOF MS para a identificação das linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* depositadas na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Materiais e métodos

Linhagens de fungos

Setenta e quatro linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* (Tabela 1) obtidas da Micoteca URM (Recife, Brasil, www.ufpe.br/micoteca, WDCM 604) e dezenove linhagens desta seção compreendendo espécies de referência foram obtidas da Micoteca da Universidade do Minho (MUM, Braga, Portugal, www.micoteca.deb.uminho.pt, WDCM 816) (Tabela 1). As linhagens foram avaliadas com base em uma abordagem polifásica que consistiu em uma análise morfológica, perfis bioquímicos (OTA e FB₂) e análise de proteômica pela técnica do MALDI-TOF MS.

Análises morfológicas

Todas as linhagens foram submetidas à observação das características morfológicas. Para a análise macroscópica, as linhagens foram cultivadas e mantidas em Agar de Extrato de Malte (MEA: malte 20 g/L, glicose 20 g/L, peptona 1 g/L, agar 20 g/L) e Czapeck Agar Dox (CZ: sacarose 30 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, NaNO₃ 2 g/L, KCl 0,5 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L, FeSO₄.7H₂O 0,01 g/L, ZnSO₄.7H₂O 0,01 g/L, CuSO₄.5H₂O 0,005 g/L, agar 20 g/L). Os esporos de cada uma das linhagens foram suspensos em 1 mL de solução aquosa contendo 0,2% de agar e em seguida foram inoculados em três pontos de uma placa de Petri de 9 centímetros de diâmetro contendo 20 mL de MEA e CZ. As linhagens foram incubadas durante 7 dias no escuro a 25°C. Para identificação foram utilizados guias para o gênero *Aspergillus* (Raper; Fennell, 1965; Klich, 2002; Samson *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2011).

Análise bioquímica

Todas as linhagens foram avaliadas quanto à produção de OTA e FB₂. Para detecção da OTA, esporos de cada uma das linhagens foram suspensos em 1 mL de solução aquosa contendo 0,2% de agar e em seguida inoculadas em um ponto único em placas de Petri de 6 centímetros de diâmetro contendo 5 mL de meio Extrato de Levedura Sacarose Agar (YES: extrato de levedura (Difco™) 20 g/L, sacarose 150 g/L, agar 15 g/L), indutor para produção de OTA. As linhagens foram então incubadas durante 7 dias no escuro a 25°C. Para a extração da OTA foi utilizada a metodologia descrita por Bragulat *et al.* (2001), onde foram removidos três tampões de agar de cada colônia e colocados em um frasco âmbar de 4 mL de vidro de borosilicato e adicionado 1 mL de metanol. Após 60 minutos, os extratos foram filtrados através de filtros de seringa de PTFE com poros de 0,45 µm (Merck) e colocado em frascos âmbar de 1 mL de vidro de borosilicato, em seguida o material foi evaporado com nitrogênio.

As amostras foram analisadas por CLAE equipado com um detector de fluorescência Jasco FP-920 (333 nm de comprimento de onda de excitação/emissão de 460 nm de comprimento de onda), utilizando-se um reator fotoquímico de derivatização pós-coluna (PHRED unit – Aura Industries, USA). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa C18 (Waters Spherisorb ODS2, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm), equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila:água:ácido acético (99:99:2, v/v/v) com fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura da coluna foi ajustada para 28°C e o volume de injeção foi de 50 µL. O padrão de OTA, contendo 10,0 µg/mL foi obtido da Sigma-Aldrich. As amostras foram consideradas positivas quando um pico no tempo de retenção similar ao padrão foi detectado com uma altura de cinco vezes maior do que o ruído de linha de base.

Para FB₂ foi feita uma suspensão de esporos para cada linhagem em 1 mL de suspensão aquosa contendo 0,2% de agar e foram inoculadas em um ponto único em placas de Petri com 6 centímetros de diâmetro contendo 5 mL de meio de Czapek Agar Levedura Autolisado (CYA: sacarose 30 g/L, extrato de levedura 5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, NaNO₃ 2 g/L, KCl 0,5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/L, FeSO₄·7H₂O 0,01 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0,01 g/L, CuSO₄·5H₂O 0,005 g/L, agar 20 g/L). Todas as linhagens foram incubadas durante 7 dias no escuro a 25°C. Após esse período foram removidos cinco tampões de agar de cada colônia, e transferidos para um frasco âmbar de 4 mL de vidro de borossilicato e adicionado 1 mL de metanol:H₂O destilada (3:1, v/v). Os frascos foram vigorosamente

misturados em vórtex e colocados em banho de ultrasons (Sonicor) durante 50 minutos para melhorar a extração da FB₂. Os extratos foram filtrados através de filtros de seringa de PTFE com poros de 0,45 µm (Merck) e colocados em frascos âmbar de 4 mL de vidro de borossilicato e em seguida evaporados com nitrogênio.

A FB₂ a partir de cada amostra foi então derivatizada com 2,3-naftaleno-dicarboxaldeído (NDA). Para a reação de derivatização, os reagentes foram adicionados a cada frasco: 200 µL de metanol, 200 mL de tampão borato 0,05 M (pH 9,5, ajustado com NaOH 2 N), 100 µL de solução de cianeto de sódio (0,13 mg/mL em água destilada) e 100 µL de solução de NDA (0,25 mg/mL em metanol). As amostras foram imediatamente agitadas em vórtex durante 1 minuto, mantidas a 60°C durante 15 minutos em banho termostático e depois esfriadas à temperatura ambiente. Para o último passo do processo, as amostras foram diluídas com 1,4 mL de acetonitrila:H₂O destilada (3:2, v/v) (Abrunhosa *et al.*, 2011).

As amostras foram então analisadas por CLAE equipado com um detector de fluorescência Jasco FP-920 (420 nm de comprimento de onda de excitação/500 nm de comprimento de onda de emissão). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna C18 (Waters Spherisorb ODS2, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm), equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila:água:ácido acético (60:40:1, v/v/v) e o fluxo foi ajustado para 1,0 mL/min. A temperatura da coluna foi ajustada para 28°C e o volume de injeção foi de 50 µL. O padrão para FB₂ contendo 50,0 µg/mL foi obtido da Sigma-Aldrich. As amostras foram consideradas positivas quando um pico no tempo de retenção similar ao padrão foi obtido, com uma altura de cinco vezes maior do que o ruído de linha de base.

Análise fenotípica dos dados

Um dendrograma fenotípico com base em características morfológicas e perfis bioquímicos foi construído e a análise do mesmo foi realizada com o programa estatístico SPSS versão 16.0 (IBM). As características morfológicas analisadas foram: seriação, ornamentação dos conídios, forma e tamanho, tipo de cabeça conidial e cor da colônia em MEA e CZ. Para os dados bioquímicos foi observada a presença ou ausência da produção de OTA e FB₂.

Perfis proteômicos por MALDI-TOF MS

Os esporos de cada linhagem foram suspensos em 1 mL de solução aquosa contendo 0,2% de agar e inoculados em três pontos em placas de Petri de 6 centímetros de diâmetro contendo 5 mL de MEA. As linhagens foram incubadas no escuro durante 36 horas a 25°C. *Escherichia coli* DH5 α obtida da MUM foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS. As células da *Escherichia coli* DH5 α foram cultivadas em meio Luria Bertani Agar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) a 37°C durante 20 horas (Rodrigues *et al.*, 2011). Cerca de 1 μ g de esporos e micélio jovem de cada cultura foi transferida diretamente para placa de 48 poços de MALDI-TOF MS. Simultaneamente, 0,5 μ L da solução de matriz (75 mg/mL de ácido 2,5-dihidroxibenzóico em etanol/água/acetoneitrila (1:1:1) com 0,03% ácido trifluoracético) foi adicionada às amostras e homogenizadas suavemente. As misturas foram secas a temperatura ambiente. Para a garantia de reprodutibilidade, cada amostra foi feita em duplicata. Durante a análise, todas as soluções foram preparadas e armazenadas a 5°C de acordo com Rodrigues *et al.* (2011).

As análises foram realizadas em um sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipado com um laser de nitrogênio (337 nm), em que a intensidade do laser foi fixada imediatamente acima do limiar para a produção de íons. Doze proteínas ribossomais conhecidas de *E. coli* DH5 α (4.365,4; 5.096,8; 5.381,4; 6.241,4; 6.255,4; 6.316,2; 6.411,6; 6.856,1; 7.158,8; 7.274,5; 7.872,1; 9.742 e 12.227,3 Da) foram utilizadas como calibrantes externos. Os espectros de massa com base na gama de massas 2-20 kDa foram registados utilizando o modo linear, com um atraso de 104 ns e uma voltagem de aceleração de 20 kV. Os espectros finais foram gerados somando 20 disparos do laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, o que levou a 1000 disparos de laser por espectros somados.

As listas de picos resultantes foram exportadas para o programa SARAMISTM (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Germany, www.anagnostec.eu), onde a identificação microbiana final foi alcançada. No SARAMISTM as listas de picos das amostras individuais foram comparadas no banco de dados gerando uma lista ordenada de espectros correspondentes. O SARAMISTM utiliza um sistema de pontos baseado em lista de picos com sinais de massa ponderados de acordo com a sua especificidade. A semelhança entre os espectros individuais é expressa como o número absoluto ou relativo de combinar sinais de massa e depois de submeter os dados

para um único algoritmo de agrupamento aglomerativo. Identificações microbianas através do SARAMIS™ são baseadas na presença ou ausência de cada pico no espectro. Um dendrograma baseado na análise proteômica das linhagens foi criado através do SARAMIS™.

Resultados e discussão

Caracterização morfológica e bioquímica

A Figura 1 mostra as características macroscópicas para as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, onde foram avaliadas após crescimento em meio MEA e CZ durante 7 dias no escuro a 25°C. A Figura 2 mostra as características microscópicas das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* após crescimento em meio MEA durante 7 dias no escuro a 25°C. Todas as linhagens avaliadas neste estudo apresentaram conídios variando de castanho-escuro a preto; conidióforos uniseriados ou biseriados; vesículas esféricas; e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice (Klick, 2002). Nas Figuras 1-3 e Tabela 1, diferentes características morfológicas foram observadas para as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*.

Das 93 linhagens avaliadas neste estudo, aproximadamente 23% e 9% delas foram caracterizadas como produtoras de OTA e FB₂, respectivamente. Onze linhagens (cerca de 20%) de toda população de *A. niger* avaliadas neste estudo foram caracterizadas como produtoras de OTA. Todas as linhagens de *A. carbonarius* avaliadas foram consideradas produtoras de OTA. Também foram produtoras de OTA *A. laticoffeatus* MUM 06.150, *A. sclerotioniger* MUM 06.151 e *A. foetidus* URM 749. Por outro lado, apenas oito linhagens (14%) de toda população de *A. niger* produziram FB₂ neste trabalho (Tabela 1). Estes resultados corroboram os dados relatados por Samson *et al.* (2007a) para a produção de OTA por *A. carbonarius*, *A. laticoffeatus*, *A. niger* e *A. sclerotioniger*, e os resultados apresentados por Magnoli *et al.* (2003) para a produção de OTA por *A. foetidus*. Em 2007, Frisvad *et al.* relataram pela primeira vez a produção FB₂ por *A. niger*. Varga *et al.* (2010b) encontraram 80% e 53,3% das linhagens de *A. niger* e *A. awamori* produtoras de fumonisinas, respectivamente. Perrone *et al.* (2011) também observaram a produção de FB₂ e FB₄ por linhagens de *A. niger* e *A. awamori*. A maioria dos estudos relata que *A. niger* produz apenas FB₂ e FB₄, no entanto Varga *et al.* (2010b) detectaram pela primeira vez a produção de FB₁ em linhagens de *A. niger*. Silva *et al.* (2011) relataram a produção de OTA em linhagens de *A. niger* e *A. carbonarius*. Soares *et al.* (2012) trabalhando com

270 linhagens pertencentes ao “agregado *Niger*” isolados de milho, observaram que 37 linhagens foram produtoras de OTA e 105 consideradas produtoras de FB₂. A produção de OTA e FB₂, dentro da seção *Nigri*, varia de linhagem para linhagem. De acordo com Samson *et al.* (2007a) linhagens muito antigas podem ter perdido a capacidade de produzir alguns dos metabólitos secundários característicos da espécie.

As informações fenotípicas como: seriação, tamanho, forma e ornamentação dos conídios, cabeça conidial, cor das colônias nos meios CZ e MEA e detecção da produção de OTA e FB₂ foram utilizadas para a construção do dendrograma fenotípico com todas as linhagens estudadas. O dendrograma fenotípico obtido foi separado em três grupos distintos (Figura 3). O primeiro grupo consistiu das seguintes espécies: *Aspergillus brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. sclerotioniger* e *A. tubingensis*. Estas espécies são biseriadas, ou seja, possuem fiáldes e métulas, e possuem grandes conídios. As características dos conídios são de grande importância na identificação das espécies da seção *Nigri*. Samson *et al.* (2004, 2007a) referem-se à *A. carbonarius*, *A. homomorphus*, *A. ibericus*, *A. sclerotii carbonarius* e *A. sclerotioniger* como espécies pertencentes à seção *Nigri* que produzem conídios grandes. Além disso, de acordo com Abarca *et al.* (2004) *A. carbonarius* é, possivelmente, o membro mais distinto desta seção e pode ser facilmente reconhecido devido ao tamanho dos conídios que é muito maior quando comparado aos das outras espécies desta seção. *Aspergillus carbonarius* possui conídios rugosos. Devido a estas características particulares, quase todas as linhagens de *A. carbonarius* foram agrupadas no dendrograma por semelhanças fenotípicas. Em contraste a maioria, o *A. carbonarius* URM 3818 apresentou conídio liso, havendo o agrupamento desta linhagem com as espécies *A. ellipticus* MUM 03.12 e *A. sclerotioniger* MUM 06.151. *Aspergillus sclerotioniger* apresenta conídios lisos quando jovem, tornando-se verrucosos na maturação (Samson *et al.*, 2004) e *A. ellipticus* possui conídios equinulados (Kozakiewicz, 1989). *Aspergillus carbonarius* e *A. sclerotioniger* são espécies capazes de produzir esclerócios e OTA (Samson *et al.*, 2004), características que podem ter levado a este agrupamento.

Aspergillus brasiliensis, *A. foetidus*, *A. niger* e *A. tubingensis* são morfologicamente idênticas e pertencem ao “agregado *Niger*” (Pařenicová *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2003). No entanto, alguns autores descrevem diferenças morfológicas entre as espécies do “agregado *Niger*”. Silva *et al.* (2011), por exemplo, diferenciaram *A. niger* e *A. tubingensis* com base na cor dos esclerócios, que variam de brancos a rosa em *A. niger* e preto *A. tubingensis*. No entanto, Samson *et al.* (2004) relataram que a produção de

esclerócios nem sempre é observada em *A. tubingensis*. Algumas características distintivas para *A. foetidus* foram descritas por Klich (2002) e Silva *et al.* (2011). Segundo esses autores, conidióforos curtos e conídios pequenos e lisos a delicadamente rugosos são as principais diferenças encontradas entre *A. foetidus* e outras espécies desta seção. As características observadas para a linhagem *A. foetidus* URM 749 analisada neste trabalho estão de acordo com as descritas por Klich (2002) e Silva *et al.* (2011). Além disso, Varga *et al.* (2011) com base em dados moleculares e fisiológicos consideraram *A. foetidus* como sinônimo de *A. niger*.

O segundo grupo é composto por espécies uniseriadas, ou seja, que só apresentam fiálides, no entanto, algumas espécies biseriadas como *A. niger* (URM 5654 e MUM 05.13), *A. phoenicis* MUM 03.05 e *A. vadensis* MUM 06.153 também fizeram parte deste grupo. Essas linhagens foram identificadas com base em suas características morfológicas, entretanto, o dendrograma fenotípico foi construído levando em consideração características relacionadas à morfologia e ao perfil bioquímico. O agrupamento destas características tornaram essas linhagens estatisticamente próximas das espécies uniseriadas (Tabela 1). As espécies uniseriadas que constituíram este grupo foram *A. aculeatus*, *A. japonicus* e *A. uvarum*. De acordo com Klich (2002) e Samson *et al.* (2007a) *A. japonicus* produz conídios equinulados e vesícula variando 14-30 (47) μm . Em contraste, a linhagem *A. japonicus* URM 3452 analisada neste trabalho apresentou conídios lisos. Além disso, *A. japonicus* URM 3916 e *A. japonicus* URM 5620 apresentaram vesículas com 51,1 e 50 μm , respectivamente, sendo maiores que as vesículas de *A. japonicus* MUM 03.02 avaliada neste trabalho, que é a espécie de referência (dados não apresentados).

De acordo com a análise fenotípica (Figura 3), *A. japonicus* URM 3916 e *A. japonicus* URM 5620 foram agrupados com *A. aculeatus* MUM 03.11, que é a espécie de referência utilizada neste trabalho. Klich (2002) descreve *A. aculeatus* e *A. japonicus* como espécies morfológicamente semelhantes, no entanto, grandes vesículas variando cerca de (15) 25-55 (100) μm e conídios elipsoidais são algumas das principais características morfológicas apresentadas por *A. aculeatus* e que são utilizadas na diferenciação dessa espécie de linhagens de *A. japonicus*. De acordo com Klich (2002) *A. japonicus* é descrita como uma espécie bem estabelecida e *A. aculeatus* é uma espécie onde o seu *status* taxonômico ainda está em questão. No dendrograma fenotípico as linhagens *A. aculeatus* URM 3776, *A. aculeatus* URM 4953 e *A. aculeatus* URM 5240 foram agrupadas com todas as linhagens de *A. japonicus* avaliadas neste estudo (Figura 3). Estas linhagens apresentaram vesículas menores quando comparadas com *A. aculeatus* MUM 03.11, que é

a espécie de referência utilizada (dados não apresentados). De acordo com Perrone *et al.* (2008), com base nas características morfológicas das espécies de fungos de *Aspergillus* seção *Nigri*, *A. uvarum* é estreitamente relacionado com *A. japonicus*, no entanto, algumas diferenças entre essas espécies, tais como, tamanho das vesículas e dos conídios é menor em *A. uvarum*, enquanto a forma dos conídios são semelhantes em ambas as espécies, podendo ser de subgloboso a globoso. Em contraste, os conídios de *A. japonicus* variam de 3,0-4,5 μm , enquanto *A. uvarum* apresenta conídios variando de 3,0-4,0 μm .

O terceiro grupo é composto por *A. ibericus* e *A. lacticoffeatus*, que são espécies biseriadas. No dendrograma fenotípico *A. ibericus* e *A. lacticoffeatus* estão bem separados dos outros grupos. Do ponto de vista morfológico, as espécies apresentam diferenças entre si. No entanto, a separação estatística significativa deste grupo dos outros grupos apresentados deu-se devido à ausência da produção de micotoxinas por *A. ibericus* e a cor da colônia de *A. lacticoffeatus*, essas seriam as principais razões para estes resultados.

Tabela 1. Caracterização fenotípica e perfis bioquímicos das linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri*.

| Número | Classificação Fenotípica | Origem | Cor da colônia ^a | | Diâmetro da colônia ^b | | Serição ^c | Ornamentação do confídio ^d | Micotoxinas ^e | |
|----------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|-----|----------------------------------|------|----------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------|
| | | | CZ | MEA | CZ | MEA | | | OTA | FB ₂ |
| MUM 03.01* (CBS 554.65) | <i>Aspergillus niger</i> | Fermentação | B | B | 47,0 | 58,0 | bi | r | - | + |
| MUM 03.57 | <i>A. niger</i> | Uvas | B | B | 45,0 | 48,0 | bi | r | - | + |
| MUM 05.13 | <i>A. niger</i> | Solo | W | BR | 50,0 | 58,0 | bi | r | - | - |
| URM 13 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | Br | BR | 70,0 | 80,0 | bi | r | - | - |
| URM 18 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | br | BR | 41,0 | 72,0 | bi | r | - | - |
| URM 19 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | br | BR | 46,0 | 70,0 | bi | r | - | - |
| URM 20 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | br | BR | 35,0 | 68,0 | bi | r | - | - |
| URM 28 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | br | W | 65,0 | 80,0 | bi | r | + | - |
| URM 238 | <i>A. niger</i> | Escamas epidermicas | ng | W | 19,0 | 30,0 | bi | r | - | - |
| URM 520 | <i>A. niger</i> | Suco de caju | br | br | 47,0 | 80,0 | bi | r | + | - |
| URM 949 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | b | br | 55,0 | 70,0 | bi | s | - | - |
| URM 978 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | br | g | 60,0 | 55,0 | bi | s | + | - |
| URM 2228 | <i>A. niger</i> | Secreção do ouvido | br | br | 66,0 | 80,0 | bi | s | - | - |
| URM 2604 | <i>A. niger</i> | Pulmão de ave | br | br | 54,0 | 76,0 | bi | r | + | - |
| URM 2813 | <i>A. niger</i> | Bagaga de cana | b | b | 59,0 | 68,0 | bi | r | - | - |
| URM 2908 | <i>A. niger</i> | Comida | b | b | 64,0 | 70,0 | bi | r | - | - |
| URM 3094 | <i>A. niger</i> | Folha | w | w | 6,0 | 49,0 | bi | r | + | - |
| URM 3701 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | w | w | 60,0 | 62,0 | bi | r | - | - |
| URM 3753 | <i>A. niger</i> | Água | p | w | 40,0 | 76,0 | bi | r | - | - |
| URM 3755 | <i>A. niger</i> | Água | w | w | 40,0 | 72,0 | bi | r | - | - |
| URM 3806 | <i>A. niger</i> | Resíduos de caju | g | w | 59,0 | 62,0 | bi | r | - | - |
| URM 3811 | <i>A. niger</i> | Resíduos de abacaxi | w | w | 50,0 | 76,0 | bi | r | - | - |
| URM 3820 | <i>A. niger</i> | Solo | w | w | 76,0 | 56,0 | bi | r | - | - |
| URM 3853 | <i>A. niger</i> | Polpa de cupuaçu | y | br | 63,0 | 51,0 | bi | r | - | - |
| URM 3856 | <i>A. niger</i> | Resíduo de maracujá | w | w | 70,0 | 64,0 | bi | r | - | - |
| URM 3885 | <i>A. niger</i> | Solo | w | w | 58,0 | 52,0 | bi | r | - | - |
| URM 4312 | <i>A. niger</i> | Solo | w | g | 32,0 | 80,0 | bi | r | - | - |
| URM 4645 | <i>A. niger</i> | Solo | p | p | 64,0 | 52,0 | bi | r | + | - |
| URM 4924 | <i>A. niger</i> | Solo | p | g | 75,0 | 80,0 | bi | r | - | - |
| URM 5001 | <i>A. niger</i> | Solo | w | w | 48,0 | 74,0 | bi | r | + | - |
| URM 5020 | <i>A. niger</i> | Chá | p | w | 30,0 | 66,0 | bi | r | - | - |
| URM 5117 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | w | w | 68,0 | 64,0 | bi | r | - | + |
| URM 5149 | <i>A. niger</i> | Água do mar | w | w | 60,0 | 66,0 | bi | r | - | - |
| URM 5162 | <i>A. niger</i> | Argamassa | w | w | 60,0 | 84,0 | bi | s | - | - |
| URM 5207 | <i>A. niger</i> | Desconhecido | w | w | 62,0 | 54,0 | bi | s | - | - |
| URM 5218 | <i>A. niger</i> | Cavidade oral do sagüi | b | b | 55,0 | 58,0 | bi | r | - | + |
| URM 5238 | <i>A. niger</i> | Rizosfera | b | br | 50,0 | 60,0 | bi | r | - | - |
| URM 5239 | <i>A. niger</i> | Rizosfera | b | g | 46,0 | 70,0 | bi | r | - | - |
| URM 5243 | <i>A. niger</i> | Rizosfera | br | br | 64,0 | 74,0 | bi | r | - | - |
| URM 5253 | <i>A. niger</i> | Rizosfera | b | b | 66,0 | 74,0 | bi | r | - | - |
| URM 5437 | <i>A. niger</i> | Água | br | br | 72,0 | 50,0 | bi | r | - | - |
| URM 5438 | <i>A. niger</i> | Água | b | br | 50,0 | 52,0 | bi | s | - | - |
| URM 5439 | <i>A. niger</i> | Amostra clínica | b | b | 65,0 | 70,0 | bi | s | - | - |
| URM 5555 | <i>A. niger</i> | Farinha de amendoim | br | br | 70,0 | 64,0 | bi | r | - | - |
| URM 5654 | <i>A. niger</i> | Torta de girassol | y | y | 72,0 | 68,0 | bi | r | + | - |
| URM 5741 | <i>A. niger</i> | Torta de mamona | br | b | 64,0 | 30,0 | bi | r | - | - |
| URM 5756 | <i>A. niger</i> | Torta de mamona | br | br | 66,0 | 66,0 | bi | r | - | + |
| URM 5837 | <i>A. niger</i> | Torta de mamona | br | br | 60,0 | 60,0 | bi | r | - | - |

Tabela 1. (Cont.): Caracterização fenotípica e perfis bioquímicos das linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri*.

| Número | Classificação fenotípica | Origem | Cor da colônia ^a | | Diâmetro da colônia ^b | | Seriiação ^c | Ornamentação do conídio ^d | Micotoxinas ^e | |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|-----|----------------------------------|------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------|
| | | | CZ | MEA | CZ | MEA | | | OTA | FB ₂ |
| URM 5838 | <i>A. niger</i> | Torta de mamona | br | br | 68,0 | 74,0 | bi | r | - | - |
| URM 5842 | <i>A. niger</i> | Solo | br | br | 58,0 | 60,0 | bi | r | - | - |
| URM 5853 | <i>A. niger</i> | Solo | b | b | 54,0 | 68,0 | bi | r | + | - |
| URM 5863 | <i>A. niger</i> | Torta de mamona | br | br | 54,0 | 64,0 | bi | r | - | + |
| URM 5910 | <i>A. niger</i> | Torta de mamona | br | br | 48,0 | 65,0 | bi | r | - | - |
| URM 5924 | <i>A. niger</i> | Pulmão | br | br | 70,0 | 68,0 | bi | r | + | + |
| URM 5929 | <i>A. niger</i> | Torta de mamona | br | br | 70,0 | 60,0 | bi | r | - | + |
| URM 5959 | <i>A. niger</i> | Rizosfera | br | b | 70,0 | 70,0 | bi | r | + | - |
| URM 6054 | <i>A. niger</i> | Endofítico | br | g | 45,0 | 64,0 | bi | r | - | - |
| MUM 03.06* (CBS 111.26) | <i>A. carbonarius</i> | Papel | b | b | 35,0 | 42,0 | bi | r | + | - |
| MUM 03.59 (IMI 387242) | <i>A. carbonarius</i> | Vinho | b | b | 30,0 | 54,0 | bi | r | + | - |
| MUM 05.18 (IMI 387223) | <i>A. carbonarius</i> | Uvas | b | b | 40,0 | 45,0 | bi | r | + | - |
| URM 1546 | <i>A. carbonarius</i> | Desconhecido | y | y | 65,0 | 40,0 | bi | r | + | - |
| URM 3818 | <i>A. carbonarius</i> | Água | b | g | 40,0 | 67,0 | bi | r | + | - |
| URM 5012 | <i>A. carbonarius</i> | Solo | b | b | 70,0 | 68,0 | bi | r | + | - |
| URM 6123 | <i>A. carbonarius</i> | Ar | b | b | 65,0 | 60,0 | bi | r | + | - |
| MUM 03.02* (CBS 12327) | <i>A. japonicus</i> | Solo | br | br | 10,0 | 52,0 | uni | e | - | - |
| URM 3452 | <i>A. japonicus</i> | Solo oceânico | br | br | 26,0 | 72,0 | uni | s | - | - |
| URM 3833 | <i>A. japonicus</i> | Água | br | br | 40,0 | 69,0 | uni | e | - | - |
| URM 3840 | <i>A. japonicus</i> | Solo | br | br | 37,0 | 66,0 | uni | e | - | - |
| URM 3916 | <i>A. japonicus</i> | Água | br | b | 36,0 | 70,0 | uni | e | - | - |
| URM 4533 | <i>A. japonicus</i> | Solo | br | br | 33,0 | 75,0 | uni | e | - | - |
| URM 4599 | <i>A. japonicus</i> | Sedimento de manguezal | br | br | 41,0 | 73,0 | uni | e | - | - |
| URM 4663 | <i>A. japonicus</i> | Solo | br | br | 54,0 | 59,0 | uni | e | - | - |
| URM 5242 | <i>A. japonicus</i> | Solo | br | br | 39,0 | 74,0 | uni | e | - | - |
| URM 5620 | <i>A. japonicus</i> | Torta de mamona | br | br | 45,0 | 70,0 | uni | e | - | - |
| URM 5633 | <i>A. japonicus</i> | Desconhecido | br | br | 64,0 | 66,0 | uni | e | - | - |
| URM 5723 | <i>A. japonicus</i> | Água | br | br | 67,0 | 73,0 | uni | e | - | - |
| URM 5751 | <i>A. japonicus</i> | Desconhecido | br | br | 47,0 | 80,0 | uni | e | - | - |
| MUM 03.11* (CBS 172.66) | <i>A. aculeatus</i> | Solo tropical | b | br | 47,0 | 55,0 | uni | e | - | - |
| URM 3776 | <i>A. aculeatus</i> | Solo | b | b | 74,0 | 56,0 | uni | e | - | - |
| URM 4953 | <i>A. aculeatus</i> | Solo | br | br | 63,0 | 58,0 | uni | e | - | - |
| URM 5240 | <i>A. aculeatus</i> | Rizosfera | br | br | 61,0 | 70,0 | uni | e | - | - |
| URM 749 | <i>A. foetidus</i> | Desconhecido | br | br | 37,0 | 45,0 | bi | s | + | - |
| MUM 03.05 (CBS 629.78) | <i>A. phoenicis</i> | Desconhecido | w | b | 40,0 | 45,0 | bi | s | - | - |
| MUM 05.10 | <i>A. brasiliensis</i> | Uvas | b | b | 55,0 | 48,0 | bi | e | - | - |
| MUM 03.12* (CBS 48265) | <i>A. ellipticus</i> | Solo | b | br | 26,0 | 58,0 | bi | e | - | - |
| MUM 03.49* (IMI 391429) | <i>A. ibericus</i> | Uvas | b | b | 45,0 | 60,0 | bi | e | - | - |
| MUM 03.50 (IMI 391430) | <i>A. ibericus</i> | Uvas | b | b | 47,0 | 63,0 | bi | e | - | - |
| MUM 03.51 (IMI 391431) | <i>A. ibericus</i> | Uvas | b | b | 45,0 | 62,0 | bi | e | - | - |
| MUM 06.150* (CBS 101883) | <i>A. lacticoffeatus</i> | <i>Coffea robusta</i> | br | br | 43,0 | 44,0 | bi | s | + | - |
| MUM 06.151* (CBS 115572) | <i>A. sclerotioniger</i> | <i>Coffea arábica</i> | br | y | 42,0 | 63,0 | bi | r | + | - |
| MUM 06.152* (CBS 134.48) | <i>A. tubingensis</i> | Desconhecido | g | br | 45,0 | 73,0 | bi | s | - | - |
| MUM 06.153* (CBS 113365) | <i>A. vadensis</i> | Tecido vegetal morto | br | br | 40,0 | 66,0 | bi | r | - | - |
| MUM 08.01* | <i>A. uvarum</i> | Uvas | br | br | 67,0 | 72,0 | uni | e | - | - |

^a b: negra; br: marrom; w: branca; g: cinza; y: amarela; ng: não apresentou crescimento.

^b diâmetro da colônia em mm. ^c bi: biseriado; uni: uniseriada. ^d r: rugoso; s: liso; e: equinulado. ^e valores em ng/mL. *Espécies tipo

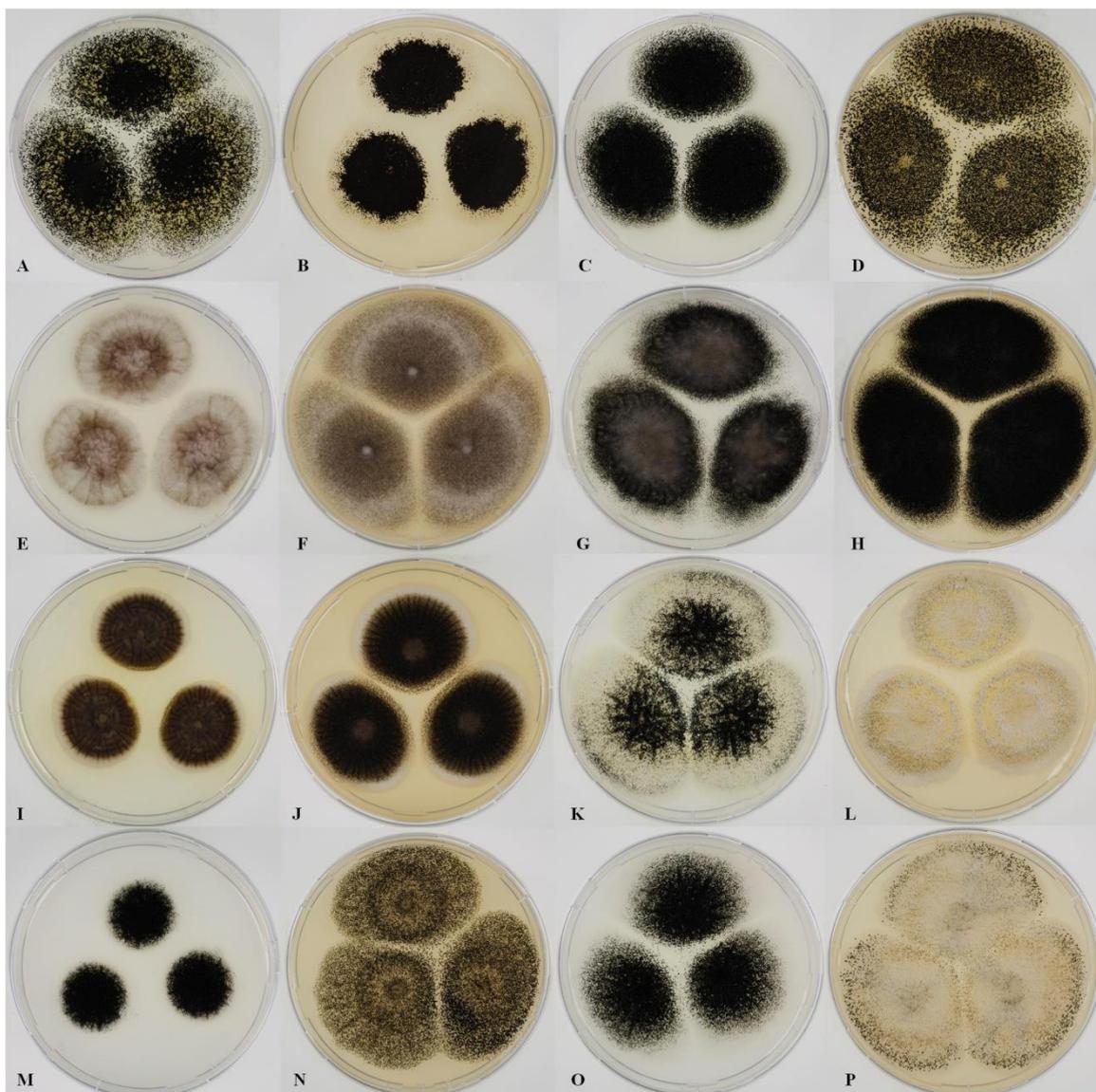


Figura 1. Verso das colônias de *Aspergillus* seção *Nigri* em CZ e MEA, respectivamente, a 25°C após 7 dias de crescimento. (A-B) *A. niger* URM 5207, (C-D) *A. carbonarius* URM 5012, (E-F) *A. japonicus* URM 3452, (G-H) *A. aculeatus* URM 3776, (I-J) *A. foetidus* URM 749, (K-L) *A. brasiliensis* MUM 05.10, (M-N) *A. ellipticus* MUM 03.12 e (O-P) *A. ibericus* MUM 03.49.

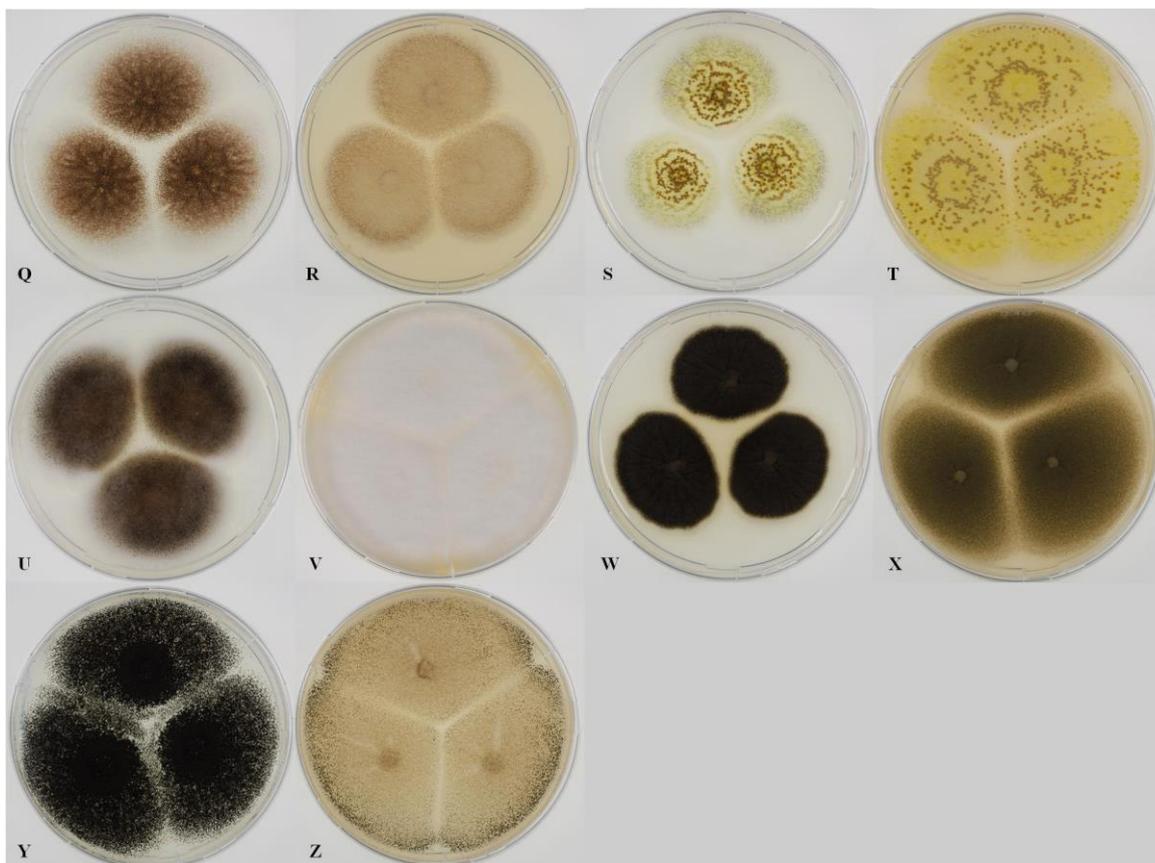


Figura 1. (Cont.): Verso das colônias de *Aspergillus* seção *Nigri* em CZ e MEA, respectivamente, a 25°C após 7 dias de crescimento. (Q-R) *A. lacticoffeatus* MUM 06.150, (S-T) *A. sclerotioniger* MUM 06.151, (U-V) *A. tubingensis* MUM 06.152, (W-X) *A. vadensis* MUM 06.153 e (Y-Z) *A. uvarum* MUM 08.01.

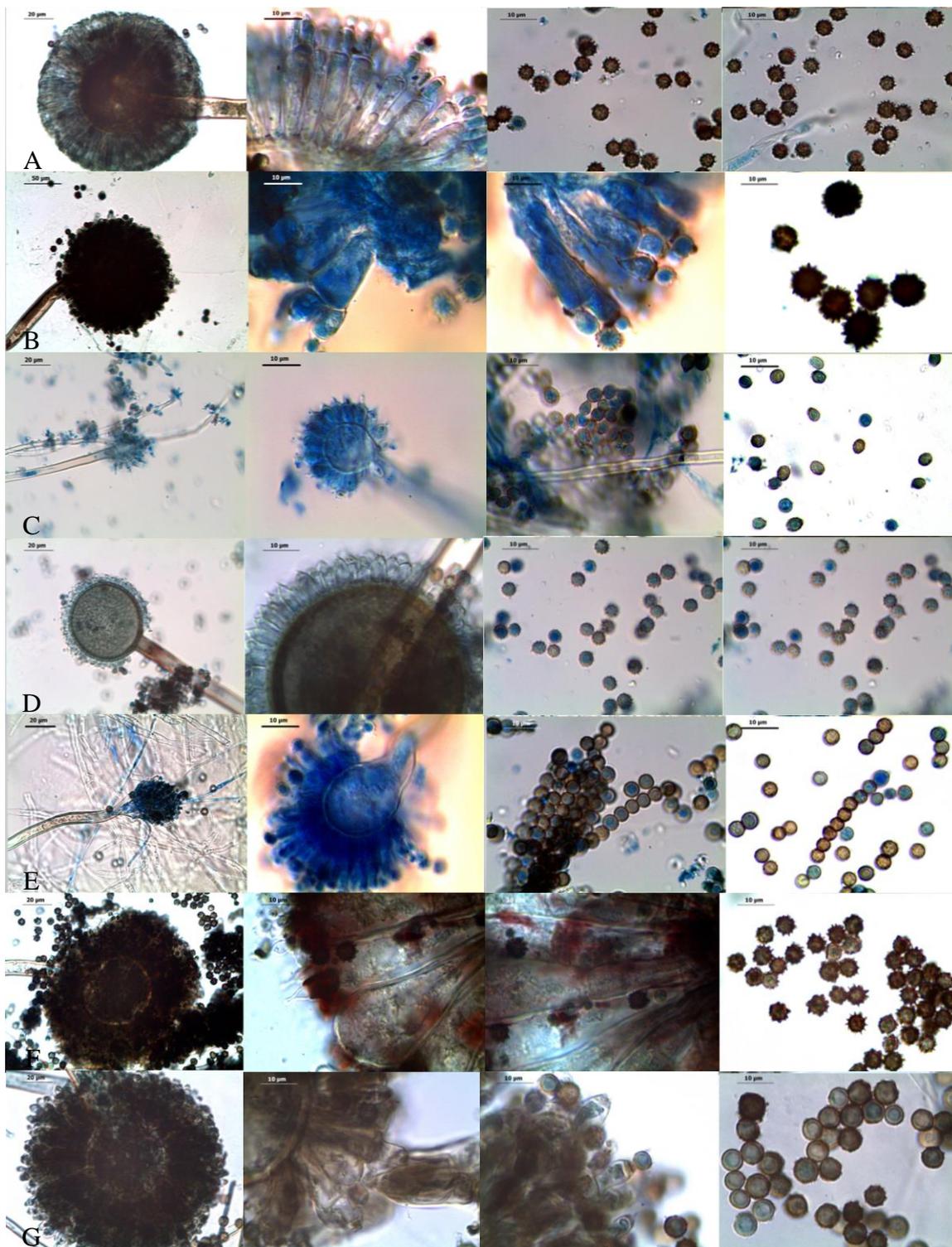


Figura 2. Características microscópicas das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* crescidas em MEA por 7 dias no escuro a 25°C. Linhas: (A) *A. niger* URM 5959, (B) *A. carbonarius* URM 1546, (C) *A. japonicus* URM 3452, (D) *A. aculeatus* URM 4953, (E) *A. foetidus* URM 749, (F) *A. brasiliensis* MUM 05.10 e (G) *A. ellipticus* MUM 03.12.

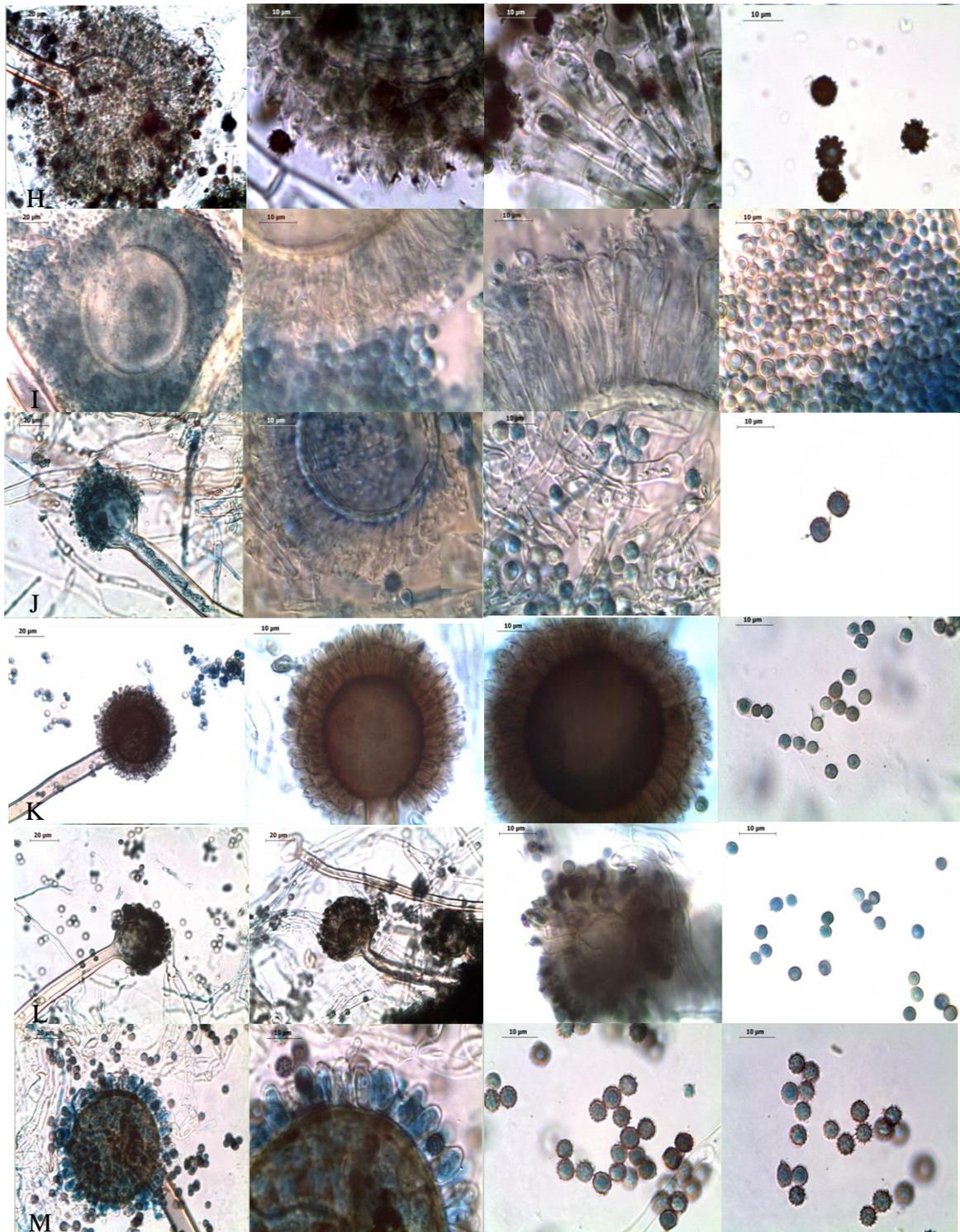


Figura 2. (Cont.): Características microscópicas das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* crescidas em MEA por 7 dias no escuro a 25°C. Linhas: (H) *A. ibericus* MUM 03.49, (I) *A. lacticoffeatus* MUM 06.150, (J) *A. sclerotioniger* MUM 06.151, (K) *A. tuingensis* MUM 06.152, (L) *A. vadensis* MUM 06.153 e (M) *A. uvarum* MUM 08.01.

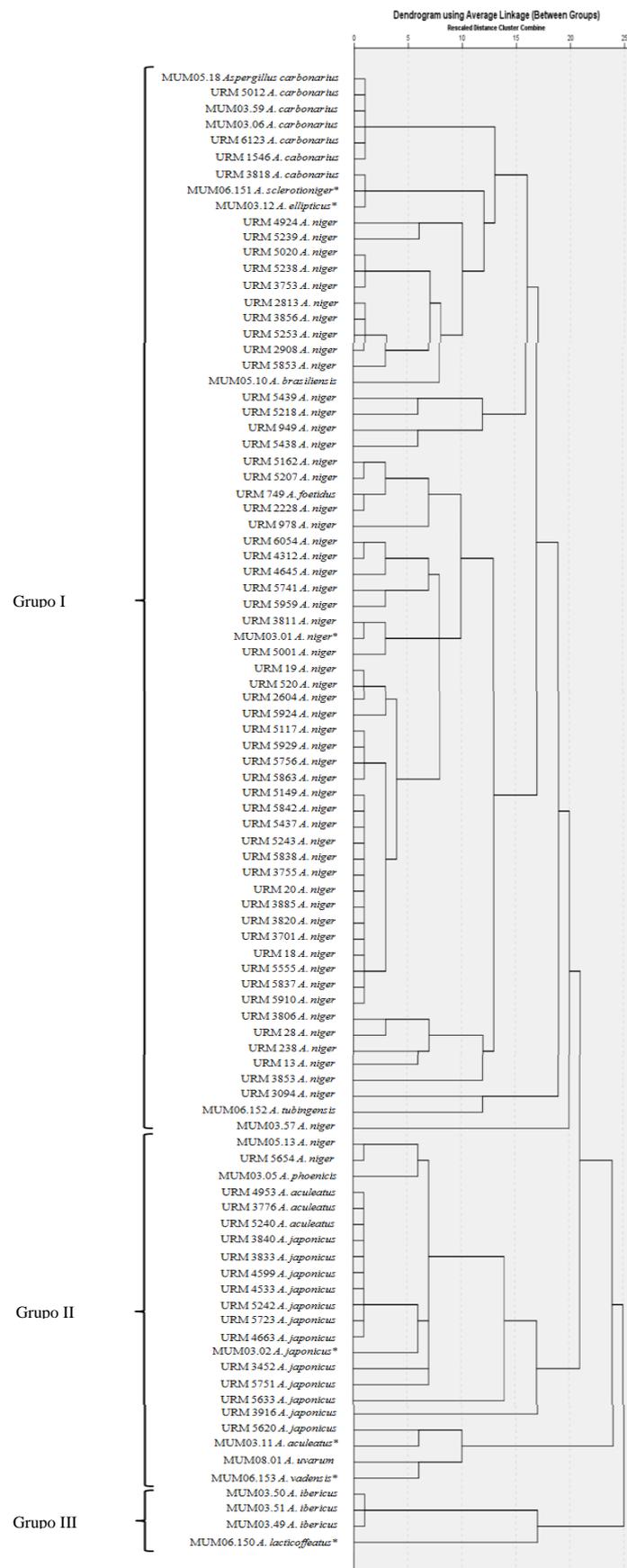


Figura 3. Dendrograma construído com base nas análises de seriação; forma, tamanho e ornamentação dos conídios; tipo de cabeça conidial; cor da colônia em CZ e MEA; e detecção da produção de OTA e FB₂ para as linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri*.

Análise proteômica por MALDI-TOF MS

O dendrograma com base nos perfis proteômicos por MALDI-TOF MS das 93 linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* avaliadas neste estudo é apresentado na Figura 4. Alguns grupos formados com base na análise proteômica foram semelhantes aos obtidos no dendrograma fenotípico. De acordo com o dendrograma proteômico construído, o primeiro grupo foi formado pelas espécies *A. brasiliensis*, *A. foetidus*, *A. laticoffeatus*, *A. niger* e *A. tubingensis*. Este grupo possui algumas espécies similares com o grupo formado no dendrograma fenotípico (Figuras 3 e 4). Além disso, as espécies pertencentes ao “agregado *Niger*” foram agrupadas no dendrograma proteômico. Isto pode indicar que as espécies do “agregado *Niger*” não são diferenciadas pela morfologia nem pela análise proteômica por MALDI-TOF MS. Kallow *et al.* (2006) analisando linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* pela técnica do MALDI-TOF MS observaram que as espécies *A. niger*, *A. phoenicis* e *A. tubingensis* estiveram relacionadas e foram consideradas como pertencentes ao “agregado *Niger*”. A linhagem *A. niger* URM 5654 no dendrograma fenotípico, obtido a partir de dados morfológicos e bioquímicos, esteve agrupada juntamente com as espécies uniseriadas no segundo grupo formado (Figura 3), no entanto, no dendrograma proteômico esteve agrupada no primeiro grupo juntamente com outras linhagens de *A. niger* corroborando a identificação morfológica (Figura 4).

O segundo grupo formado através da análise proteômica consiste de espécies uniseriadas como *A. aculeatus*, *A. japonicus* e *A. uvarum*. *Aspergillus aculeatus* URM 4953 foi agrupada com todas as linhagens de *A. japonicus*. Esta linhagem apresentou vesícula pequena, sendo esta característica da espécie *A. japonicus* (Figura 2). Através da análise proteômica, Kallow *et al.* (2006) demonstraram claramente um agrupamento para a espécie *A. aculeatus* e *A. japonicus*, confirmando a proximidade entre estas duas espécies uniseriadas. Além disso, o terceiro grupo formado foi constituído das seguintes espécies: *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. ibericus* e *A. sclerotium*. *Aspergillus ibericus* está intimamente relacionado com *A. carbonarius* devido às semelhanças fenotípicas apresentadas. No entanto, a técnica de MALDI-TOF MS foi capaz de separar estas espécies (Figura 4). Estes dados corroboram os resultados de Kallow *et al.* (2006) que trabalharam com as linhagens MUM 03.49, MUM 03.50 e MUM 03.51 de *A. ibericus* e MUM 03.06, MUM 03.59 e MUM 05.18 de *A. carbonarius* e separaram estas linhagens em dois grupos distintos com base na análise de MALDI-TOF MS. Estes autores também relacionaram as espécies de *A. carbonarius* e *A. sclerotium*.

O quarto grupo é formado por *A. niger* (URM 238, URM 2908, URM 3094, URM 4924, URM 5253, MUM 03.57, MUM 05.13), *A. phoenicis* MUM 03.05 e *A. vadensis* MUM 06.153. *Aspergillus phoenicis* foi considerado como uma espécie pertencente ao “agregado *Niger*” por Raper e Fennel (1965) e como uma variedade de *A. niger* por Al-Musallam (1980). *Aspergillus vadensis* está estreitamente relacionado com *A. tubingensis* a partir de um ponto de vista bioquímico segundo De Vries *et al.* (2005). Para as espécies deste grupo é necessária a utilização de outras técnicas para uma identificação mais precisa, uma vez que estes isolados deveriam ter sido agrupados no primeiro grupo.

De acordo com estes resultados, Rodrigues *et al.* (2011) com o objetivo de identificar, através de uma abordagem polifásica, espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*, encontraram limitações para diferenciar *A. oryzae* de *A. flavus* a partir do ponto de vista proteômico, no entanto, o MALDI-TOF MS permite a identificação rápida e eficiente para as espécies de *Aspergillus*, como visto nos estudos de Bille *et al.* (2012), onde das 64 linhagens de *Aspergillus*, 63 foram claramente identificadas pela técnica do MALDI-TOF MS. Resultados semelhantes também foram observados por Alanio *et al.* (2011) trabalhando com linhagens de *Aspergillus* seções *Fumigati*, *Flavi*, *Terrei*, *Nigri*, *Nidulantes*, *Usti* e *Circumdati*. Estes autores obtiveram 98,6% de confirmação taxonômica pelo MALDI-TOF MS. Por análise de sequências dos genes da β -tubulina e calmodulina, De Carolis *et al.* (2012) observaram que 63 das 81 linhagens de *Aspergillus* foram incorretamente identificadas, confirmando os resultados obtidos por MALDI-TOF MS. Estes autores também analisaram 18 linhagens pertencentes à seção *Flavi* e identificaram através de análises moleculares como *A. oryzae* (17 linhagens) e *A. flavus* (1 linhagem). Esses resultados foram posteriormente confirmados pelo MALDI-TOF MS.

Atualmente a técnica do MALDI-TOF MS tem sido utilizada de forma habitual na identificação de fungos filamentosos e leveduras (Santos, *et al.*, 2010b; Rodrigues *et al.*, 2011; De Carolis *et al.*, 2012; Passarini *et al.*, 2012; Wieser *et al.*, 2012). Existem poucos dados para a diferenciação de espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e dermatófitos (Wieser *et al.*, 2012). A abordagem polifásica tem sido utilizada por muitos taxonomistas para que haja uma identificação mais precisa das espécies. Poucos trabalhos são encontrados na literatura utilizando a análise proteômica por MALDI-TOF MS para *Aspergillus* seção *Nigri*. No entanto, a análise proteômica por MALDI-TOF MS tem um custo muito baixo e parece ser o primeiro método proteômico disponível para identificação precisa das espécies mais importantes de *Aspergillus*.

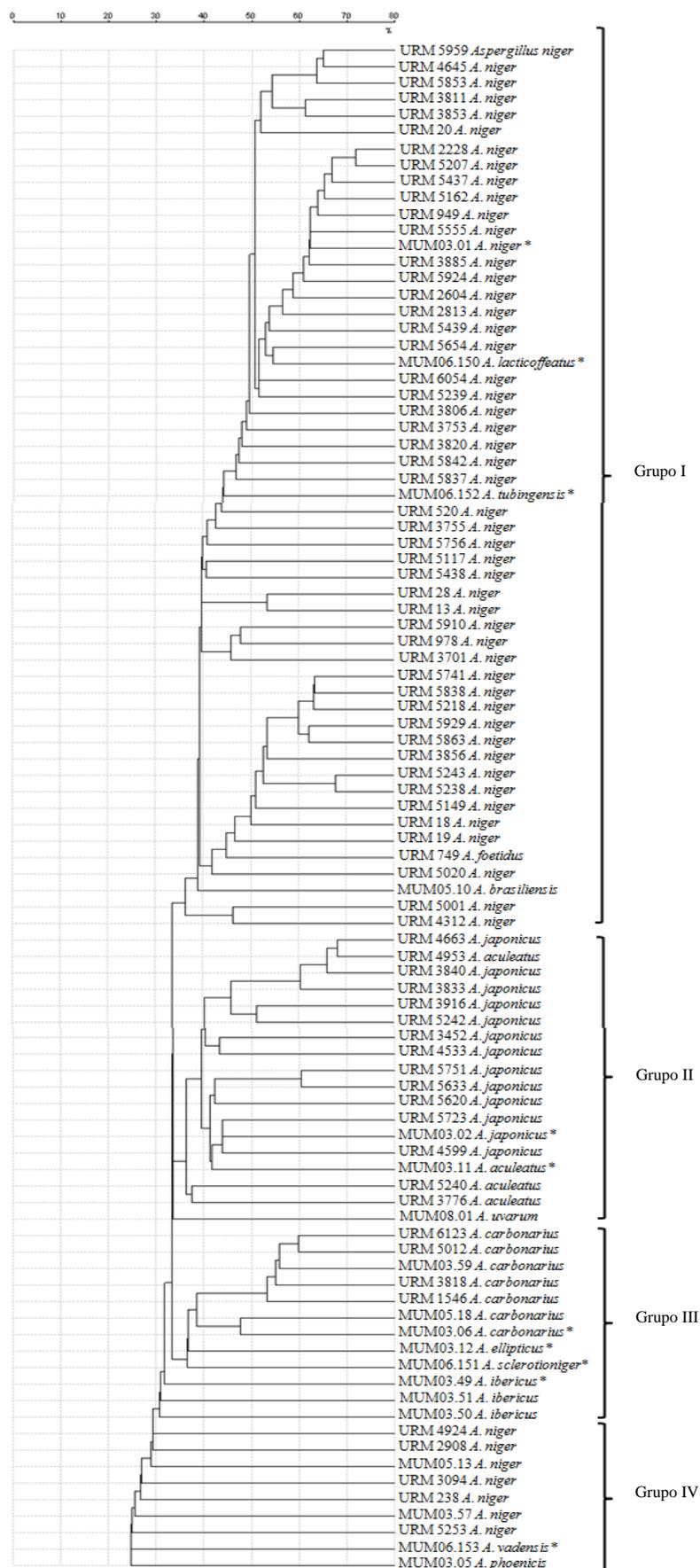


Figura 4. Dendrograma construído com base nas análises do MALDI-TOF MS entre as linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri*. As distâncias são medidas como porcentagem de similaridade.

Conclusões

A taxonomia da seção *Nigri* é considerada complexa devido às diferenças sutis entre as espécies. Os resultados obtidos pela técnica do MALDI-TOF MS corroboram os dados da taxonomia clássica e análises bioquímicas. Cerca de 20% e 14% das linhagens de *A. niger* são produtoras de OTA e FB₂, respectivamente. Diante disto, é necessária a análise prévia quanto ao perfil micotoxigênico de linhagens de *A. niger* para produção de enzimas de interesse industrial. A abordagem polifásica oferece diferentes tipos de dados, morfológicos, perfis bioquímicos e proteômicos, permitindo uma identificação mais precisa das espécies desta seção. A técnica do MALDI-TOF MS é uma ferramenta a mais que pode ser utilizada para a caracterização das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* de forma rápida e com um menor custo.

Agradecimentos

M.H.C. Maciel agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e Erasmus Mundus External Cooperation Window Lote 17.

4 PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASES POR LINHAGENS DE *ASPERGILLUS* SEÇÃO *NIGRI* EM REATOR DE LEITO FIXO²

Marília Maciel^{1,2}, Cristiane Ottoni¹, Cledir Santos¹, Nelson Lima¹, Keila Moreira³ e

Cristina Souza-Motta^{1*}

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

²IBB–Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 4710-057, Gualtar, Braga, Portugal

³Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural Pernambuco, 55292-270 Garanhuns, Pernambuco, Brasil

*Autor para correspondência: Cristina Maria Souza-Motta. Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420, Brasil. Telefone: (+55) 81 21268948, Fax: (+55) 81 21268480, email: smotta@ufpe.br

²Trabalho publicado como Marília Maciel, Cristiane Ottoni, Cledir Santos, Nelson Lima, Keila Moreira e Cristina Souza-Motta, C. 2013. Production of polygalacturonases by *Aspergillus* section *Nigri* strains in a fixed bed reactor. *Molecules* 18(2): 1660-1671. doi:10.3390/molecules18021660

Resumo

Poligalacturonases (PG) são enzimas pectinolíticas que possuem aplicações tecnológicas, funcionais e biológicas no processamento de alimentos, maturação do fruto e na interação planta-fungo, respectivamente. No presente estudo, foi utilizada uma metodologia de placa de microtitulação para selecionar de forma rápida 61 linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* quanto à capacidade de produzir endo-poligalacturonase (endo-PG) e exopoligalacturonase (exo-PG). Estudos de ampliação de escala foram realizados em um reator de leito fixo operado em diferentes parâmetros, utilizando a linhagem selecionada imobilizada em cascas de laranja. Um conjunto de quatro ensaios foi realizado nas seguintes condições: células imobilizadas sem aeração; células imobilizadas com aeração; células imobilizadas com aeração e adição de pectina; e células livres com aeração. As fermentações decorreram por um período de 168 horas, sendo as amostras retiradas a cada 24 horas. De acordo com os resultados obtidos, a linhagem *A. niger* URM 5162 apresentou valores máximos de atividade para a endo- e exo-PG (1,18 U/mL e 4,11 U/mL, respectivamente) quando o reator foi operado sem aeração. A seleção de linhagens fúngicas pelo método de placa de microtitulação promoveu a rápida detecção das linhagens capazes de produzir PG. O reator de leito fixo operado sem aeração e preenchido com casca de laranja, utilizada como suporte para a linhagem *A. niger* URM 5162 tornou-se um processo promissor para produção de PG.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, casca de laranja, células imobilizadas, poligalacturonases e reator de leito fixo

Introdução

O suco de laranja é um produto de importância econômica para o Produto Interno Bruto brasileiro (PIB). Aproximadamente 85% do total de suco de laranja produzido no Brasil são destinados à exportação, o que torna o país responsável por mais de 50% da produção mundial. A produção de suco de laranja no Brasil é maior quando comparada com a produção do café, carne bovina, frango e açúcar (Neves *et al.*, 2011). No entanto, o processo gera uma grande quantidade de resíduos, especialmente cascas e membranas. Estes resíduos são ricos em carboidratos solúveis e insolúveis (Zhou *et al.*, 2011): a casca contém aproximadamente 17% de açúcares solúveis, 9% de celulose, 10% de hemicelulose e 42% de pectina como os maiores componentes (Rivas *et al.*, 2008).

A utilização de cascas de laranja como fonte de carbono e indutor para a produção de pectinases é muito atrativo para a indústria de enzimas (Zhou *et al.*, 2011). A conversão de pectina em açúcares solúveis é possível através de reações enzimáticas catalisadas por enzimas pectinolíticas que são comumente produzidas por fungos, tais como a pectina liase (PL) (EC 4.2.1.10), pectina metilesterase (PME) (EC 3.2.1.11) e poligalacturonase (PG) (EC 3.2.1.15) (Holck *et al.*, 2011). As PG possuem principalmente função hidrolítica e são as mais utilizadas em processos industriais. Os fungos são utilizados para produção de PG em grande escala, em condições ácidas. Além disso, as PG fúngicas são mais úteis por possuírem elevada atividade e uma atividade ótima em pH baixo, o que é adequado para o processamento da maioria das frutas e legumes (Zheng; Shetty 2000).

Aproximadamente 25% das enzimas comercializadas no mercado global da indústria de alimentos são pectinases (Jayani *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2012), onde a principal aplicação industrial é na clarificação de suco e vinho. A clarificação é conseguida através da hidrólise e solubilização da pectina, promovendo a diminuição da viscosidade e da aglomeração de partículas sólidas suspensas, que podem ser removidas por filtração ou centrifugação (Gomes *et al.*, 2011; Laaksonen *et al.*, 2012).

Pectinases podem ser facilmente produzidas em elevadas concentrações por linhagens de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Certas espécies de *Aspergillus* podem ser caracterizadas pelo tipo de enzimas pectinolíticas que são capazes de produzir (Alimardani-theuil *et al.*, 2011; Fontana; Da Silveira 2012). A produção microbiana de enzimas pectinolíticas pode ser obtida por fermentação em estado sólido (FES) ou por fermentação submersa (FSm), onde pode-se utilizar células microbianas livres e imobilizadas.

A imobilização celular oferece inúmeras vantagens sobre as culturas em suspensão, como a estabilidade das células, maiores densidades celulares, maior produtividade e a viabilidade de processamento contínuo. A utilização de células imobilizadas para o aumento da produção enzimática tem sido cada vez mais avaliada. Por exemplo, Nighojkar *et al.* (2006) utilizaram com sucesso o alginato de sódio, alginato tratado com glutaraldeído e gel de alginato de álcool polivinílico para a imobilização de células de *A. niger*. Neste trabalho, os autores utilizaram cascas secas de laranja em pó como indutor para a produção de PG e os resultados obtidos apontam para a possibilidade de aplicação desses sistemas de imobilização em um processo semi-contínuo para a produção de PG.

Shrinivas *et al.* (2012) utilizaram *Bacillus halodurans* imobilizados em uma matriz de Ca-alginato para a produção de protease alcalina termoestável queratinolítica em cultivo em batelada repetido, gerando um aumento de 2,5% na produção de protease obtida sobre as células livres depois de 24 horas. Taşkin (2012) relataram a produção de tanase e PG utilizando células imobilizadas de *Rhodotorula glutinis* em Ca-alginato. Estes autores obtiveram uma maior produção de tanase e PG com o sistema de células imobilizadas. Embora diferentes sistemas de imobilização celular tenham sido estudados, muita informação referente à imobilização de células fúngicas para a produção de pectinases extracelulares permanece restrita.

O presente estudo teve como objetivo utilizar um método rápido para detecção de linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* produtoras de PG e utilizar a linhagem mais promissora em um reator de leito fixo operado em diferentes condições com células livres e imobilizadas.

Materiais e métodos

Micro-organismos

Cinquenta e três linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* (Tabela 1) obtidas a partir da coleção de culturas Micoteca URM (URM, Recife, Brasil, www.ufpe.br/micoteca/) e oito linhagens desta seção obtidas da coleção de culturas Micoteca da Universidade do Minho (MUM, Braga, Portugal, www.micoteca.deb.uminho.pt/) foram inoculadas em Agar Extrato de Malte (MEA: malte 20 g/L, glicose 20 g/L, peptona 1 g/L, agar 20 g/L) e incubadas durante 7 dias no escuro a 25°C.

Padronização do inóculo

Placas de Petri com 6 cm de diâmetro, contendo 7 mL de meio MEA esterilizado foram inoculadas com cada linhagem e incubadas durante 7 dias no escuro a 25°C. Em seguida, 5 discos de 6 mm foram cortados, com furador de cortiça estéril, da área periférica das colônias para suspender os esporos dos discos em 30 mL de uma solução de Tween 80 (0,02%). A concentração de esporos foi ajustada para 3×10^5 esporos/mL.

Tabela 1. Linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* avaliadas quanto à capacidade de produzir endo-poligalacturonase e exo-poligalacturonase.

| Número | Linhagens | Número | Linhagens |
|----------|--------------------------|------------|------------------------|
| URM 13 | <i>Aspergillus niger</i> | URM 5555 | <i>A. niger</i> |
| URM 18 | <i>A. niger</i> | URM 5741 | <i>A. niger</i> |
| URM 19 | <i>A. niger</i> | URM 5837 | <i>A. niger</i> |
| URM 20 | <i>A. niger</i> | URM 5838 | <i>A. niger</i> |
| URM 238 | <i>A. niger</i> | URM 5842 | <i>A. niger</i> |
| URM 949 | <i>A. niger</i> | URM 5910 | <i>A. niger</i> |
| URM 2228 | <i>A. niger</i> | URM 6054 | <i>A. niger</i> |
| URM 2813 | <i>A. niger</i> | URM 3452 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 2908 | <i>A. niger</i> | URM 3833 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 3701 | <i>A. niger</i> | URM 3840 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 3753 | <i>A. niger</i> | URM 3916 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 3755 | <i>A. niger</i> | URM 4533 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 3806 | <i>A. niger</i> | URM 4599 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 3811 | <i>A. niger</i> | URM 4663 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 3820 | <i>A. niger</i> | URM 5242 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 3853 | <i>A. niger</i> | URM 5620 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 3856 | <i>A. niger</i> | URM 5633 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 3885 | <i>A. niger</i> | URM 5723 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 4312 | <i>A. niger</i> | URM 5751 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 4924 | <i>A. niger</i> | URM 3776 | <i>A. aculeatus</i> |
| URM 5020 | <i>A. niger</i> | URM 4953 | <i>A. aculeatus</i> |
| URM 5149 | <i>A. niger</i> | URM 5240 | <i>A. aculeatus</i> |
| URM 5162 | <i>A. niger</i> | MUM 03.02 | <i>A. japonicus</i> |
| URM 5207 | <i>A. niger</i> | MUM 03.11 | <i>A. aculeatus</i> |
| URM 5238 | <i>A. niger</i> | MUM 05.10 | <i>A. brasiliensis</i> |
| URM 5239 | <i>A. niger</i> | MUM 03.12 | <i>A. ellipticus</i> |
| URM 5243 | <i>A. niger</i> | MUM 03.49 | <i>A. ibericus</i> |
| URM 5253 | <i>A. niger</i> | MUM 06.152 | <i>A. tubingensis</i> |
| URM 5437 | <i>A. niger</i> | MUM 06.153 | <i>A. vadensis</i> |
| URM 5438 | <i>A. niger</i> | MUM 08.01 | <i>A. uvarum</i> |
| URM 5439 | <i>A. niger</i> | | |

Método miniaturizado de seleção

Todas as linhagens foram submetidas a uma seleção em meio de cultura líquido (MCL: 100 g de casca de laranja por litro de água destilada) para avaliação da produção de PG. O MCL foi previamente esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C. Aliquotas (180 µL) de MCL esterilizado foram introduzidas em placas de 96 poços de microtitulação de poliestireno de fundo plano estéreis (Greiner, Frickenhausen, Alemanha) contendo 20 µL de uma suspensão de esporos com cerca de 3×10^5 esporos/mL e como branco foi utilizado água esterilizada. Uma vez inoculadas, as placas de microtitulação foram incubadas durante 5 dias no escuro a 25°C, sendo retiradas amostras a cada 24 horas. O ensaio foi realizado em triplicata.

Produção de poligalacturonases em reator de leito fixo

Procedimento de imobilização de biomassa no suporte natural

Cascas de laranja foram previamente esterilizadas durante duas horas em uma solução de hipoclorito de sódio a 2% (p/v) e, em seguida, lavadas abundantemente com água destilada esterilizada. As cascas de laranja foram incubadas durante 36 horas a 65°C para secagem e, em seguida, expostas a radiação de luz ultravioleta durante 2 horas (Spier *et al.*, 2008). Depois de seca, 100 g de cascas de laranja foram utilizadas como suporte para a imobilização da linhagem selecionada como maior atividade de PG. O suporte foi inoculado com 5 mL de suspensão de esporos contendo cerca de 3×10^5 esporos/mL. Após a inoculação, o suporte foi incubado durante 7 dias no escuro a 25°C para o crescimento do fungo. Posteriormente, estas cascas colonizadas foram utilizadas como substrato para os ensaios de fermentação.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Observações da estrutura morfológica da casca de laranja antes e depois da colonização pelo micélio fúngico foram avaliadas por MEV (Leica Cambridge S360, Cambridge, UK). As amostras foram revestidas com ouro e platina (80/20%) antes da observação microscópica.

Fermentação submersa

A ampliação de escala para produção das PG foi realizada em um reator de leito fixo utilizando células livres e imobilizadas da linhagem selecionada. Um reator de leito fixo de 300 mL de capacidade foi operado com um volume de 260 mL, à temperatura ambiente e assistido por uma bomba peristáltica (Figura 1). A fim de manter o metabolismo do fungo durante longos períodos, a adição contínua de MCL foi realizada. Nos ensaios conduzidos com aeração o grau de agitação do meio foi estabelecido de modo a evitar formação excessiva de espuma. Para a fermentação com células imobilizadas, com aeração e adição de pectina (5 g/L concentração final no MCL), a adição de pectina foi feita no tempo de 96 horas, a fim de manter o metabolismo do fungo por um período maior de fermentação. As atividades das PG foram avaliadas durante 168 horas para todos os ensaios e as amostras foram retiradas a cada 24 horas.

Ensaio enzimáticos

A atividade de endo-PG foi medida viscosimetricamente pela mistura de 5,5 mL de 1% (p/v) de pectina cítrica em tampão acetato 0,025 M pH 5,0 (suplementado com 1 mM de EDTA) e 250 µL do extrato enzimático bruto. A reação foi incubada durante 10 minutos a 50°C e em seguida esfriada em banho de gelo. Uma unidade viscosimétrica (U) foi definida como a quantidade da enzima requerida para diminuir a viscosidade inicial por minuto em 50%, nas condições descritas anteriormente (Tuttobello; Mill, 1961). A atividade de exo-PG foi determinada medindo a liberação de grupos redutores da pectina cítrica utilizando o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). A mistura de reação contendo 0,5 mL de 0,5% (p/v) de pectina cítrica em tampão acetato 0,025 M pH 5,0 e 0,5 mL de extrato enzimático bruto foi incubada a 50°C durante 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade da enzima que libera um mmole de ácido galacturônico por minuto.

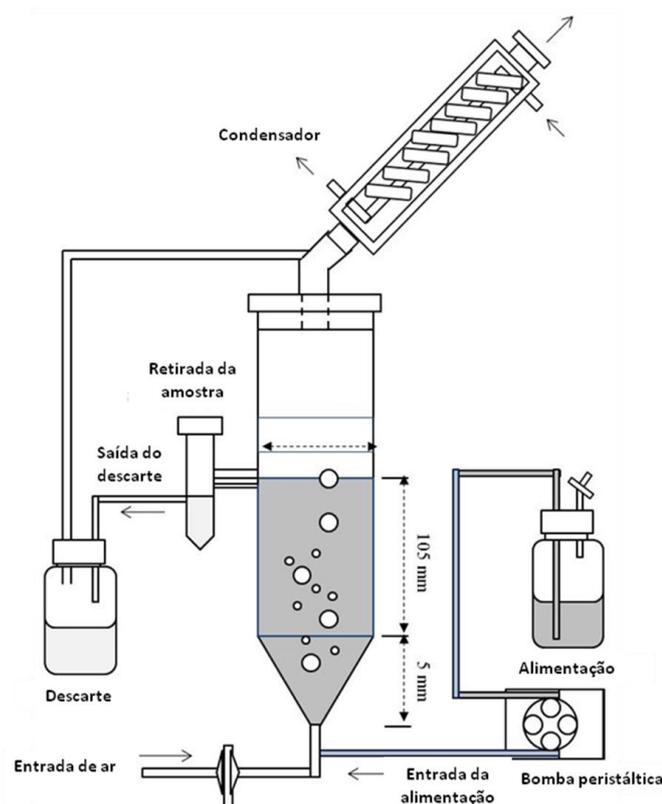


Figura 1. Diagrama do reator de leito fixo utilizado no presente estudo.

Resultados e discussão

Seleção das linhagens de *Aspergillus*

A seleção é frequentemente o primeiro passo para se obter os micro-organismos com características destinadas a aplicações industriais, permitindo a caracterização e a escolha de linhagens de fungo com a produção ótima de enzimas. Além disso, a informação obtida adiciona valores a esses recursos microbianos conservados em coleções de culturas.

Uma vez que as enzimas produzidas por fungos são utilizadas na indústria alimentar, estas não devem ser contaminadas com metabólitos tóxicos. Neste estudo, todas as linhagens foram previamente testadas para detecção de micotoxinas (ocratoxina A e fumonisina B₂), no entanto, nenhuma foi considerada produtora destes metabólitos (dados não apresentados).

Linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* foram avaliadas quanto à capacidade de sintetizar PG em placa de microtitulação de 96 poços contendo MCL (casca de laranja 100 g/L). A utilização de casca de laranja como o único componente do MCL permitiu a

detecção da produção de endo- e exo-PG. O método de placa de microtitulação possui algumas vantagens sobre os outros métodos de seleção microbiana. A principal vantagem relaciona-se com os custos, onde pequenas quantidades do meio de cultura (180 μ L) são utilizados, o espaço ocupado pelas placas de microtitulação é menor quando comparado ao espaço necessário quando a seleção é efetuada em placas de Petri ou frascos de Erlenmeyer e, por último, mas não menos importante, é um método quantitativo. Atualmente, há algumas técnicas desenvolvidas usando uma abordagem miniaturizada para produção de enzimas como as celulases e xilanases (Lee *et al.*, 2011) e um sistema mais avançado que integram um microbioreator e um separador contínuo miniaturizado (Pohar *et al.*, 2012).

Mrudula e Anitharaj (2011) testaram diferentes substratos como: farelo de arroz, farelo de trigo, bagaço de cana, casca de laranja, casca de limão e casca de banana para a produção de pectinases. A casca de laranja foi o substrato que permitiu maior produção de pectinases por *A. niger*. Além disso, Maller *et al.* (2011) concluíram que resíduos agro-industriais, tais como as casca de laranja e de limão, induziram a produção de elevados níveis de PG por *A. niveus*. O uso de casca de laranja pode ser altamente econômico à escala industrial.

Na Figura 2 encontra-se as linhagens que apresentaram uma maior atividade de PG. Os maiores valores de atividade para endo- e exo-PG foram detectados para as linhagens *A. niger* URM 5439 e *A. niger* URM 5162. *Aspergillus niger* URM 5439 apresentou atividade de endo-PG (3,5 U/mL) superior aos valores obtidos para *A. niger* URM 5162 (3,2 U/mL), entretanto, para a atividade de exo-PG, *A. niger* URM 5162 apresentou atividade (4,5 U/mL) superior à detectada pela linhagem de *A. niger* URM 5439 (3,7 U/mL). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Martins *et al.* (2012), quando avaliaram a produção de PG por *Thermoascus aurantiacus* em FSm utilizando meios sintéticos como Czapeck, Khanna, SR e meio Vogel suplementado com pectina cítrica comercial. A atividade mais elevada de PG foi obtida nos meios SR (2,0 U/mL) e Vogel (1,9 U/mL) na fase logarítmica, que ocorreu após o terceiro ou quarto dia de fermentação. Martins *et al.* (2012) também utilizaram subprodutos agro-industriais como fonte de carbono para a produção de PG. Quando a casca de laranja foi utilizada foram obtidos dois picos de produção: o primeiro pico ocorreu após 72 horas, e o segundo no fim da fermentação com atividades similares de 2,1 U/mL. No entanto, quando casca de maracujá foi utilizada o primeiro pico de produção ocorreu após 72 horas (2,0 U/mL) e o segundo, após 192 horas (3,0 U/mL). Em meio contendo farelo de trigo também houve dois picos de produção, depois de 72 horas (2,0 U/mL) e depois de 168 horas de

fermentação (1,8 U/mL). No entanto, a mais elevada atividade foi obtida depois do quinto dia (3,2 U/mL) quando o resíduo a partir do processamento do suco de laranja foi utilizado, referido como a “água amarela”.

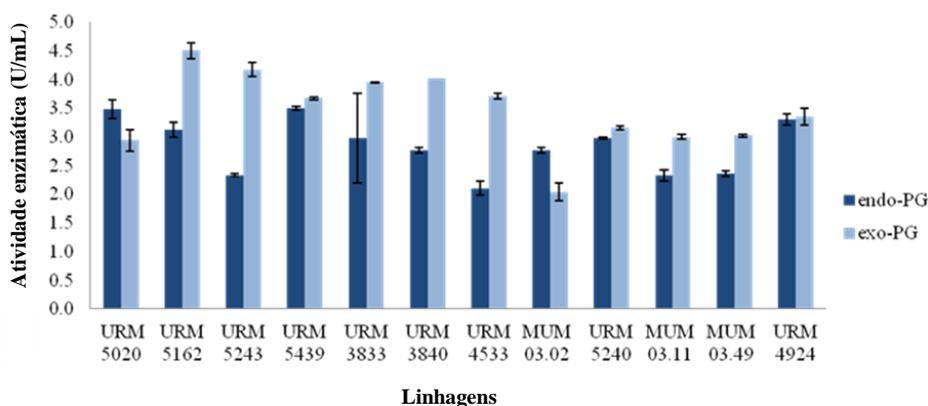


Figura 2. Atividade de endo-poligalacturonase e exo-poligalacturonase das 12 linhagens de *Aspergillus* que apresentaram maiores atividades em 72 horas.

Reator de leito fixo

As atividades das PG são apresentadas na Figura 3 para os diferentes ensaios realizados. As atividades de endo- e exo-PG foram detectadas no tempo inicial, entretanto, este fato poderá ter ocorrido devido ao substrato utilizado no reator, a casca de laranja, ter sido incubado por 7 dias com uma suspensão de esporos do fungo, período no qual deve ter ocorrido a produção das PG. Os valores máximos de atividades para exo- e endo-PG (4,13 U/mL e 1,18 U/mL, respectivamente) foram obtidos no ensaio com células imobilizadas, sem aeração no intervalo de 24 e 72 horas de fermentação, respectivamente (Figura 3a). Deste modo, o ensaio sem aeração é vantajoso uma vez que ocorre a redução nos custos de operação.

A adição de pectina, após 96 horas de fermentação não influenciou significativamente nas atividades das PG (Figura 3c). Cordeiro e Martins (2009) também observaram que o aumento da concentração de pectina cítrica acima de 0,5%, no meio de cultura, não aumentou a atividade de PG. A adição de pectina ao processo fermentativo é considerada um aumento nos custos de produção, o que torna muitas vezes o processo inviável. A atividade de endo-PG foi mantida semelhante para todos os testes, com uma pequena diminuição da atividade após 72 e 96 horas (Figuras 3a e 3c), respectivamente.

Para a exo-PG a maior atividade detectada foi de 4,13 U/mL após 24 horas de fermentação, seguido de um decréscimo ao longo do tempo (Figura 3a). A maior produção da enzima durante as primeiras horas de fermentação permite uma redução dos custos de produção em comparação com a produção mais elevada para o final.

Quando comparados com os resultados obtidos para o ensaio com células livres (Figura 3d), a imobilização celular de *A. niger* URM 5162 proporcionou uma maior atividade para a exo-PG (Figuras 3a, 3b e 3c). Taşkin (2012) quando trabalhou com a produção de PG por *Rhodotorula glutinis* obteve ótima produção da enzima com células imobilizadas em esferas de Ca-alginato (28,6 U/mL). Em contraste, a utilização de células livres levou à menor atividade (26,9 U/mL). O meio de cultura utilizado por este autor continha ácido tânico, pectina cítrica e sais minerais. Gattas *et al.* (2009) relataram a produção de PG com uma linhagem de *Aspergillus* imobilizada em 3% de Ca-alginato. A atividade de PG obtida foi de 5,95 U/mL em meio de cultura contendo 2% de glicose, e na ausência desta fonte de carbono a atividade de PG foi significativamente mais baixa (0,55 U/mL).

O custo mais elevado de produção de PG está relacionado com o suplemento do meio de cultura, por exemplo, com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Gomes *et al.* (2011) obtiveram valores elevados para a produção de PG devido à suplementação do meio de cultura. A atividade máxima de PG (51,82 U/mL) foi obtida pela utilização de pectina, L-asparagina, fosfato de potássio e sulfato de ferro em diferentes concentrações (32 g/L, 2 g/L, 0,06 g/L e de 1,0 g/L, respectivamente) na composição do meio de cultura em FSm com *A. niger*. Além disso, Kumar *et al.* (2011) avaliaram a produção de PG por *A. niger* em FSm utilizando uma mistura de farelo de trigo, farelo de milho e casca de laranja na proporção de 2:1:2, respectivamente, como fontes de carbono. A produção máxima da enzima detectada pelos autores foi de 1,64 U/mL utilizando uma concentração de fontes de carbono de 65 g/mL. Abbasi *et al.* (2011) utilizaram pectina cítrica e farinha de trigo como fontes de carbono e substrato, respectivamente, para a produção de PG por *A. awamori* em FSm. Inicialmente, a fermentação foi realizada em batelada, até o crescimento do fungo e, em seguida, a fermentação foi realizada pelo modo de alimentação contínua com a introdução de meio de cultura fresco. Estes autores obtiveram uma maior produção de PG quando uma concentração de 8 g/mL de sulfato de amônio foi utilizada. Os valores de produção foram 1,5 e 0,014 U/mL de exo- e endo-PG, respectivamente. Além disso, Galiotou-Panayotou e Kapantai (1993) obtiveram 3,0 U/mL de PG ao utilizar *A. niger* em FSm com meio de cultura contendo pectina cítrica como fonte de carbono.

A produção de pectinase tem sido relatada em diferentes tipos de bioreatores (por exemplo, tanque agitado, “airlift” e coluna) (Fontana *et al.*, 2009; Linde *et al.*, 2007). De acordo com Kahar *et al.* (2002) o crescimento micelial, morfologia e formação de produtos estão diretamente relacionados com o tipo de reator utilizado. No presente trabalho, os valores de pH de todas as amostras foram monitorados. Observou-se que o pH do meio de cultura não esteve relacionado com as atividades das PG (Figura 3). Conforme apresentado na Figura 3, ocorreu uma ligeira redução do pH em todos os ensaios. De acordo com Uenojo e Pastore (2007) e Cordeiro e Martins (2009) a redução do pH durante o processo de fermentação pode ser explicado pela liberação de ácido glucurônico no meio, devido à ação de enzimas pectinolíticas. Estas enzimas são produzidas por micro-organismos durante as primeiras horas de fermentação. De acordo com Ming Chu *et al.* (1992), as alterações de pH no meio de cultura podem ser explicadas como um resultado do consumo de substrato. Quando os íons de amônio são utilizados pelos micro-organismos o meio é acidificado. Além disso, quando o nitrogênio orgânico (aminoácidos e péptidos) é assimilado, o meio é alcalinizado. Considerando esta relação entre as PG e a utilização de compostos orgânicos, as alterações nos valores de pH podem ser usadas para explicar algumas variações na produção de PG.

Gomes *et al.* (2011) também não observaram qualquer relação entre a alteração de pH e a produção de PG. Pashova *et al.* (1999a) trabalhando com *A. niger* e utilizando 3% de Ca-alginato para imobilização celular, não observaram diferenças nas curvas de pH entre culturas com células livres e imobilizadas. De acordo com estes autores, as alterações na produção de polimetilgalacturonase (PMG) não pode ser explicada pela variação de pH. Estes autores observaram que a imobilização do fungo não alterou o modelo de síntese PMG. Pashova *et al.* (1999b) observaram que a imobilização celular de *A. niger* em esferas de alginato alterou o espectro das enzimas que degradam pectina. As culturas de células livres produziram quatro enzimas pectinolíticas: PMG, PG, PME e PL, enquanto o micélio retido sintetizou apenas PMG e PG.

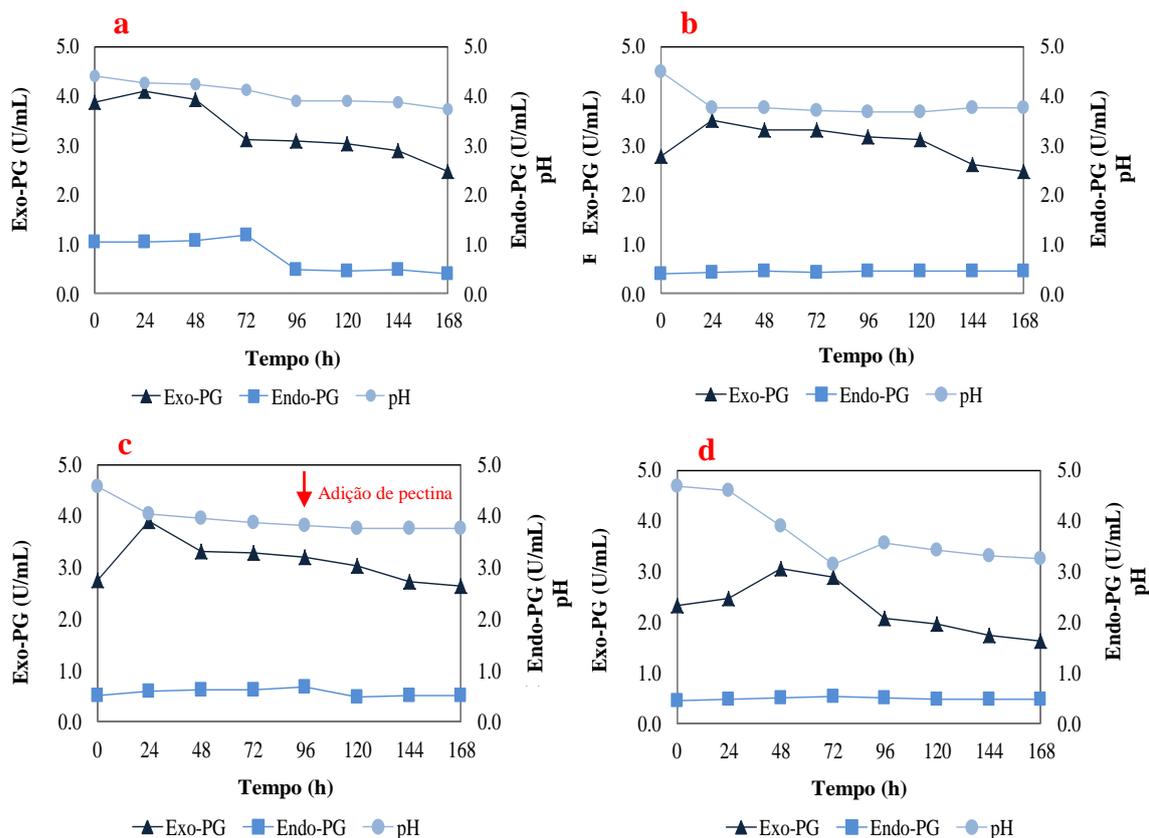


Figura 3. Produção de exo-poligalacturonase (▲) e endo-poligalacturonase (■) por *Aspergillus niger* URM 5162 em reator de leito fixo. (a) célula imobilizada sem aeração; (b) célula imobilizada com aeração; (c) célula imobilizada com aeração e adição de pectina; e (d) célula livre com aeração. Variação de pH durante a produção de poligalacturonases (●).

Observação microscópica do crescimento celular em casca de laranja

O crescimento da linhagem de *A. niger* URM 5162 em casca de laranja é apresentado na Figura 4. Após 4 dias de incubação é possível observar apenas o micélio denso cobrindo toda a superfície do suporte (Figura 4a). Além disto, uma grande quantidade de conidióforos e esporos pode ser observada cobrindo toda superfície do suporte (Figura 4b). O micélio imobilizado foi concentrado na camada superficial do suporte de casca de laranja. Pashova *et al.* (1999a) avaliaram o desenvolvimento de *A. niger* em Ca-alginato, e concluíram que géis de alginato proporcionam um bom ambiente

para o crescimento de células de *A. niger*. Segundo estes autores, o micélio imobilizado ficou concentrado na camada superficial das esferas de alginato e as hifas não puderam ser observadas na parte central do gel. Em contraste, no presente trabalho, o uso de casca de laranja como suporte, apresentou colonização fúngica homogênea (Figura 4a).

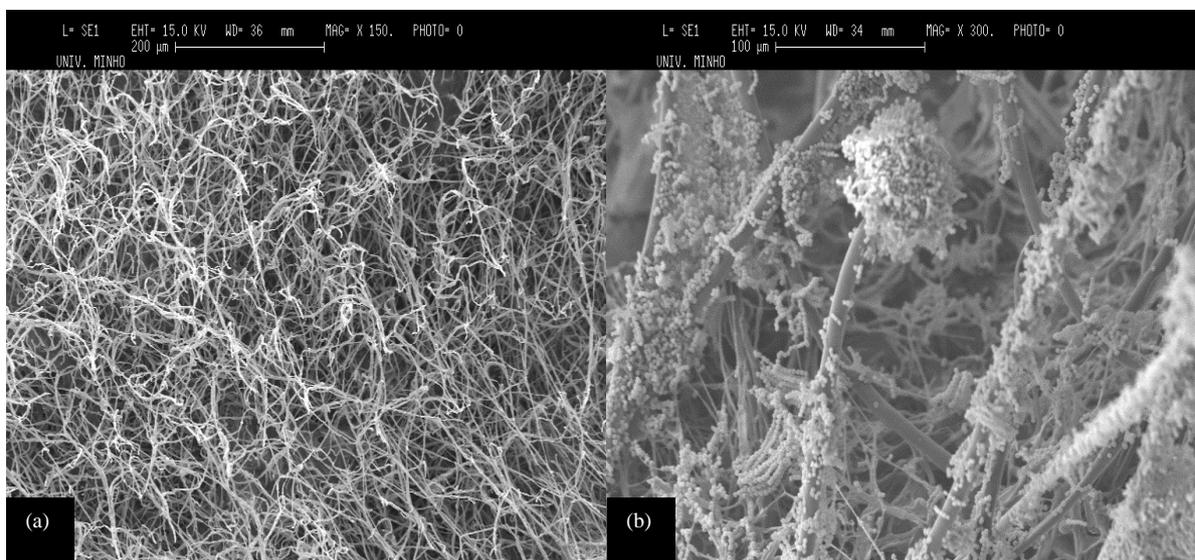


Figura 4. Imagens obtidas por MEV para o suporte casca de laranja (CL) colonizado por *Aspergillus niger* URM 5162: (a) suporte com 4 dias de incubação a 25°C (x 150) e (b) suporte com 7 dias de incubação a 25°C (x 300).

Conclusões

No presente estudo, a avaliação da capacidade de produção de poligalacturonases por linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* foi avaliada utilizando a metodologia de seleção rápida em placa de microtitulação, seguida da produção em reator de leito fixo. O método de seleção rápida em placa de microtitulação é apropriado para seleção de uma grande quantidade de linhagens fúngicas produtoras de PG. A linhagem *A. niger* URM 5162, quando imobilizada em casca de laranja, apresenta maiores atividades para endo- e exo-PG em um reator de leito fixo, operado sem aeração. A produção das PG não é influenciada pelo pH do meio de cultura.

Agradecimentos

M.H.C. Maciel agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e Erasmus Mundus External Cooperation Window Lote 17.

5 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLIGALACTURONASES PRODUZIDAS POR *ASPERGILLUS NIGER* URM 5162 UTILIZANDO PEG/FOSFATO EM UM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS³

Marília de H. C. Maciel^{1,2}, Cristiane A. Ottoni², Polyanna N. Herculano³, Tatiana S. Porto⁴, Ana L. F. Porto³, Cledir Santos¹, Nelson Lima¹, Keila A. Moreira⁴, Cristina Maria de Souza-Motta^{1*}

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

²IBB–Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 4710-057, Gualtar, Braga, Portugal

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural Pernambuco, Recife - PE, 52171-900, Brasil

⁴Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural Pernambuco, Garanhuns - PE, 55292-270, Brasil

*Autor para correspondência: Cristina Souza-Motta. Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420, Brasil. Telefone: (+55) 81 21268948, Fax: (+55) 81 21268480, email: smotta@ufpe.br

³Trabalho a ser submetido para publicação como Marília de H. C. Maciel, Cristiane A. Ottoni, Polyanna N. Herculano, Tatiana S. Porto, Ana L. F. Porto, Cledir Santos, Nelson Lima, Keila A. Moreira, Cristina M. Souza-Motta. Partitioning and purification of polygalacturonases produced by *Aspergillus* section *Nigri* URM 5162 using PEG/phosphate in an aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria*.

Resumo

A separação e purificação das poligalacturonases (PG) produzidas pela linhagem de *Aspergillus niger* URM 5162 em reator de leito fixo foram realizadas pelo sistema de duas fases aquosas (SDFA) formado por polietilenoglicol e sais de fosfato (PEG/fosfato). Foi utilizado um planejamento experimental (2⁴) para avaliar o efeito das variáveis independentes: massa molar do PEG (400-8000 g/mol - M_{PEG}), concentração do PEG (12,5-17,5%, m/m - C_{PEG}), concentração de fosfato (15-25%, m/m - C_{FOS}) e pH (6,0-8,0). O coeficiente de partição, rendimento em atividade e o fator de purificação foram analisados como respostas. A endo-poligalacturonase (endo-PG) teve preferência pela fase superior do sistema, fase rica em PEG. Os melhores resultados para o coeficiente de partição ($K=1,23$), rendimento em atividade ($Y=74,04\%$) e para o fator de purificação ($FP=8,18$) foram obtidos com 12,5% (m/m) de PEG 8000 (g/mol) e C_{FOS} de 25% (m/m) em pH 6,0. A C_{FOS} foi a variável que mais influenciou nas respostas das variáveis. A exo-poligalacturonase (exo-PG) também teve preferência pela fase superior do sistema. A M_{PEG} teve uma influência positiva significativa sobre o K , Y e no FP . Com o PEG 8000 (g/mol), C_{PEG} de 12,5% (m/m), C_{FOS} de 25% (m/m) e pH 6,0 foram obtidos os maiores valores para o K (2,40), para o Y (33,33%) e para o FP (1,98) da exo-PG. A condição de M_{PEG} 8000 (g/mol), C_{PEG} de 12,5% (m/m), C_{FOS} de 25% (m/m) e pH 6,0 foi considerada como a mais adequada para a purificação das PG produzidas por *A. niger* URM 5162. A variável independente que mais influenciou as variáveis respostas foi a M_{PEG} . O sistema PEG/fosfato é uma alternativa de baixo custo para a purificação de PG.

Palavras-chave: Sistema de duas fases aquosas, poligalacturonases, coeficiente de partição, fator de purificação e PEG/fosfato

Introdução

As pectinases são enzimas que atuam sobre substâncias pécticas por reações de hidrólise, transeliminção e esterificação (Kashyap *et al.*, 2001). As pectinases são de grande importância na clarificação e redução da viscosidade em sucos de frutas, melhorando e aumentando a eficiência de filtração. Quando utilizadas no esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhoram a extração do suco, reduzem o tempo de clarificação e aumentam o conteúdo de terpenos no vinho (Uenojo; Pastore, 2007).

Os fungos filamentosos são frequentemente utilizados para fins industriais, pois cerca de 90% das enzimas produzidas são secretadas no meio de cultura (Blandino *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2003). As poligalacturonases (PG) são as enzimas pectinolíticas mais estudadas (Ustok *et al.*, 2007) e são classificadas em endo-poligalacturonase (endo-PG) e exo-poligalacturonase (exo-PG) de acordo com o seu modo de ação na cadeia de ácido poligalacturônico. As PG catalisam a clivagem hidrolítica na cadeia do ácido poligalacturônico pela introdução de água através das pontes de oxigênio. A endo-PG atua de forma aleatória na cadeia do ácido poligalacturônico, liberando ácido oligogalacturônico. No entanto, a exo-PG atua em monômeros terminais do ácido poligalacturônico, liberando ácido monogalacturônico (Jayani *et al.*, 2005; Abassi *et al.*, 2011).

A purificação de enzimas pelo sistema de duas fases aquosas (SDFA) tem demonstrado elevado grau de pureza e pouca perda de atividade durante o processo (Mayerhoff *et al.*, 2004; Gautam; Simon, 2006; Yang *et al.*, 2008; Kammoun *et al.*, 2009; Zhang; Liu, 2010). O SDFA é formado pela incompatibilidade entre as soluções aquosas de dois polímeros, ou de um polímero e um sal de elevada força iônica. Os polímeros mais utilizados são o polietilenoglicol (PEG) e dextrana. Um fenômeno de exclusão pode ser observado entre um polímero e um sal de elevada concentração (por exemplo, PEG/fosfato ou sulfato ou citrato), uma vez que o sal irá captar uma grande quantidade de água presente no sistema (Asenjo; Andrews, 2011).

O SDFA é simples e oferece muitas vantagens, incluindo biocompatibilidade, baixo tempo de processamento, baixo custo de material e de energia, confiabilidade no aumento da escala e requer equipamentos simples e que são fáceis de manusear (Ratanapongleka, 2010; Herculano *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2012). A desnaturação ou perda da atividade biológica geralmente não é observada devido ao elevado teor de água e a baixa tensão interfacial do sistema, que pode atuar protegendo as proteínas (Asenjo; Andrews, 2011). A

partição das biomoléculas é controlada por uma série de parâmetros relativos às propriedades do sistema (por exemplo, o tipo de polímero, sua massa molar, concentração e o tipo, e concentração de sais, valores de pH e força iônica) e o tipo de molécula a ser analisada (por exemplo, carga, peso molecular, hidrofobicidade e características de conformação) (Antov; Pericin, 2001; Rosa *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a aplicação de S DFA tem sido focada para a extração e purificação de proteínas, em particular, na purificação de enzimas (Ratanapongleka, 2010), incluindo, celulasas (Herculano *et al.*, 2012), colagenase (Rosso *et al.*, 2012), α -galactosidase (Naganagouda; Mulimani, 2008), lacase (Silvério *et al.*, 2013), lipase (Ventura *et al.*, 2012), pectinases (Wu *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2003; Antov *et al.*, 2004), fitase (Bhavsar *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2012), proteases (Kirsch *et al.*, 2012) e tanase (Rodríguez-Durán *et al.*, 2013).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a partição e purificação de poligalacturonases (endo- e exo-PG) produzidas pela linhagem de *Aspergillus niger* URM 5162 utilizando o S DFA PEG/fosfato.

Materiais e métodos

Reagentes

Todos os produtos químicos utilizados no presente trabalho foram de grau analítico e obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Imobilização da biomassa em suporte natural

Cascas de laranja foram previamente esterilizadas durante duas horas em uma solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) e, em seguida, lavadas abundantemente com água destilada esterilizada. As cascas de laranja foram incubadas durante 36 horas a 65°C para a secagem e, em seguida, expostas a radiação de luz ultravioleta durante duas horas (Spier *et al.*, 2008). Depois de seca, 100 g de cascas de laranja foram utilizadas como suporte para a imobilização da linhagem de *A. niger* URM 5162. O suporte foi inoculado com um volume de 5 mL da suspensão de esporos contendo cerca 3×10^5 esporos/mL. Após a inoculação, o suporte foi incubado durante 7 dias no escuro a 25°C para o crescimento do fungo. Posteriormente, estas cascas colonizadas foram utilizadas como substrato para os ensaios de fermentação (Maciel *et al.*, 2013).

Fermentação submersa em reator de leito fixo

A produção das PG foi realizada em um reator de leito fixo utilizando células imobilizadas de *A. niger* URM 5162. Um reator contínuo de leito fixo de 300 mL de capacidade foi operado com um volume de 260 mL, à temperatura ambiente e assistido por uma bomba peristáltica. A adição contínua de meio de cultura líquido (MCL: 100 g de casca de laranja por litro de água destilada), previamente esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C, foi realizada com o objetivo de manter as funções metabólicas do fungo por um maior período. O ensaio foi conduzido com aeração e o grau de agitação do meio foi estabelecido de modo a evitar a formação excessiva de espuma (Maciel *et al.*, 2013). O líquido fermentado foi retirado no tempo de 72 horas para posterior análises enzimáticas e utilização no SDFa para separação e purificação das PG.

Preparo do sistema de duas fases aquosas

Para a extração das PG, o sistema foi preparado com PEG de diferentes massas molares (400, 3350 e 8000 g/mol) e sais de fosfato. As soluções fosfato (40%, m/m) foram preparadas pela mistura de quantidades adequadas de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) a diferentes valores de pH (6,0, 7,0 e 8,0) a $25 \pm 1^\circ C$. As quantidades desejadas de PEG e sal foram colocadas em tubos de centrífuga graduados (15 mL). O extrato enzimático bruto contendo as PG, representou 20% do volume total do sistema e foi adicionado aos tubos. A água foi então adicionada a um peso final de 10 g. Após agitação por um minuto em vórtex, os tubos permaneceram em repouso por 60 min para a separação das fases. Após a separação das fases, os volumes de cada fase foram medidos e em seguida separados com pipetas automatizadas. Posteriormente foram realizadas as atividades enzimáticas e dosagem do teor de proteínas, o que permitiu o cálculo do coeficiente de partição, rendimento e fator de purificação das PG.

Técnicas analíticas

A dosagem do teor de proteínas foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), a uma absorvância de 595 nm. O soro de albumina bovino (BSA) foi utilizado como padrão. As determinações foram realizadas em triplicata para cada amostra e a média foi utilizada. As atividades enzimáticas foram expressas em unidades de

atividade por mL (U/mL). A atividade de endo-PG foi medida viscosimetricamente pela mistura de 5,5 mL da solução de 1% (p/v) de pectina cítrica em tampão acetato 0,025 M, pH 5,0 (adicionado de 1 mM de EDTA) e 250 μ L do extrato enzimático bruto. A reação foi incubada por 10 minutos a 50°C e em seguida esfriada em banho de gelo. Uma unidade viscosimétrica (U) foi definida como a quantidade da enzima requerida para diminuir a viscosidade inicial por minuto em 50%, nas condições descritas anteriormente (Tuttobello; Mill, 1961). A atividade de exo-PG foi determinada medindo a liberação de grupos redutores da pectina cítrica utilizando o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). A mistura de reação contendo 0,5 mL da solução de 0,5% (p/v) de pectina cítrica em tampão acetato 0,025 M, pH 5,0 e 0,5 mL do extrato enzimático bruto foi incubada a 50°C por 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade da enzima que libera um mmole de ácido galacturônico por minuto.

Delineamento experimental

Os efeitos da massa molar do PEG (M_{PEG}), concentração do PEG (C_{PEG}), concentração de fosfato (C_{FOS}) e pH sobre as variáveis resposta do sistema (coeficiente de partição (K), rendimento em atividade (Y) e fator de purificação (PF)) foram avaliados com base nos resultados obtidos por um planejamento experimental do tipo 2^4 , mais um ponto central que foi realizado quatro vezes para permitir uma estimativa do erro experimental (Barros-Neto *et al.*, 2002) (Tabela 1). Todas as análises estatísticas e gráficos foram feitos no software Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) (Statsoft, 2008).

Tabela 1. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento experimental do tipo 2^4 selecionados para a extração e purificação das poligalacturonases (PG) utilizando o SDFA PEG/fosfato.

| Variáveis | Níveis | | |
|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | Inferior (-1) | Central (0) | Superior (+1) |
| M_{PEG}^a | 400 | 3350 | 8000 |
| C_{PEG}^b | 12,5 | 15 | 17,5 |
| C_{FOS}^c | 15 | 20 | 25 |
| pH | 6,0 | 7,0 | 8,0 |

^aMassa molar do PEG (g/mol); ^bConcentração do PEG (%); ^cConcentração de fosfato (%).

Determinação do coeficiente de partição, rendimento e fator de purificação

O coeficiente de partição da enzima foi definido como a razão entre a atividade enzimática das enzimas na fase superior (A_s) e na fase inferior (A_i):

$$K = \frac{A_s}{A_i} \quad (1)$$

O fator de purificação foi calculado como a razão entre a atividade específica na fase superior e a atividade específica do extrato enzimático bruto (antes da partição) (A_i):

$$FP = \frac{A_s / C_s}{A_i / C_i} \quad (2)$$

onde C_s e C_i são as concentrações de proteína total, expressa em g/mL, na fase superior e no extrato enzimático bruto, respectivamente.

O rendimento em atividade foi definido como a razão entre a atividade total na fase superior e a do extracto enzimático bruto e foi expressa em porcentagem:

$$Y = \left(\frac{A_s V_s}{A_i V_i} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde V_s e V_i são os volumes da fase superior e do extrato enzimático bruto, respectivamente.

Resultados e discussão

A atividade de endo- e exo-PG de *A. niger* URM 5162 foi de 4,13 U/mL e 1,18 U/mL, respectivamente, quando as cascas de laranja é utilizado como suporte para a imobilização de células durante a fermentação submersa em reator de leito fixo. O extrato enzimático utilizado para purificação das PG foi obtido no tempo de 72 horas de fermentação (Maciel *et al.*, 2013). Poucos estudos envolvendo separação e purificação de PG são descritas na literatura. Neste trabalho utilizou-se o SDFA para separação e purificação das PG e os resultados obtidos a partir do planejamento experimental são apresentados na Tabela 2.

Coeficiente de partição, rendimento em atividade e fator de purificação de endopoligalacturonase (endo-PG) em S DFA

A endo-PG teve preferência pela fase superior do sistema ($K > 1$) (Tabela 2). Corroborando nossos resultados, Lima *et al.* (2002) utilizando o S DFA PEG 10000/fosfato observaram a partição da endo-PG para a fase superior ($K=1,35$). De acordo com Mazzola *et al.* (2008) valores de K maiores que 1 indicam particionamento para a fase superior do sistema. As enzimas do complexo pectinolítico apresentam maior preferência pela fase rica em PEG (fase superior), principalmente quando é utilizado PEG de baixo peso molecular (Lima *et al.*, 2002). No entanto, os resultados obtidos por Antov *et al.* (2004) usando um sistema composto de PEG 4000/sulfato de amônio para o particionamento da endo-PG, observaram que esta enzima possuiu preferência pela fase rica em sal.

Quando a M_{PEG} no sistema possui elevado valor pode ocorrer o que chamamos de “efeito de volume excluído”, que significa uma diminuição do espaço para a enzima na fase PEG e conseqüentemente uma migração da mesma para a fase rica em sal (Porto *et al.*, 2008; 2010). Segundo Rabelo *et al.* (2004) quando se tem uma M_{PEG} elevada ocorre diminuição do K do sistema, no entanto, baixa M_{PEG} proporciona aumento no valor do K e conseqüentemente migração da enzima para a fase rica em PEG. Neste estudo, o “efeito de volume excluído” não influenciou no particionamento da endo-PG, pois ao utilizar PEG 8000 (g/mol) ocorreu o particionamento da enzima para a fase superior do sistema. Outros autores também não observaram o “efeito de volume excluído” (Kirsch *et al.*, 2012; Herculano *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2012). No entanto, este efeito foi observado por Rosso *et al.* (2012) onde ocorreu um aumento da concentração de colagenase na fase inferior de quase todos os ensaios realizados.

Outro efeito, denominado de “*salting out*”, também pode ser observado quando a concentração de sal na fase inferior do sistema é elevada e ocorre a migração da enzima para a fase do sistema rica em PEG (Babu *et al.*, 2008; Porto *et al.*, 2008). Este efeito não foi observado no presente estudo, pois quando utilizou-se elevada C_{FOS} , a endo-PG permaneceu na fase inferior do sistema.

Na Tabela 2 são apresentadas as variações dos valores para o K (0,73-1,23), Y (52,66-143,83%) e FP (0,87-8,18) da endo-PG produzida pela linhagem de *A. niger* URM 5162. De acordo com estas variações, é necessário otimizar a separação e purificação utilizando o S DFA. A melhor condição obtida para a purificação da endo-PG foi com

12,5% (m/m) de PEG 8000 (g/mol) e 25% (m/m) de fosfato e pH 6,0. Esta condição resultou em um K de aproximadamente 1,23, Y de 74,04% e um FP de 8,18 vezes.

As variáveis independentes do sistema estudadas neste trabalho apresentaram efeito significativo sobre o coeficiente de partição (Tabela 3). As variáveis M_{PEG} , C_{PEG} e C_{FOS} apresentaram um efeito positivo significativo, em contrapartida, o pH apresentou um efeito negativo para o K . O efeito positivo da M_{PEG} , C_{PEG} e C_{FOS} no K significa que altos níveis dessas variáveis promovem o particionamento da endo-PG para a fase PEG do sistema.

As variáveis independentes, M_{PEG} , C_{FOS} e pH e suas interações, apresentaram efeito significativo para o FP. A interação positiva significativa entre $M_{\text{PEG}} \times C_{\text{FOS}}$ mostrou que níveis mais altos dessas variáveis aumentam os valores do FP para a endo-PG (Tabela 3). Os maiores valores para o FP (8,18) e para K foram obtidos na condição de M_{PEG} 8000 (g/mol), C_{PEG} de 12,5% (m/m), C_{FOS} de 25% (m/m) e pH 6,0 (Figura 1).

As variáveis C_{PEG} e C_{FOS} apresentaram uma correlação significativa no Y da endo-PG, onde altos níveis da C_{PEG} e níveis mais baixos da C_{FOS} proporcionam um maior Y . Como podemos observar na Tabela 2, o maior valor para o Y (143,83%) foi obtido com M_{PEG} 400 (g/mol), C_{PEG} de 17,5% (m/m), C_{FOS} de 15% (m/m) e pH 8,0. A interação entre a $M_{\text{PEG}} \times C_{\text{PEG}} \times C_{\text{FOS}}$ foi positiva, significando que quanto mais elevado os valores dessas variáveis maior será o Y da endo-PG.

Lima *et al.* (2002) utilizaram o SDFA PEG/fosfato de potássio para purificação das enzimas pectinolíticas. Os autores obtiveram um maior valor para o FP (16,28) e um menor valor relacionado ao Y (53,5%) da endo-PG quando comparados com os resultados obtidos neste trabalho. Rosso *et al.* (2012) trabalharam com a purificação de colagenase produzida por *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 utilizando o SDFA PEG/fosfato e obtiveram valores elevados para o FP (23,5) e Y (242%). Estes resultados foram obtidos utilizando-se 20% (m/m) de PEG 550 e 17,5% (m/m) de fosfato a pH 6,0.

Tabela 2. Condições e resultados do planejamento experimental (2⁴) para a extração das poligalacturonases utilizando PEG/ fosfato em SDFA.

| | M_{PEG}^a | C_{PEG}^b | C_{FOS}^c | pH | Endo-PG | | | Exo-PG | | |
|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|----|---------|--------|--------|--------|-------|--------|
| | | | | | K^d | Y^e | FP^f | K^d | Y^e | FP^f |
| 1 | 400 | 12,5 | 15 | 6 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2 | 8000 | 12,5 | 15 | 6 | 0,94 | 76,60 | 3,87 | 1,69 | 17,49 | 0,88 |
| 3 | 400 | 17,5 | 15 | 6 | 1,00 | 138,30 | 4,70 | 1,15 | 15,90 | 0,54 |
| 4 | 8000 | 17,5 | 15 | 6 | 0,96 | 111,17 | 3,45 | 2,10 | 33,33 | 1,03 |
| 5 | 400 | 12,5 | 25 | 6 | 1,06 | 76,06 | 4,43 | 1,92 | 16,57 | 0,96 |
| 6 | 8000 | 12,5 | 25 | 6 | 1,23 | 74,04 | 8,18 | 2,40 | 17,97 | 1,98 |
| 7 | 400 | 17,5 | 25 | 6 | 1,06 | 95,85 | 2,49 | 1,64 | 26,03 | 0,68 |
| 8 | 8000 | 17,5 | 25 | 6 | 1,04 | 77,45 | 2,93 | 2,09 | 25,20 | 0,95 |
| 9 | 400 | 12,5 | 15 | 8 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 10 | 8000 | 12,5 | 15 | 8 | 1,00 | 86,17 | 1,05 | 2,06 | 22,11 | 0,27 |
| 11 | 400 | 17,5 | 15 | 8 | 0,91 | 143,83 | 3,26 | 1,62 | 31,50 | 0,71 |
| 12 | 8000 | 17,5 | 15 | 8 | 0,96 | 102,13 | 0,87 | 2,35 | 26,63 | 0,23 |
| 13 | 400 | 12,5 | 25 | 8 | 0,87 | 60,00 | 3,31 | 2,12 | 13,78 | 0,76 |
| 14 | 8000 | 12,5 | 25 | 8 | 0,83 | 52,66 | 1,95 | 2,00 | 21,50 | 0,80 |
| 15 | 400 | 17,5 | 25 | 8 | 0,87 | 83,40 | 1,15 | 0,64 | 12,53 | 0,17 |
| 16 | 8000 | 17,5 | 25 | 8 | 0,73 | 56,70 | 7,71 | 0,39 | 9,66 | 1,31 |
| 17 ^g | 3350 | 15,0 | 20 | 7 | 0,89 | 78,19 | 2,76 | 0,46 | 11,83 | 0,42 |
| 18 ^g | 3350 | 15,0 | 20 | 7 | 0,90 | 75,00 | 2,65 | 0,47 | 9,77 | 0,35 |
| 19 ^g | 3350 | 15,0 | 20 | 7 | 0,83 | 83,40 | 2,76 | 0,53 | 11,98 | 0,40 |
| 20 g | 3350 | 15,0 | 20 | 7 | 0,83 | 70,21 | 2,07 | 0,63 | 12,43 | 0,37 |

Endo-PG, endo-poligalacturonase; Exo-PG, exo-poligalacturonase. ^a Massa molar do PEG (g/mol). ^b Concentração do PEG (%). ^c Concentração de fosfato (%). ^d Coeficiente de partição. ^e Rendimento em atividade (%). ^f Fator de purificação na fase PEG. ^g Pontos centrais.

Tabela 3. Efeitos calculados a partir das respostas dos resultados obtidos do planejamento experimental (2^4) para extração das poligalacturonases utilizando PEG/fosfato em SDFA.

| | Endo-PG | | | Exo-PG | | |
|----------------------|----------|----------|--------|----------|----------|---------|
| | <i>K</i> | <i>Y</i> | FP | <i>K</i> | <i>Y</i> | FP |
| (1) M_{PEG} | 12,35* | 1,78 | 8,00* | 18,92* | 12,18* | 28,13* |
| (2) C_{PEG} | 10,29* | 17,29* | 2,83 | -0,67 | 15,10* | -0,22 |
| (3) C_{POS} | 12,32* | -3,70* | 11,23* | 7,01* | -0,79 | 30,69* |
| (4) pH | -7,13* | -2,91 | -8,06* | -5,74* | -3,13 | -21,58* |
| 1 x 2 | -14,28* | -12,06* | -2,96 | -7,05* | -8,43 | -6,07* |
| 1 x 3 | -12,66* | -6,69* | 6,08* | -15,40* | -9,89* | 10,19* |
| 1 x 4 | -1,24 | -0,84 | -2,21 | -3,56* | -2,83 | -13,29* |
| 2 x 3 | -13,98* | -12,72* | -8,22* | -22,60* | -13,58* | -21,36* |
| 2 x 4 | -0,36 | -0,40 | 7,19* | -6,80* | -5,40* | 9,52* |
| 3 x 4 | -6,70* | -3,46* | 2,19 | -12,66* | -8,85* | -2,25 |
| 1 x 2 x 3 | 10,41* | 8,83* | 9,88* | 6,00* | 3,01 | 11,69* |
| 1 x 2 x 4 | 0,73 | -1,22 | 9,68* | -2,17 | -7,47* | 11,48* |
| 1 x 3 x 4 | -3,06 | -0,39 | 3,72* | -4,57* | 4,65* | 11,41* |
| 2 x 3 x 4 | 1,58 | 0,78 | 8,99* | -8,94* | -7,21* | 9,81* |

* Valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$).

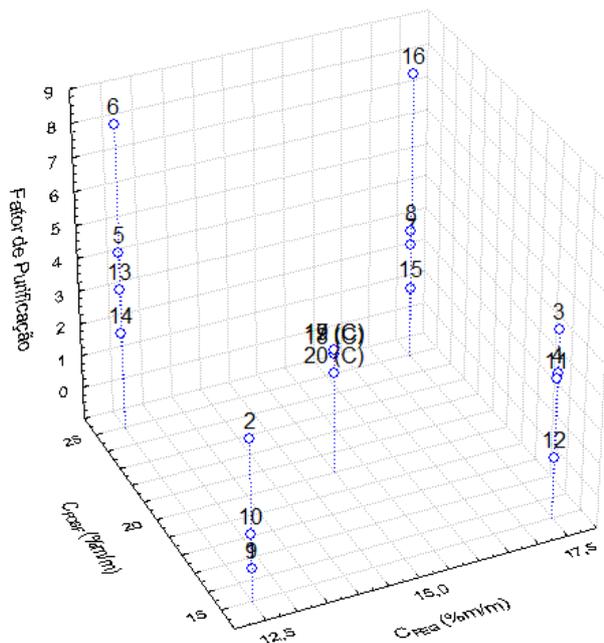


Figura 1. Efeitos das variáveis concentração do PEG (C_{PEG} , % m/m) e concentração de fosfato (C_{FOS} %, m/m) sobre o fator de purificação da endo-poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* URM 5162 pelo S DFA.

A C_{FOS} foi a variável independente que mais influenciou as variáveis resposta (K , Y e FP). A interação positiva significativa entre $M_{PEG} \times C_{PEG} \times C_{FOS}$ também influenciou na resposta das variáveis. Cavalcanti *et al.* (2008) trabalhando com a purificação da α -toxina de *Clostridium perfringens* tipo A, utilizando um S DFA formado por PEG/fosfato, observaram que além C_{FOS} , a C_{PEG} também influenciou fortemente as respostas das variáveis. Kirsch *et al.* (2012) também observaram que a C_{PEG} e a C_{FOS} influenciaram nas variáveis resposta para purificação de proteases.

De acordo Voet *et al.* (2000) as cadeias laterais dos aminoácidos podem ser afetadas por variações no pH, havendo mudança na distribuição de carga e de ligações de hidrogênio. Assim, o pH é considerado com uma variável que interfere diretamente no K . Neste estudo, os resultados indicaram que a variação do pH teve um efeito significativo sobre o K e o FP da endo-PG. O particionamento da endo-PG para a fase superior do sistema pode ter sido influenciado pelo pH, pois esta enzima possui ponto isoelétrico na zona ácida (Pařenicová *et al.*, 2000) e uma superfície carregada negativamente nos valores de pH utilizados neste estudo (6,0, 7,0 e 8,0). Estas características fazem com que a endo-

PG particione para a fase superior do sistema, que possui carga positiva, por meio de interações eletrostáticas entre a enzima e as moléculas de PEG. As proteínas carregadas negativamente possuem uma preferência pela fase superior e as proteínas de carga positiva para a fase inferior do SDFA (Cavalcanti *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2009).

Coefficiente de partição, rendimento em atividade e fator de purificação de exopoligalacturonase (exo-PG) em SDFA

A exo-PG também foi particionada para a fase do sistema rica em PEG. Lima *et al.* (2002) também observaram a partição da exo-PG para a fase PEG ao utilizar um o SDFA PEG 400/fosfato com NaCl ($K=5,35$). No entanto, Antov *et al.* (2004) usando o SDFA PEG 4000/sulfato de amônio observaram a partição da exo-PG para a fase do sistema rica em sal. A M_{PEG} e a C_{FOS} mostraram uma correlação positiva significativa com o valor do K , entretanto, o pH apresentou uma correlação negativa (Tabela 3). Estes resultados são apresentados na Tabela 2 (ensaio 6), onde a melhor condição para o particionamento da exo-PG, para a fase rica em PEG, foi obtida com M_{PEG} 8000 (g/mol), C_{PEG} de 12,5% (m/m), C_{FOS} 25% (m/m) e pH 6,0 ($K=2,40$). Na Tabela 2, podemos observar que os experimentos mostraram variações no K (0,39-2,40), Y (9,66-33,33%) e no FP (0,23-1,98) da exo-PG produzida por *A. niger* URM 5162. Assim, é necessário otimizar o particionamento e o processo de purificação.

As variáveis independentes M_{PEG} e C_{PEG} foram significativamente positivas na análise estatística para o rendimento em atividade da exo-PG, onde quanto maior os valores destas variáveis, maior será o Y . A interação negativa significativa entre as variáveis C_{FOS} e pH significam que valores menores dessas variáveis proporcionam maior rendimento em atividade da exo-PG. As melhores condições para o rendimento da atividade da exo-PG (33,33%) foi obtida com a M_{PEG} de 8000 (g/mol), C_{PEG} de 17,5% (m/m), C_{FOS} de 15% (m/m) e pH 6,0 (Tabela 2, ensaio 4).

Com relação ao FP, as variáveis independentes C_{FOS} e M_{PEG} foram significativamente positivas e o pH foi significativo e negativo. Estes resultados estão apresentados na Tabela 2 (ensaio 6), onde a M_{PEG} de 8000 (g/mol), C_{PEG} de 12,5% (m/m), C_{FOS} de 25% (m/m) e pH 6,0 foi a melhor condição para o FP (1,98) (Figura 2).

Lima *et al.* (2002) utilizaram um SDFA formado por PEG/fosfato de potássio para tentar purificar a exo-PG e obtiveram valores de 5,49 para o FP no sistema contendo PEG

6000 e Y de 89,5% no sistema PEG 400/fosfato de potássio contendo com NaCl. Esses valores foram superiores aos obtidos no presente estudo ($Y=33,33\%$ e $PF=1,98$). Kirsch *et al.* (2012) também utilizaram um SDFA formado por PEG/fosfato e observaram a partição das proteases produzidas por *Lentinus citrinus* DPUA 1535 para a fase superior do sistema. Esses autores obtiveram a melhor condição para a extração de proteases com M_{PEG} 6000 (g/mol), C_{PEG} de 17,5% (m/m) e C_{FOS} de 25% (m/m). Os valores obtidos para o FP e Y foram de 1,1 e 151%, respectivamente. O maior valor obtido por Cavalcanti *et al.* (2008) para o FP (5,7) foi com C_{PEG} e C_{FOS} de 17,5% e 15%, respectivamente, para a purificação de toxinas α de *C. perfringens* tipo A.

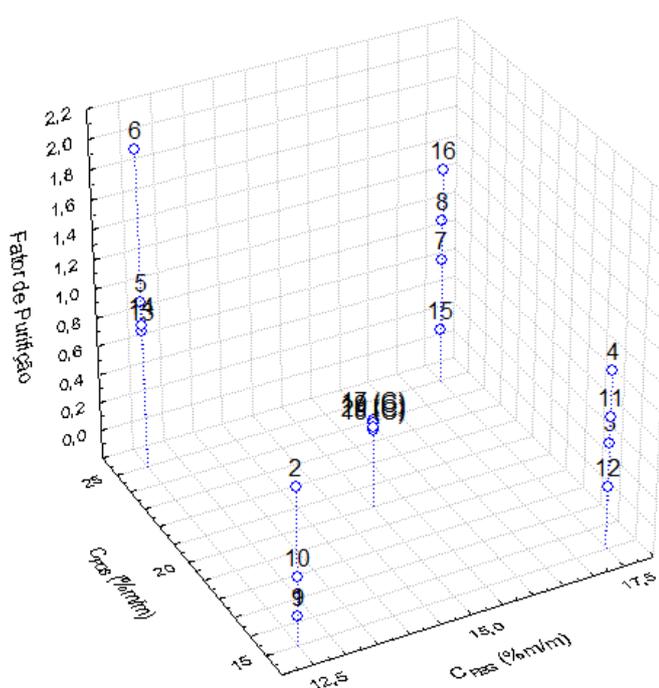


Figura 2. Efeitos das variáveis concentração do PEG (C_{PEG} , % m/m) e concentração de fosfato (C_{FOS} %, m/m) sobre o fator de purificação da exo-poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* URM 5162 pelo SDFA.

A melhor condição obtida foi de 12,5% (m/m) de PEG 8000 (g/mol) e 25% (v/v) de fosfato pH 6,0. Estas condições resultaram em um K de aproximadamente de 2,40, Y de 17,97% e um FP de 1,98 vezes. Esta condição foi considerada a mais adequada para a purificação da endo- e exo-PG produzidas por *A. niger* URM 5162.

A variável independente que mais influenciou o K , Y e o FP foi a M_{PEG} . Este resultado também foi obtido por Herculano *et al.* (2012) trabalhando com celulases. O K da endo- e exo-PG foram significativamente influenciados pela M_{PEG} (Lima *et al.*, 2002). A interação negativa significativa entre $C_{\text{PEG}} \times C_{\text{FOS}}$ também influenciou a resposta das variáveis.

Os resultados indicaram que a variação do pH teve um efeito significativo sobre o K e o FP da exo-PG dentro do intervalo de pH estudado (6,0-8,0). O pH, tal como discutido acima, pode ter influenciado a partição da exo-PG para a fase superior do sistema devido ao ponto isoelétrico na região ácida (Kester *et al.*, 1990).

O “efeito de volume excluído” não influenciou o particionamento da exo-PG, uma vez que ao utilizar uma M_{PEG} de 8000 (g/mol) a enzima foi particionada para a fase superior do sistema. O efeito “*salting out*” também não foi observado, onde em C_{FOS} elevadas a exo-PG foi particionada para a fase inferior do sistema (Tabela 2).

Conclusões

As PG produzidas por *A. niger* URM 5162, preferencialmente, são particionadas para a fase PEG quando utilizando um sistema PEG/fosfato. A condição de M_{PEG} 8000 (g/mol), C_{PEG} de 12,5% (m/m), C_{FOS} de 25% (m/m) e pH 6,0 é considerada como a mais adequada para a purificação das PG produzidas por esta linhagem. A C_{FOS} e M_{PEG} são as variáveis que mais influenciam os valores de K , Y e PF da endo- e exo-PG. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o SDFA é uma alternativa promissora e que agrega baixo custo na purificação dessas enzimas.

Agradecimentos

M.H.C. Maciel agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil), Erasmus Mundus External Cooperation Window Lote 17.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A taxonomia da seção *Nigri* é considerada complexa devido às diferenças sutis entre as espécies. Dessa forma, a abordagem polifásica, baseada em caracteres morfológicos, bioquímicos e espectral por MALDI-TOF MS, oferece diferentes tipos de informações o que permite uma identificação mais precisa das espécies desta seção. O MALDI-TOF MS é uma ferramenta importante para a caracterização das linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* e é considerada rápida, sensível e de baixo custo. Os resultados obtidos pela técnica do MALDI-TOF MS corroboram os dados da taxonomia clássica e análises bioquímicas. No entanto, poucos trabalhos são encontrados na literatura utilizando esta ferramenta na identificação de espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*.

A caracterização bioquímica das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* quanto à detecção da produção de micotoxinas ajuda a solucionar alguns problemas na identificação. Algumas linhagens de *A. niger*, cerca de 20% e 14%, são produtoras de OTA e FB₂, respectivamente. Uma vez que *A. niger* é considerado produtor de micotoxinas, apesar de ser considerado como GRAS, é imprescindível uma análise prévia quanto ao perfil micotoxigênico das linhagens utilizadas em determinados setores industriais, bem como a identificação correta em nível de espécie. Linhagens de *A. niger* são frequentemente utilizadas na produção comercial de enzimas, por exemplo, as pectinases que são utilizadas no processamento de sucos de frutas, na recuperação de óleos essenciais, na extração de óleos vegetais, na fabricação de ração para animais, na indústria de vinhos, têxtil e de papel e celulose.

Assim como a caracterização quanto à produção de micotoxinas, também é importante avaliar a capacidade de produzir enzimas por essas linhagens. O método de seleção rápida em placa de microtitulação é apropriado para caracterização de uma grande quantidade de linhagens fúngicas quanto à produção de poligalacturonases. A linhagem *A. niger* URM 5162, quando imobilizada em casca de laranja, apresenta maiores atividades para endo- e exo-PG em um reator de leito fixo, operado sem aeração e é considerado um processo promissor para produção destas enzimas. O pH do meio de cultura e a adição de pectina no tempo de 96 horas de fermentação não influenciam na produção destas enzimas.

Durante o processo fermentativo, diferentes tipos de enzimas são produzidas o que impede a utilização direta do extrato bruto da fermentação em aplicações industriais. Sendo assim, métodos estão sendo desenvolvidos para a separação e purificação de proteínas, bem como, organelas celulares e outros produtos biológicos. O SDFIA é

considerado um dos mais econômicos processos de recuperação e purificação, e possui vantagens como: biocompatibilidade, baixo consumo de energia e processamento rápido. Ao utilizar um sistema PEG/fosfato, as poligalacturonases produzidas por *A. niger* URM 5162 são referencialmente particionadas para a fase PEG do sistema e a condição mais adequada para a purificação é obtida com a massa molar do PEG 8000 (g/mol), concentração de PEG de 12,5% (m/m), concentração de fosfato de 25% (m/m) e pH 6,0. As variáveis que mais influenciaram o coeficiente de partição, o rendimento em atividades e o fator de purificação da endo- e exo-PG são a concentração do fosfato e a massa molar do PEG, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o SDFA composto de PEG/fosfato é uma alternativa promissora e de baixo custo para purificação das poligalacturonases.

7 REFERÊNCIAS

- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 2001. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection* 64: 903-906.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J., Cabañes, F.J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 33-49.
- Abbasi, H., Shafighzadeh, H., Rahimi, A. 2011. Continuous production of polygalacturonases (PGases) by *Aspergillus awamori* using wheat flour in surface culture fermentation. *Iranian Journal of Biotechnology* 9: 50-55.
- Abrunhosa, L.J. 2008. *Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos*. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal.
- Abrunhosa, L., Calado, T., Resende, T., Venâncio, A. 2011. A fluorescence-lc method with NDA pre-column derivatization for fumonisin B₂ determination in black aspergilli cultures. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 34: 1594-1603.
- Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Venâncio, A. 2010. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins* 2: 1078-1099.
- Accensi, F., Cano, J., Figuera, L., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 1999. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters* 180: 191-196.
- Aguirre, C., Concha, I., Vergara, J., Riveros, R., Illanes, A. 2010. Partition and substrate concentration effect in the enzymatic synthesis of cephalixin in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry* 45: 1163-1167.
- Alanio, A., Beretti, J.L., Dauphin, B., Mellado, E., Quesne, G., Lacroix, C., Amara, A., Berche, P., Nassif, X., Bougnoux, M.E. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clinical Microbiology and Infection* 17: 750-755.
- Albertsson, P.A. 1986. *Partition of cell and macromolecules*. John Wiley, New York.
- Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claisse, A., Duchiron, F. 2011. Yeasts: An attractive source of pectinases-From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry* 46:1525-1537.
- Al-Anati, L., Petzinger, E. 2006. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 29: 79-90.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J., Serra, J.L. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry* 33: 21-28.

- Almela, L., Robe, V., Sanchez, B., Torella, F., Perez-Lopez, J., Gabaldon, J.A. 2007. Ochratoxin A in red paprika: relationship with the origin of the raw material. *Food Microbiology* 24: 319-327.
- Al-Musallam, A. 1980. *Revision of the black Aspergillus species*. Thesis. University of Utrecht, The Netherlands.
- Andrews, B.A., Asenjo, J.A. 2010. Theoretical and experimental evaluation of hydrophobicity of proteins to predict their partitioning behavior in aqueous two phase systems: A review. *Separation Science and Technology* 45: 2165-2170.
- Ano, T., Jin, G.Y., Mizumoto, S., Rahman, M.S., Okuno, K., Shoda, M. 2009. Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. *Journal of Environmental Sciences Supplement* 21: 162-165.
- Asenjo, J.A. (1990) *Separation Processes in Biotechnology*. Marcell Dekker Inc., New York.
- Asenjo, J.A., Andrews, B.A. 2011. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. *Journal of Chromatography A* 1218: 8826-8835.
- Antov, M.G., Pericin, D.M. 2001. Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 467-472.
- Antov, M.G., Pericin, D.M., Pejin, S.N. 2004. Pectinases partitioning in aqueous two-phase systems: an integration of the systems poly (ethylene glycol)/crude dextran and poly(ethylene glycol)/ammonium sulphate. *Journal of the Serbian Chemical Society* 69: 299-307.
- Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 274, *Diário Oficial da União*, 16/10/2002.
- Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, *Diário Oficial da União*, 18/02/2011.
- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 719-739.
- Azevedo, A.M., Gomes, A.G., Rosa, P.A.J., Ferreira, I.F., Pisco, A.M.M.O., Aires-Barros, M.R. 2009. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology* 65: 14-21.
- Babu, B.R., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S. 2008. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing* 47: 83-89.
- Baker, S.E. 2006. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Medical Mycology* 44: 17-21.

Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T. 2008. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5402-5407.

Barros-Neto, B.B., Scarminio, I.C., Bruns, R.E. 2002. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2nd ed., Editora da Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Bartók, T., Szécsi, Á., Szekeres, A., Mesterházy, Á., Bartók, M. 2006. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 2447-2462.

Bartók, T., Szekeres, A., Szécsi, Á., Bartók, M., Mesterházy, Á. 2008. A new type of fumonisin series appeared on the scene of food and feed safety. *Cereal Research Communications* 36: 315-319.

Bartók, T., Tolgyesi, L., Szekeres, A., Varga, M., Bartha, R., Szécsi, Á., Bartók, M., Mesterházy, Á. 2010. Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B₁ (FB₁) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24: 35-42.

Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, A.T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z. 2003. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection* 66: 633-636.

Battilani, P., Magan, N., Logrieco, A. 2006. European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology* 111: 2-4.

Bazin, I., Andreotti, N., Hassine, A.I.H., Waard, M.D., Sabatier, J.M., Gonzalez, C. 2012. Peptide binding to ochratoxin A mycotoxin: A new approach in conception of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 40: 240-246.

Bayman, P., Baker, J.L. 2006. Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia* 162: 215-223.

Benavides, J., Aguilar, O., Lapizco-Encinas, B.H., Rito-Palomares, M. 2008. Extraction and purification of bioproducts and nanoparticles using aqueous two-phase systems strategies. *Chemical Engineering & Technology* 31: 838-845.

Bennett, J.W. 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. In: Machida, M., Gomi, K. *Aspergillus molecular biology and genomics*. Japão, pp.1-17.

Bennett, J.W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516.

Berek, L., Petri, I.B., Mesterhazy, A., Teren, J., Molnar, J. 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicology In Vitro* 15: 25-30.

Bernardo, K., Pakulat, N., Macht, M., Krut, O., Seifert, H., Fler, S., Hüngrer, F., Krönke, M. 2002. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics* 2: 747-753.

Betina, V. 1984. *Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Betina, V. 1989. Ochratoxin and related dihydroisocoumarins. In: Betina, V. (ed) *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, pp.161-163.

Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Svedese, V.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M.J.S., Paiva, L.M., Souza-Motta, C.M. 2012. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1989-1995.

Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G., Vleggaar, R. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications* 19: 743-745.

Bhardwaj, V., Garg, N. 2010. Exploitation of microorganism for isolation and screening of pectinase from environment. In: *Globelics 2010 8th International Conference*. University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia, 16pp.

Bhat, M.K. 2000. Cellulases related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355-383.

Bhavsar, K., Kumar, V.R., Khire, J.M. 2012. Downstream processing of extracellular phytase from *Aspergillus niger*: Chromatography process vs. aqueous two phase extraction for its simultaneous partitioning and purification. *Process Biochemistry* 47: 1066-1072.

Bille, E., Dauphin, B., Leto, J., Bougnoux, M.E., Beretti, J.L., Lotz, A., Suarez, S., Meyer, J., Join-Lambert, O., Descamps, P., Grall, N., Mory, F., Dubreuil, L., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A. 2012. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection* 18: 1117-1125.

Blandino, A., Dravillas, K., Cantero, D., Pandiella, S.S., Webb, C. 2001. Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochemistry* 37: 497-503.

Blumenthal, C.Z. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: Justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39: 214-228.

Bonner, P.L.R., Lill, J.R., Hill, S., Creaser, C.S., Ress, R.C. 2002. Electrospray mass spectrometry for the identification of MHC class I-associated peptides expressed on cancer cells. *Journal of Immunological Methods* 262: 5-19.

Bonnin, E., Le Goff, A., Körner, R., Van Alebeek, G.J.W.M., Christensen, T.M.I.E., Voragen, A.G.J., Roepstorff, P., Caprari, C., Thibault, J.F. 2001. Study of the mode of action of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1526: 301-309.

Boudra, H., Morgavi, D.P. 2006. Development and validation of a HPLC method for the quantitation of ochratoxins in plasma and raw milk. *Journal of Chromatography B* 843: 295-301.

Boundy-Mills, K. 2012. Yeast culture collections of the world: meeting the needs of industrial researchers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39: 673-680.

Bradford, M.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.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabanes, F.J. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology* 71: 139-144.

Braz, S.C.M., Souza-Motta, C.M., Massa, D.M.L., Neves, R.P., Magalhães, O.M.C. 2009. Viability, taxonomic confirmation and enzymatic detection of *Acremonium* species preserved under mineral oil in the URM Culture Collection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 63-66.

Brera, C., Debegnach, F., De Santis, B., Pannunzi, E., Berdini, C., Prantera, E., Gregori, E., Miraglia, M. 2011. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods and paprika by HPLC with fluorescence detection: A single-laboratory validation study. *Talanta* 83: 1442-1446.

Cabañes, F.J., Bragulat, M.R., Castellá, G. 2010. Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins* 2: 1111-1120.

Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J., Ferroni, A., Gutmann, L., Nassif, X. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 44: 104-109.

Cardwell, K.F. 2001. Mycotoxin contamination of foods in Africa: Antinutritional factors. *Food Nutrition Bulletin* 21: 488-492.

Casteel, S.W., Turk, J.R., Rottinghaus, G.E. 1994. Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. *Fundamental and Applied Toxicology* 23: 518-524.

Castellani, A. 1967. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70: 181-184.

- Cavalcanti, M.T.H., Carneiro-da-Cunha, M.G., Brandi, I.V., Porto, T.S., Converti, A., Lima Filho, J.L., Porto, A.L.F., Pessoa, A. 2008. Continuous extraction of α -toxin from a fermented broth of *Clostridium perfringens* Type A in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase PEG–phosphate system. *Chemical Engineering and Processing* 47: 1771–1776.
- Cavalcanti, M.T.H., Porto, T.S., Barros Neto, B., Lima Filho, J.L., Porto, A.L.F., Pessoa Jr., A. 2006. Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. *Journal of Chromatography B* 833: 135-140.
- Chen, H.Y., Chen, Y.C. 2005. Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 3564-3568.
- Chu, F.S. 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. *Mutation Research* 259: 291-306.
- Chulze, S.N., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M. 2006. Occurrence of ochratoxin a in wine and ochratoxigenic mycoflora in grape and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology* 111: 5-9.
- Coker, R.D., Nagler, M.J., Bluden, G., Shrakey, A.J., Defize, P.R., Derksen, G.B., Whitaker, T.B. 1995. Design of sampling plans for mycotoxins in foods and feeds. *Natural Toxins* 3: 322-326.
- Cole, R.J., Jarvis, B.B. Schweikert, M.A. 2003. *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*, vol. III. Academic Press, New York.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. 2009. Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzyme. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29: 135-141.
- Couto, S.R., Sanroman, M.A. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry, A Review. *Journal of Food Engineering* 76: 291-302.
- Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S.M., Palacio, G., Rosa, C.A.R. 2002. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 19: 1065-1072.
- Dartora, A.B., Bertolin, T.E., Bilibio, D., Silveira, M.M., Costa, J.A.V. 2002. Evaluation of fungi and inducers for the production of endopolygalacturonase by solid state fermentation. *Naturforsch* 57: 666-670.
- Da Silva, E.G., Borges, M.F., Medina, C., Piccoli, R.H., Schwan, R.F. 2005. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research* 5: 859-865.
- Da Silva, L.H.M., Loh, W. 2006. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova* 29: 1345-1351.

Dawson, R.J. 1991. A global view of the mycotoxin problem. In: *International conference of the fungi and mycotoxins in stored products*, 1991. Bangkok. Australian Centre for International Agricultural Research, pp. 22-28.

De Carolis, E., Posteraro, B., Lass-Flörl, C., Vella, A., Florio, A.R., Torelli, R., Girmenia, C., Colozza, C., Tortorano, A.M., Sanguinetti, M., Fadda, G. 2012. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection* 18: 475-484.

De Gregorio, A., Mandalani, G., Arena, N., Nucita, F., Tripodo, M.M., Lo Curto, R.B. 2002. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology* 83: 89-94.

De Respini, S., Vogel, G., Benagli, C., Tonolla, M., Petrini, O., Samuels, G.J. 2010. MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress* 9: 79-100.

Desjardins, A.E., Busman, M., Muhitch, M.J., Proctor, R. 2007. Complementary hostpathogen genetic analyses of the role of fumonisins in the *Zea mays-Gibberella moniliformis* seedling interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70: 149-160.

De Vries, R.P., Frisvad, J.C., Van De Vondervoort, P.J.I., Burgers, K., Kuijpers, A.F. A., Samson, R.A., Visser, J. 2005. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black Aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87: 195-203.

De Vries, R.P., Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 497-522.

Dias, N., Santos, C., Portela, M., Lima, N. 2011. Toenail onychomycosis in a Portuguese geriatric population. *Mycopathologia* 172:55-61.

Díaz, A.B., Ory, I., Caro, I., Blandino, A. 2012. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food and Bioproducts Processing* 90: 72-78.

Dörge, T., Carstensen, J.M., Frisvad, J.C. 2000. Direct identification of pure *Penicillium* species using image analysis. *Journal of Microbiological Methods* 41: 121-133.

Echavarria, A., Pagán, J., Ibarz, A. 2011. Effect of previous enzymatic recirculation treatment through a tubular ceramic membrane on ultrafiltration of model solution and apple juice. *Journal of Food Engineering* 102: 334-339.

EMBRAPA. 2002. *Fumonisinias em Milho: um Risco à Saude Humana e Animal*. Antonio Xavier de Farias, Eliane Santos da Rocha, Patricia Pimenta Costa. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos.

EMBRAPA. 2007. *Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal*. Francisco das Chagas Oliveira Freire, Gusmão Pinto Vieira, Maria Isabel Florindo Guedes, Francisca Noélia Pereira Mendes. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical.

Farruggia, B., Nerli, B., Pico, G. 2003. Study of the serum albumin polyethyleneglycol interaction to predict the protein partition-ingen aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 798: 25-33.

Feau, N., Decourcelle, T., Husson, C., Desprez-Loustau, M.L., Dutech, C. 2011. Finding single copy genes out of sequenced genomes for multilocus phylogenetics in non-model fungi. *PLoS One* 6: e18803.

Fenselau, C., Demirev, P.A. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 20: 157-171.

Fernández, M., Úbeda, J.F., Briones, A.I. 2000. Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology* 59: 29-36.

Fernández-González, M., Úbeda, J.F., Vasudevan, T.G., Cordero Otero, R.R., Biones, A.I. 2004. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiology Letters* 237: 261-266.

Figueiredo, M.B. 2001. Métodos de Preservação de Fungos Patogênicos. *Biológico* 63: 73-82.

Fontana, R.C., Polidoro, T.A, Da Silveira, M.M. 2009. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology* 100: 4493-4498.

Fontana, R.C., Da Silveira, M.M. 2012. Production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in stirred tank and internal- and external-loop airlift reactors. *Bioresource Technology* 123: 157-163.

Food Ingredientes Brasil. 2009. Micotoxinas. *Revista FIB*. ed. 2, nº 7.

Forciniti, D., Hall, C.K. 1991. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. *Fluid Phase Equilibria* 61: 243-262.

Frisvad, J.C., Andersen, B., Thrane, U. 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research* 112: 231-240.

Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50: 23-43.

Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A., Pitt, J.I. 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Food Mycology* 571: 3-31.

- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R., Larsen, T.O., Thrane, U. 2007. Fumonisin B₂ Production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9727-9732.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R.A., Nielsen, K. F. 2011. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS ONE* 6: e23496.
- Galiotou-Panayotou, M.P.R., Kapantai, M. 1993. Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. *Letters in Applied Microbiology* 17:145-148.
- Gallo, A., Perrone, G., Solfrizzo, M., Epifani, F., Abbas, A., Dobson, A.D.W., Mulè, G. 2009. Characterisation of a PKS gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 129: 8-15.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H., Pitt, J.I., Samson, R.A. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson, R.A., Pitt, J.L. (eds.) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, New York, Plenum Press, pp.55-62.
- Garza-Madrid, M., Rito-Palomares, M., Serna-Saldívar, S.O., Benavides, J. 2010. Potential of aqueous two-phase systems constructed on flexible devices: Human serum albumin as proof of concept. *Process Biochemistry* 45: 1082-1087.
- Gattás, E.A.L., Bueno, M.R., Ribeiro, M.H.L. 2009. Stimulation of polygalacturonase production in an immobilized system by *Aspergillus* sp.: effect of pectin and glucose. *European Food Research and Technology* 229:923-928.
- Gauchi, J.P., Leblanc, J.C. 2002. Quantitative assessment exposure to the mycotoxin Ochratoxin A in food. *Risk Analysis* 2: 219-234.
- Gautam S, Simon L. 2006. Partitioning of b-glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly (ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two- phase systems: influence of pH and temperature. *Biochemical Engineering Journal* 30: 104-108.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59: 1-10.
- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, M.J., Vleggaar, R. 1988. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1806-1811.
- Gelderblom, W.C.A., Sewram, V., Shephard, G.S., Snijman, P.W., Tenza, K., Van Der Westhuizen, L., Vleggaar, R. 2007. Structure and natural occurrence of stereoisomers of the fumonisin B series mycotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4388-4394.
- Gervais, P., Molin, P. 2003. The rule of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 85-101.

- Goldblatt, L.A. 1969. *Aflatoxin: scientific background, control and implications*. Academic Press, New York.
- Goldberg, I., Rokem, J.S., Pines, O. 2006. Organic acids: old metabolites, new themes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81: 1601-1611.
- Gomes, J., Zeni, J., Cence, K., Toniazzo, G., Treichel, H., Valduga, E. 2011. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC9642. *Food and Bioproducts Processing* 89: 281-287.
- Graham, R.L.J., Graham, C., McMullan, G. 2007. Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. *Microbial Cell Factories* 6: 26-40.
- Griffiths, W.J., Jonsson, A.P., Liu, S., Rai, D.K., Wang, Y. 2001. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochemical Journal* 355: 545-561.
- Gummadi, S.N., Panda, T. 2003. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. *Process Biochemistry* 38: 987-996.
- Hashemi, M., Mousavic, S.M., Razavia, S.H., Shojaosadati, S.A. 2011. Mathematical modeling of biomass and α -amylase production kinetics by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation based on solid dry weight variation. *Biochemical Engineering Journal* 53: 159-164.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432.
- Heinl, S., Hartinger, D., Thamhesl, M., Vekiru, E., Krska, R., Schatzmayr, G., Moll, W., Grabherr, R. 2010. Degradation of fumonisin B₁ by the consecutive action of two bacterial enzymes. *Journal of Biotechnology* 145: 120-129.
- Herculano, P.N., Porto, T.S., Maciel, M.H.C., Moreira, K.A., Souza-Motta, C.M., Porto, A.L.F. 2012. Partitioning and purification of the cellulolytic complex produced by *Aspergillus japonicus* URM5620 using PEG–citrate in an aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria* 335: 8-13.
- Herculano, P.N., Porto, T.S., Moreira, K.A., Pinto, G.A.S., Souza-Motta, C.M., Porto, A.L.F. 2011. Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165: 1057-1067.
- Hermanns, G., Pinto, F.T., Kitazawa, S.E., Noll, I.B. 2006. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26: 7-10.
- Hettick, J.M., Green, B.J., Buskirk, A.D., Kashon, M.L., Slaven, J.E., Janotka, E., Blachere, F.M., Schmechel, D., Beezhold, D.H. 2008. Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Analytical biochemistry* 380: 276-281.

Hirooka, E.Y. 2000. Micotoxinas emergentes. In: Scussel, V.M. (ed.) *Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos*. Florianópolis: Ed. da Autora.

Holck, J., Hjernø, K., Lorentzen, A., Vignsnæs, L.K., Hemmingsen, L., Licht, T.R., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S. 2011. Tailored enzymatic production of oligosaccharides from sugar beet pectin and evidence of differential effects of a single DP chain length difference on human faecal microbiota composition after *in vitro* fermentation. *Process Biochemistry* 46:1039-1049.

Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tiwari, R., Dahiya, N., Beg, Q.K. 2000. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology* 59: 409-418.

Houbraken, J., Due, M., Varga, J., Meijer, M., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. *Studies in Mycology* 59: 107-128.

Houbraken, J., Samson, R.A. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology* 70: 1-51.

Hsieh, S.Y., Tseng, C.L., Lee, Y.S., Kuo, A.J., Sun, C.F., Lin, Y.H., Chen, J.K. 2008. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Molecular and Cellular Proteomics* 7: 448-456.

Hubka, V., Kolarik, M. 2012. β -tubulin paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia* 29: 1-10.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, Naphthalene and Styrene*, v. 82, 171 IARC (ed.), Geneve.

Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40: 2931-2944.

Joshi, V.K., Parmar, M., Rana, N. 2006. Pectin esterase production from apple pomace. *Food Technology and Biotechnology* 44: 253-256.

Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C., González-Jaén, M.T. 2010. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiology* 27: 50-57.

Jurjević, Ž., Peterson, S.W., Stea, G., Solfrizzo, M., Varga, J., Hubka, V., Perrone, G. 2012. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. *IMA Fungus* 3: 159-173.

Kahar, P., Kobayashi, K., Iwata, T., Hiraki, J., Kojima, M., Okabe, M. 2002. Production of polylysine in an airlift bioreactor (ABR). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93: 274-280.

- Kallow, W., Santos, I.M., Erhard, M., Serra, R., Venâncio, A., Lima, N. 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* characterised by MALDI-TOF MS. In: *Proceedings of 8th International Mycological Congress*, ed. Meyer, W. and Pearce, C. pp. 189-193. Bologna: Medimond S.r.l.
- Kammoun, R., Chouayekh, H., Abid, H., Naili, B., Bejar, S. 2009. Purification of CBS 819.72 α -amylase by aqueous two-phase systems: Modelling using Response Surface Methodology. *Biochemical Engineering Journal* 46: 306-312.
- Karam, N.E., Belarbi, A. 1995. Detection of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 559-563.
- Karas, M., Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionisation of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons. *Analytical Chemistry* 60: 2301-2303.
- Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J. 2000. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* 35: 1-12.
- Karbancioglu-Guler, F., Heperkan, D. 2009. Natural occurrence of fumonisin B₁ in dried figs as an unexpected hazard. *Food and Chemical Toxicology* 47: 289-292.
- Kaur, G., Kumar, S., Satyanarayana, T. 2004. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Bioresource Technology* 94: 239-243.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* 77: 215-227.
- Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B., Whittall, R. M. 2008. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 627: 71-81.
- Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A., Cawood, M., Coetzer, J.A.W. 1990. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 57: 269-275.
- Kester, H.C., Visser, J. 1990. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 12: 150-160.
- Kickman, A.T., Parkin, M.C., Iles, R.K. 2007. An introduction to mass spectrometry based proteomics - Detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Molecular and Cellular Endocrinology* 262: 212-227.
- Kirsch, L.S., Pinto, A.C.S., Teixeira, M.F.S., Porto, T.S., Porto, A.L.F. 2012. Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the PEG/phosphate aqueous two-phase system. *Química Nova* 35: 1912-1915.
- Klich, M.A. 2002. *Identification of common Aspergillus species*. 1rd ed. Utrecht: Centraalbureau vöör Schimmelcultures.

- Klich, M.A. 2006. Identification of clinically relevant aspergilli. *Medical Mycology* 44: 127-131.
- Klich, M.A., Pitt, J.I. 1988. *A Laboratory Guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. CSIRO Division of Food Processing, Australia.
- Kotzekidov, P. 1991. Production of polygalacturonases by *Byssachlamys fulva*. *Journal of Industrial Microbiology* 7: 53-56.
- Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers* 161: 1-188.
- Krader, P., Emerson, D. 2004. Identification of archaea and some extremophilic bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Extremophiles* 8: 259-268.
- Kremnický, L., Biely, P. 2005. Unique mode of acetylation of oligosaccharides in aqueous two-phase system by *Trichoderma reesei* acetyl esterase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 37: 72-78.
- Krishnamurthy, T., Rajamani, U., Ross, P.L., Jabbour, R., Nair, H., Eng, J., Yates, J., David, M.T., Stahl, D.C., Lee, T.D. 2000. Mass spectral investigations on microorganisms. *Journal of Toxicology - Toxin Reviews* 19: 95-117.
- Krska, R., Welzig, E., Boudra, H. 2007. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137: 241-264.
- Kumar, S., Sharma, H.K., Sarkar, B.C. 2011. Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). *Food Science and Biotechnology*, 20: 1289-1298.
- Kumar, S., Shekhar, M., Ali, K.A., Sharma, P. 2007. A rapid technique for detection of toxigenic and non-toxic strain of *Aspergillus flavus* from maize grain. *Indian Phytopathology* 1: 31-34.
- Kusters van Someren, M.A., Samson R.A., Visser J. 1991. The use of RFLP analysis in classification of the black Aspergilli: reinterpretation of *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics* 19: 21-26.
- Laaksonen, O., Sandell, M., Nordlund, E., Heinio, R.L., Malinen, H.L., Jaakkola, M., Kallio, H. 2012. The effect of enzymatic treatment on blackcurrant (*Ribes nigrum*) juice flavour and its stability. *Food Chemistry* 130: 31-41.
- Lay, J.O.Jr. 2000. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *Trends in Analytical Chemistry* 19: 507-516.
- Lay, J.O.Jr. 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* 20: 172-194.

- Lee, Y.M., Lee, H., Kim, G.H., Kim, J.J. 2011. Miniaturized enzyme production and development of micro-assays for cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Journal of Microbiological Methods* 86: 124-127.
- Lima, A.S., Alegre, R.M., Meirelles, A.J.A. 2002. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers* 50: 63-68.
- Lima, N. 2007. Centro de recursos biológicos: novos desafios para as coleções de culturas. In: Congresso Brasileiro de Micologia, 5, Recife. *Anais do Congresso Brasileiro de Micologia*. Recife, Ed. Universitária da UFPE, 2007, p. 173-180.
- Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., Shimidell, W. 2001. *Produção de Enzimas Microbianas*. *Biotecnologia Industrial*, Volume 2 e 4, ed. 1ª, São Paulo.
- Linde, G.A., Magagnin, G., Costa, J.A.V., Bertolin, T.E, Colauto, N.B. 2007. Column bioreactor use for optimization of pectinase production in solid substrate cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 557-562.
- Ling, Y., Nie, H., Su, S., Branford-White, C., Zhu, L. 2010. Optimization of affinity partitioning conditions of papain in aqueous two-phase system using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 73: 343-348.
- Lino, C.M., Silva, L.J.G., Pena, A.S., Silveira, M.I. 2006. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in Portuguese maize and maize-based samples by HPLC with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384: 1214-1220.
- Lino, C.M., Silva, L.J.G., Pena, A., Fernández, M., Mañes, J. 2007. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in broa, typical Portuguese maize bread. *International Journal of Food Microbiology* 118: 79-82.
- Logrieco, A., Ferracane, R., Viscontia, A., Ritieni, A. 2010a. Natural occurrence of fumonisin B₂ in red wine from Italy. *Food Additives and Contaminants* 27: 1136-1141.
- Logrieco, A.F., Ferracane, R., Cozzi, G., Haidukowsky, M., Susca, A., Mulè, G., Ritieni, A. 2010b. Fumonisin B₂ by *Aspergillus niger* in the grape-wine chain: an additional potential mycotoxicological risk. *Annals of Microbiology* 61: 1-3.
- Maciel, M.H.C., Herculano, P.N., Porto, T.S., Teixeira, M.F.S., Moreira, K.A., Souza-Motta, C.M. 2011. Production and partial characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM4645. *African Journal of Biotechnology* 10: 2469-2475.
- Maciel, M., Ottoni, C., Santos, C., Lima, N., Moreira, K., Souza-Motta, C. 2013. Production of polygalacturonases by *Aspergillus niger* section *Nigri* strains in a fixed bed reactor. *Molecules* 18: 1660-1671.
- Magnani, M., Fernandes, T., Cavenaghi, C.E., Homechim, M., Ono, E.Y.S., Vilas-Boas, L.A., Sartori, D., Furlaneto, M.C., Fungaro, M.H.P. 2005. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola* 62: 45-49.

Magnoli, C., Violanta, M., Combina, M., Palacia, G., Dalcero, A. 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 37: 179-184.

Maier, T., Klepel, S., Renner, U., Kostrzewa, M. 2006. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods* 3.

Maller, A., Damásio, A.R.L., Da Silva, T.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M. 2011. Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. *Enzyme Research* 2011: 1-6.

Malpiedi, L.P., Picó, G., Nerli, B. 2008. Features of partitioning pattern of two pancreatic enzymatic precursors: trypsinogen and chymotrypsinogen in polyethyleneglycol–sodium citrate aqueous biphasic systems. *Journal of Chromatography B* 870: 1-7.

Marin, S., Magan, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2004. Fumonisin producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *Journal of Food Protection* 67: 1792-1805.

Marinach-Patrice, C., Lethuillier, A., Marly, A., Brossas, J. Y., Gené, J., Symoens, F., Datry, A., Guarro, J., Mazier, D., Hennequin, C. 2009. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 634-42.

Marinach-Patrice, C., Fekkar, A., Atanasova, R., Gomes, J., Djamdjian, L., Brossas, J. Y., Meyer, I., Buffet, P., Snounou, G., Datry, A., Hennequin, C., Golmard, J. L., Mazier, D. 2010. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PloS One* 5:e8862.

Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Muller, E., Horré, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A., Sahl, H.G. 2009. MALDI-TOF Mass-Spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 2912-2917.

Marques, L.A. 2006. *Aplicação de técnicas avançadas de espectrometria de massas em ciências de alimentos e perfumaria*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química Universidade Estadual de Campinas.

Martins, E.S., Leite, R.S.R., Silva, R., Gomes, E. 2012. Production and characterization of polygalacturonase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus* on submerged fermentation. *Annals of Microbiology* 62: 1199-1205.

Marvin, L.F., Roberts, M.A., Fay, L.B. 2003. Matrix- assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* 337: 11-21.

Mathur, S., Constable, P.D., Eppley, R.M., Waggoner, A.L., Tumbleson, M.E., Haschek, W.M. 2001. Fumonisin B₁ is hepatotoxic and nephrotoxic in milk-fed calves. *Toxicological Sciences* 60: 385-396.

Mazzola, P.G., Lopes, A.M., Hasmann, F.A., Jozala, A.F., Penna, T.C.V., Magalhães, P.O., Rangel-Yagui, C.O., Pessoa JR, A. 2008. Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83: 143-157.

Maziero, M.T., Bersot, L.S. 2010. Review: micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 12: 89-99.

Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., Pickersgill, R., Jenkins, J. 1997. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure* 5: 677-689.

Mayerhoff, Z.D.V.L., Roberto, I.C., Franco, T.T. 2004. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal* 18: 217-23.

Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M. 2005. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4696-4702.

Menniti, A.M., Gregori, R., Neri, F. 2010. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels. *International Journal of Food Microbiology* 136: 304-309.

Merrill, A.H.Jr., van Echten, G., Wang, E., Sandhoff, K. 1993. Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *Journal of Biological Chemistry* 268: 27299-27306.

Micheli, P.A. 1729. *Nova plantarum genera*. Florence, Italy.

Milicevic, D., Skrinjar, M., Baltic, T. 2010. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins* 2: 572-592.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

Ming Chu, I., Lee, C., Li, T.S. 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 755-761.

Mogensen, J.M., Varga, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. 2009. *Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B₂. *International Journal of Food Microbiology* 132: 141-144.

Mogensen, J.M., Frisvad, J.C., Thrane, U., Nielsen, K.F. 2010. Production of fumonisin B₂ and B₄ by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5: 954-958.

- Molin, R., Valentini, M.L. 1999. *Simpósio sobre micotoxinas em grãos*. Fundação Cargil, São Paulo.
- Monaci, L., Palmisano, F. 2004. Determination of ochratoxin A in foods: State-of-art and analytical challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 96-103.
- Mondal, K., Mehta, P., Gupta, M.N. 2004. Affinity precipitation of *Aspergillus niger* pectinase by microwave-treated alginate. *Protein Expression and Purification* 33: 104-109.
- Moslem, M.A., Mashraqi, A., Abd-Elsalam, K.A., Bahkali, A.H., Elnagaer, M.A. 2010. Molecular detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species isolated from coffee beans in Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research* 9: 2292-2299.
- Mosseray, R. 1934. Les *Aspergillus* de la section "Niger" Thom and Church. *La Cellule* 43: 203-285.
- Mrudula, S., Anitharaj, R. 2011. Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 6: 64-71.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M. 2006. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science* 71: 51-65.
- Mutlu, M., Sarioglu, K., Demir, N., Ercan, M.T., Acar, J. 1999. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. *Journal of Food Engineering* 41: 147-150.
- Naganagouda, K., Mulimani, V.H. 2008. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. *Process Biochemistry* 43: 1293-1299.
- Naidu, G.S.N., Panda, T. 1998. Production of pectolytic enzymes-a review. *Bioprocess Engineering* 19: 355-361.
- Nakkeeran, E., Umesh-Kumar, S., Subramanian, R. 2011. *Aspergillus carbonarius* polygalacturonases purified by integrated membrane process and affinity precipitation for apple juice production. *Bioresource Technology* 102: 3293-3297.
- Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. (2011) *O retrato da citricultura brasileira*. CitrusBR, São Paulo.
- Neves, M.L.C., Porto, T.S., Souza-Motta, C.M., Spier, M.R., Soccol, C.R., Moreira, K.A., Porto, A.L.F. 2012. Partition and recovery of phytase from *Absidia blakesleeana* URM5604 using PEG–citrate aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria* 318: 34-39.
- Nielsen, K.F., Mogensen, J.M., Johansen, M., Larsen, T.O., Frisvad, J.C. 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395: 1225-1242.

- Nighojkar, S., Phanse, Y., Sinha, D., Nighojkar, A., Kumar, A. 2006. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochemistry* 41: 1136-1140.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Varga, J., Frisvad, J.C. Samson, R.A. 2008. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1727-1734.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2009. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. *Food Additives & Contaminants* 26: 94-100.
- Orsi, R.B., Corrêa, B., Possi, C.R., Schammas, E.A., Nogueira, J.R., Dias, S.M.C., Malozzi, M.A.B. 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research* 36: 75-87, 2000.
- Oszmianski, J., Wojdylo, A., Kolniak, J. 2009. Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7078-7085.
- Palencia, E.R., Hinton, D.M., Bacon, C.W. 2010. The black *Aspergillus* species of maize 404 and peanuts and their potential for mycotoxin production. *Toxins* 2: 300-416.
- Palma, M. 2003. *Produção de xilanases por Thermoascus aurantiacus em cultivo em estado sólido*. Florianópolis, 169p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico - Universidade Federal de Santa Catarina.
- Pandey, A., Weibv, C., Soccol, C.R., Larroche, C. 2005. *Enzyme Technology*. Springer, New York, USA.
- Pařenicová, L., Benen, J.A.E., Samson, R.A., Visser, J. 1997. Evaluation of RFLP analysis of the classification of selected black aspergilli. *Mycological Research* 101: 810-814.
- Pařenicová, L., Kester, H.C., Benen, J.A., Visser, J. 2000. Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. *FEBS Letters* 467: 333-336.
- Pařenicová, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R.A., Rossen, L., Ten Hoor-Suykerbuyk, M., Visser, J. 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 521-527.
- Pariza, M.W., Cook, M. 2010. Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56: 332-342.
- Pariza, M.W., Foster, E.M. 1983. Determining the safety of enzymes used in food processing. *Journal of Food Protection* 46: 453-458.

Pashova, S., Slokoska, L., Sheremetska, P., Krumova, E., Vasileva, L., Angelova, M. 1999a. Physiological aspects of immobilised *Aspergillus niger* cells producing polymethylgalacturonase. *Process Biochemistry* 35: 15-19.

Pashova, S., Slokoska, L., Krumova, E., Angelova, M. 1999b. Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspergillus niger* 26. *Enzyme and Microbial Technology* 24:535-540.

Passarini, M.R.Z., Santos, C., Lima, N., Berlinck, R.G.S., Sette, L.D. 2012. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drarmacidon reticulatum*. *Archives of Microbiology*. DOI 10.1007/s00203-012-0854-6.

Paterson, R.R.M., Lima, N. 2009. Mutagens manufactured in fungal culture may affect DNA/RNA of producing fungi. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1070-1080.

Paterson, R.R.M., Lima, N. 2010a. Toxicology of mycotoxins. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Volume 2: Clinical Toxicology. Luch, A. (ed), Birkhauser Verlag Ag, Basel.

Paterson, R.R.M., Lima, N. 2010b. How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food Research International* 43: 1902-1914.

Pattono, D., Gallo, P.F., Civera, T. 2011. Detection and quantification of ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry* 127: 374-377.

Pel, H.J., De Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., De Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A.E., Van Den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G.J., Debets, A.J.M., Dekker, P., Van Dijck, P.W.M., Van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J.M., D'enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S.P., De Groot, P.W.J., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., Van Den Hombergh, J.P.T.W., Van Den Hondel, C.A.M.J., Van Der Heijden, R.T.J.M., Van Der Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., Van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., Van Der Maarel, M.J.E.C., Meulenberg, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., Van Peij, N.N.M.E., Ram, A.F.J., Rinas, U., Roubos, J.A., Sagt, C.M.J., Schmoll, M., Sun, J.B., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., De Vondervoort, P.J.J.V., Wedler, H., Wosten, H.A.B., Zeng, A.P., Van Ooyen, A. J.J., Visser, J., Stam, H. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology* 25: 221-231.

Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin W. H. O.* 77: 754-766.

Pereira, M., Wu, You-Ting, Venâncio, A., Teixeira, J. 2003. Aqueous two-phase extraction using thermoseparating polymer: a new system for the separation of endopolygalacturonase. *Biochemical Engineering Journal* 15: 131-138.

Pereira, M.L.G., Carvalho, E.P., Prado, G. 2002. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *Boletim do Ceppa* 20: 141-156.

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 59: 53-66.

Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Frisvad, J., Stea, G., Kocsube, S., Toth, B., Kozakiewicz, Z., Samson, R. 2008. *Aspergillus uvarum* sp nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1032-1039.

Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology* 115: 1138-1150.

Peterson, S.W. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus. Classification*. Samson, R. A., Pitt, J. C. (eds), Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Peterson, S.W. 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100: 205-226.

Piccoli-Valle, R.H., Passos, F.M.L., Passos, F.J.V., Silva, D.O. 2001. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Brazilian Journal Microbiology* 32: 135-140.

Pitt, J.I., Samson, R.A., Frisvad, J.C. 2000. List of species and their teleomorphs in the family *Trichocomaceae*. In: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus*. Samson, R. A. & PITT, J. C. (eds), Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Pitt, J.I., Samson, R.A. 2007. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Studies in Mycology* 59: 67-70.

Poland, G.A., Ovsyannikova, I.G., Johnson, K.L., Naylor, S. 2001. The role of mass spectrometry in vaccine development. *Vaccine* 19: 17-19.

Pohar, A., Žnidaršič-Plazl, P., Plazl, I. 2012. Integrated system of a microbioreactor and a miniaturized continuous separator for enzyme catalyzed reactions. *Chemical Engineering Journal* 189-190: 376-382.

Porto, T.S., Marques, P.P., Porto, C.S., Moreira, K.A., Lima-Filho, J.L., Converti, A., Pessoa Jr., A., Porto, A. L. F. 2010. Extraction of ascorbate oxidase from *Cucurbita maxima* by continuous process in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 1057-1064.

Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S. 2007. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. *International Journal of Food Microbiology* 114: 131-135.

Porto, T.S., Medeiros e Silva, G.M., Porto, C.S., Cavalcanti, M.T.H., Neto, B.B., Lima-Filho, J.L., Converti, A., Porto, A.L.F., Pessoa, Jr. A. 2008. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/ citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing* 47: 716-721.

Porto, C.S., Porto, T.S., Nascimento, K.S., Teixeira, E.H., Cavada, B.S., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F. 2011. Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. *Biochemical Engineering Journal* 53: 165-171.

Pozzi, C.R., Arcaro, J.R.P., Arcaro J., Fagundes, H., Correa, B. 2002. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. *Ciência Rural* 32: 901-907.

Prieta, J., Moreno, M.A., Díaz, S., Suárez, G., Domínguez, L. 1994. La patulina como indicador de calidad en productos elaborados con manzana. *Alimentaria* 75-80.

Prodanović, J.M., Antov, M.G. 2008. The influence of molecular weight of polyethylene glycol on separation and purification of pectinases from *Penicillium cyclopium* in aqueous two-phase system. *Acta Periodica Technologica* 39: 193-199.

Qian, J., Cutler, J.E., Cole, R.B., Cai, Y. 2008. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392: 439-449.

Rabelo, A.P.B., Tambourgi, E.B., Pessoa, Jr. A. 2004. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. *Journal of Chromatography B* 807: 61-68.

Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V., Karanth, N.G. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 127-135.

Ramos, A.M., Gally, M., García, M.C., Levin, L. 2010. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. *Revista Iberoamericana de Micología* 27: 186-190.

Rangarajan, V., Rajasekharan, M., Ravichandran, R., Sriganesh, K., Vaitheeswaran, V. 2010. Pectinase production from orange peel extract and dried orange peel solid as substrates using *Aspergillus niger*. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6: 445-453.

Raper, K.B., Alexander, D.F. 1945. Preservation of molds by lyophil process. *Mycologia* 37: 499-525.

Raper, K.B., Fennell, D.I. 1965. *The genus Aspergillus*. 1st ed. Baltimore: The Willians & Wilkins Company.

Ratanapongleka, K. 2010. Recovery of biological products in aqueous two phase systems. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. vol. 1. ISSN: 2010-0221.

- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Vismer, H.F. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2101-2105.
- Rivas, B., Torrado, A., Torres, P., Converti, A., Dominguez, J.M. 2008. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 2380-2387.
- Rizzatto, M.L. 1999. Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado. Campinas, 89pp. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - *Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas*.
- Rodríguez-Amaya, D.B., Sabino, M. 2002. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 1-11.
- Rodríguez Couto, S., Toca-Herrera, J.L. 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 25: 558-569.
- Rodríguez-Durán, L.V., Spelzini, D., Boeris, V., Aguilar, C.N., Picó, G.A. 2013. Partition in aqueous two-phase system: Its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101: 392-397.
- Rodríguez-Fernández, D.E., Rodríguez-León, J.A., De Carvalho, J.C., Sturm, W., Soccol, C.R. 2011. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 102: 10657-10662.
- Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., Lima, N. 2011. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *Journal of Applied Microbiology* 111: 877-892.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N. 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology* 129: 187-193.
- Rosa, P.A.J., Ferreira, I.F., Azevedo, A.M., Aires-Barros, M.R. 2010. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A* 1217: 2296-2305.
- Rosso, B.U., Lima, C.A., Porto, T.S., Nascimento, C.O., Junior, A.P., Converti, A., Carneiro-da-Cunha, M.G., Porto, A.L.F. 2012. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria* 335: 20-25.
- Ruiz, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Rodríguez, R., Contreras-Esquivel, J.C. 2012. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 60: 90-95.

- Said, S., Pietro, R.C.L.R. 2004. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Editora Legis Summa, Ribeirão Preto, São Paulo.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vandamme, E. 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology* 39: 213-294.
- Salgado, J.C., Andrews, B.A., Ortuzar, M.F., Asenjo, J.A. 2008. Prediction of the partitioning behaviour of proteins in aqueous two-phase systems using only their amino acid composition. *Journal of Chromatography A* 1178: 134-144.
- Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C. 2004. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50: 45-61.
- Samson, R.A., Hong, S.B., Frisvad, J.C. 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44: 133-148.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J. 2007a. Diagnostic tools to identify black aspergilla. *Studies in Mycology* 59: 129-145.
- Samson, R.A., Pitt, J.I. 1985. *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum Press, New York.
- Samson, R.A., Pitt, J.I. 1990. *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. Second NATO ARW, Baarn, The Netherlands.
- Samson, R.A., Pitt, J.I. 2000. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Samson, R.A., Varga, J. 2007. *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Studies in Mycology* 59.
- Samson, R.A., Varga, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*?. *Medical Mycology* S1-S8.
- Samson, R.A., Varga, J., Witiak, S.M., Geiser, D.M. 2007b. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Studies in Mycology* 59: 71-73.
- Sandri, I.G., Fontana, R.C., Barfknecht, D.M., Silveira, M.M. 2011. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *Food Science and Technology* 44: 2217-2222.
- Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N. 2010a. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology* 161: 168-175.
- Santos, C., Lima, N., Sampaio, P., Pais, C. 2011. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71: 304-308.

- Santos, C., Paterson, R.R.M., Venâncio, A., Lima, N. 2010b. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 108: 375-85.
- Santos, I.M., Lima, N. 2001. Criteria followed in the establishment of a filamentous fungal culture collection – Micoteca da Universidade do Minho (MUM). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17: 215-220.
- 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* 35:272-275.
- Sarioglu, K., Demir, N., Acar, J., Mutlu, M. 2001. The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase. *Journal of Food Engineering* 47: 271-274.
- Sawada, K., Ueda, M. 2001. Enzyme processing of textiles in reverse micellar solution. *Journal of Biotechnology* 89: 263-269.
- Scaff, R.M.C., Scussel, V.M. 2004. Fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products commercialized in the State of Santa Catarina-Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47: 911-919.
- SCF (Scientific Committee on Foods of the European Union). 2003. *Updated opinion of the Scientific Committee on Foods on Fumonisin B₁, B₂ and B₃*. Expressed on 4 April 2003. SCF/CS/CNTM/MYC/28 FINAL. Directorate - Scientific Opinions. European Commission, Brussels, Belgium.
- Schmidt, A.S., Venton, A.M., Asenjo, J.A. 1994. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase. *Enzyme Microbiology Technology* 16: 131-142.
- Scott, P.M. 2012. Recent research on fumonisins: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29: 242-248.
- Serra, R., Cabanes, F.J., Perrone, G., Castella, G., Venâncio, A., Mule, G., Kozakiewicz, Z. 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia* 98: 295-306.
- Sette, L.D., Cupolillo, E., Tigano, M.S., Vazoller, R.F., Canhos, V.P. 2007. Recomendações para operação e gerenciamento de coleções de culturas de micro-organismos. *Microbiologia in Foco* 2: 49-55.
- Sherf, A.F. 1943. A method for maintaining *Phytophthora septentrionalis* in culture for long periods without transfer. *Phytopathol* 33: 330-332.
- Shier, W.T. 1992. Sphingosine analogs: an emerging new class of toxins that includes the fumonisins. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 11: 241-257.
- Shrinivas, D., Kumar, R., Naik, G.R. 2012. Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic

Bacillus halodurans JB 99 exhibiting dehairing activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39: 93-98.

Silva, D.M., Batista, L.R., Rezende, E.F., Fungaro, M.H.P., Sartori, D., Alves, E. 2011. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 761-773.

Silva, D., Martins, E.S., Leite, R.S.R., Da Silva, R., Ferreira, V., Gomes, E. 2007. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 42: 1237-1243.

Silva, L.H.M. 2006. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova* 29: 1345-1351.

Silvério, S.C., Rodríguez, O., Tavares, A.P.M., Teixeira, J.A., Macedo, E.A. 2013. Laccase recovery with aqueous two-phase systems: enzyme partitioning and stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 87: 37-43.

Simões, M.F., Pereira, L., Santos, C., Lima, N. 2013. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: Malik, A., Grohmann, E., Alves, M. *Management of microbial resources in the environment*. Springer, The Netherlands.

Singh, S.A., Ramakrishna, M., Rao, A.G.A. 1999. Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented broth of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochemistry*, 35: 411-417.

Siqueira, V.M., Conti, R., Araújo, J.M., Souza-Motta, C.M. 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 53: 89-95.

Soares, C., Calado, T., Venâncio, A. 2012. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Revista Iberoamericana de Micología, In Press*.

Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal* 13: 205-218.

Somma, S., Perrone, G., Logrieco, A.F. 2012. Diversity of black aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 131-147.

Sørensen, A., Lübeck, P.S., Lübeck, M., Nielsen, K.F., Ahring, B.K., Teller, P.J., Frisvad, J.C. 2011. *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a black *Aspergillus* species isolated in Denmark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 3077-3083.

Souza, J.V.B., Silva, E.S., Maia, M.L.S., Teixeira, M.F.S. 2003. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1. *Process Biochemistry* 4: 455-458.

Souza-Motta, C.M. 2007. Rede de coleções de culturas de microrganismos do Norte e Nordeste do Brasil (RENNEBRA):implantação da rede e modernização das coleções para a conservação da biodiversidade microbiana e pesquisa biotecnológica. In: Congresso Brasileiro de Micologia, 5, Recife. *Anais do Congresso Brasileiro de Micologia*. Recife, Ed. Universitária da UFPE, 2007, p. 181-188.

Souza-Motta, C.M. 2011. Micoteca URM. *Estudos Universitários*. Revista de Cultura, Recife, v. 27, n. 8, p. 167-169.

Spier, M.R., Greiner, R., Rodriguez-León, J.A., Woiciechowski, A.L., Pandey, A., Soccol, V.T., Soccol, C.R. 2008. Phytase production using citric pulp in SSF. *Food Technology and Biotechnology* 46: 178-182.

Statsoft Inc. 2008. Statistica (Data Analysis Software Systems) Version 8.0.

Storari, M., Dennert, F.G., Bigler, L., Gessler, C., Broggini, G.A.L. 2012a. Isolation of mycotoxins producing black aspergilli in herbal teas available on the Swiss market. *Food Control* 26: 157-161.

Storari, M., Broggini, G.A.L., Bigler, L., Cordano, E., Eccel, E., De Filippi, R., Gessler, C., Pertot, I. 2012b. Risk assessment of the occurrence of black aspergilla on grapes grown in an alpine region under a climate change scenario. *European Journal of Plant Pathology* 134: 631-645.

Storari, M., Pertot, I., Gessler, C., Broggini, G.A.L. 2010. Amplification of polyketide synthase gene fragments in ochratoxigenic and nonochratoxigenic black aspergilla in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 393-405.

Su, C.L., Tseng, W.L. 2007. Gold nanoparticles as assisted matrix for determining neutral small carbohydrates through laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79: 1626-1633.

Susca, A., Proctor, R.H., Mulè, G., Stea, G., Ritieni, A., Logrieco, A., Moretti, A. 2010. Correlation of mycotoxin fumonisin B₂ production and presence of the fumonisin biosynthetic gene *fum8* in *Aspergillus niger* from grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 9266-9272.

Szécsi, Á., Szekeres, A., Bartók, T., Oros, G., Bartók, M., Mesterházy, Á. 2010. Fumonisin B₁₋₄-producing capacity of Hungarian *Fusarium verticillioides* isolates. *World Mycotoxin Journal* 3: 67-76.

Takayanagi, T., Uchibori, T., Yokutsuka, K. 2001. Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grapes skins. *American Journal Enology and Viticulture* 52: 41-44.

Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2: 151-53.

- Tariq, A.L., Reyaz, A.L. 2012. The influence of carbon and nitrogen sources on pectinase productivity of *Penicillium chrysogenum* in solid state fermentation. *International Research Journal of Microbiology* 3: 202-207.
- Taşkın, M. 2012. Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. DOI:10.1007/s00449-012-0771-8
- Taşkın, E., Stratilová, E. 2008. Polygalacturonases produced under solid state and submerged fermentation conditions by two strains of *Aspergillus foetidus*. *Turkish Journal of Biochemistry* 33, 190-196.
- Thom, C., Church, M. 1926. *The Aspergilli*. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA.
- Thom, C., Raper, K.B. 1945. *A Manual of the Aspergilli*. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA.
- Tokatli, F., Tari, C., Unluturk, S.M., Baysal, N.G. 2009. Modeling of polygalacturonase enzyme activity and biomass production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 1139-1148.
- Tonolla, M., Benagli, C., Rossi, V., Fragoso, C., Petrini, O. 2010. MALDI-TOF MS: a new laboratory option for the diagnosis of clinical infections. *Pipette* 6-10.
- Tuttobello, B.R., Mill, P.J. 1961. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. 1. The production of active mixtures of pectic enzymes. *Biochemical Journal* 79: 51-57.
- Ueno, Y., Kawakura, O., Sugiura, Y., Horiguchi, K., Nakajima, M., Yamamoto, K., Sato, S. 1991. Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. *IARC-Sci.-Publ* 115: 71-75.
- Uenojo, M., Pastore, G.M. 2007. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova* 30: 388-394.
- União Europeia, Regulamento (UE) N° 105/2010, *Jornal Oficial da União Europeia*, 05/02/2010.
- Ustok, F.I., Tari, C., Gogus, N. 2007. Solid-stat production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal of Biotechnology* 127: 322-334.
- Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C., Wahl, K. 2005. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 58-64.
- Van Der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., Scott, D.B., Theron, J.J. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Nature* 205: 1113.

- Vanlaere, E., Sergeant, K., Dawyndt, P., Kallow, W., Erhard, M., Sutton, H., Dare, D., Samyn, B., Devreese, B., Vandamme, P. 2008. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species. *Journal of Microbiological Methods* 75: 279-286.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., Samson R. A. 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 69: 1-17.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2007a. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology* 59: 75-88.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2010a. *Aspergillus* sect. *Aeni* sect. nov., a new section of the genus for *A. karnatakaensis* sp. nov. and some allied fungi. *IMA Fungus* 1: 197-205.
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J., Kozakiewicz, Z. 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4461-4464.
- Varga, J., Kocsubé, S., Suri, K., Szigeti, G., Szekeres, A., Varga, M., Tóth, B., Bartók, T. 2010b. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. *International Journal of Food Microbiology* 143: 143-149.
- Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson, R.A. 2007b. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1925-1932.
- Varga J., Rigó K., Tóth B., Téren J., Kozakiewicz, Z. 2003. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology* 41: 29-36.
- Varga, J., Samson, R.A. 2008. *Aspergillus* in the genomic era. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.
- Ventura, S.P.M., Barros, R.L.F., Barbosa, J.M.P., Soares, C.M.F., Lima, A.S., Coutinho, J.A.P. 2012. Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. *Green Chemistry* 14: 734-740.
- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G. 2000. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 888: 21-26.
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. 2000. *Fundamentos de Bioquímica*. Editora Artes Medicas Sul, Porto Alegre, RS.
- Zafarani-Moattar, M.T., Sadeghi, R. 2001. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilibria* 181: 95-112.

- Zain, M.E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15: 129-144.
- Zaki, M.M., El-Midany, S.A., Shaheen, H.M., Rizzi, L. 2012. Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 4: 13-28.
- Zhang, X., Boesch-Saadatmandi, C., Lou, Y., Wolffran, S., Huebbe, P., Rimbach, G. 2009. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. *Genes and Nutrition* 4: 41-48.
- Zhang, Y., Liu, J. 2010. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B* 878: 909-912.
- Zhang, Y., Choi, Y., Zou, X., Xu, J. 2011. The FvMK1 mitogen-activated protein kinase gene regulates conidiation, pathogenesis, and fumonisin production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology* 48: 71-79.
- Zheng, Z., Shetty, K. 2000. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochemistry* 35: 825-830.
- Zheng, Z., Hanneken, J., Houchins, D., King, R.S., Lee, P., Richard, J.L. 2005. Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. *Mycopathologia* 159: 265-272.
- Zhou, J.M., Ge, X.Y., Zhang, W.G. 2011. Improvement of polygalacturonase production at high temperature by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 102: 10085-10088.
- Wang, E., Norred, W., Bacon, C., Riley, R., Merrill, A.J. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 14486-14490.
- Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., Fenn, J.B. 1985. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry* 57: 675-679.
- Wicklowsky, D.T., Dowd, P.F., Alfta, A.A., Gloer, J.B. 1996. Ochratoxin A: an antiinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1100-1103.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 965-974.
- Wilkes, J.G., Sutherland, J.B. 1998. Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. *Journal of Chromatography B* 717: 135-156.

Williams, T.L., Andrzejewski, D., Lay, J.O., Musser, S.M. 2003. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 14: 342-351.

Wittwer, M., Heim, J., Schär, M., Dewarrat, G., Schürch, N. 2011. Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: Detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 12-19.

Wu, You-Ting., Pereira, M., Venâncio, A., Teixeira, J. 2001. Separation of endopolygalacturonase using aqueous two-phase partitioning. *Journal of Chromatography A* 929: 23-29.

Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S. 2009a. Pectin-lyase: a review. *Process Biochemistry* 44: 1-10.

Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S. 2009b. Purification and characterization of pectin lyase produced by *Aspergillus terricola* and its application in retting of natural fibers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159: 270-283.

Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S. 2008. Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochemistry* 43: 547-552.

Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Tsukahara, M., Mikami, S. 2011. Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112, 233-237.

Yan-Min, L., Yan-Zhao, Y., Xi-Dan, Z., Chuan-Bo, X. 2010. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. *Food and Bioproducts Processing* 88: 40-46.

Yang, S., Huang, Z., Jiang, Z., Li, L. 2008. Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophila* in solid-state fermentation using aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry* 43: 56-61.

Yugandhar, N.M., Ravi Kumar, D.V.R., Prasanthi, V., Kiran Kumar, N., Sri Ramireddy, D. 2008. Optimization of pectinase production from *Manihot utilissima* by *Aspergillus niger* NCIM 548 using statistical experimental design. *Research Journal of Microbiology* 3: 9-16.

Sites consultados:

<<http://www.eng.uminho.pt/ModuleLeft.aspx?mdl=~/Modules/UMEventos/EventoView.ascx&ItemID=4110&Mid=477&lang=pt-PT&pageid=427&tabid=11>> Acesso em 20 de Outubro de 2012.

<<http://www.micoteca.deb.uminho.pt>> Acesso em 20 de Outubro de 2012.

< <http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/>> Acesso em 29 de Janeiro de 2013.

<<http://www.fung-growth.org>> Acesso em 17 de Janeiro de 2013.

<<http://www.sigmaaldrich.com>> Acesso em 11 de Março de 2013.

ANEXO

Article

Production of Polygalacturonases by *Aspergillus* Section *Nigri* Strains in a Fixed Bed Reactor

Marília Maciel^{1,2}, Cristiane Ottoni², Cledir Santos², Nelson Lima², Keila Moreira³ and Cristina Souza-Motta^{1,*}

¹ Mycology Department, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife 50670-420, Pernambuco, Brazil; E-Mail: lilomaciel@hotmail.com

² IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Micoteca da Universidade do Minho, University of Minho, Campus of Gualtar, Braga 4710-057, Portugal; E-Mails: cristiane.ottoni@deb.uminho.pt (C.O.); cledir.santos@deb.uminho.pt (C.S.); nelson@ie.uminho.pt (N.L.)

³ Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Garanhuns 55292-270, Pernambuco, Brazil; E-Mail: moreiralab@yahoo.com.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: smotta@ufpe.br; Tel.: +55-81-2126-8948; Fax: +55-81-2126-8480.

Received: 26 November 2012; in revised form: 9 January 2013 / Accepted: 11 January 2013 / Published: 28 January 2013

Abstract: Polygalacturonases (PG) are pectinolytic enzymes that have technological, functional and biological applications in food processing, fruit ripening and plant-fungus interactions, respectively. In the present, a microtitre plate methodology was used for rapid screening of 61 isolates of fungi from *Aspergillus* section *Nigri* to assess production of endo- and exo-PG. Studies of scale-up were carried out in a fixed bed reactor operated under different parameters using the best producer strain immobilised in orange peels. Four experiments were conducted under the following conditions: the immobilised cells without aeration; immobilised cells with aeration; immobilised cells with aeration and added pectin; and free cells with aeration. The fermentation was performed for 168 h with removal of sample every 24 h. *Aspergillus niger* strain URM 5162 showed the highest PG production.