



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARA MUNIQUE FERRACIN

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS DO AGREGADO *ASPERGILLUS NIGER*
OBTIDOS DE FRUTAS SECAS**

Londrina
2007

LARA MUNIQUE FERRACIN

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS DO AGREGADO *ASPERGILLUS NIGER*
OBTIDOS DE FRUTAS SECAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Londrina
2007

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos
da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F368i Ferracin, Lara Munique.

Identificação e caracterização molecular de isolados do agregado *Aspergillus niger* obtidos de frutas secas / Lara Munique Ferracin. – Londrina, 2007.

77f. : il.

Orientador : Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2007.

Inclui bibliografia.

1. *Aspergillus niger* – Teses. 2. Ocratoxinas A– Teses. 3. Frutas secas – Teses. 4. Genética molecular – Teses. I. Fungaro, Maria Helena Pelegrinelli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Fundação Instituto Agrônomo do Paraná. IV. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Brasil). V. Título.

CDU 631.52:664.854

LARA MUNIQUE FERRACIN

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS DO AGREGADO *ASPERGILLUS NIGER*
OBTIDOS DE FRUTAS SECAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Helena P. Fungaro
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner
ESALQ/USP

Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de fevereiro de 2007.

DEDICO

Aos meus pais e irmãs por me apoiarem na busca pelos meus ideais.

OFEREÇO

À Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tornar possível esta conquista;

Aos meus pais, Nivaldo e Marissuze e às minhas irmãs, Ingryte Márjore, pelo sacrifício, amor, compreensão, confiança e apoio durante a realização deste trabalho;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, pelo profissionalismo e competência, dando-me exemplos de coragem e dedicação e pela confiança em meu trabalho;

Às professoras Dr^a. Aline Aparecida Pizzirani- Kleinere Dr^a. Márcia Cristina Furlaneto, pela disponibilidade de participar da banca examinadora;

À Ms. Daniele Sartorieao Prof^o. Dr^o. André Luiz Martinez de Oliveira, pela colaboração, e pelas sugestões e críticas durante o exame de qualificação;

À Dr^a. Marta Hiromi Taniwaki, e às Ms. Beatriz Thie Iamanaka e Marina Copetti do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas-SP, pelas colaborações;

Aos amigos do laboratório, Carla, Éber, Fram, Guga, Lígia, Luiz, Maria Elena, Márcia, Milla, Renan, Rosana, Yuldi, pelos momentos agradáveis e companheirismo, em especial à Dani, por todo o apoio, exemplo, incentivo e amizade;

Aos amigos do mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina; A todos os professores do programa de mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina;

À Prof^a. Dr^a Ilce Marade Syllos Cólus, pelo empenho e trabalho realizado na coordenação do programa de mestrado em Genética e Biologia Molecular;

À Maria Sueli Trindade Miranda, secretária do programa em Genética e Biologia Molecular, pelo carinho e dedicação;

À Universidade Estadual de Londrina, UEL, por contribuir na minha formação;

Por fim, à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,

Muito obrigada!

“Eu não me envergonho de corrigir meus erros e mudar as opiniões, porque não me envergonho de raciocinar e aprender”. (Alexandre Herculano)

FERRACIN, Lara Munique. **Identificação e Caracterização Molecular de fungos isolados do agregado *Aspergillus niger* obtidos de frutas secas**. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A ocratoxina A (OA) é uma micotoxina que vem sendo detectada em uma ampla variedade de produtos alimentares, incluindo frutas secas. Embora as frutas secas não sejam a principal fonte de OA de consumo humano, ações para evitar sua presença neste alimento poderiam diminuir a exposição humana a esta micotoxina. A OA foi descoberta como um metabólito secundário de linhagens de *Aspergillus ochraceus*, mas em seguida várias outras espécies de *Aspergillus* foram descritas como produtoras desta toxina. Atualmente, as espécies de *Aspergillus* negros (*Aspergillus* seção *Nigri*) têm sido descritas como as principais fontes de OA em frutas secas. Há poucas diferenças entre algumas espécies pertencentes à seção *Nigri* e a identificação destes fungos muitas vezes requer análises baseadas em DNA. De acordo com a proposta mais atual, 15 espécies são reconhecidas na seção *Nigri*: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. homomorphus*, *A. heteromorphus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. costaricensis*, *A. sclerotioniger*, *A. piperis*, *A. lacticoffeatus* e *A. vadensis*. As cinco últimas foram recentemente descritas como espécies novas. *A. nigersensu stricto*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis* são espécies morfologicamente idênticas se juntas são chamadas de “agregado *A. niger*”. O potencial das espécies do “agregado *A. niger*” em produzir OA é ainda incerto, provavelmente devido à dificuldade de identificação das espécies. Neste trabalho, foram analisadas por RAPD e seqüências de nucleotídeos do gene que codifica para a β -tubulina as relações genéticas de 51 isolados fúngicos, previamente identificados como “agregado *A. niger*”, obtidos de amostras de frutas secas (uva passa escura, tâmara, ameixa, e figo), originárias de diferentes países (Argentina, Chile, Iran, Turquia, Espanha, Tunísia, Estados Unidos e México). A maior diversidade fúngica foi encontrada em uvas passas. *Aspergillus niger* foi a espécie mais freqüente (69%). Esta espécie foi detectada em todos os substratos e todas as origens geográficas. *Aspergillus tubingensis* também foi freqüentemente encontrado em frutas secas (28%). Usando dados de RAPD e seqüências de nucleotídeos do gene da β -tubulina, *A. tubingensis* foi claramente subdividido em dois grupos (IA e IB). Um dos grupos (IA) foi formado por linhagens produtoras e não produtoras de OA, enquanto o subgrupo IB foi formado apenas por linhagens não produtoras. A descoberta de dois grupos de linhagens de *A. tubingensis* pode explicar a incongruência da literatura sobre a capacidade de *A. tubingensis* em produzir OA.

Palavras-chave: Agregado *aspergillus niger*. Ocratoxina A. Frutas secas. Fungos toxigênicos.

FERRACIN, Lara Munique. **Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate collected from dried fruit.** 2007. 76 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OA) is a mycotoxin that has been detected in a variety of food products, including dried fruits. Even though dried fruits are not the main font of OA in human consumption, actions to prevent its presence in dried fruits would decrease the human exposure to this toxin. OA was discovered as a secondary metabolite in *Aspergillus ochraceus* strains, but after this, several other *Aspergillus* species were described as OA producers. Nowadays, the black *Aspergilli* species (*Aspergillus* section *Nigri*) has been found as the main source of OA in dried fruits. There are minor differences between some species belonging to section *Nigri* and their identification requires DNA-based analyses. According to the most recently revision, 15 species are recognized in *Aspergillus* section *Nigri*, e.g. *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. homomorphus*, *A. heteromorphus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. costaricaensis*, *A. sclerotioniger*, *A. piperis*, *A. lacticoffeatus* and *A. vadensis*. The latter five were only recently described as a new species. *A. niger* sensu stricto, *A. tubingensis*, *A. foetidus* and *A. brasiliensis* are morphologically identical and altogether has been called as “*A. niger* aggregate”. With the exception of *A. niger* sensu stricto, the potential of species within the “*A. niger* aggregate” to produce ochratoxin A is uncertain, probably due to the difficulty of species identification. We analyzed by RAPD and β -tubulin sequences the genetic relationships among 51 fungal isolates, previously identified as “*A. niger* aggregate”, obtained from dried fruit samples (black sultana, plum, date and fig) from worldwide origin (Argentina, Chile, Iran, Turkey, Spain, Tunisia, USA and Mexico). Greater fungal diversity was found in black sultanas. *Aspergillus niger* was the most prevalent species (69%). It was found in all fruit substrates of all geographical origins. *Aspergillus tubingensis* was also frequently found (28%). By using RAPD and β -tubulin sequences data, *A. tubingensis* were clearly subdivided into two groups (IA and IB). One of them (IA) was formed by nonochratoxin-producing strains and ochratoxin-producing strains, while the other one (IB) was formed only by nonochratoxin-producing strains. The finding of two groups for *A. tubingensis* strains may explain the incongruence of the literature about the capability of *A. tubingensis* for OA production.

Keywords: *A. niger* aggregate. Ochratoxin A. Dried fruits. Toxigenic fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

- Figura 1** – Estrutura química da ocratoxina A (VAN der MERWE, et al. 1965)15

Artigo científico

- Figure 1** – Dendrogram of 29 isolates of *Aspergillus niger* aggregate based on cluster analysis with UPGMA method using Dice genetic similarity index on RAPD data obtained with three primer. The number of each node indicates the percentage bootstrap support (out of 1,000). Toxigenic and nontoxigenic strains are denoted (+) and (-), respectively54
- Figure 2** – RAPD profiles from 20 isolates of *Aspergillus tubingensis* using the 10-mer primer OPX-7. Isolates number are present above each lane. Molecular weight size markers (1kb ladder) are indicated by M. The isolates ITAL 442, ITAL 167, ITAL 108, ITAL 200, ITAL 97, ITAL 207 and ITAL 217 were obtained from coffee beans and the isolates ITAL 319, ITAL 332, ITAL 326, ITAL 263, ITAL 313, ITAL 503, ITAL 166, ITAL 354, ITAL 356, ITAL 363, ITAL 353, ITAL 460, ITAL 517 were obtained from dried fruits.....55

LISTA DE TABELA

Artigo científico

Table1 – Isolates of the “*Aspergillus niger* aggregate” analysed in this study.

Potential to produce ochratoxin A (OA) is indicated by + or -53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 ASPECTOS GERAIS DA OCRATOXINA A E ESPÉCIES PRODUTORAS	14
2.2 OCRATOXINA A EM FRUTAS SECAS	18
2.3 TAXONOMIA DE <i>Aspergillus</i> SECÇÃO <i>Nigri</i>	21
3 OBJETIVOS	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	29
4.2 OBTENÇÃO DO MICÉLIO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO	29
4.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO (RAPD)	29
4.4 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2.....	30
4.5 AMPLIFICAÇÃO DA PORÇÃO Bt1 DO GENE DA β -TUBULINA	30
4.6 AMPLIFICAÇÃO DA PORÇÃO Bt2 DO GENE DA β -TUBULINA	31
4.7 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-5,8 S-ITS2 do DNAr e porções Bt1 e Bt2 do gene da β -TUBULINA	31
4.8 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS	32
4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 ARTIGO: GENETIC RELATIONSHIPS AMONG STRAINS OF THE <i>Aspergillus niger</i> AGGREGATE COLLECTED FROM DRIED FRUIT SAMPLES OF WORLDWIDE ORIGIN, APRESENTADO NAS NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO RESEARCH IN MICROBIOLOGY	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO	68

1 INTRODUÇÃO

As frutas secas apresentam uma grande variedade de sabores e representam uma fonte concentrada de calorias, fibras, açúcar natural e alguns nutrientes. As frutas nesta forma têm grande prazo de validade e conseqüentemente possibilidade de consumo durante todo o ano. As ameixas, damascos, figos e uvas estão entre as frutas secas mais consumidas no mundo.

Mediante condições inapropriadas, o alto teor de açúcar das frutas secas favorece o crescimento de fungos, incluindo os micotoxigênicos. Dentre as micotoxinas presentes em frutas secas têm-se as pertencentes aos grupos das ocratoxinas e aflatoxinas.

A ocratoxina A (OA) tem recebido atenção especial devido ao seu caráter nefrotóxico, imunossupressor, carcinogênico e potencial teratogênico. Embora as frutas secas não sejam as principais fontes de OA de consumo humano, ações para evitar sua produção nestes produtos poderiam diminuir a exposição humana a esta micotoxina. Ainda que a contaminação de frutas secas com OA tenha sido evidenciada por diversos autores, poucos países apresentam legislação em relação ao controle da presença desta toxina nestes produtos. A Comunidade Européia elaborou recomendações do limite máximo permitido de ocratoxina na uva passa escura em 10 µg/Kg ou ppb. No Brasil, a maioria das frutas secas consumidas pela população é importada e não há normas que regularizam a entrada destes produtos no país.

Esta micotoxina foi descoberta como um metabólito secundário de linhagens de *Aspergillus ochraceus*, mas em seguida várias outras espécies de *Aspergillus* foram descritas como produtoras de OA. Atualmente, as espécies de *Aspergillus* negros (*Aspergillus* secção *Nigri*) têm sido descritas como as principais fontes de OA em frutas secas. Há poucas diferenças entre algumas espécies pertencentes à secção *Nigri* e a identificação destes fungos muitas vezes requer análises baseadas em DNA. De acordo com a proposta mais atual, 15 espécies são reconhecidas na secção *Nigri*: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. homomorphus*, *A. heteromorphus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. costaricensis*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. lacticoffeatus* e *A. vadensis*. As cinco últimas foram recentemente descritas como espécies novas.

Aspergillus niger sensu stricto, *A. tubingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis* são espécies morfológicamente idênticas e juntas são chamadas de “agregado *A. niger*”. O potencial das espécies do “agregado *A. niger*” em produzir OA é ainda incerto, provavelmente devido à dificuldade de identificação das espécies.

Este trabalho representa a primeira análise das relações genéticas de isolados fúngicos, previamente identificados como “agregado *A. niger*”, obtidos de amostras de frutas secas (uva passa, ameixa, tâmara e figo secos), comercializadas no Brasil e importadas de diferentes países.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA OCRATOXINA A E ESPÉCIES PRODUTORAS

Micotoxina é a denominação genérica atribuída a uma ampla gama de moléculas de baixo peso molecular provenientes do metabolismo secundário de fungos que são prejudiciais à saúde humana ou animal. As micotoxinas podem estar contidas no micélio fúngico, no interior dos esporos ou serem liberadas por fungos produtores em produtos destinados à alimentação. Este termo foi primeiramente noticiado em 1960, quando mais de cem mil perus morreram na Inglaterra devido a hemorragias e necroses no fígado causadas por rações à base de amendoim excessivamente infectadas com o fungo *Aspergillus flavus* (BLOUT, 1961; FORGACS; CARLL, 1962). O metabólito responsável por este surto foi denominado aflatoxina, do termo em inglês “*A. flavus* toxin”. Esse acontecimento despertou a atenção dos cientistas para o perigo e uma série de trabalhos científicos relacionados a metabólitos fúngicos foi publicada a partir desta data.

Atualmente, aproximadamente 300 diferentes micotoxinas já foram identificadas, mas dentre estas, apenas 20 micotoxinas produzidas por diferentes espécies, têm importância relevante para a saúde humana (GEISEN, 1998). Devido as micotoxinas terem uma diversidade de estruturas, que vão desde a presença de um único anel heterocíclico até oito anéis associados, os riscos à saúde humana são variáveis, podendo ser teratogênicas, imunossupressivas, nefrotóxicas, hepatotóxicas ou carcinogênicas. Ainda que as espécies de fungos micotoxigênicos sejam extremamente comuns, podendo crescer em um amplo campo de substratos e sob uma gama extensiva de condições ambientais, a importância das micotoxinas para a saúde humana não é facilmente avaliada, uma vez que seus efeitos são comumente sutis, porém cumulativos (BENNETT; KLICH, 2003).

Dentre os metabólitos fúngicos, a classe das micotoxinas é dividida em grupos relacionados quimicamente (COLE; COX, 1981). Os grupos principais que recebem atenção devido à potencialidade em contaminar produtos destinados à alimentação de animais e seres humanos são: as aflatoxinas, os tricotecenos, as fumonisinas, as zearalenonas e as ocratoxinas (GEISEN, 1998).

Quimicamente, as ocratoxinas são compostos que apresentam uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina por uma ligação amida. O grupo dessas toxinas divide-se em ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C. A ocratoxina A (OA) apresenta em sua estrutura uma molécula de cloro (Figura 1), tem estabilidade térmica e solubilidade em água. Em meio agar-coco e mediante luz ultravioleta a ocratoxina A apresenta-se com fluorescência azul. A ocratoxina B, apresenta fluorescência azulada em meio agar coco, e não revela toxicidade provavelmente devido à ausência de uma molécula de cloro. A ocratoxina C apresenta, em meio agar coco, fluorescência verde, e constitui um etil éster da ocratoxina A, sendo muito menos tóxica que a mesma (SCUSSEL, 1998).

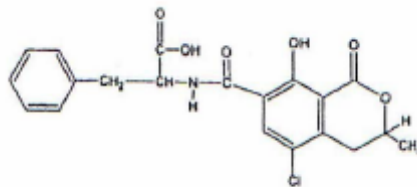


Figura 1 – Estrutura química da ocratoxina A (VAN der MERWE et al., 1965)

A OA tem recebido atenção especial devido ao seu caráter nefrotóxico, imunossupressor, carcinogênico e potencial teratogênico (PETZINGER; ZIEGLER, 2000). Esta micotoxina foi originalmente descrita como um produto do metabolismo secundário de uma linhagem de *Aspergillus ochraceus*, isolada na África do Sul (VAN der MERWE et al., 1965). Sabe-se que a OA é associada a várias nefropatias em animais, tais como a Nefropatia Suína na Dinamarca e a Nefropatia das Galinhas na Bulgária (PLESTINA, 1996; STOEV et al., 2001; VARGA et al., 2001). Especificamente em humanos, esta toxina é freqüentemente citada como relacionada à Nefropatia Endêmica dos Bálcãs (BEN), uma disfunção renal crônica degenerativa ocorrida em meados da década de 50, que acometeu grande parte de uma população adulta na região dos Bálcãs (KROGH et al., 1977). Esta relação foi sugerida após verificarem que a presença de OA em alimentos cultivados era mais freqüente na região onde a BEN era prevalente (BALZER et al., 1977; KROGH et al., 1977; PAVLOVIC et al., 1979; PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1985). Além disso, extensivas investigações epidemiológicas apontaram a ocratoxina A

como agente causal da BEN, quando as análises dos tumores desenvolvidos no trato urinário foram correlacionadas com a alta concentração desta micotoxina no sangue dos pacientes da região (PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1988).

Devido aos seus efeitos, a OA tem atraído nos últimos anos a atenção de autoridades de saúde, e é classificada pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC, 1993) como um possível carcinógeno humano do Grupo 2B.

Embora esta micotoxina tenha sido descrita originalmente a partir de linhagens de *Aspergillus ochraceus*, conforme já mencionado, em anos subsequentes, seis outras espécies de *Aspergillus* da secção *Circumdati* (grupo *A. ochraceus*) foram identificadas como produtoras de ocratoxina A: *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. ostianus*, *A. petrakii* e *A. sclerotiorum* (BETINA, 1984). Mais recentemente, *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae* pertencentes igualmente a esta secção foram descritas como produtoras desta micotoxina (FRISVAD et al., 2004). Em 1987, a produção de ocratoxina foi descrita para *Eurotium herbariorum*, um membro da secção *Aspergillus* (grupo *A. glaucus*) (CHELKOWSKI et al., 1987). Posteriormente, a produção de ocratoxina A por *Penicillium verrucosum* foi também relatada (PITT, 1991).

Em 1994, surpreendentemente, a capacidade de algumas linhagens de *Aspergillus niger* (secção *Nigri*) produzirem OA foi descrita (ABARCA et al., 1994). Dentre 19 isolados de *A. niger* var. *niger*, obtidos a partir de ração de aves e grãos de soja, dois deles produziram OA. Esta descoberta causou bastante preocupação porque o *A. niger* era uma das poucas espécies consideradas seguras para a saúde humana, e tem sido amplamente utilizada na indústria para a produção de ácidos orgânicos, enzimas e outras substâncias que são utilizadas na manufatura de produtos alimentares.

Além de *A. niger*, outras espécies representantes da secção *Nigri* também foram descritas como produtoras de OA. Em 1996, *A. carbonarius* (TÉREN et al., 1996) foi descrito como um potente produtor de OA e mais recentemente esta propriedade foi também descrita para as espécies *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger* (SAMSON et al., 2004). Para algumas espécies o potencial de produzir ocratoxina A ainda é controvertido na literatura. *Aspergillus tubingensis*, por exemplo, era uma espécie definida como não produtora desta toxina até então (SAMSON et al., 2004).

Porém, muito recentemente, Medina et al. (2005), relataram a produção de OA por isolados de *A. tubingensis* obtidos de uvas da Espanha em níveis que vão de 46,4 a 115,5 ng/mL. Ainda neste contexto, Perrone et al. (2006), ao analisarem a capacidade de *A. tubingensis*, isolados de uvas da Itália, em produzir OA, observaram que 25% dos isolados de *A. tubingensis* estudados, eram positivos para produção da toxina em quantidades que variavam de 4 a 130 ng/mL.

Assim como para *A. tubingensis*, outra espécie pertencente ao chamado “agregado *A. niger*”, *A. foetidus*, também apresenta controvérsia quanto à capacidade de produção de OA. Ueno et al. (1991) descreveram uma linhagem de *A. foetidus* (CBS 618.78) que é capaz de produzir OA. No entanto, segundo Samson et al. (2004) a linhagem CBS 618.78 é de fato *A. niger* e não *A. foetidus* conforme descrito previamente por Ueno (1991). Da mesma forma, a capacidade de produção de OA por *A. japonicus*, não tem uma definição esclarecida (DALCERO et al., 2002; BATTILANI et al., 2003).

Devido à ampla distribuição de fungos que a produz, a OA é distribuída mundialmente e é detectada em uma ampla variedade de substratos, como por exemplo, carnes de porco e aves (JORGENSEN, 1998), grãos de café verde, torrado, moído e solúvel (FURLANI et al., 1998; JORGENSEN, 1998; TANIWAKI et al., 2003; PARDO et al., 2004), cacau e derivados (MATISSEK e RATERS, 2000), pimenta do reino (THIRUMALA et al. 2000), uvas (BATTILANI; PIETRI, 2002; BELLÍ et al., 2004), frutas secas (MACDONALD et al., 1999; MAFF, 2002; ABARCA et al., 2003; IAMANAKA et al., 2005), cereais como, trigo, aveia, centeio, cevada e malte, em legumes, amendoins, e bebidas como leite, cerveja (SCOTT; KANHERE, 1995; JORGENSEN, 1998; NAKAJIMA et al., 1999; TRUCKESS et al., 1999; VISCONTI et al., 2001), sucos de uvas e mais recentemente, em vinhos (ZIMMERLI; DICK, 1996; BURDASPAL; LEGARDA, 1999; OTTENEDER; MAJERUS, 2001). Como muitos desses alimentos fazem parte da dieta normal das populações, a OA também tem sido detectada em fluidos biológicos como leite humano, plasma e sangue humano (CREPPY et al., 1995).

2.2 OCRATOXINA A EM FRUTAS SECAS

As frutas são alimentos que oferecem grande variedade de sabores, aromas e propriedades nutricionais. Compostas por água, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais, estes alimentos apresentam uma combinação singular de nutrientes, podendo ser comercializados de duas formas: *in natura* ou seco. A primeira é a forma natural que não sofreu modificação em sua estrutura, ao passo que a fruta seca é aquela em que a água é retirada por meio de processos tecnológicos. As frutas secas, ao contrário das frescas, representam uma fonte mais concentrada de calorias, fibras, açúcar natural e alguns nutrientes; além de terem um prazo de validade muito maior, já que a água, que é a responsável pelo crescimento de microrganismos que deterioram o alimento, é retirada. A possibilidade do consumo durante todo o ano e a praticidade de uso, são características que colaboram para viabilizar o consumo de frutas secas. Estes produtos podem ser facilmente exportados, porque se tem com o processo de desidratação uma drástica redução de volume e, além disso, nesta forma este alimento deixa de estar sujeito à lei de proteção de plantas dos países importadores. As ameixas, damascos, figos e uvas estão entre as frutas secas mais consumidas no mundo (RODRIGUES, 2006).

Países como Estados Unidos, Turquia, Chile, Argentina e Irã, são os que se destacam entre os principais produtores e exportadores de frutas secas. Os Estados Unidos produzem uvas passas e ameixas. Da mesma forma, a Turquia, o Chile e a Argentina, são importantes países produtores de uvas passas. A Turquia destaca-se também na produção de damascos e figos secos (JAUSORO, 2006). Já o Irã, apesar de ter um papel relevante na exportação de uvas passas, caracteriza-se como maior produtor de tâmaras e figos.

Apesar de estar entre os principais produtores mundiais de frutas frescas, o Brasil não se destaca na produção e comércio de frutas secas, uma vez que importa quase a totalidade destes produtos que são comercializados no país. O Brasil importa principalmente uvas passas e ameixas da Argentina e Chile, figos da Turquia e tâmaras do Irã. No ano de 2006, o país exportou ameixas secas e figos secos nos valores de US\$ 72.240,00 e US\$ 1.275,00, respectivamente, ao passo que, a importação destes produtos atingiu valores de US\$ 15.893.430,00 e US\$

673.369,00 (ALICE web, 2007). Em relação às uvas passas, o Brasil é totalmente dependente do mercado externo, apresentando um valor de US\$ 18.970,00 de importação deste produto no ano de 2004 (MELLO, 2004).

Mediante condições inapropriadas, o alto teor de açúcar das frutas secas favorece o crescimento de fungos, incluindo os micotoxigênicos que são capazes de produzir toxinas e contaminar o produto infectado. Segundo Valero et al. (2005), dentre os principais fatores que interferem na contaminação das frutas secas com micotoxinas se destacam a presença de espécies toxigênicas nas frutas, a variedade da fruta, a origem geográfica, as condições climáticas, o método de secagem e armazenamento.

Dentre as micotoxinas descritas como presentes em frutas secas têm-se as pertencentes aos grupos das ocratoxinas e aflatoxinas. Nesta revisão serão discutidos apenas os trabalhos que relatam a presença da ocratoxina A.

Estima-se que as frutas secas contribuem com aproximadamente 0,6 ng de ocratoxina A por Kg de peso corpóreo por semana (BENFORD et al. 2006). Embora este valor seja bastante inferior comparado à contribuição de outros alimentos, tais como cereais (25 ng/Kg de peso corpóreo por semana), vinho (8,3 ng/Kg de peso corpóreo por semana) e café (2,1 ng/Kg de peso corpóreo por semana), medidas que evitem a presença desta toxina em frutas secas é de grande relevância dado ao seu efeito cumulativo no organismo.

Em 1997, no Reino Unido, foram analisadas 20 amostras de frutas secas com relação à presença de ocratoxina A, incluindo damasco, groselha, uvas passas e tâmaras, provenientes da Turquia, Grécia, dentre outros países. Mais de 80% das amostras de groselhas e uvas passas foram positivas para a presença de OA, sendo que algumas excederam níveis de 10 µg/Kg. Somente uma amostra de tâmara estava contaminada por OA, contendo 0,2 µg/Kg, e nenhuma amostra de damasco estava contaminada com esta toxina (MAFF, 1997). Logo em seguida, os mesmos autores analisaram 301 amostras de frutas secas, que incluíam groselha e uvas passas. Detectou-se neste caso, contaminação em 95% delas, sendo 9% com níveis maiores de 10 µg/Kg (MAFF, 1998).

Um total de 61 amostras de uvas passas foi analisado quanto à presença de OA na Austrália. Segundo o autor cerca de 80% das amostras continham níveis detectáveis de OA. Cerca de 40% das amostras analisadas

apresentavam acima de 1 µg/Kg e outros 10% apresentavam níveis acima de 5 µg/Kg (PITT apud IAMANAKA, 2004).

Recentemente, mais de cem amostras de frutas secas foram examinadas por Iamanaka et al. (2005). Dentre as frutas analisadas encontravam-se tâmaras, ameixas, figos, uvas passas escuras e claras provenientes da Argentina, Tunísia, Turquia, Chile, Espanha, Irã e Estados Unidos. Dentre as analisadas, as uvas passas escuras apresentaram o maior índice de contaminação por OA. Nestas frutas, as de procedência chilena foram as que apresentaram maiores níveis da toxina (algumas amostras com níveis superiores a 13 µg/Kg). O nível médio de OA em uvas passas argentinas foi de 3 µg/Kg. Os figos secos ocuparam o segundo lugar quanto à contaminação por OA. Uma das amostras, por exemplo, apresentou 4,1µg/Kg de ocratoxina A. As frutas secas que não acusaram nenhuma contaminação por micotoxinas foram o damasco seco e a uva passa clara. Para ameixa seca contaminações por OA foram observadas, porém em níveis bastante reduzidos.

Ainda que a contaminação de frutas secas com OA tenha sido evidenciada por diversos autores, poucos países apresentam legislação em relação ao controle da presença desta toxina nestes produtos. A Comunidade Européia elaborou recomendações do limite máximo permitido de ocratoxina A na uva passa escura em 10 µg/Kg ou ppb (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002). No Brasil, a maioria das frutas secas consumidas pela população é importada e não há normas que regularizam a entrada destes produtos no país.

Atualmente, os aspergilos pretos, principalmente *Aspergillus carbonarius* e membros do “agregado *A. niger*” têm sido descritos como principais responsáveis pela contaminação de frutas secas com OA (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1999; ABARCA et al., 2003; MAGNOLI et al., 2004; IAMANAKA et al., 2005). É provável que os esporos negros proporcionem proteção à luz solar e radiação UV dando maior vantagem aos aspergilos pretos na competição neste substrato (PITT; HOCKING, 1997).

Cerca de 50 amostras de uvas passas da Espanha foram analisadas quanto à presença de fungos produtores de OA. Verificou-se que 98% e 58% das amostras se apresentaram contaminadas com *A. niger* e *A. carbonarius*, respectivamente. Dentre os isolados de *A. carbonarius*, 96,7% foram positivos para a

produção de OA e apenas uma cepa de *A. niger* foi ocratoxigênica (ABARCA et al., 2003).

Magnoli et al. (2004) ao estudarem a microbiota de 50 amostras de uvas passas da Argentina observaram contaminações por espécies de *Aspergillus* secção Nigri. Entre 9 gêneros identificados, o gênero *Aspergillus* foi predominante. A espécie *A. niger* foi a mais freqüentemente encontrada. Quanto à presença de OA, a análise revelou a presença da mesma em 74% das amostras estudadas, sendo que em 28% havia contaminação por *Aspergillus* da secção Nigri.

Um trabalho realizado por Iamanaka et al. (2005), revelou que as uvas passas podem apresentar alta incidência de fungos e ocratoxina A. Dentre os *Aspergillus* com potencial para a produção de OA, os mais freqüentes foram pertencentes ao “agregado *A. niger*” (94%). Dentre estes fungos caracterizados como pertencentes ao “agregado *A. niger*”, 34% foram capazes de produzir a OA in vitro.

Finalizando, fica evidente que a presença de micotoxinas em alimentos não é remota e que os *Aspergillus* da secção Nigri são os principais responsáveis pela contaminação das frutas secas. A descrição da capacidade ocratoxigênica do “agregado *A. niger*” tem causado grande preocupação na comunidade científica, em função de que estes têm uma distribuição muito ampla.

2.3 TAXONOMIA DE ASPERGILLUS SECÇÃO NIGRI

Membros da secção Nigri são distribuídos mundialmente e crescem em uma vasta variedade de substratos. Várias espécies desta secção são utilizadas na indústria de fermentação para a produção de diferentes ácidos orgânicos e enzimas hidrolíticas. Fungos desta secção se caracterizam por apresentar conídios de coloração marrom-escuros a negros, com estruturas dos conidióforos uniseriadas ou biseriadas, vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice (KLICH; PITT, 1988). *Aspergillus niger* é a espécie desta secção reportada mais freqüentemente, possui “status” GRAS (“Generally Regarded as Safe”) pela “Food And Drug Administration” e é amplamente utilizada em processos biotecnológicos (BIGELIS; LASURE, 1987).

A taxonomia da secção Nigri ainda não está totalmente esclarecida, provavelmente porque durante muitos anos a classificação foi essencialmente baseada em critérios morfológicos e, em alguns casos, as diferenças entre as espécies são muito sutis. A taxonomia dos fungos pertencentes à secção Nigri se constitui em uma das mais complexas e confusas do gênero. Em decorrência disso, muito freqüentemente todos os isolados de *Aspergillus* que desenvolvem colônias de coloração negra são identificadas como *A. niger*.

Dentre os caracteres morfológicos utilizados para a classificação de fungos desta secção, destacam-se forma e ornamentação conidiais, tamanho dos conídios, estruturas dos conidióforos, coloração das colônias e taxa de crescimento em meios de cultura característicos (RAPER; FENNEL, 1965).

Em 1965, Raper e Fennell publicaram um manual que reunia 12 espécies e 2 variedades dentro da secção Nigri: *A. niger*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*, *A. ficuum*, *A. tubingensis*, *A. phoenicis*, *A. pulverulentus*, *A. awamori*, *A. foetidus* var. *pallidus* e *A. foetidus* var. *acidus*. Em 1980, Al-Musallam revisou a taxonomia desta secção e dividiu os *Aspergillus* negros em 5 espécies que são facilmente distinguíveis entre si: *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. helicothrix* e *A. japonicus*, além de um agregado denominado “agregado *A. niger*”, formado por duas espécies: *A. foetidus* e *A. niger*, sendo esta última espécie dividida por sua vez, em 6 variedades e 2 formas. Klich e Pitt (1988) aceitaram em seu manual, as modificações propostas por Al-Musallam.

Kozakiewicz em 1989 se baseou em ornamentação de conídios e recomendou alterações na taxonomia da secção Nigri, sugerindo agora 16 taxa. Em uma revisão formulada por Abarca et al. (2004) tem-se uma tabela que ilustra as variações das espécies aceitas entre os diferentes autores mencionados acima. Há de se ressaltar, no entanto, que em todas as classificações propostas para a secção Nigri, a delimitação de alguns taxa é problemática devido a pequenas diferenças em caracteres variáveis.

Conforme já mencionado, os fungos da secção Nigri são freqüentemente utilizados pela indústria de alimentos para a produção de enzimas, ácidos orgânicos e preparação de comidas orientais (CAMPBELL et al., 1989). Após *A. niger* ter sido descrito como produtor de ocratoxina A por Abarca et al. (1994), a correta identificação das espécies desta secção passou a ser necessidade

preponderante. Esta necessidade induziu a realização de uma série de estudos baseados em marcadores de DNA com a finalidade de esclarecer a confusa taxonomia da secção Nigri.

As espécies da secção Nigri podem ser uniseriadas ou biseriadas (RAPER; FENNEL, 1965). Dentre as uniseriadas Raper e Fennell (1965) reconheceram duas espécies: *A. japonicus* e *A. aculeatus*. No entanto, *A. aculeatus* foi reduzida a uma variedade de *A. japonicus* por Al-Musallam. Kozakiewicz (1989) manteve as duas espécies separadas, porém *A. aculeatus* se tornou sinônimo de *A. atroviolaceus*. Kusters-van Somerem et al. (1991) demonstraram que os padrões de DNAr de *A. japonicus* e *A. aculeatus*, digerido com Smal, eram praticamente idênticos. No entanto, Mégnégneau et al. (1993) e Visser et al. (1996) puderam distinguir estas espécies digerindo o DNAr com EcoRI e PstI-Sall. Hamari et al. (1997), descreveram que Smal, EcoRI e PstI-Sall não apresentam padrões diferentes quando da digestão de DNAr, mas estes autores puderam defender a separação destas espécies através de RFLP de DNAm. Baseados em RFLPs e considerando as enzimas de restrição utilizadas, Parenicová et al. (1997; 2000) puderam distinguir os referidos taxa. Yokohama et al. (2001) concluíram que *A. japonicus* e *A. aculeatus*, pertencem a uma mesma espécie uma vez que apresentaram a mesma seqüência de aminoácidos a partir do seqüenciamento do gene mitocondrial do citocromo b. Por fim, Klich (2002) descreve em seu Manual de Taxonomia de *Aspergillus*, apenas *A. japonicus* e refere-se que o "status" de *A. aculeatus* está em discussão.

Das espécies biseriadas da secção Nigri, *A. carbonarius* é a mais distinta da secção. É reconhecida facilmente através da ornamentação e tamanho de seus conídios, geralmente com 7 a 9 µm de diâmetro (RAPER; FENNEL, 1965). Além disso, seus conídios são multinucleados com 5 a 12 núcleos (KEVEI et al. 1996). Técnicas como RFLP de DNAr, DNAm e análises de RAPD, possibilitam diferenciar claramente *A. carbonarius* dos demais aspergilos pretos (KUSTERS-VAN SOMEREM et al., 1991; MÉGNÉGNEAU et al., 1993; KEVEI et al., 1996; PARENICOVÁ et al., 2000, 2001; VARGA et al., 2000). Parenicová et al. (2000), separaram facilmente *A. carbonarius* de outras espécies de *Aspergillus* que produzem esporos negros através de seqüências de nucleotídeos de DNAr, visto que de 18 a 51 diferenças entre pares de bases, separam *A. carbonarius* dos demais taxa.

Sobre o chamado “agregado *A. niger*”, os taxa nele inclusos são extremamente difíceis de serem distinguidos com base nos dados de morfologia, uma vez que as diferenças entre as espécies e variedades, indicadas nas várias classificações sugeridas, são extremamente sutis. O número de taxa proposto para o “agregado *A. niger*” varia entre os autores. Al-Musallam (1980) sugeriu o termo “agregado *A. niger*” para albergar as espécies *A. foetidus* e *A. niger*. Esta última seria composta por seis variedades e duas formas (*A. niger* var. *niger*, *A. niger* var. *niger* f. *hennebergii*, *A. niger* var. *phoenicis* f. *pulverulentus*, *A. niger* var. *awamori*, *A. niger* var. *usamii*, *A. niger* var. *intermediarius*), definidas com base nas análises de características morfológicas e culturais. Kozakiewicz (1989) apresentou uma nova proposta para o “agregado *A. niger*”, baseando-se na observação da ornamentação conidial através de microscopia eletrônica de varredura, descrevendo dois padrões básicos de ornamentações: verrugosos e equinulados. A autora descartou a classificação de Al-Musallam e sugeriu, assim, a divisão do agregado em três espécies: *A. acidus*, *A. niger*, por sua vez subdividida em seis variedades (*A. niger* var. *niger*, *A. niger* var. *tubingensis*, *A. niger* var. *phoenicis*, *A. niger* var. *pulverulentus*, *A. niger* var. *awamori* e *A. niger* var. *ficuum*) e *A. citricus*, também subdividida em variedades (*A. citricus* var. *acidus* e *A. citricus* var. *pallidus*).

Kusters-van Someren et al. (1991) colaboraram com o esclarecimento da taxonomia do “agregado *A. niger*”. Estes autores analisaram os perfis de PCR-RFLP de DNAr de 23 isolados de *A. niger* e observaram 2 padrões distintos com a enzima de restrição *Sma*I. Os autores propuseram que os perfis obtidos caracterizassem espécies, denominadas *A. niger* e *A. tubingensis*. Desta forma, *A. tubingensis* considerado como variedade de *A. niger* recebeu “status” de espécie do “agregado *A. niger*”. Estes dados posteriormente foram confirmados por Mégnégneau et al. (1993). Analisando fungos do “agregado *A. niger*” através de perfis de RFLP, Varga et al. (1994) confirmaram os perfis encontrados pelos dois autores mencionados acima e descreveram um terceiro perfil. Este último perfil descrito por Varga et al. (1994) foi encontrado para 6 linhagens isoladas de solos brasileiros. Este isolado poderia ser uma variedade de *A. niger* ou uma nova espécie do “agregado *A. niger*”. Temporariamente estas linhagens foram denominadas *A. brasiliensis*. Parenicová et al. (1997) ao estudarem 27 linhagens do “agregado *A. niger*”, descreveram um novo perfil de DNAr-RFLP obtido com *Pst*I-Sall que está representando a linhagem tipo de *A. foetidus*. Conseqüentemente propuseram uma

nova subdivisão para o “agregado *A. niger*” em 3 taxa morfológicamente idênticos: *A. niger*, *A. tubingensis* e *A. foetidus*. Em trabalho posterior, Parenicová et al. (2001) propôs a divisão do “agregado *A. niger*” em quatro espécies morfológicamente idênticas, denominadas *A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis* e *A. brasiliensis*.

Accensi et al. (1999), seqüenciaram a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr de cepas de *A. niger* e *A. tubingensis*. Embora as seqüências fossem similares, os autores encontraram uma região alvo para a enzima de restrição RsaI na posição 75 da seqüência de *A. niger* e a sua ausência na seqüência de *A. tubingensis*. Deste modo, dois padrões de RFLP foram descritos (N e T). No padrão N (que apresentava dois fragmentos, um de 519 e outro de 76 bp), agruparam-se isolados com o mesmo padrão que *A. niger*, enquanto para o padrão T (o qual mantinha o perfil com um fragmento de 595bp), agrupavam-se isolados com padrão igual a *A. tubingensis*. Pode ser observado também que *A. foetidus* apresentou perfil de restrição com RsaI tipo T, ao passo que o isolado *A. brasiliensis* mostrou padrão N. Em estudo posterior, Accensi et al. (2001) analisaram os padrões de RFLP de 92 isolados do “agregado *A. niger*” e também a capacidade ocratoxigênica dos mesmos, sendo que 44 isolados foram classificados como tipo N e 48 como tipo T. A análise da capacidade de produzir OA permitiu a conclusão de que todos os isolados positivos para produção da toxina apresentavam padrão de RFLP do tipo N.

De acordo com a revisão de Abarca et al. (2004) a análise de seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 das espécies propostas para o “agregado *A. niger*” mostra um pequeno número de variações pontuais entre as espécies. Somente três nucleotídeos diferenciam *A. niger* de *A. tubingensis*. *Aspergillus foetidus* e *A. tubingensis* são separados por apenas dois nucleotídeos, ao passo que cinco foram as diferenças entre *A. niger* e *A. foetidus*.

Ainda dentre as espécies de *Aspergillus* da secção Nigri biseriadas, *A. helicorhix*, *A. ellipticus* e *A. heteromorphus* são espécies incomuns, pois existe apenas um isolado de cada espécie no órgão “International Culture Collections”. *Aspergillus helicorhix* apresenta como características, produção de esclerócios de tamanhos grandes e coloração marrom; *A. ellipticus* tem conídios elipsoidais e notavelmente equinulados (AL-MUSALLAM apud ABARCA et al. 2004) e *A. heteromorphus* apresenta descrições de características muito variáveis (ABARCA et al. 2004). Kusters-van Somerem et al. (1991) consideram *A. heteromorphus* como mutante de *A. ellipticus*. Parenicová et al. (2000) relatam que seqüências de

nucleotídeos das regiões ITS de *A. ellipticus* e *A. heteromorphus* são altamente relacionados, apresentando apenas seis nucleotídeos diferentes.

Baseando-se em análises filogenéticas de dados moleculares e em características morfológicas e culturais, Varga et al. (2003) sugeriram que à secção Nigri pertencem as espécies: *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis*. Uma vez que *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis* são morfologicamente indistinguíveis, estas quatro espécies pertencem ao “agregado *A. niger*”. As espécies *A. awamori*, *A. usarii*, *A. phoenicis* e *A. ficuum* foram consideradas sinônimos.

Um importante trabalho publicado recentemente por Samson et al. (2004) sugere 15 taxa para a secção Nigri: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger* e *A. vadensis*. Estes autores sugeriram pela primeira vez as novas espécies *A. costaricensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*. Embora já relatado no trabalho de Samson et al. (2004), a descrição de *A. vadensis* como uma nova espécie pertencente à secção Nigri foi mérito de De Vries e colaboradores, os quais publicaram sua proposta apenas em 2005 (De VRIES et al., 2005). Dados moleculares das seqüências de nucleotídeos das regiões ITS e β -tubulina mostram que *A. vadensis* é altamente similar às espécies, *A. tubingensis* e *A. foetidus*. No caso de *A. lacticoffeatus*, a similaridade com *A. niger* é muito alta, uma vez que estas espécies compartilham seqüências iguais do gene da β -tubulina, capacidade de produzir ocratoxina A, piranonigrinas, cotaninas e esclerócios. Apesar disso, estas duas espécies podem ser diferenciadas através da coloração da colônia em meio de cultura YES, uma vez que *A. lacticoffeatus* possui coloração amarelo mais forte que *A. niger* (SAMSON et al., 2004).

Após o trabalho de Samson et al. (2004), uma outra espécie da secção Nigri foi descrita por Serra et al. (2006). *Aspergillus ibericus* foi isolado de uvas e/ou frutas secas da Espanha e Portugal. Os autores relatam que isolados desta espécie, embora não produzam quantidades detectáveis de OA, se assemelham morfologicamente a *A. carbonarius*. Esta espécie possui características morfológicas que permitem distingui-la de outras espécies da secção Nigri, particularmente em relação ao tamanho dos conídios (5 a 7 μ m). A confirmação deste novo taxon é suportada com base em análises de seqüências de nucleotídeos

da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr e parte do gene da calmodulina, além da análise de padrões gerados pela técnica de AFLP (Análise de Polimorfismo de Fragmentos Amplificados).

Para concluir, a taxonomia e o potencial de produção de ocratoxina A dos fungos pertencentes à secção Nigri ainda está em discussão. Nesta dissertação aceitaremos todas as espécies descritas por Samson et al. (2004), ou seja, *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. piperis*, *A. sclerotium* e *A. vadensis*, além de *A. ibericus* descrito mais recentemente por Serra et al. (2006).

3 OBJETIVOS

Esta dissertação teve como objetivo identificar e caracterizar isolados fúngicos pertencentes ao “agregado *A. niger*” obtidos de frutas secas, utilizando técnicas moleculares de RAPD e seqüenciamento de nucleotídeos das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr e do gene que codifica para a β -tubulina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para a caracterização molecular, foram analisados 51 isolados de *Aspergillus* inicialmente identificados como pertencentes ao “agregado *A. niger*”, fornecidos pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, SP. Estes isolados foram obtidos de frutas secas (uva passa escura, tâmara, ameixa e figo) provenientes da Argentina, Chile, Espanha, Estados Unidos, Irã, México, Tunísia e Turquia e comercializadas no Brasil.

4.2 OBTENÇÃO DE MICÉLIO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para cada isolado foi obtida uma suspensão de aproximadamente 10^7 conídios por mL de “Tween 80”. Um mL desta solução foi inoculado em 50 mL de meio completo líquido (PONTECORVO et al., 1953). Após a preparação do inóculo, a cultura foi incubada sob agitação de 180 rpm a 28 °C durante 24 horas. O micélio foi coletado por filtração e lavado em água destilada esterilizada para retirada de resíduos do meio de cultura. O peso úmido do micélio foi determinado, e este foi utilizado para o processo de extração de DNA conforme descrito por Azevedo et al. (2000). O DNA extraído foi quantificado utilizando-se de fluorímetro “DyNA Quant 200” (Hoefer) e solução padrão de dosagem (Hoescht dye H33258).

4.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO (RAPD)

Para a análise de RAPD cerca de 5 ng de DNA genômico foram utilizados nas reações de ampliações conforme descrito por Fungaro et al. (1996).

Controles negativo foram realizados substituindo-se o DNA genômico por água. As reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) Após o processo de amplificação, os produtos de RAPD foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4%, em tampão TBE (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os géis foram corados com brometo de etídio 1 µg/mL e fotografados em fotodocumentador Digi Doc.

Os dados de RAPD foram analisados com o auxílio do programa de NTSYS.PC (“Numerical Taxonomy System”, Applied Biostatistics, Setauket, NY) (ROHLF, 1987), fazendo-se uso do coeficiente de similaridade de DICE (1945). A construção do dendrograma foi feita através do método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method With Arithmetical Averages”).

4.4 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2

O DNA de onze isolados (ITAL 177, ITAL 263, ITAL 326, ITAL 331, ITAL 353, ITAL 403, ITAL 425, ITAL 460, ITAL 461, ITAL 490, ITAL 528) foi submetido à amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2. Os *primers* ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') descritos por White et al. (1990) foram utilizados nas reações de amplificação. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando-se a temperatura de “anelamento” de 58°C. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a reações de seqüenciamento.

4.5 AMPLIFICAÇÃO DA PORÇÃO Bt1 DO GENE DA B-TUBULINA

O DNA de quinze isolados (ITAL 150, ITAL 152, ITAL 177, ITAL 249, ITAL 263, ITAL 326, ITAL 331, ITAL 353, ITAL 402, ITAL 403, ITAL 425, ITAL 426, ITAL 460, ITAL 490, ITAL 528) foi submetido à amplificação da porção Bt1 do gene que codifica para a β-tubulina. Os *primers* Bt1a (5' TCC CCC CGT CTC CAC TTC TTC ATG 3') e Bt1b (5' GAC GAG ATC GTT CAT GTT GAA CTC 3') descritos por

Glass e Donaldson (1995) foram utilizados nas reações de amplificação. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando-se a temperatura de “anelamento” de 58°C. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a reações de seqüenciamento.

4.6 AMPLIFICAÇÃO DA PORÇÃO BT2 DO GENE DA B-TUBULINA

O DNA de quinze isolados (ITAL 166, ITAL 177, ITAL 263, ITAL 277, ITAL 313, ITAL 319, ITAL 326, ITAL 331, ITAL 353, ITAL 403, ITAL 425, ITAL 460, ITAL 461, ITAL 490, ITAL 528) foi submetido à amplificação da porção Bt2 do gene que codifica para a β -tubulina. Os primers Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') descritos por Glass e Donaldson (1995) foram utilizados nas reações de amplificação. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando-se a temperatura de “anelamento” de 64°C. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a reações de seqüenciamento.

4.7 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO DNAR E PORÇÕES BT1 E BT2 DO GENE DA B-TUBULINA

Os produtos da PCR foram seqüenciados através do método de Sanger et al. (1977) utilizando-se dos mesmos primers já descritos para a obtenção dos respectivos fragmentos. As reações foram feitas em um volume final de 10 μ l, contendo 2,0 μ l de DNA da amostra (5 ng/ μ l), 2,0 μ l de (3 pM/ μ l) e 4,0 μ l do kit “DYEnamic ET dye terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences) e 2,0 μ l de água ultrapura. Estas foram submetidas a um termociclador “Mastercycler gradient” (Eppendorf), previamente programado para 35 ciclos de três etapas: desnaturação (95 °C, 20 seg.), anelamento (55 °C, 15 seg.) e extensão (60 °C, 1 min). Após a amplificação, a precipitação foi realizada com 65 μ l de etanol 96% e 2 μ l de acetato de amônio 7,5 M. O DNA foi ressuspenso em 10 μ l de água ultrapura,

e em seguida submetido à eletroforese em seqüenciador do tipo “MegaBace™ 1000 Molecular Dynamics” (Amersham Biosciences). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 60 segundos. A condição de eletroforese foi de 6 Kv por 230 minutos.

4.8 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS

A qualidade das seqüências foi analisada com auxílio do pacote computacional “Phred/Phrap/Consed”. As seqüências obtidas foram alinhadas usando o “software” BioEdit versão 1.6.6 (HALL, 1999) e comparadas com aquelas depositadas no “Banco de Dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia” (NCBI), com o auxílio da ferramenta “BLAST Search” (ALTSCHUL et al., 1990). A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa “ClustalW multiple-sequence alignment”, versão 1.6 (THOMPSON et al., 1994).

4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

Para a avaliação da capacidade de produção da ocratoxina A os isolados foram inoculados em três pontos da placa contendo o meio de cultura Yeast Extract Sucrose Agar (YES agar) e incubados a 25°C por 7 dias. Três “plugs” de agar foram removidos do centro da colônia, pesados e introduzidos em um pequeno tubo. Um volume de 0,5 mL de metanol foi adicionado ao tubo. Após 60 min, os extratos foram filtrados (Millex-Millipore). A quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi realizada no equipamento Shimadzu LC-10VP, com detector de fluorescência RF-10AXL, bomba LC10A-VP (sistema isocrático) e injetor automático SIL – 10ADVP. Coluna Shimadzu CLC ODS 4,6 x 250 mm e coluna guarda Shimadzu Shimpack CLC G-ODS (4) 4,0 x 10mm. Forno da coluna CTO 10ASVP com temperatura de 25°C, comprimento de onda de excitação à 333nm e comprimento de onda de emissão à 477nm como condições cromatográficas, tendo como fase móvel metanol:acetoneitrila:água:ácido acético (35:35:19:10) e fluxo de

0,8mL/min. Uma ocratoxina A padrão (Sigma) foi usada para construir uma curva com 5 pontos de calibração, área do pico versus massa (ng). A concentração da OA no extrato de cada amostra foi determinada pela interpolação da área do pico obtido com o gráfico de calibração. Estas análises foram realizadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos, mediante colaboração com a Dra. Marta Hiromi Taniwaki.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para identificação e caracterização molecular de isolados fúngicos do “agregado *A. niger*” obtidos de frutas secas, serão apresentados no artigo “Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate collected from dried fruit samples of worldwide origin”, nas normas de publicação do periódico *Research in Microbiology* na secção brief notes (Anexo).

5.1 ARTIGO

**Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate
collected from dried fruit samples of worldwide origin**

Este artigo apresenta-se nas normas de publicação do periódico Research in Microbiology na secção brief notes.

**Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate
collected from dried fruit samples of worldwide origin**

Lara Munique Ferracin^a, Maria Elena Schapovaloff^a, Daniele Sartori^a, Marta Hiromi Taniwaki^b, Beatriz Thie Iamanaka^b, Ligia Uno Lunardi^a, Maria Helena Pelegrinelli Fungaro^{a,*}.

^aUniversidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, P. O. Box 6001, CEP 86051-990, Londrina, Brazil

^bInstituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas, Brazil

*Author for correspondence. E-mail: fungaro@uel.br

Abstract

The presence of ochratoxin A in dried fruits may be due to contamination by strains belonging to the *A. niger* species aggregate. We analyzed the genetic relationships among several isolates recognized as *A. niger* aggregate obtained from dried fruit samples from worldwide origin. *Aspergillus niger* sensu stricto was the most prevalent species. It was found in all fruit substrates of all geographical origins. *A. tubingensis* isolates, that were also frequently found, were subdivided into two groups. One of them was formed by nonochratoxin-producing strains and ochratoxin-producing strains, while the other one was formed only by nonochratoxin-producing strains. This finding may explain the incongruence of the literature about the capability of *A. tubingensis* for OA production.

Keywords: *A. niger* aggregate; ochratoxin A; dried fruits; toxigenic fungi

1. Introduction

Ochratoxin A (OA) is a mycotoxin that has been detected in a variety of food products. Human exposure to this mycotoxin should be avoided or kept to minimal concentration because it has nephrotoxic effects and carcinogenic activity. Several authors reported the presence of OA in dried fruit samples exceeding $10\mu\text{g kg}^{-1}$, which is the maximum limit recommended by the European Union for this kind of substrate [1,7,8].

The black Aspergilli species (*Aspergillus* section *Nigri*) are the main source of OA in dried fruits [1,3,7,9]. Because there are minor differences between some species belonging to section *Nigri* the identification of some of them requires DNA-based analyses. The species *A. niger* sensu stricto, *A. tubingensis*, *A. foetidus* and *A. brasiliensis* are morphologically identical and altogether has been called *A. niger* aggregate [11].

With the exception of *A. niger* sensu stricto, the potential of species within the *A. niger* aggregate to produce ochratoxin A is uncertain, probably due to the difficulty of species identification. For instance, Ueno et al. [17] described an *A. foetidus* strain (CBS 618.78) that was able to produce OA. Very recently, two research groups found OA-producers isolates of *A. tubingensis* [10, 12]. Nevertheless, according to Samson et al. [14], no strains of *A. tubingensis* and *A. foetidus* sensu stricto produce OA, and CBS 618.78 was in fact *A. niger* but not *A. foetidus*.

Our group performed an extensive work searching for the presence of toxigenic fungi in dried fruits from worldwide origin. *A. niger* aggregate was found as the most common species [7]. In the present study, we analyzed by RAPD and β -tubulin sequences, the genetic relationships among fungal isolates collected from

black sultana, dates, figs and plums with the aim of enlightening the taxonomical position of the isolates previously identified as belonging to the *A. niger* aggregate.

2. Material and Methods

2.1. Strains

A total of 51 isolates, previously identified by morphological data as *A. niger* aggregate, obtained from dried fruit was analysed (Table 1). The dried fruit samples from worldwide origin (Argentina, Chile, Iran, Turkey, Spain, Tunisia, USA and Mexico) were purchased from different markets in Campinas and São Paulo, as described by Iamanaka et al [7]. Another 07 *A. tubingensis* strains, isolated from Brazilian coffee beans, were used to confirm the subdivision of this species in two groups.

2.2. Genomic DNA extraction

Mycelium recovered from the culture fluid by filtration was pulverized to a fine powder under LN in a mortar. Ca. 400 mg of the ground mycelium was suspended in 800 μ L of lysis buffer (200 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1% wv⁻¹ SDS) and maintained at 65°C for 20 min. The DNA was purified in phenol: chloroform (25:24) and chloroform: isoamyl alcohol (24:1), precipitated in a 3M NaCl solution in the presence of 98% ethanol, then washed with 70% ethanol, and resuspended in ultrapure water.

2.3. PCR and sequencing:

Amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 region was performed using ITS1 and ITS4 as forward and reverse primers, respectively [18]. Two portions of the β -tubulin gene were amplified using the primer-pairs Bt1 and Bt2, as described by Glass & Donaldson [5]. Amplifications were performed in a Thermocycler (PTC 100, MJ Research). PCR products were directly sequenced in both forward and reverse directions in a MegaBACE TM 1000 sequencer (Amersham Biosciences). The quality of the sequences was examined using Phred/Phrap/Consed package. The sequences were aligned using the software BioEdit version 1.6.6 [6]. Phylogenetic analyses were performed by ClustalW multiple-sequence alignment program, version 1.6 [16].

2.4. RAPD analysis

DNA amplifications were carried out by using random primers (QIAGEN-Operon) in a PTC-100 thermocycler (MJ Research, Inc.) according to Fungaro et al. [4]. Each isolate was scored for the presence or absence of DNA bands. An UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) cluster based on the similarity Dice index [15] was generated using the NTSYS (Numerical Taxonomy System, Applied Biostatistics) computer application software [13].

2.5. Characterization of OA-producing isolates

The isolates were three point inoculated into Yeast Extract Sucrose Agar (YES agar) and incubated at 25°C for 7 days. Three agar plugs were removed from the central area of the colony, weighted and introduced into a small vial. A volume of 0.5 mL of methanol was added to the vial. After 60 min., the extracts were filtered (Millex-Millipore) and injected into the HPLC (Shimadzu 10VP system). The system has a fluorescence detector, set at 333 nm excitation and 477 nm emission. The HPLC was fitted with a Shimadzu CLC G-ODS (4 x 10 mm) guard column and Shimadzu Shimpack CLC-ODS (4.6 x 250 mm) column. The mobile phase was methanol: acetonitrile: water: acetic acid (35:35:29:10) and the flow rate was 0.8mL/min. An ochratoxin A standard (Sigma) was used for the construction of the 5-point calibration curve, peak areas versus mass (ng). The OA concentration in the sample extract was determined by interpolation of resulting peak areas from the calibration graph.

3. Results and Discussion

Firstly, a total of 51 isolates from the *A. niger* aggregate collected from dried fruit samples e.g. black sultana, dates, figs, plums in different countries were analyzed (Table 1) by the RAPD technique. As distinct RAPD profiles were observed, a sample of 29 isolates was selected and re-analyzed by using more three random primers (profiles not shown) for genetic relationships analyses. The 29 isolates were divided into four major groups (I, II, III, IV) supported by high bootstrap values. As shown in Fig. 1, the clustering was not related to fruit type or country origin.

Greater fungal diversity was found in black sultanas. The 18 isolates from this substrate spanned in all four groups. The isolates collected from plums, dates, and figs spanned into two, three, and one group, respectively. Group III accommodated the majority of the isolates (69%). Only one group (II) did not comprise toxigenic strains. In the other three, toxigenic and nontoxigenic strains were found.

Strains from each of the RAPD-groups were submitted to sequencing analysis of a portion of the β -tubulin gene (β -tub2) for species identification. Moreover, details on the relationships among the *A. niger* aggregate isolates were of interested. Altogether, 430 nucleotides were involved in the analysis. In summary, good consensus was found between RAPD and β -tub2 sequences data.

The isolates from RAPD group I were recognized as *A. tubingensis*, which were clearly subdivided into two subgroups IA and IB. Three single nucleotide polymorphisms discriminated the two groups of *A. tubingensis*: one deletion (T) at position 290 and two substitutions at position 48 (A instead G) and 63 (T instead G). Interestingly, the subgroup IA was formed by nonochratoxin-producing strains and ochratoxin-producing strains (ITAL 313, ITAL 356 and ITAL 353), while the subgroup

IB was formed only by nonochratoxin-producing strains. According to the literature, the potential of *A. tubingensis* to produce OA is uncertain, probably due to the difficulty of species identification. Accensi et al. [2] evaluated 48 *A. tubingensis* strains (termed as *A. niger* type T) for OA production and described this species as non-producer. Analyzing grape samples, Medina et al. [10] reported that 55% of the isolates recognized as *A. niger* aggregate were in fact *A. tubingensis*; conversely to Accensi results, 14% of them were positive for OA production. Perrone et al. [2006] published similar results, as five out of 20 *A. tubingensis* strains collected from grape berries were OA-producers. It is interesting to state that in our work the potential of *A. tubingensis* strains ITAL 313, ITAL 356 and ITAL 353 as OA-producers was repeatedly confirmed.

In our case, out of 14 *A. tubingensis* strains three were OA-producers, all included into group IA. Due to the small number of strains (5) that were clustered into subgroup IB, and their homogeneity concerning substrate and country origin (date from Spain), we extended our analysis to include several other *A. tubingensis* strains collected from coffee beans. The RAPD profiles of 20 *A. tubingensis* strains collected from coffee bean, date and black sultana samples are shown in Fig. 2. Together with five isolates from dates, all from coffee beans were non-ochratoxin producers and were included in subgroup IB. Subgroup IA integrated exclusively dried fruit derived strains i.e. from date and black sultana.

Even if β -tub2 data clearly indicated that *A. tubingensis* isolates were accommodated into two groups, we tried to get more evidence to support their separation. Another region of the β -tubulin gene (β -tub1) was sequenced and analyzed. Three nucleotide polymorphisms were found between the two groups: Group IA differ from group IB at the following positions: C instead of T at 148, G

instead of C at 300 and C instead of T at 402. However, no differences between the two groups were found in ITS sequences. Although good consensus was found between the RAPD profiles and β -tub1 and β -tub2 sequence data for discriminating *A. tubingensis* into two groups, it is still premature to assign a new taxonomic rank to these groups. However, the finding of two groups for *A. tubingensis* strains may explain the incongruence about the capability of *A. tubingensis* for OA production.

Only two isolates were gathered into RAPD-group II, both being unable to produce OA. After β -tub2 sequence analyses, they were recognized as *A. foetidus*, which agrees with a previous publication that described *A. foetidus* as OA non-producers [14].

Based on β -tubulin sequences all isolates clustered into RAPD-group III were equally similar to *A. niger* and *A. lacticoffeatus*. The description of *A. lacticoffeatus* as a new species is recent [14]. Although *A. niger sensu stricto* and *A. lacticoffeatus* could not be separated by their β -tubulin sequences, there are evident differences in their colony color and extrolite pattern. Differently to *A. niger sensu stricto*, *A. lacticoffeatus* has sulphur yellow mycelium on YES agar and do not produce naphtha-y-pyrones [14]. The morphological observation on YES agar showed that all RAPD-group III isolates are *A. niger sensu stricto*.

Isolates clustered into RAPD-group IV were identified as *A. niger* based on β -tub2 sequences and their colony color. The β -tub2 sequences from group III- and IV-isolates characterized in our laboratory were aligned with other *A. niger* and *A. lacticoffeatus* sequences available in the GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). One single nucleotide polymorphism (A instead of T) into intron 5 of β -tub2 sequence was found to discriminate the RAPD-groups III and IV. No differences between the two

groups were found in β -tub1 sequences. Gene faster evolving analysis need to be performed to confirm the genetic divergence between these two groups.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação Araucária and CNPq, Brazil.

References

- [1] M.L. Abarca, F. Accensi, M.R. Bragulat, G. Castellá, F.J. Cabañes, *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market, *J. Food Prot.* 66 (2003) 504-634.
- [2] F. Accensi, M.L. Abarca, J. Cano, L. Figuera, F.J. Cabañes, Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate, *Antonie van Leeuwenhoek* 79 (2001) 365-370.
- [3] F.J. Cabañes, F. Accensi, M.R. Bragulat, M.L. Abarca, G. Castellá, A.P. Minguéz, What is the source of ochratoxin A in wine? *Int. J. Food Microbiol.* 79 (2002) 213-215.
- [4] M.H.P. Fungaro, M.L.C. Vieira, A.A. Pizzirani-Kleiner, J.L. Azevedo, 1996. Diversity among soil and insect isolates *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD, *Lett. Appl. Microbiol.* 22 (1996) 389-392.
- [5] N.L. Glass, G.C. Donaldson, Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 1323-1330.
- [6] T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium.* 41 (1999) 95-98.

- [7] B.T. Iamanaka, M.H. Taniwaki, H.C. Menezes, E. Vicente, M.H.P. Fungaro, Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 1258-1263.
- [8] S. MacDonald, P. Wilson, K. Barners, A. Damant, R. Massey, E. Mortby, and M.J. Shepherd, Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey, *Food Addit. Contam.* 16 (1999) 253-260.
- [9] C. Magnoli, A. Astoreca, L. Ponsone, M. Combina, G. Palacio, C.A. Rosa, A.M. Dalcero, Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets *Lett. Appl. Microbiol.* 37 (2004) 179-184.
- [10] A. Medina, R. Mateo, L. Lopez-Ocana, F.M. Valle-Algarra, M. Jimenez, Study of Spanish Grape Mycobiota and Ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* Section *Nigri*, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 4696-4702.
- [11] L. Parenicova, P. Skouboue, J. Frisvad, R.A. Samson, L. Rossen, M. ten Hoor-Suykerbuyk, J. Visser, Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 521-527.
- [12] G. Perrone, G. Mulé, A. Susca, P. Battilani, A. Pietri, A. Logrieco, Ochratoxin A Production and Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Aspergillus*

tubingensis, and *Aspergillus niger* Strains Isolated from Grapes in Italy, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 680-685.

[13] F.J. Rohlf, NTSYS-pc: Microcomputer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis, *American Statistician.* 41 (1987) pp.330.

[14] R.A. Samson, A.M.P. Jos Houbraken, A.F.A. Kuijpers, J.M. Frank, J.C. Frisvad, New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*, *Stud. Mycol.* 50 (2004) 45-61.

[15] P.H.A. Sneath, R.R. Sokal, *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*, W. H. Freeman, San Francisco, (1973) pp. 573.

[16] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673-4680.

[17] Y. Ueno, O. Kawakura, Y. Sugiura, K. Horiguchi, M. Nakajima, K. Yamamoto, S. Sato, 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. In M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky, H. Bartsch (Eds.), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC – Sci. – Publ., Lyon, France, 1991, pp. 71-75.

[18] T.J. White, T. Burns, S. Lee, J. Taylor, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, Edited by INNIS, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. Academic Press, San Diego, 1990, pp. 315-322.

Legends

Fig.1. Dendrogram of 29 isolates of *Aspergillus niger* aggregate based on cluster analysis with UPGMA method using Dice genetic similarity index on RAPD data obtained with three primer. The number of each node indicates the percentage bootstrap support (out of 1,000). Toxigenic and nontoxigenic strains are denoted (+) and (-), respectively.

Fig.2. RAPD profiles from 20 isolates of *Aspergillus tubingensis* using the 10-mer primer OPX-7. Isolates number are present above each lane. Molecular weight size markers (1kb ladder) are indicated by M. The isolates ITAL 442, ITAL 167, ITAL 108, ITAL 200, ITAL 97, ITAL 207 and ITAL 217 were obtained from coffee beans and the isolates ITAL 319, ITAL 332, ITAL 326, ITAL 263, ITAL 313, ITAL 503, ITAL 166, ITAL 354, ITAL 356, ITAL 363, ITAL 353, ITAL 460, ITAL 528 were obtained from dried fruits.

Table 1

Isolates of the *Aspergillus niger* aggregate analysed in this study. Potential to produce ochratoxin A (OA) is indicated by + or -.

n.º	Substrate	Origin	OA
ITAL 166	black sultana	Argentina	-
ITAL 176	black sultana	Argentina	+
ITAL 177	black sultana	Argentina	+
ITAL 178	black sultana	Argentina	+
ITAL 180	black sultana	Argentina	-
ITAL 460	black sultana	Argentina	-
ITAL 461	black sultana	Argentina	-
ITAL 517	black sultana	Argentina	-
ITAL 353	black sultana	Turkey	+
ITAL 354	black sultana	Turkey	-
ITAL 356	black sultana	Turkey	+
ITAL 363	black sultana	Turkey	-
ITAL 402	black sultana	USA	-
ITAL 403	black sultana	USA	-
ITAL 404	black sultana	USA	-
ITAL 405	black sultana	USA	-
ITAL 406	black sultana	USA	-
ITAL 150	black sultana	Iran	+
ITAL 152	dry plum	Chile	-
ITAL 424	dry plum	Argentina	-
ITAL 425	dry plum	Argentina	+
ITAL 426	dry plum	Argentina	+
ITAL 428	dry plum	Argentina	+
ITAL 429	dry plum	Argentina	-
ITAL 430	dry plum	Argentina	+
ITAL 431	dry plum	Argentina	+
ITAL 437	dry plum	Argentina	-
ITAL 438	dry plum	Argentina	-
ITAL 439	dry plum	Argentina	-
ITAL 263	date	Spain	-
ITAL 277	date	Spain	-
ITAL 313	date	Spain	+
ITAL 318	date	Spain	-
ITAL 319	date	Spain	-
ITAL 325	date	Spain	-
ITAL 326	date	Spain	-
ITAL 327	date	Spain	-
ITAL 331	date	Spain	+
ITAL 332	date	Spain	-
ITAL 503	date	Spain	-
ITAL 490	date	Tunisia	+
ITAL 493	date	Tunisia	+
ITAL 494	date	Tunisia	+
ITAL 496	date	Tunisia	-
ITAL 498	date	Tunisia	-
ITAL 499	date	Mexico	+
ITAL 500	date	Mexico	-
ITAL 501	date	Mexico	+
ITAL 528	date	USA	-
ITAL 249	dry fig	Turkey	+
ITAL 250	dry fig	Turkey	+

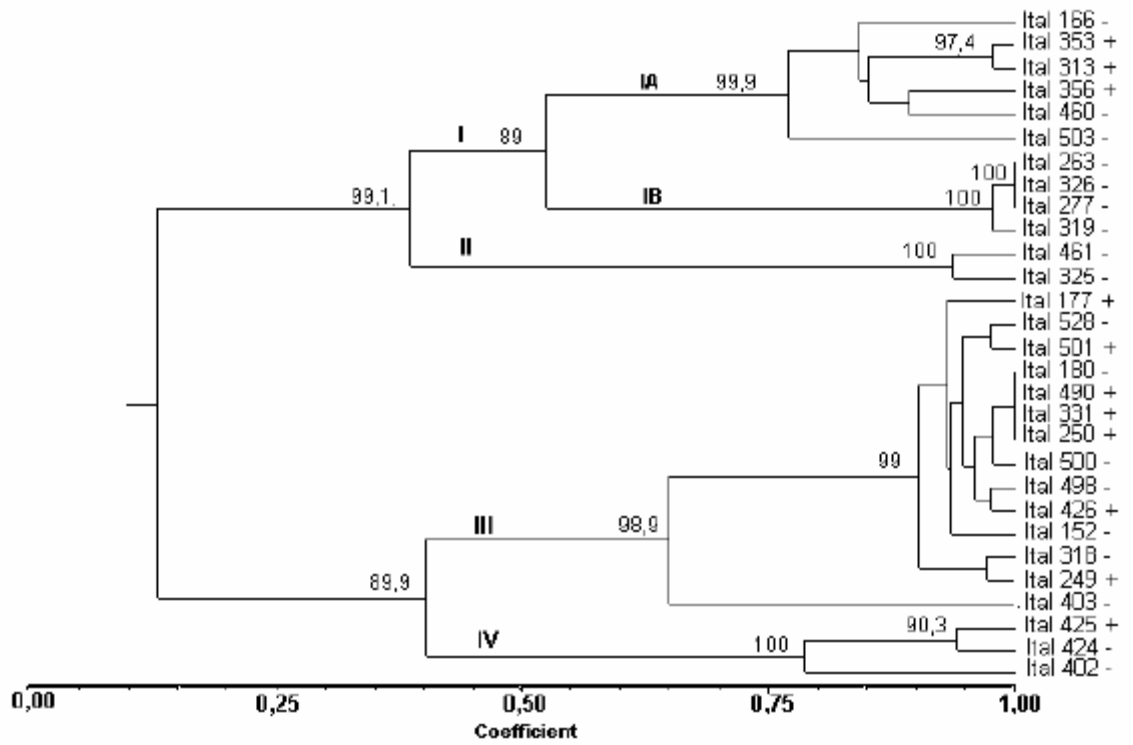


Fig. 1

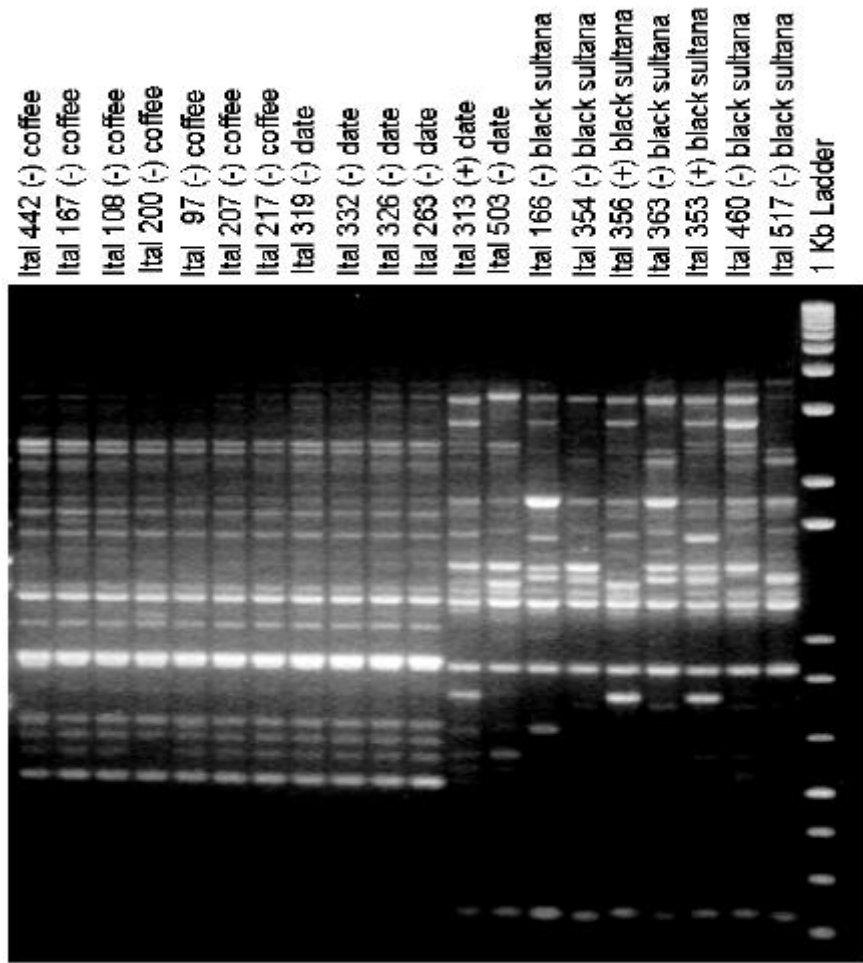


Fig. 2

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1) Dentre os substratos analisados, uva passa escura apresenta-se com a maior diversidade de contaminantes do “agregado *A. niger*”.

2) Dentre os fungos do “agregado *A. niger*”, as espécies *A. tubingensis*, *A. niger* sensu stricto e *A. foetidus* foram encontrados em frutas secas comercializadas no Brasil. *A. niger* sensu stricto foi a espécie mais freqüente (68,6%), seguida de *A. tubingensis* (27,5%) e *A. foetidus* (3,92%).

3) Os isolados de *A. niger* sensu stricto formam dois grupos moleculares. Um dos grupos é constituído da maioria dos isolados analisados neste trabalho (62,7%) e o outro, por um menor número de exemplares (5,88%). Ambos os grupos incluem isolados produtores e não produtores de ocratoxina A.

4) Dados de RAPD e seqüências de nucleotídeos do gene da β -tubulina subdividem a espécie *A. tubingensis* em dois grupos. Um deles contempla somente isolados não produtores de OA e o outro, contempla produtores e não produtores. Esta observação explica a incongruência encontrada na literatura com relação à capacidade ou não de *A. tubingensis* em produzir ocratoxina A.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2650-2652, 1994.
- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 504-506, 2003.
- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 86, p. 33-49, 2004.
- ACCENSI, F.; CANO, J.; FIGUERA, L.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 191-196, 1999.
- ACCENSI, F.; ABARCA, M. L.; CANO, J.; FIGUERA, L.; CABAÑES, F. J. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 365-370, 2001.
- ALICE web. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/alice.asp>> Acesso em: 12 jan. 2007.
- AL-MUSALLAM, 1980 apud ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 86, p. 33-49, 2004.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOZA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina hyphomycetes) isolates. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 729-732, 2000.

BALZER, I.; BOGDANIC, C.; MUZIC, S. Natural contamination of corn (*Zea mays*) with mycotoxins in Yugoslavia. **Annales de la Nutrition et de l'Alimentation**, v. 31, p. 425-430, 1977.

BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 639-643, 2002.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 715-722, 2003.

BELLÍ, N.; MARÍNS, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 19-27, 2004.

BENFORD, D.; BOYLE, C.; DEKANT, W.; FUCHS, R.; GAYLOR, D. W.; HARD, G.; MCGREGOR, D. B.; PITT, J. I.; PLESTINA, R.; SHEPHARD, G.; SOLFRIZZO, M.; VERGER, P. J. P.; WALKER, R. **Ochratoxin A**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>> Acesso em: 12 dez. 2006.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497-516, 2003.

BETINA, V. Mycotoxins: Production, isolation, separation and purification. **Elsevier**: Amsterdam, Netherlands, p. 520, 1984.

BIGELIS, R.; LASURE, L. L. Fungal enzymes and primary metabolites used in food processing. In: BEUCHAT, L. R. (ed.) **Food and Beverage Mycology**. Van Nostrand Reinhold, New York, USA, p. 473-516, 1987.

BLOUT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, v. 9, p. 52-77, 1961.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. **Alimentaria**, v. 36, p. 107-114, 1999.

CABAÑES, F. J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CASTELLÁ, G.; MINGUEZ, A. P. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 213-215, 2002.

CAMPBELL, E. I.; UNKLES, S. E.; ACRO, J. A.; van den HONDEL, C.; CONTRERAS, R.; KINGHORN, J. Improved transformation efficiency of *Aspergillus niger* using the homologous *niaD* gene for nitrate reductase. **Current Genetics**, v. 16, p. 53-56, 1989.

CHELKOWSKI, J.; SAMSON, R. A.; WIEWIÓROWSKA, M.; GOLIŃSKI, P. Ochratoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of *Aspergillus glaucus* Link ex Grey [=Eurotium herbariorum (Wiggers) Link ex Gray] from cereals grains. **Nahrung**, v. 4, p. 267-269, 1987.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex Committee on Food Additives and Contaminants**, 31st session, The Hague, The Netherlands, p. 22-26, 1999.

COLE, R. J.; COX, R. H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. Academic Press: New York, N.Y., p. 866, 1981.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission regulation (EC) n. 472/2002 of 12 March 2002 amending regulation (EC) n. 466/2002 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, v. 75, p. 18-20, 2002.

CREPPY, E. E.; BRAUDRIMONT, I.; BETBEDER, A. M. Prevention of nephotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant. **Toxicological Letters**, v. 83, p. 869-877, 1995.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIO, G.; ROSA, C. A. R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p.1065-1072, 2002.

De VRIES, R. P.; FRISVAD, J. C.; van der VONDERVOORT, P. J. I.; BURGERS, K.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSOM, R. A.; VISSER, J. *Aspergillus vadensis*, a new specie of the group of black *Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 195-203, 2005.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v. 26, p. 297-302, 1945.

FORGACS, J.; CARLL, W. T. Mycotoxicoses. **Advances in Veterinary Science**, v. 7, p. 273-382, 1962.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 23-43, 2004.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Diversity among soil and insect isolates *Metharizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letter in Applied Microbiology**, v. 22, p. 389-392, 1996.

FURLANI, R. P. Z. Ocratoxina A em café brasileiro. **Dissertação em Ciência dos Alimentos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, p. 61, 1998.

GEISEN, R. PCR methods for the detection of mycotoxin producing fungi. In: BRIDGE, P. D.; ARORA, K. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. (eds) **Applications of PCR in micology**. Cambridge, UK: CAB International, p. 243-266, 1998.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMARI, Z.; KEVEI, F.; KOVÁCS, E.; VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z.; CROFT, J. H. Molecular and phenotypic characterization of *Aspergillus japonicus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 72, p. 337-347, 1997.

IAMANAKA, B. T. Fungos toxigênicos e micotoxinas em frutas secas e produção de ocratoxina A em uvas passas em condições de abuso. **Dissertação em Tecnologia de Alimentos**. Universidade de Campinas, UNICAMP, Campinas-SP, p. 72, 2004.

IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; VICENTE, E.; FUNGARO, M. H. P. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives Contaminants**, v.22, p.258-1263, 2005.

IARC. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans**, v. 56, Lyon, France, 1993.

JAUSORO, Alejandro. **Trading Argentina**. Disponível em:
<<http://www.tradar.com.ar>> Acesso em: 06 dez. 2006.

JORGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives Contaminants**, v.15, p. 550-555, 1998.

KEVEI, F.; HAMARI, Z.; VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z.; CROFT, J. H. Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. **Antonie Van Leeuwenhoek International**, v.70, n. 1, p. 59-66, 1996.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and Their Teleomorphs. **CSIRO Division of Food Science and Technology**, North Ryde, New South Wales, Australia, p. 164, 1988.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, p. 122, 2002.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, v. 161, p. 1-188, 1989.

KROGH, P. Mycotoxin tolerances in foodstuffs. **Annales de la Nutrition et de l'Alimentation**, v. 31, p. 411-414, 1977.

KUSTERS-VAN SOMEREN, M.; SAMSON, R. A.; VISSER, J. The use of RFLP analyses in classification of the black aspergilli: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. **Current Genetics**, v. 19, p. 21-26, 1991.

MACDONALD, S.; WILSON, P.; BARNES, K.; DAMANT, A.; MASSEY, R.; MORTBY, E.; SHEPHERD, M. J. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, p. 253-260, 1999.

MAFF - MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. Survey of aflatoxins and ochratoxin A in cereals and retail products. **Food Safety Information Bulletin n° 130**, United Kingdom, 1997.

MAFF - MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. Survey of retail products for ochratoxin A. **Food Safety Information Bulletin n° 185**, United Kingdom, 1998.

MAFF - MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. Survey of nuts, nuts products and dried tree fruits for mycotoxins. **Food Safety Information Bulletin** nº. 21, United Kingdom, 2002.

MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; COMBINA, M.; PALACIO, G.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. M. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 326-331, 2004.

MATISSEK, R.; RATERS, M. Ochratoxin A in cocoa and human health aspects. **13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Malaysia, 14 October, 2000.

MEDINA, A.; MATEO, R.; LOPEZ-OCANA, L.; VALLE-ALGARRA, F. M.; JIMENEZ, M. Study of Spanish Grape Mycobiota and Ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section Nigri. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4696-4702, 2005.

MÉGNÉGNEAU, B.; DEBETS, F.; HOEKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, v. 23, p. 323-329, 1993.

MELLO, L. M. R. Atuação do Brasil no Mercado internacional de uvas e vinhos – Panorama 2004. Artigos técnicos. **Embrapa uva e vinho**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/autor-l.html>> Acesso em: 13 dez. 2006.

NAKAJIMA, N.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 82, p. 897-902, 1999.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Ochratoxin A (OTA) in coffee: Nation-wide evaluation of data collected by German food control 1995-1999. **Food Additives Contaminants**, v.18, p. 431-435, 2001.

PARDO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science Technology International**, v. 10, p. 45-49, 2004.

PARENICOVÁ, L.; BENEN, J. A. E.; SAMSON, R. A.; VISSER, J. Evaluation of RFLP analysis of the classification of selected black *aspergilli*. **Mycological Research**, v. 101, p. 810-814, 1997.

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; VISSER, J. Genotypic and phenotypic variability among black Aspergilli. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (eds), **Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification**, p. 413-424. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2000.

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; ter HOOR- SUYKERBUYK, M.; VISSER, J. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied Environmental Microbiological**, v. 67, p. 521-527, 2001.

PAVLOVIC, M.; PLESTINA, R.; KROGH, P. Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology**, v. 87, p. 243-246, 1979.

PERRONE G.; MULÈ, G.; SUSCA, A.; BATTILANI, P.; PIETRI A.; LOGRIECO, A.; Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 680-685, 2006.

PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CASTEGNARO, M. Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high incidence of Balkan endemic nephropathy in Bulgaria. **Food Additives and Contaminants**, v. 5, p. 267-270, 1985.

PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I. N.; CASTEGNARO, M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. **Food Additives and Contaminants**, v. 5, p. 299-301, 1988.

PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy**, v. 23, p. 91-98, 2000.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common Penicillium species**. North Wales: CSIRO-Division of Food Processing, p. 187, 1991.

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

PITT, 1999 apud IAMANAKA, B. T. Fungos toxigênicos e micotoxinas em frutas secas e produção de ocratoxina A em uvas passas em condições de abuso. **Dissertação em Tecnologia de Alimentos**. Universidade de Campinas, UNICAMP, Campinas-SP, p. 72, 2004.

PLESTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 49-50, 1996.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MaCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-148, 1953.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. (Ed). **The genus Aspergillus**. Willians and Wilkins Company, Baltimore, Md. USA, p. 686, 1965.

RODRIGUES, Maria Geralda Vilela. **Toda Fruta**. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo> Acesso em: 29 nov. 2006.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: Micro-computer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis. **American Statistician**, v. 41, p. 330, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. **Studies in Microbiology**, v. 50, p. 45-61, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Determination of ochratoxin A in beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, p. 591-598, 1995.

SCUSSEL, V. M. Micologia em alimentos. **Insular**, Florianópolis, p.144, 1988.

SERRA, R.; CABAÑES, F. J.; PERRONE, G.; CASTELLÁ, G.; VENÂNCIO, A.; MULÈ, G.; KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, v. 98, p. 295-306, 2006.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. **San Francisco**: W. H. Freeman, p. 573, 1973.

STOEV, S. D.; VITANOV, S.; ANGUELOV, G.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CREPPY, E. E. Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. **Veterinary Research Communications**, v. 25, p. 205-223, 2001.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to precessing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, p. 173-179, 2003.

TÉREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEI, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 134, p. 171-176, 1996.

THIRUMALA, D. K.; MAYO, M. A.; GOPAL, R.; REDDY S. V.; DELFOSSE, P.; REDDY, D. V. R. Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5079-5082, 2000.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRUCKNESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee. **Journal of AOAC International**, v. 8, p. 85-87, 1999.

UENO, Y.; KAWAKURA, O.; SUGIURA, Y.; HORIGUCHI, K.; NAKAJIMA, M.; YAMAMOTO, K.; SATO, S. 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. *In*: CASTAGNERO, M.; PLESTINA, R.; DIRHEIMER, G.; CHERNOZEMSKY, I. N.; BARTSCH, H. (eds), **Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours**, IARC – Sci. – Publ., Lyon, France, p. 71-75, 1991.

- VALERO, A.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. **Letters in Applied Microbiology**, v. 108, p. 1-6, 2005.
- VAN der MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature**, v. 205, p. 1113, 1965.
- VARGA, J.; KEVEI, F.; VRIESEMA, A.; DEBETS, F.; KOZAKIEWICZ, Z.; CROFT, J. H. Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 612-621, 1994.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 1-7, 2000.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J.; MESTERHÁZY, A. Recent advances in ochratoxin research I: Production, detection and occurrence of ochratoxins. **Cereal Research Communications**, v. 29, p. 85-100, 2001.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÓTH, B.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 29-36, 2003.
- VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CEWNTONZE, G. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 8, p. 1818-1827, 2001.
- VISSER, J.; SUYKERBUYK, M.; KUSTERS-VAN SOMEREN, M.; SAMSON, R.; SCHAAP, P. Classification of black aspergilli by RFLP analysis. In: ROSSEN, I.; RUBIO, V.; DAWSON, M. T.; FRISVAD, J. C. (eds), **Fungal identification techniques**, ECSC-EC-EAEC, Brussets, Belgium, p. 194-201, 1996.
- WHITE, T. J.; BURNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. Edited by INNIS, M. A.; GELFAND; D. H., SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. Academic Press, San Diego, p. 315-322, 1990.
- YOKOHAMA, K.; WANG, L.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. **FEMS Letters Microbiology Applied**, 200, p. 241-246, 2001.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 655-688, 1996.

ANEXO

ANEXO – Normas para publicação do periódico Research in Microbiology na seção brief notes



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

- [1. The contents of Research in Microbiology](#)
- [2. Types of papers](#)
- [3. How to submit a manuscript](#)
- [4. Papers length](#)
- [5. General format](#)
- [6. Organization of research paper and brief notes](#)
- [7. Organization of reviews](#)
- [8. Forum issues](#)
- [9. Conventions](#)
- [10. Proofs and reprints](#)
- [11. Revision](#)
- [12. Copyright](#)

1. The contents of Research in Microbiology



Papers are published in Research in Microbiology under one of the following subheadings:

- Phylogeny, evolution, ecology and population dynamics
- Physiology and metabolism
- Molecular genetics and genomics
- Mobile elements (viruses of prokaryotes, transposons, plasmids and other related genetic elements)
- Interactions between microbes and interactions of microbes with their environment

The overriding criteria for publication are originality, high scientific quality and up-to-date relevance. Papers should be written with a wide audience of microbiologists in mind. Purely descriptive papers, as well as those which do not report on significant advances in scientific research, are discouraged and may be rejected without review. Incomplete characterizations of new bacterial strains, bacterial communities, enzymes or antimicrobial compounds, for instance, will not be considered. Papers dealing with methods and theoretical microbiology may be published if they are associated with significant novel approaches and results. Papers on host-pathogen interactions, virulence and disease fall within the scope of the journal only if they cover the biology of the microbes.

2. Types of papers



Original articles in two formats: research papers or brief notes

Reviews

Letters to the Editor

News

3. How to submit a manuscript



Electronic submission of papers using on-line manuscript submission instruction is available at: <http://pasteur.fontismedia.com/res>

PLEASE NOTE: English grammar, syntax and spelling must be carefully prepared and checked before submission of the paper. The authors are encouraged to include

a cover letter for the Editor and to provide the names and e-mail addresses of 3 potential referees. A PDF version of the paper containing figures and tables is needed for the reviewing process. The authors should also provide their paper as a Word document and submit figures separately according to on-line submission instructions. In addition, if the submitted manuscript contains a reference to other related papers in press or considered for publication, PDFs of these papers should be added to the submission as supplementary information.

4. Papers length



Research papers: abstract 200 words, main text (Introduction, Materials and methods, Results and Discussion) 3500-word maximum, references up to 35, and a combination of a total of six figures and tables at a maximum.

Brief notes: abstract 100 words, main text 1800 words, references up to 18, and a combination of a total 3 figures and tables.

Reviews: abstract 50 words, main text 4000 words, references 50.

Letters to the Editor: 800-word maximum, including a total of 5 references or less, no abstract, no methods, no tables or figures.

News: 600 words

5. General format of papers



Double-space (32 lines per page maximum) throughout (including references, figure legends and table footnotes).

2.5-cm (1 inch) margins on all four sides.

Font size of at least 12 points.

Each page numbered top right (title page is 1).

Lines numbered

Each new paragraph indented

Either American or English spelling, but not both.

In general, do not use capital letters (except for first letter) for titles, author names, section headings, etc.

When referring to figures in the main text, figure is abbreviated to Fig., i.e., Fig. 1.

When referring to tables, Arabic numerals are used, i.e., Table 2.

NOTE: A template is available on the submission site.

6. Organization of research papers and brief notes



Manuscript should be arranged in the following order (each item should appear on a separate page):

a) Title page; b) Abstract + keywords; c) Introduction; d) Materials and methods; e) Results; f) Discussion; g) Acknowledgements; h) References; i) Legends to figures; j) Tables; k) Figures; l) Supplementary material for on-line submission. Abbreviations: A list of unusual abbreviations may appear below the keywords. In general, however, they must be defined in the text the first time they are used, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter, they are to be used throughout the paper.

Chapters for Introduction, Materials and methods, Results and Discussion are numbered in bold; subheadings are in italics; e.g.: **1. Introduction**; then 1.1 Subheading. Results and Discussion may be grouped together.

a) Title page

Title: it should be informative and concise and not exceed 25 words. It should not contain non-standard acronyms or abbreviations nor be in capital letters. Authors' names: full first name of each author is followed by last name. Do not use capital letters; use commas to separate names; do not use "and" before name of last author. Each name should be followed by a superscript letter a, b, etc. to designate the affiliation. The name of the author responsible for correspondence and proof correction should be followed by an asterisk (*) after the superscript letter.

Affiliations: give complete address (department and / or laboratory, college, university, and full postal address) of each institute at which the work was carried out, preceded by the appropriate superscript letter (a, b, etc.).

Affiliations should follow the list of names, and each address should be given in a separate paragraph.

The e-mail address of each author is given at the bottom of the title page. The e-mail address of the corresponding author is followed by the note "*Correspondence and reprints".

b) Abstract and keywords

The abstract is on page 2; it is accessible to a wide audience, summarizing the objectives and major conclusions and indicating the relevance of the work. Do not

use references, footnotes or abbreviations in the abstract. The word “Abstract” is in bold.

Keywords: place them below the abstract; provide a list of at least three keywords existing in the MeSH thesaurus. They are in lower case letters, separated by semi-colons. They are used for indexing your paper and should express the precise content.

c) Introduction

The Introduction outlines the background of the study; it should not summarize results nor be an extensive review of the literature. Do not use subheadings in the Introduction.

d) Materials and methods

Avoid detailed description of standard procedures, procedures performed using commercial kits or procedures fully described in a former paper.

e) Results

f) Discussion

Discuss major findings. Avoid repeating parts of the Introduction and Results. Do not defend the main conclusions with unpublished data or with data from manuscripts in preparation.

g) Acknowledgements

Personal acknowledgements precede those of agencies and institutions; use only a single paragraph.

h) References

References are in alphabetical order and numbered consecutively. References are cited by numbers in square brackets in the main text. Unpublished work and personal communications are indicated as such in the text but not listed. Only published work and manuscripts in press (indicate the journal) appear in the references list. The list of references at the end of the paper, **in alphabetic order and numbered [1], [2], [3], etc.**, appears after the **Acknowledgements**. Verify that each reference number has its counterpart in the list and vice-versa; **incorrect or incomplete referencing will delay publication**.

Follow the styles shown below.

Periodicals

[N] Trueba, G. A., Old, I. G., Saint Girons, I., Johnson, R. C. (1997) Ache Achew operon in *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Res. Microbiol.* 148, 191-

200.

Books

An entire volume:

[N] Melchiorre, C. and Giannella, M. (1984) *Highlights in Receptor Chemistry*, Elsevier, Amsterdam. A chapter in a book:

[N] Buyniski, R. J., Cavanagh, P. L., Pircio, A. W., Algieri, A. A., Crenshaw, R. R. (1984) In: C. Melchiorre, M. Giannella (Eds.), *Highlights in Receptor Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, pp. 195–215.

i) Legends to figures

The text for figure titles and their corresponding legends starts on a separate page following the reference list.

j) Tables

Tables are consecutively numbered according to their order of appearance in the main text. Each table carries a short title at the top (Table 2, etc.) describing its content in relation to the main text. Except for the heading and bottom of the table, avoid horizontal dividing lines; vertical lines between columns are completely omitted from any table. Instead, the first column is left-aligned and other columns are generally centered. Only the first letter of each heading is capitalized, and any units (Roman characters) appear in parentheses after or under the corresponding heading. Footnotes are collected under the table and referred to in the table by superscript letters (a, b, etc.).

k) Figures

Figures are numbered (Arabic numerals) consecutively by order of appearance in the main text (Fig. 1). Figures should be provided in the PDF version for the review process. The lettering and the graph symbols (squares, triangles, circles, etc.) should have a finished printed size of at least 9 pt. Authors of accepted papers should supply graphic files of halftone illustrations, saved as TIFF, EPS or BMP. Line arts should have a resolution of approximately 1000 dpi. Half-tone graphics (photographs or graphics with shades of gray) should have a resolution of 300 dpi. A figure that is a combination of both a half-tone and line art should have a resolution of at least 500 dpi. When necessary, indicate magnification by a scale bar. Visit <http://authors.elsevier.com/ArtworkInstructions.html?dc=A11>.

There is no charge for reproduction of black and white illustrations. **Colors figures are charged to the author.**

I) Supplementary material for on-line submission

Supplementary material in the form of tables or figures can be accepted for publication on line at the Editor's discretion.

7. Organization of reviews



The main text may be divided into sections with subheadings; it should end with a concluding section. The use of tables, charts, pictures and maps is strongly encouraged. Style used for Title, Abstract page, Tables, Figures and References follows the instructions above.

8. Forum issues



They may follow the style of original papers or reviews; the convener will specifically define the style of paper for each Forum issue. The Publications Office will forward instructions to invited authors.

9. Conventions



Microorganisms: follow guidelines of the Nomenclature Committees, ICSP <http://www.the-icsp.org/> and ICTV. Genus and species are written in full the first time the name appears in the text; subsequently, only use the first letter of the genus, followed by the species (e.g. *Escherichia coli*, then *E. coli*). When proposing new names or a new combination of names for the organisms they describe, authors are invited to apply guidelines ICSP and IJSEM (*Int J Syst Evol Microbiol* 50, 2239-44 and 2247-49 and *Int J Syst Evol Microbiol* 52 1043-47 for new rules for species definition, or visit <http://intl-ij.sgmjournals.org/misc/ifora.shtml>), and to provide evidence that type strains are deposited in two recognized culture collections in two different countries. For genetic nomenclature of IS and transposons, visit <http://www-is.biotoul.fr/> and <http://www.ucl.ac.uk/eastman/tn/> Nucleotide sequences: they should be deposited in the NCBI or EMBL databases prior to submission. Their accession number should be provided in the submitted manuscript and the sequences should be made public prior to publication. Units of measurement: follow the Système International (SI). Always respect the space between the number and the units (e.g. 100 °C, 25 mg). Use small l for liter). Genetic loci are italicized; protein products of the loci are not italicized. Latin words in current use, such as *in vitro*/ *vivo*/ *situ*, *via*, as well as abbreviations for expressions such as

cf., e.g., i.e., et al., appear in Roman type.

10. Proofs and reprints



Proofs are sent to the author responsible for correspondence. After **careful correction**, return them to the publisher **within 48 h**. If there is no response the article will be published as it appeared in the first proofs. Aside from typographical errors, no changes can be made in the references.

Elsevier provides either 25 free reprints of each article or the PDF version. To purchase additional reprints, fill in the order form which accompanies the proofs and return it to the publisher together with the corrected proofs.

11. Revision



A paper sent back to the author for revision **should be returned to us within 2 months**, together with a letter describing all modifications performed as well as answers to critics' remarks item by item; otherwise, it will be considered as a new submission. The Publications Office may request additional modifications after acceptance of a paper if the length is excessive or if the format does not conform to instructions.

12. Copyright



Submission implies that the paper reports original research, has not been published previously, is not under consideration for publication elsewhere and will not be published in whole or in part elsewhere (in the same or in another language). As soon as the article is published, the author is considered to have transferred his or her rights to the publisher. Requests for reproduction should be sent to the Publisher: **<http://www.elsevier.com/locate/permissions>**.