



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DAYANE OSCARINA APARECIDA VANZELA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aspergillus* SEÇÃO  
*Nigri*, POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS E  
LIPASES EM ALHOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL**

---

Londrina  
2018

DAYANE OSCARINA APARECIDA VANZELA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aspergillus* SEÇÃO  
*Nigri*, POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS E  
LIPASES EM ALHOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Sartori

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Vanzela, Dayane Oscarina Aparecida.

Isolamento e identificação de *Aspergillus* seção *Nigri*, potencial de produção de micotoxinas e lipases em alhos comercializados no Brasil / Dayane Oscarina Aparecida Vanzela. - Londrina, 2018.  
98 f. : il.

Orientador: Daniele Sartori.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola - Tese. 2. *Aspergillus* - Tese. 3. Fungos toxigênicos - Tese. 4. Micotoxinas - Tese. I. Sartori, Daniele. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

DAYANE OSCARINA APARECIDA VANZELA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aspergillus* SEÇÃO *Nigri*,  
POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS E LIPASES EM  
ALHOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Sartori  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Maria Inês Rezende  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2018.

*À Deus, razão da minha existência. Aos meus pais Claudedir Vanzela e Luciene Mesquini Vanzela, pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas. A minha irmã Maria Jayne Vanzela, companheira de vida, presente de Deus. E a minha orientadora, Daniele Sartori pelo apoio, amizade e compreensão.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, Senhor da minha história, sem o qual nada seria possível. Por guiar meus passos e me conduzir pelo caminho, para que a concretização desse sonho fosse possível.

A minha orientadora, Dra. Daniele Sartori, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo por toda doação, por todo ensinamento, experiências compartilhadas. Obrigada pela confiança, amizade e compreensão.

Aos meus pais, Luciene e Claudécir Vanzela, pela criação baseada em dignidade e honestidade, por serem exemplos de pessoas e estarem sempre ao meu lado, me apoiando em todas as decisões, sendo meu refúgio, minha base.

Agradeço a minha irmã, Maria Jayne Vanzela, meu presente de Deus, minha amiga e companheira. Aquela que me traz alegria, que é exemplo de persistência e determinação.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia.

À Capes pela bolsa.

A Professora Dra. Maria Helena Pelegrine Fungaro, por abrir as portas do seu gabinete de trabalho e dar todo o suporte para que grande parte desse trabalho pudesse ser concretizado. Grata por tudo!

Aos Professores Dr. Mário Sérgio Mantovani, Dr. André Luis Martinez e Dra. Elisete Pains Rodrigues, por disponibilizarem os equipamentos, essenciais para o êxito deste trabalho. Obrigada pela colaboração e disponibilidade!

A amiga e Professora Dra. Nicole Caldas Pan, pela dedicação com a análise estatística deste trabalho, pelo apoio e companheirismo de sempre.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa, pela disponibilidade e atenção.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, por todo ensinamento compartilhado, pela dedicação e atenção. De modo especial, a Professora Dra. Josiane Vignoli, pelo incentivo em todas etapas da minha vida acadêmica.

Ao técnico de laboratório, Nelson Janeiro Rodriguez, pela educação, dedicação e disponibilidade, por todo auxílio no desenvolvimento experimental desse trabalho. Obrigada por ser instrumento de Deus!

Aos amigos que o Senhor me confiou em Londrina, de modo mais que especial: Mayara, Nicole, Kátia e Juliano. Obrigada por partilharem risos e lágrimas, desespero e calma. Aprendi muito com vocês. Ficam as inúmeras lembranças!

Gostaria de agradecer também algumas pessoas que contribuíram muito para a concretização deste trabalho: Fernanda Pelisson Massi, Rafaella Livieiro, Josué Silva, Adrivânio Baranoski, Rayane Alves e Thaina Mendes.

A minha família, de modo especial meus avós Waldemar Mesquini, Maria Otenio Mesquini, e Oscarina Fernandes Vanzella. Sou eternamente grata pelo apoio, pela preocupação, pelo incentivo e pelas sinceras orações, que me sustentaram nos momentos mais difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização e concretização desse trabalho. Meu respeito e gratidão.

Grata a todos!

*E Maria disse:*

*“Minha alma glorifica ao Senhor, meu espírito exulta de alegria em Deus meu Salvador, porque olhou para sua pobre serva. Por isto, desde agora, me proclamarão bem-aventurada todas as gerações, porque realizou em mim maravilhas aquele que é poderoso e cujo nome é Santo. Sua misericórdia se estende, de geração em geração, sobre os que o temem. Manifestou o poder do seu braço: desconcertou os corações dos soberbos. Derrubou do trono os poderosos e exaltou os humildes. Saciou de bens os indigentes e despediu de mãos vazias os ricos. Acolheu a Israel, seu servo, lembrado de sua misericórdia, conforme prometera a nossos pais, em favor de Abraão e sua posteridade, para sempre.”*

*(Lc 1, 46-55)*

VANZELA, Dayane Oscarina Aparecida. **Isolamento e identificação de *Aspergillus* seção *Nigri*, potencial de produção de micotoxinas e lipases em alhos comercializados no Brasil.** 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

O alho (*Allium sativum* L.) pode ser considerado fator de risco para a saúde por apresentar infecção fúngica durante o armazenamento. Há predominância do gênero *Aspergillus*, podendo algumas espécies ser produtoras de ocratoxinas e fumonisinas. Entretanto, algumas espécies de *Aspergillus* apresentam aplicabilidade na indústria biotecnológica, quanto à produção de enzimas hidrolíticas. Este estudo objetivou analisar a incidência de fungos, isolar e identificar *Aspergillus* seção *Nigri* de 36 amostras de alhos adquiridas comercialmente em estados brasileiros. Os fungos foram identificados morfológicamente, sendo encontrados principalmente os gêneros *Aspergillus* 50,3 %, *Penicillium* 34,7 % e *Fusarium* 11 %. Um total de 60 isolados identificados como *Aspergillus* seção *Nigri* foram selecionados para identificação molecular da espécie e análise do potencial de produção de ocratoxina A (OTA) e fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>). Isolados que não apresentaram genótipo de produção de OTA e FB<sub>2</sub> foram avaliados quanto ao potencial de produção de lipases. A análise de variabilidade genética dos 60 isolados, demonstrou não haver correlação com a origem geográfica, no entanto, houve a formação de 4 grupos e um subgrupo. Representantes de cada grupo foram identificados como *Aspergillus niger* (subgrupo IA), *Aspergillus welwitschiae* (grupos I, II e III) e *Aspergillus luchuensis* (grupo IV). Os resultados apontaram que 98,3 % dos isolados encontrados no alho são das espécies *A. niger/A. welwitschiae* (26,6 % *A. niger* e 71,7 % *A. welwitschiae*) e 1,7 % *A. luchuensis*. Quanto ao potencial de produção de micotoxinas, nenhuma linhagem apresentou genótipo para produção de OTA, enquanto que 50 % das espécies *A. niger/A. welwitschiae* apresentaram genótipo para produção de FB<sub>2</sub>, desse total, 56 % da espécie *A. welwitschiae*. As linhagens que não apresentaram genótipo para produção de OTA e FB<sub>2</sub> (1 linhagem *A. niger* e 24 linhagens *A. welwitschiae*) foram avaliadas quanto ao potencial de produção de lipases em temperaturas de 25 °C a 42 °C e escala de pH, de 5,5 a 9,0. Das 25 linhagens avaliadas, 3 (UEL As 2.14, UEL As 4.82 e UEL As 15.262) apresentaram os maiores índices enzimáticos (IE). A linhagem *A. welwitschiae* UEL As 15.262 apresentou maior potencial de produção de lipases extracelulares (IE 6,93±0,11 em pH 9,0 a 40 °C), seguida por *A. welwitschiae* UEL As 2.14 (IE 5,75±0,12; pH 9,0 a 42 °C) e *A. niger* UEL As 4.82 (IE 3,31±0,27; pH 8,0 a 42 °C). Este é o primeiro relato da incidência de *Aspergillus* seção *Nigri* em alhos comercializados no Brasil e proporcionou selecionar linhagens com potencial de produção lipases extracelulares para avaliações futuras.

**Palavras-chave:** *Allium sativum* L. *Aspergillus* seção *Nigri*. Fumonisina B<sub>2</sub>. Ocratoxina A.

VANZELA, Dayane Oscarina Aparecida. **Isolation and identification of *Aspergillus* section *Nigri*, potential production of mycotoxins and lipases in garlic marketed in Brazil.** 2018. 98 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) can be considered a health risk factor because it presents fungal infection during storage. The genus *Aspergillus* predominates the infections, being able some species to be producers of ochratoxins and fumonisinas. However, some species of *Aspergillus* present applicability in the biotechnology industry, regarding the production of hydrolytic enzymes. This study aimed to analyze fungal incidence and identify *Aspergillus* section *Nigri* of 36 samples of garlic commercially acquired in Brazilian states. The samples were identified morphologically, being found mainly the genera *Aspergillus* 50.3%, *Penicillium* 34.7% and *Fusarium* 11%. A total of 60 isolates morphologically identified as *Aspergillus* section *Nigri* were selected for molecular identification of the species and analysis of the potential production of ochratoxin A (OTA) and fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>). Isolates that did not present a genotype of OTA and/or FB<sub>2</sub> production were evaluated for potential production of extracellular lipases. The analysis of the genetic variability of the 60 isolates showed no correlation with the geographical origin, however, there were 4 groups and one subgroup. Representatives of each group were identified as *Aspergillus niger* (subgroup IA), *Aspergillus welwitschiae* (groups I, II and III) and *Aspergillus luchuensis* (group IV). The results showed that 98.3% of the isolates found in garlic are *A.niger* / *A.welwitschiae* species, and 1.7% *A. luchuensis*. In this way, it was possible to verify that of the identified species, 26.6% of the isolates are *A.niger*, and 71.7% *A.welwitschiae*. Regarding the potential for mycotoxin production, no lineage presented a genotype for OTA production, while 50% of the *A.niger* / *A.welwitschiae* species had genotype for FB<sub>2</sub> production, of this total approximately 56% of *A.welwitschiae* species. The strains that did not present genotype for OTA and FB<sub>2</sub> production (1 *A. niger* strain and 24 *A. welwitschiae* strains) were evaluated for the production potential of extracellular lipases at temperatures of 25 °C to 42 °C and pH range of 5.5 to 9.0. Of the 25 strains evaluated, three (UEL As 2.14, UEL As 4.82 and UEL As 15.262) had the highest enzymatic indexes (IE). The *A. welwitschiae* strain UEL As 15.262 had a higher potential for the production of extracellular lipases (IE 6.93 ± 0.11 at pH 9.0 at 40 °C), followed by *A. welwitschiae* UEL As at 2.14 (IE 5.75 ± 0.12; pH 9.0 at 42 °C) and *A. niger* UEL A 4.82 (IE 3.31 ± 0.27; pH 8.0 at 42 °C). This is the first report of the incidence of *Aspergillus Nigri* section in garlic marketed in Brazil. On the other hand, this study provided selective strains with potential for extracellular lipases production for future evaluations.

**Key words:** *Allium sativum* L. *Aspergillus* section *Nigri*. Fumonisin B<sub>2</sub>. Ochratoxin A.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão da literatura

- Figura 1** – Planta de alho com as bainhas, psocaulo, raízes, bulbilhos e bulbo. (A) Planta de alho com bainhas e pseudocaulo. (B) Caule verdadeiro. (C) Bulbilhos. (D) Bulbo .....18
- Figura 2** – Plantio do alho no Rio Grande do Sul. (A) e (B) Safra de 2016/17. (C) Alho recém brotado .....21
- Figura 3** – Caracteres morfológicos macroscópicos. *Aspergillus awamori* em vários meios: (A) ágar de extrato de levedura de Czapek (CYA) a 25 °C, (B) CYA a 37 °C, (C) CYA com 20% de sacarose, (D) Czapek Dox ágar (CZ) e (E) ágar de extrato de malte (MEA). O: verso da placa. R: reverso da placa .....26
- Figura 4** – Caracteres morfológicos microscópicos de *Aspergillus acidus*. 1: vesícula/ 2: métula/ 3: fiálide/ 4: conídios/ 5: estipe. Escala bar = 10 µm.....27
- Figura 5** – Estrutura química da ocratoxina A .....30
- Figura 6** – Estrutura química das fumonisinas (FBs).....32

### Artigo científico 1

- Figure 1** – Dendrogram constructed from 60 isolates of *Aspergillus section Nigri* collected of the garlic marketed in Brazil. The UPGMA method was used based in a similarity matrix, using Jaccard coefficient. The isolates were grouped into 4 clusters and 1 sub cluster (Clusters I, II, III and IV. Sub cluster IA).....61
- Figure 2** – Phylogenetic tree constructed based on partial sequence data from the calmodulin (CaM) gene for *Aspergillus section Nigri*. Kimura 2-parameter model (K2 + G), using distance data from the Neighbor-Joining Method (NJ) and bootstrap analysis of 1000 replicates, using *Aspergillus flavus* as outgroup.....62

- Figure 3** – Partial region alignment of the calmodulin gene from *A. niger* and *A. welwitschiae* strains isolated from garlic with *A. niger* and *A. welwitschiae* strains taken from NCBI. It indicates two regions with possible SNPs of differentiation between *A. niger* and *A. welwitschiae* species, where *A. welwitschiae* presents "T" and *A. niger* "C" at position 93, and *A. welwitschiae* presents "T" and *A. niger* "G" at position 100.....63
- Figure 4** – Representative image of the profiles of the isolates found in mPCR. A - Profile found in 34 isolates. Amplicons of 192 bp and 128 bp, indicating *A.niger* / *A.welwitschiae* species and genotype for FB2 production, respectively. B - Profile found in 59 isolates. Amplicon in 192 bp, identifying species *A.niger* / *A.welwitschiae*. C - Profile found in 1 isolated. No amplified fragment. M- ladder molecular weight marker 1kb (Invitrogen Life Technologies, USA). C + (positive control) - *A. niger* isolated from coffee. B - White (DNA replaced by water). Primers: *fum8* - involved in the synthesis of FB2, *pks* and *radH* - (involved in the synthesis of OTA) *benA* - (identification of species *A. niger* / *A. welwitschiae*) .....64

## Artigo científico 2

- Figura 1** – Halo de atividade enzimática de lipases extracelulares da linhagem UEL As 2.14 de *A. welwitschiae* em diferentes temperaturas de incubação. A - 25 oC; B - 28 oC; C - 30 oC; D - 32 oC; E - 35 oC; F - 37 oC; G - 40 oC; H - 42 oC. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento.....80

- Figura 2** – Halo de atividade enzimática de lipase extracelular do isolado UEL As 4.82 em diferentes temperaturas de incubação. A - 25 oC; B - 28 oC; C - 30 oC; D - 32 oC; E - 35 oC; F - 37 oC; G - 40 oC; H - 42 oC. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento .....80
- Figura 3** – Halo de atividade enzimática de lipase extracelular do isolado UEL As 15.262 em diferentes temperaturas de incubação. A - 25 oC; B - 28 oC; C - 30 oC; D - 32 oC; E - 35 oC; F - 37 oC; G - 40 oC; H - 42 oC. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento .....81
- Figura 4** – Avaliação de produção de lipase extracelular do isolado UEL As 2.14 em 42 oC e diferentes pHs. A – pH 5,5; B – pH 6,0; C – pH 6,5; D – pH 7,0; E – pH 7,5; F – pH 8,0; G – p 8,5; H – pH 9,0. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento .....81
- Figura 5** – Avaliação de produção de lipase extracelular do isolado UEL As 4.82 em temperatura de 42 oC e diferentes pHs. A – pH 5,5; B – pH 6,0; C – pH 6,5; D – pH 7,0; E – pH 7,5; F – pH 8,0; G – p 8,5; H – pH 9,0. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento .....82
- Figura 6** – Avaliação de produção de lipase extracelular da linhagem UEL As 15.262 em temperatura de 40 oC e diferentes pHs. A – pH 5,5; B – pH 6,0; C – pH 6,5; D – pH 7,0; E – pH 7,5; F – pH 8,0; G – p 8,5; H – pH 9,0. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento .....82

## LISTA DE TABELAS

### Revisão da literatura

- Tabela 1** – Composição nutricional do alho cru .....19
- Tabela 2** – Enzimas comerciais obtidas a partir de fungos do gênero *Aspergillus*.....36
- Tabela 3** – Lipases fúngicas utilizadas comercialmente .....38

### Artigo científico 1

- Table 1** – Profile presented by the isolates in Multiplex PCR. *A. niger* / *A. welwitschiae* strains found in garlic commercially purchased in several Brazilian states, as well as the presence (+) or absence (-) of the genes that identify the genotype for OTA and FB2 production .....59

### Artigo científico 2

- Tabela 1** – Produção de lipases de linhagens de *A. niger* e *A. welwitschiae* isoladas de alho .....77
- Tabela 2** – Produção de lipases e avaliação do crescimento das colônias das linhagens UEL As 2.14, UEL As 4.82 e UEL As 15.262 de *A. niger*/ *A. welwitschiae*, sob diferentes temperaturas de incubação.....78
- Tabela 3** – Produção de lipases e avaliação do crescimento das colônias das linhagens UEL As 2.14, UEL As 4.82 e UEL As 15.262 de *A. niger*/ *A. welwitschiae*, em temperatura ótima de incubação encontrada para cada linhagem e diferentes pHs.....79

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
2.1	OBJETIVO GERAL .....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
3.1	CARACTERÍSTICAS DE <i>Allium Sativum</i> L .....	18
3.2	INCIDÊNCIA DO GÊNERO <i>Aspergillus</i> EM ALHOS ( <i>Allium Sativum</i> ).....	22
3.3	O GÊNERO <i>Aspergillus</i> .....	24
3.3.1	Taxonomia de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> .....	25
3.4	MICOTOXINAS PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS .....	29
3.4.1	Aspectos Gerais da Produção de Fcratoxina a Por Espécies de <i>Aspergillus</i> .....	30
3.4.2	Aspectos Gerais das Fumonisinias (FBs) Por Espécies de <i>Aspergillus</i> .....	32
3.5	ENZIMAS PRODUZIDAS POR MCRORGANISMOS .....	34
3.5.1	Características de Lipases Produzidas Por Microrganismos e Aplicações Industriais .....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
4.1	ISOLAMENTO DE <i>Aspergillus</i> DE AMOSTRAS DE ALHO .....	40
4.2	MATERIAL BIOLÓGICO PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	40
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	41
4.4	TRATAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS COM RNASE A .....	42
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	42
4.6	ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD.....	42
4.7	ANÁLISE DE DADOS DO RAPD .....	43
4.8	AMPLIFICAÇÃO DE REGIÃO PARCIAL DO GENE DA CALMODULINA.....	43
4.9	PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR COM EXOSAP-IT® .....	44
4.10	SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES PARCIAIS DO GENE DA CALMODULINA.....	44
4.11	ANÁLISE DE DADOS DO SEQUENCIAMENTO .....	45

4.12	ANÁLISE DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE OCHRATOXINA A E FUMONISINA B2 .....	46
4.13	SELEÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Aspergillus</i> SEÇÃO <i>Nigri</i> PRODUTORAS DE LIPASES .....	46
4.14	AVALIAÇÃO DA MELHOR TEMPERATURA E PH PARA PRODUÇÃO DE LIPASES. ....	46
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO. ....</b>	<b>48</b>
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1: <b>ISOLATION AND IDENTIFICATION OF <i>Aspergillus</i> SECTION <i>Nigri</i>, AND GENOTYPE FOR OCHRATOXIN A AND FUMONISIN B2 PRODUCTION IN GARLIC MARKETED IN.....</b>	<b>49</b>
5.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2: <b>POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR LINHAGENS DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> E <i>Aspergillus Welwitschiae</i> ISOLADOS DE ALHOS .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>83</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>97</b>
ANEXO A –	Perfil de RAPD das linhagens de <i>Aspergillus niger</i> (subgrupo A), <i>Aspergillus welwitschiae</i> (grupos I, II e III) e <i>Aspergillus luchuensis</i> (grupo IV) .....	98

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior consumidor de alho (*Allium sativum* L.) do mundo e o segundo maior importador dessa especiaria. A safra no país é realizada duas vezes ao ano, em duas regiões de climas bem distintos: o Sul de clima mais fresco e o Cerrado de clima quente. No Sul do país o alho é cultivado nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, enquanto que no Cerrado, são contemplados, principalmente, os estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia. Os cultivares são divididos em dois grandes grupos: o alho nobre roxo, que produz bulbos de alto valor comercial e o alho comum ou semi-nobre, que provém de cultivares mais rústicos com menor valor comercial.

O alho é utilizado em pequenas quantidades, principalmente, como condimento no preparo de alimentos, entretanto mesmo em pequenas quantidades, devido à possível infecção por microrganismos ele é considerado fator de risco à saúde.

Os fungos, destacam-se pela capacidade de sintetizar metabólitos secundários, denominados de micotoxinas que são altamente prejudiciais a saúde. De forma que, os benefícios do alho à saúde, dependem em grande parte dos métodos de processamento implementados, enquanto que a segurança depende principalmente das condições de armazenamento, devido a contaminação por microrganismos como por exemplo algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., reportadas por possuírem elevado potencial na produção de micotoxinas.

As micotoxinas produzidas por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* têm grande impacto agrícola, epidemiológico e econômico, pois estão associadas à flora microbiana comum de muitas culturas agrônômicas. Os esporos fúngicos, quando encontram nutrientes e condições ambientais favoráveis, se desenvolvem propiciando para que o fungo colonize rapidamente e consiga produzir várias toxinas. Como é o caso de alguns fungos da seção *Nigri* que rapidamente colonizam e danificam os produtos.

De modo geral, as micotoxinas podem acarretar problemas de saúde devido ao seu acúmulo e termoestabilidade, ponto chave para o alto risco que apresentam a saúde humana e animal.

Dentre esses metabólitos, destacam-se duas micotoxinas que podem ser produzidas por espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri*: as ocratoxinas (OTs) e fumonisinas (FBs). A ocratoxina A (OTA), possível carcinógeno humano, foi relatada por causar nefrotoxicidade, efeitos imunossupressores, neurotóxicos, hepatotóxicos e teratogenia. Também estão relacionadas com a etiologia em doenças animais como a nefropatia suína dinamarquesa. Por outro lado, foi evidenciado que as fumonisinas B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) são capazes de desencadear vários distúrbios, como: edema pulmonar em suínos, leucoencefalomalacia em cavalos, hepatocarcinoma em animais de laboratório. As FBs também têm sido relatadas como potencial fator de risco para defeitos do tubo neural, anomalias craniofaciais e outros defeitos congênitos decorrentes de células da crista neural.

Destacam-se também, a alta aplicabilidade de fungos filamentosos na indústria biotecnológica, pois apresentam material biológico ideal para produção de substâncias de interesse industrial, pois crescem rapidamente e com baixo custo de produção, possibilitando cultivos sob condições controladas em laboratório. Dentre as espécies pertencentes aos *Aspergillus* da seção *Nigri*, o *Aspergillus niger* destaca-se como potencial produtor de enzimas com aplicação industrial, uma vez que é capaz de produzir uma série de enzimas lignocelulolíticas e hidrolíticas, a partir de substratos de baixo valor comercial. Além disso, essa espécie é considerada pela *Food and Drug Administration* (FDA) como GRAS - Geralmente reconhecida como segura - e não tóxica em condições industriais; representando uma grande vantagem nas aplicações industriais de fermentação.

As enzimas possuem especificidade ao substrato e cada substrato contribui para a síntese de enzimas específicas. Dessa forma, acredita-se que o rico valor nutricional do alho e a ampla composição de nutrientes (proteínas, lipídios e carboidratos), propicie para que ele sirva de substrato para a síntese de enzimas extracelulares, em especial as lipases.

Desta forma, o presente trabalho, objetivou verificar a incidência de fungos, isolar e identificar fungos *Aspergillus* seção *Nigri* em amostras de alhos armazenados e comercializados em diferentes regiões do Brasil, e seu potencial de produção de OTA, FB<sub>2</sub> e lipases extracelulares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a incidência de fungos, isolar e identificar fungos do gênero *Aspergillus* em amostras de alhos comercializados no Brasil e verificar o potencial de produção de lipases em isolados não produtores de micotoxinas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* em amostras de alho comercializadas no Brasil;
- Isolar e identificar as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, isoladas das referidas amostras;
- Verificar a variabilidade genética dos isolados da seção *Nigri*;
- Sequenciar regiões parciais do gene da calmodulina de perfis representantes;
- Verificar o potencial de produção de ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub>;
- Verificar o potencial de produção de lipases de espécies não produtoras de ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub> de *Aspergillus* seção *Nigri*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS DE *Allium Sativum* L.

O *Allium sativum* L. é uma planta herbácea que atinge de 0,40 a 0,70 m de altura, possui folhas lanceoladas (Figura 1A), com limbo medindo de 0,20 a 0,30 m de comprimento. O pseudocaulé é formado pelas bainhas das folhas (Figura 1A) implantadas em caule pequeno e com característica achatada (Figura 1B). As gemas do caule se desenvolvem formando os “dentes” do alho, denominados bulbilhos (Figura 1C), e estes juntos formam o bulbo ou “cabeça” do alho, que por sua vez, apresentam características arredondada e piriforme (Figura 1D). Os bulbilhos são ligados ao caule pela base, recobertos por folhas, constituindo a túnica, que pode possuir coloração arroxeadada, amarronzada ou branca. Na base do caule é encontrado o sistema radicular (Figura 1B) do tipo fasciculado, formado pelas raízes, que podem atingir de 40 a 82 cm de profundidade no solo. Na parte superior do caule se desenvolvem as folhas, podendo ser estreitas ou largas, lisas ou cerosas; e o escapo floral, quando presente, se originam no centro do bulbo (HARVEY, 1995; CORZO-MARTÍNEZ et al., 2007; RESENDE et al., 2015).

**Figura 1** – Planta de alho com as bainhas, pseudocaulé, raízes, bulbilhos e bulbo. (A) Planta de alho com bainhas e pseudocaulé. (B) Caule verdadeiro. (C) Bulbilhos. (D) Bulbo



Fonte: Resende et al., 2015

O alho é uma especiaria que apresenta alto valor nutricional, sendo indicado como alimento funcional por possuir ampla composição de nutrientes (Tabela 1),

além de vitaminas, principalmente as do complexo B e vitamina C, antioxidantes, flavonoides e minerais (ferro, selênio, enxofre, silício, iodo, cromo), enzimas como a alinase e compostos biologicamente ativos como a alicina (MARTINS et al., 2016).

**Tabela 1** – Composição nutricional do alho cru

Componente	Concentração em 100 gramas
Umidade	67,5 %
Proteínas	7,0 g
Lipídeos	0,2 g
Carboidratos	23,0 g
Fibra alimentar	4,3 g
Cinzas	1,3 g
Cálcio	0,014 g
Magnésio	0,021 g

**Fonte:** O próprio autor. (Adaptado de NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, 2011)

Segundo a Resolução RDC nº 276 de 22 de setembro de 2005 o alho é classificado como especiaria; pertencente à família *Liliaceae*, constituída de mais de 700 espécies, entre elas, o alho-poró, a cebola e a cebolinha, (LORENZI; MATOS, 2002; MOTA et al., 2005; BRASIL, 2005). O alho, foi inicialmente cultivado em regiões da Sicília, Ásia Central e vários locais da Europa e Ocidente, sendo utilizado desde a antiguidade como alimento ou com fins terapêuticos (MOTA et al., 2005).

Os cultivares de alho são divididos em dois grandes grupos: nobre e comum ou semi-nobre. O alho nobre roxo, produz bulbos de alto valor comercial, com característica arredondada e uniforme, bulbilhos grandes com ausência de palito e sensibilidade ao superbrotamento, com túnicas de coloração roxa intensa. Os bulbos nobres, apresentam túnica branca e película rósea ou na maioria das vezes, roxa, com cerca de 8 a 12 bulbilhos por bulbo (MOTA et al., 2004; MOTA et al., 2006; LUCINI, 2008; RESENDE et al., 2015).

O alho comum ou semi-nobre, provém de cultivares mais rústicos, com bulbos de formato e aparência menos atrativas ao consumidor, com formato irregular, e cerca de 15 bulbilhos por bulbo. Além disso, tem-se a presença de palitos, túnica e película branca ou levemente arroxeadas, dispensa vernalização para produção em climas tropicais e é resistente ao superbrotamento, que é

indicativo da baixa adaptação ao local de cultivo, diminuindo a produtividade do cultivo. O superbrotamento, brotamento antecipado dos bulbilhos antes da colheita, pode ser desencadeado por influência de vários fatores, como fotoperíodo, temperatura, adubação nitrogenada, cultivar e irrigação (MACÊDO et al., 2006; RESENDE et al., 2015).

A cultura dessa especiaria exige condições amenas de temperatura: 18 a 20 °C na fase inicial do ciclo, 10 a 15 °C durante o período de bulbificação e temperaturas um pouco mais elevadas (20 a 25 °C) no período de maturação. Entretanto, no Brasil, o cultivo contempla duas regiões de climas bem distintos: o Sul de clima mais fresco, e o Cerrado de clima quente. No Sul do país o alho é cultivado nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, enquanto que no Cerrado, o cultivo contempla principalmente os estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia (FREDDO, 2016). Os cultivares de alho nobre, além de temperaturas mais baixas, também necessitam de mais de 13 horas diárias de luz para formação dos bulbos. Por esse motivo, os cultivares da região do Cerrado, somente bulbificam quando são submetidos a vernalização em pré-plantio (SOUZA; MACÊDO, 2004; MACÊDO et al., 2006; RESENDE et al., 2015).

No processo de vernalização, os bulbilhos-semente permanecem em câmeras de frigoconservação, por 45 a 60 dias, em temperatura de 3 a 5 °C antes do plantio, para que os bulbilhos se desenvolvam e estejam preparados para o plantio (LUCINI, 2008; SIMON et al., 2014; FREDDO, 2016). Em alguns casos a vernalização pode ocorrer naturalmente, como foi o caso das regiões de cultivo situados no Sul do Brasil (Figura 2), que no período de plantio (julho/ 2016), a região passou por um período intenso de inverno, com geadas (Figura 2A), beneficiando a safra com um processo de “vernalização natural” dos bulbilhos-semente, indicativo de excelentes resultados (LUCINI, jul/2016).

**Figura 2** – Plantio do alho no Rio Grande do Sul. (A) e (B) Safra de 2016/17. (C) Alho recém brotado



**Fonte:** LUCINI, Jun/2016

No Brasil, a safra do alho acontece duas vezes ao ano, sendo a maior delas na região do Cerrado, com início nos meses de março e abril, e término no final de julho a outubro; E na região Sul, com início em junho e julho, finalizando em dezembro e janeiro (RESENDE et al., 2015).

O Brasil é considerado o maior consumidor de alho do mundo e o segundo maior importador dessa especiaria. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor de alho do Brasil, com 48.139 toneladas em 2016. Seguido pelo Estado de Goiás (28.881 toneladas), Santa Catarina (26.016 toneladas) e Rio Grande do Sul (15.542 toneladas) (CARVALHO; KIST, 2017).

Em 2016 o consumo de alho no país foi de aproximadamente, 300 mil toneladas, sendo 42% de produtos internos (CARVALHO; KIST, 2017). Para o ano de 2017, o consumo nacional de alho também foi estimado em trezentas mil toneladas (LUCINI, ago/2017).

A safra da região do Cerrado, abastece o país no segundo semestre do ano, juntamente com os alhos importados da China. Enquanto que a safra da região Sul abastece o país no primeiro semestre do ano, juntamente com o alho da Argentina, período considerado de entressafra no Brasil (RESENDE et al., 2015). A partir desses dados, percebe-se que longos períodos de armazenamento são necessários

para que todo o volume de alho seja comercializado, suprimindo as necessidades de consumo durante a entressafra.

Em alguns casos, onde há grande quantidade dessa especiaria no mercado, o alho pode ficar armazenado por mais de um ano. O mais recomendado é que seja mantido em câmaras frias com umidade controlada a 65 – 70 % e temperatura entre 1 a 2 °C, de forma que os alicultores possam manter a qualidade, e estabilizar a oferta dos produtos (LUCINI, 2016).

Embora a utilização do alho seja pequena nos alimentos ele pode ser considerado um fator de risco reconhecido à saúde, devido à contaminação por microrganismos nos períodos de estocagens inadequadas. Dentre os microrganismos destacam-se os, fungos, que podem sintetizar metabólitos secundários, denominados micotoxinas, altamente prejudiciais a saúde. Dentre as espécies de fungos reportadas por possuírem um elevado potencial na produção de micotoxinas, destacam-se algumas espécies do gênero *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., e *Penicillium* spp. (SWEENEY; DOBSON, 1998; VARGA et al., 2015).

### 3.2 INCIDÊNCIA DO GÊNERO *Aspergillus* EM ALHOS (*Allium Sativum*)

O alho, além de utilizado como alimento é utilizado em forma terapêutica, pelas diversas propriedades que apresenta, constitui-se em fator de risco à saúde, pois sua eficácia e recomendação clínica dependem em grande parte dos métodos de processamento implementados pós-colheita, enquanto que a segurança de seu uso, depende principalmente das condições de armazenamento deste produto, o que pode favorecer a contaminação por microrganismos (AMAGASE, 2006; VERÍSSIMO et al., 2010).

Os condimentos em geral, quando não são mantidos em condições de umidade e temperatura recomendados, favorecem o desenvolvimento de fungos filamentosos ou outros microrganismos que podem levar à deterioração do alimento tornando um fator de riscos à saúde do consumidor devido a consequente síntese de toxinas (FONTENELE et al., 2015).

A contaminação e proliferação de fungos pode ocorrer em diferentes etapas da produção do alho, como a coleta, o processamento e o armazenamento, esta última etapa constitui-se no principal fator de contaminação por fungos filamentosos. As condições ambientais em que este produto é transportado e estocado até a

completa comercialização, são responsáveis pela perda da qualidade (DE OLIVEIRA et al., 2002)

Até o momento, poucos são os relatos que contemplam a situação do alho e seus produtos derivados, quanto à contaminação de espécies do gênero *Aspergillus*.

Na maioria dos estudos, o alho é pouco representado pelo fato dos mesmos contemplarem várias especiarias ou outros produtos alimentares (PATEL, 1996; MACDONALD; CASTLE, 1996; GNONLONFIN et al., 2013; TOMA; ABDULLA, 2013; TANCINOVÁ et al., 2014). Dentre os poucos relatos relacionados somente à microflora fúngica em alhos está o estudo de Ghangaonkar (2013). O autor contemplou exclusivamente a microflora fúngica de bulbos de alho, obtidos do campo e comercializados, no entanto, o autor não avaliou a presença de micotoxinas. Neste estudo, realizado na Índia, o autor identificou a presença de 14 espécies fúngicas, das quais as espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina Phaseolina*, *Botrytis alli*, *Penicillium corymbiferum*, *Rhizopus stolonifer*, *Chaetomium globosum* foram predominantes em amostras de alho comercializadas.

Recentemente, Fontenele et al. (2015) estudaram a contaminação fúngica em alhos comercializados nos mercados públicos piauienses, oriundos da microrregião de Picos, no estado do Piauí. Foram avaliados 35 amostras de alho produzidas na microrregião de Picos e 15 amostras de alhos importados, e comercializados no mercado local. Os autores observaram que em alhos cultivados na região de Picos houve maior prevalência de contaminação por fungos filamentosos quando comparado aos alhos importados. No entanto, a frequência de *Aspergillus* foi de 21,83 % em alhos da região de Picos e 31,81 % em alhos importados.

Oh et al. (2016) ao estudarem alhos provenientes da Coréia, isolaram *Aspergillus* negros e relataram pela primeira vez *Aspergillus awamori* como fungo patogênico neste produto.

Embora existam poucos relatos descritos na literatura, relativos à presença de fungos do gênero *Aspergillus* em alho, as espécies comumente encontradas neste produto são pertencentes à secção *Nigri* e *Flavi*. Como indica o relato de Toma e Abdulla (2013), que ao investigarem 16 amostras representativas de plantas medicinais e especiarias incluindo o alho, coletadas e comercializadas na cidade de

Erbil, os autores observaram maior frequência de fungos dos gêneros *Aspergillus* (*A. flavus*) e *Penicillium*.

Gnonlonfin et al. (2013), avaliaram 114 amostras de especiarias secas e moídas tais como gengibre, alho (35 amostras) e pimenta do reino, comercializadas nas regiões Benin e Togo (oeste da África). A contaminação fúngica foi avaliada após plaqueamento em meio de cultura seletivo, obtendo-se um total de 20 gêneros de fungos identificados. Variando de 7 a 14 gêneros no alho e gengibre, respectivamente. As espécies do gênero *Aspergillus* foram predominantes em todas as especiarias comercializadas secas e moídas.

Tancinová et al. (2014), ao estudarem 67 amostras de especiarias e ervas de diferentes países, relataram espécies de fungos pertencentes a 11 gêneros, com predomínio dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. No alho em pó, os autores isolaram *Aspergillus* seção *Nigri*, *Penicillium alli* e *Penicillium chrysogenum*.

Agregado aos relatos da presença de *Aspergillus* em alhos está a produção de micotoxinas por algumas espécies deste gênero. Atualmente, somente os estudos Patel (1996), MacDonald e Castle (1996), e Toma e Abdulla (2013), identificaram a produção de aflatoxina por *Aspergillus* em amostras de alho.

### 3.3 O GÊNERO *Aspergillus*

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são anamórficos pertencentes a família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes, e filo Ascomycota, caracterizando-se por produzirem fiálides e conídios em cadeia. Esse gênero apresenta conidióforo simples, usualmente aseptado, terminando em vesícula onde estão inseridas as fiálides. Algumas espécies também podem produzir esclerócios ou células de Hülle, além de poder apresentar telemorfos e se reproduzir sexuadamente (KLICH, 2002).

A denominação do gênero *Aspergillus* foi catalogado pela primeira vez pelo biólogo italiano Pietro Micheli, no ano de 1729, introduzido por Haller em 1768, e sancionado por Fries (1832), com nome genérico de *Aspergillus glaucus* (L.). Sendo que os maiores estudos publicados sobre o gênero *Aspergillus* foram realizados por Thom e Raper (1945), Raper e Fennell (1965) e Samson et al., (2014).

A lista de nomes de uso corrente (NCU) para família *Trichocomaceae*, segundo Pitt e Samson (1993), aceitou 185 nomes de *Aspergillus* anamórficos e 72

teleomórficos. Em 2000, Pitt et al., atualizaram a lista de espécies do gênero *Aspergillus*, aceitando 184 *Aspergillus* e 70 nomes teleomórficos associados. Tais listas basearam-se em conceitos morfológicos de espécies naquele momento, no entanto essas listas rapidamente foram desatualizadas perante o surgimento de novas espécies descritas, utilizando não somente caracteres morfológicos, mas também distinções filogenéticas.

Estudos recentes como de Houbraken et al (2014) e Hubka et al., (2014) apresentaram 4 subgêneros: *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes* e 20 seções para o gênero *Aspergillus* (SAMSON, et al., 2014).

### 3.3.1 Taxonomina de *Aspergillus* Seção *Nigri*

Os *Aspergillus* pertencentes a seção *Nigri*, caracterizam-se num grupo de espécies fúngicas de grande importância micológica, por deteriorarem alimentos. Por outro lado, são significativos em outras áreas como micologia médica e biotecnologia, nesta última por aplicações industriais em processos fermentativos para a produção de enzimas hidrolíticas, como lipases e amilases, além de ácidos orgânicos como ácido cítrico e ácido glucônico (SAMSON et al., 2007; SPERB et al., 2015; VARGA et al., 2015).

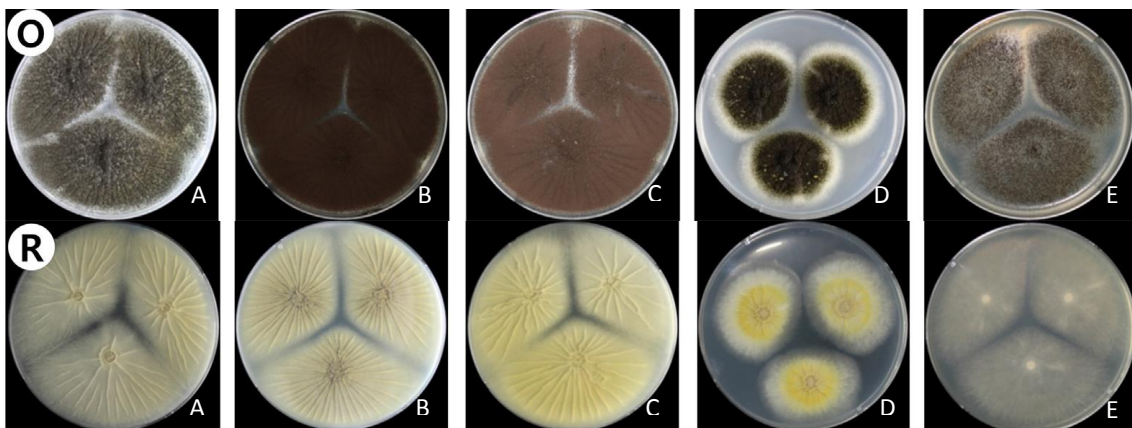
Espécies de fungos da seção *Nigri* são encontrados abundantemente em muitos habitats, vivendo de forma saprófita, deteriorando vegetais em condições elevadas de umidade. Além disso, uma variedade de espécies dessa seção tem sido encontradas e descritas em muitas outras fontes como: animais, grãos de cereais armazenados, grãos de café, vegetais, frutas secas, cacau, feijão, guaraná, avelã, amêndoas, castanha de caju, milho, arroz, amendoin, soja, trigo, uvas, figos, nozes e especiarias como pimenta, cebola e alho (KLICH, 1987; KLICH; PITT, 1988; ABARCA et al., 1994; KONIETZNY; GREINER, 2003; FUNGARO; SARTORI, 2009; SILVA et al., 2011; OH et al., 2016).

A taxonomia e identificação dessa seção é uma das mais complexas do gênero. Para a identificação e caracterização de espécies deve-se levar em consideração inicial a caracterização morfológica macroscópica, como a coloração das colônias em meios de culturas característicos (Figura 3) e a caracterização morfológica microscópica (Figura 4), considerando a ornamentação conidial, o

tamanho dos conídios e as estruturas dos conidióforos (RAPER; FENNELL, 1965; KLICH; PITT, 1988).

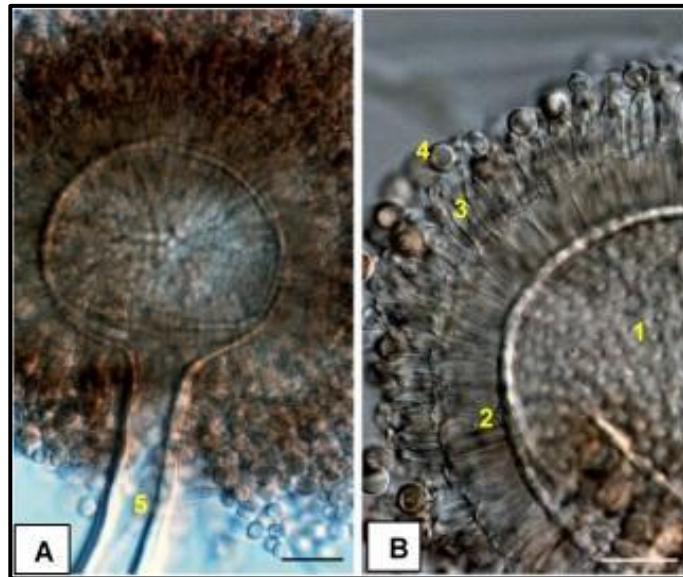
Os fungos da seção *Nigri* normalmente apresentam-se com micélio de coloração branca na fase inicial de maturação, evoluindo para conídios com coloração marrom escuro a negro (Figura 4); os conidióforos podem apresentar estruturas unisseriadas ou bisseriadas, vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice (RAPER; FENNELL, 1965; KLICH; PITT, 1988).

**Figura 3** – Caracteres morfológicos macroscópicos. *Aspergillus awamori* em vários meios: (A) ágar de extrato de levedura de Czapek (CYA) a 25 °C, (B) CYA a 37 °C, (C) CYA com 20 % de sacarose, (D) Czapek Dox ágar (CZ) e (E) ágar de extrato de malte (MEA). O: verso da placa. R: reverso da placa



Fonte: Oh et al., (2016)

**Figura 4** – Caracteres morfológicos microscópicos de *Aspergillus acidus*. 1: vesícula/ 2: métula/ 3: fiálide/ 4: conídios/ 5: estipe. Escala bar = 10 µm



**Fonte:** O próprio autor (Adaptado de Varga et al., 2011)

Um dos estudos mais completos sobre fungos do gênero *Aspergillus*, foi realizado por Raper e Fennell (1965), através do agrupamento de fungos que apresentavam conídios de cor preta, buscando identificar e descrever as espécies pertencentes a seção *Nigri*, resultando em um manual que identificava 12 espécies e 2 variedades, sendo elas: *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*.

Com o decorrer dos anos, muitos estudos foram realizados para melhor identificar e classificar ou reclassificar essa seção. No estudo realizado por Samson et al. (2007), os autores analisaram caracteres morfológicos, produção de metabólitos secundários e sequenciamento das regiões ITS do DNA ribossomal, genes da  $\beta$ -tubulina e calmodulina aceitando 19 espécies para a seção *Nigri*: *A. aculeatinus*, *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricaensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. ibericus*, *A. japonicus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotii carbonarius*, *A. sclerotioniger*, *A. tubingensis*, *A. uvarum* e *A. vadensis*.

Anos depois, Varga et al. (2011), estudaram a seção considerando a morfologia, fisiologia, ecologia e caracteres moleculares para a classificação da seção *Nigri*, identificando quatro novas espécies (*A. eucalypticola*, *A. fijiensis*, *A.*

*indologenus* e *A. neoniger*), totalizando 26 espécies que foram divididas em cinco clados principais (clado *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus* e *A. aculeatus*). O clado *A. niger* foi composto por 10 espécies bisseriadas dividida em três subclados (*A. tuingensis*, *A. niger* e *A. brasiliensis*), conforme dados de sequências parciais dos genes da calmodulina e  $\beta$ -tubulina. Outro clado inclui as espécies semelhantes a *A. carbonarius* (*A. ibericus*, *A. sclerotioniger* e *A. sclerotiocarbonarius*), que possuem como características próprias, conídios relativamente grandes. Um terceiro clado foi formado por *A. ellipticus* e *A. heteromorphus*, enquanto que a espécie bisseriada *A. homomorphus* forma um clado diferente. Por fim, o quinto e último clado foi formado por todas espécies uniseriadas, sete espécies no total, pertencentes ao clado *A. aculeatus* (VARGA et al., 2011).

Recentemente Samson et al., (2014), utilizaram as sequências parciais das regiões ITS do DNAr, genes da  $\beta$ -tubulina e calmodulina para identificação de espécies pertencentes à seção *Nigri*, relatando a existência de 26 espécies: *A. welwitschiae*; *A. niger*; *A. brasiliensis*; *A. costaricaensis*; *A. carbonarius*; *A. ellipticus*; *A. floridensis*; *A. heteromorphus*; *A. homomorphus*; *A. ibericus*; *A. japonicus*; *A. luchuensis* (= *A. acidus*) / *A. piperis*; *A. saccharolyticus*; *A. sclerotiocarbonarius*; *A. sclerotioniger*; *A. trinidadensis*; *A. uvarum*; *A. vadensis*; *A. tuingensis* / *A. neoniger*; *A. japonicus* / *A. indologenus*; *A. aculeatinus*; *A. aculeatus*; *A. fijjensis* / *A. brunneoviolaceus* (SAMSON et al., 2014). No entanto, recentemente o grupo de Fungaro et al., (2017), descreveram a espécie *Aspergillus labruscus* isolada de uvas *Vitis labrusca* L. no Brasil, totalizando 27 espécies inclusas nessa seção (FUNGARO et al., 2017).

A seção *Nigri* abriga espécies muito semelhantes entre si, algumas espécies indistinguíveis apenas por caracteres morfológicos. Dentre as 27 espécies descritas, Samson et al., (2014) descreveram 10 espécies pertencentes ao “agregado *niger*”, que são espécies cuja identificação exige análise parcial do gene da *b-tubulina* (*ben-A*) e calmodulina (*CaM*), pois são altamente relacionadas e indistinguíveis morfológicamente (PERRONE et al., 2011; MASSI et al., 2016).

As espécies dessa seção evoluem e diferenciam-se rapidamente, como a espécie *A. awamori*, inicialmente associada a fermentação de koji awamori fabricado nas ilhas Okinawa no Japão, foi recentemente desmebrada do táxon de *A. niger* (PERRONE et al, 2011). E renomeada por Hong et al., (2013) como *A. welwitschiae*,

pelo fato do táxon ser idêntico a estirpe CBS 139.54, depositada na CBS (CBS - KNAW Fungal Biodiversity Centre, the Netherlands), isolada de *Welwitschia* na Namíbia – África. Além das pesquisas mostrarem que essa estirpe não tem relação com os fungos envolvidos na fermentação de koji awamori (HONG et al., 2013; PALUMBO; O'KEEFFE, 2015). Entretanto, as duas espécies são filogeneticamente relacionadas, amplamente aplicadas na indústria biotecnológica e apresentam potencial para produção de FB<sub>2</sub> e OTA (PERRONE et al., 2011; PALUMBO et al., 2013; PALUMBO; O'KEEFFE, 2015).

### 3.4 MICOTOXINAS PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos metabolizam diversos compostos orgânicos, variando de simples moléculas a complexas estruturas químicas, que frequentemente assumem algum papel biológico, desencadeando papel maléfico ou benéfico, sendo assim conhecidos como metabólitos secundários (KLICH, 2002; SILVA et al., 2015; VARGA et al., 2015). As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos e apresentam como características: baixo peso molecular, geralmente menores que 1.000 daltons, não volatilizam, além da diversidade de estruturas química e atividade biológica, sendo sintetizadas por fungos em condições favoráveis de umidade e temperatura. Podem estar contidas no micélio fúngico, no interior dos esporos ou extracelulares, liberadas em produtos alimentícios (KLICH, 2002; GOLÇALVES et al., 2012; ALSHANNAQ; YU, 2017). De forma mais breve e sintética, Bennett (1987) definiu micotoxinas como “*produtos naturais produzidos por fungos que evocam uma resposta tóxica quando introduzidas em baixa concentração em vertebrados superiores e outros animais por uma rota natural.*”

Espécies fúngicas dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, destacam-se como os principais contaminantes produtores de micotoxinas em alimentos. Enquanto *Aspergillus* e *Penicillium* desenvolvem-se predominantemente em alimentos durante o período de armazenamento, *Fusarium* é comumente encontrado na fase de crescimento no campo, propagando-se pela planta (BENNETT; KLICH, 2003; VARGA et al., 2015; ALSHANNAQ; YU, 2017).

As micotoxinas apresentam importância relevante para saúde humana, podendo causar efeitos teratogênicos, imunossupressivos, nefrotóxicos, hepatotóxicos e carcinogênicos (GELDERBLOM et al., 1991; GUTLEB et al., 2002;

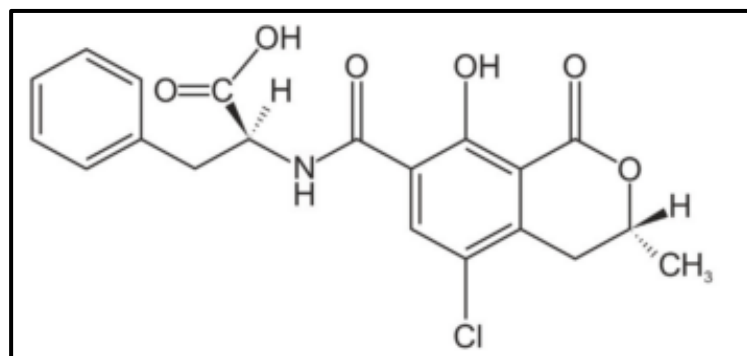
FRISVAD et al., 2007, 2011; PERRONE et al., 2011; PALUMBO; O'KEEFFE, 2015). Tais efeitos são atribuídos a diversidade estrutural apresentada, variando desde a presença de um único anel heterocíclico até oito anéis associados (GEISEN, 1998; BENNETT; KLICH, 2003). Apesar dos possíveis efeitos causados, a importância dessas micotoxinas a saúde humana ainda não pode ser totalmente avaliada e esclarecida, pois seus efeitos são normalmente sutis, porém cumulativos (BENNETT; KLICH, 2003).

Segundo Samson et al., (2014) o gênero *Aspergillus* compreende 344 espécies, e a quimiodiversidade entre elas é muito alta, de forma que uma mesma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies ou uma mesma espécie pode produzir diversos metabólitos secundários, como por exemplo, *A. niger* que pode produzir tanto fumonisina B2 como ocratoxinas (FRISVAD et al., 2011).

#### 3.4.1 Aspectos Gerais da Produção de Ocratoxina a Por Espécies de *Aspergillus*

As ocratoxinas (OTs) são divididas em três classes (A, B ou C), sendo a ocratoxina A (OTA), a mais frequente e com maior grau de toxicidade. Elas são formadas por um policetídeo cíclico, derivado da dihidroisocumarina clorado ligado a fenilalanina por uma ligação amida (Figura 5) (FRISVAD et al., 2006; VARGA et al., 2015).

**Figura 5** – Estrutura química da Ocratoxina A



**Fonte:** O próprio autor (Adaptado de Varga et al., 2015)

Pouco se sabe sobre a biossíntese da OTA, acredita-se que o policetídeo dihidroisocumarina é formado a partir da condensação do acetato e malonato por uma enzima policetídeo sintase (PKS). Este que, por sua vez, sofre metilação e

oxidação originando a OT $\beta$ , e através da cloroperoxidase é clorada formando a OT $\alpha$ . Por fim, a ligação entre os grupos carboxila do policetideo e do aminoácido fenilalanina é catalizado por uma enzima peptídeo sintase (HARRIS; MANTLE, 2001).

Estão relacionadas com a etiologia em doenças animais e humanas como a nefropatia suína dinamarquesa (VARGA et al., 2001; FUNGARO; SARTORI, 2009; ALSHANNAQ; YU, 2017). Uma das causas desse grande alarde e do foco maior destinado a essa micotoxina, foi a inclusão e classificação da OTA como pertencente ao grupo 2B, pela *Agência Internacional de Investigação do Câncer* - IARC, ou seja, essa micotoxina é um possível carcinógeno humano (IARC, 2010).

Elas são estáveis em ambientes acidificados além de tolerar altas temperaturas de processamento. De maneira que essas micotoxinas foram encontradas em diferentes produtos alimentícios, como cereais, especiarias, café, cacau, uvas, maçãs, cerveja e produtos derivados, dentre muitos outros alimentos (VARGA et al., 2001; AMÉZQUETA et al., 2012; ALSHANNAQ; YU, 2017). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, instaurou através da Resolução No 7, de 18 de fevereiro de 2011, o limite máximo tolerável (LMT) de 30  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para OTA em especiarias. Entretanto, de acordo com essa Resolução, estão inclusas apenas as especiarias: *Capsicum* spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta decaena e pimentão-doce), *Piper* spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta), *Myristica fragrans* (noz-moscada), *Zingiber officinale* (gingibre) e *Curcuma longa* (Açafrão/Cúrcuma). O *Allium sativum* (alho) não está englobado nessa Resolução. Portanto, não se tem instituído na legislação brasileira LMT de OTA em alhos.

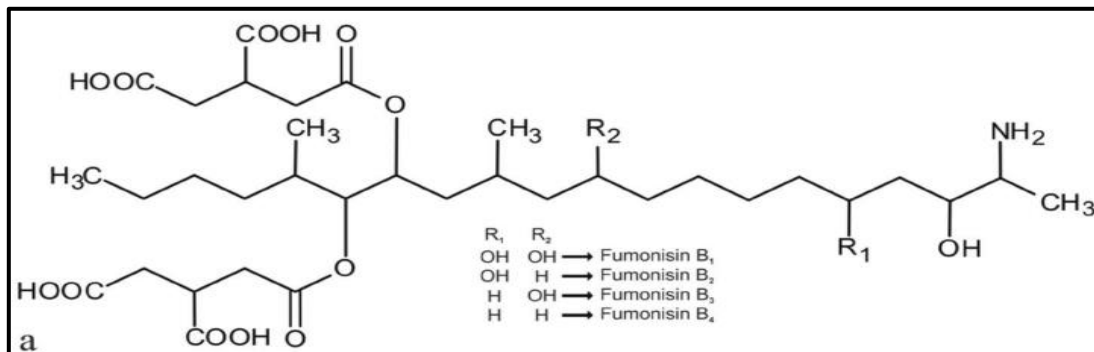
A OTA foi descoberta em 1965, no sul da África por Van Der Merwe e colaboradores, em isolados de *Aspergillus ochraceus* e desde então vem sido reportada em várias espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (VAN DER MERWE, et al., 1965).

A produção de OTA por espécies pertencentes a seção *Nigri* ainda é assunto de muita discussão, entretanto, Varga et al., (2015), ressaltam que na seção *Nigri*, apenas *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. sclerotioniger* e *A. welwitschiae* possuem elevado potencial para produção de Ocratoxina.

### 3.4.2 Aspectos gerais das Fumonisinias (FBs) Por Espécies de *Aspergillus*

As fumonisinias (FBs) são micotoxinas produzidas principalmente por espécies de *Fusarium*. São substâncias hidrofílicas, com estrutura molecular de um amino poliálcool tricarboxilado altamente polar e solúvel em água e solventes orgânicos (Figura 6) (VARGA et al., 2015; ALSHANNAQ; YU, 2017).

**Figura 6** – Estrutura química das Fumonisinias (FBs)



Fonte: O próprio autor (Adaptado de Varga et al., 2015)

Foram isoladas pela primeira vez por Gelderblom e pesquisadores do *South African Medical Research Council*, no ano de 1988, identificando as fumonisinias B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) do microrganismo isolado *Fusarium verticillioides* (GELDERBLOM et al., 1988). Anos mais tarde, pesquisas revelaram que outras espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Bipolaris* e *Tolypocladium* também são capazes de produzir fumonisinias (FRISVAD et al., 2011; SHIMIZU et al., 2015). No gênero *Aspergillus*, a primeira constatação de produção de FBs, neste caso FB<sub>2</sub>, foi realizada por Frisvad et al. (2007), em cepas de *Aspergillus niger* utilizadas no setor industrial para produção de ácido cítrico e enzimas extracelulares (FRISVAD et al., 2007).

No grupo das FBs pode-se identificar várias espécies estruturalmente diferentes nomeadas numericamente de FB<sub>1</sub> a FB<sub>4</sub> e FB<sub>6</sub> (MÅNSSON et al., 2009). A FB<sub>1</sub> é o tipo mais encontrado e constitui cerca de 70-80% do total das FBs. Entretanto, a FB<sub>2</sub> é considerada a mais tóxica do grupo, encontrada frequentemente em cereais, podendo causar uma variedade de efeitos tóxicos em diferentes espécies (RHEEDER et al., 2002; COLE et al., 2003; LINO et al., 2006; KRŠKA et al., 2007; KARBANCIUGLU-GULER; HEPERKAN, 2009; SZÉCSI et al., 2010; VARGA et al., 2010; SCOTT, 2012; ROCHA et al., 2014).

De modo geral, essas micotoxinas podem acarretar graves problemas de saúde, sendo considerada a termoestabilidade o ponto chave para o alto risco que apresentam a saúde humana e animal (FARIAS et al., 2002). As FBs são capazes de desencadear vários distúrbios, como: edema pulmonar em suínos, leucoencefalomalacia em cavalos, hepatocarcinoma em animais de laboratório (MARIN et al., 2013). Em humanos, há uma ligação entre o alto consumo de café contaminado por fumonisinas e a ocorrência de câncer esofágico em algumas áreas do mundo, além de que as FBs também têm sido relatadas como potencial fator de risco para defeitos do tubo neural, anomalias craniofaciais e outros defeitos congênitos decorrentes de células da crista neural (MARASAS, 2001; MARASAS et al., 2004; MISSMER et al., 2006).

Além disso, as FBs possuem alta similaridade estrutural com a parte polar da esfingosina, sugerindo que possa acontecer uma inibição da biossíntese de esfingolipídios, acarretando em problemas para atividade celular, pois essas substâncias são essenciais para a composição da membrana celular, para a comunicação entre as células, interação celular e matriz celular, além de interferir também em fatores de crescimento (MERRILL et al., 1993; ALSHANNAQ; YU, 2017).

Desta forma, a IARC classificou as FBs como substâncias cancerígenas pertencentes ao grupo 2B (IARC, 2010), e o Comitê Científico em Alimentos da Comissão Europeia determinou a ingestão diária tolerável (TDI) para FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub>, isoladamente ou em conjunto, de 2µg/Kg de peso corporal (SCF, 2003; ALSHANNAQ; YU, 2017). Enquanto que, no Brasil, a RDC No 7/2011 instituiu o LMT de Fumonisinas apenas para milhos e alimentos à base de milho.

Na seção *Nigri*, *A. niger* e *A. welwitschiae* são relatadas como potenciais produtoras de FB<sub>2</sub> (SAMSON et al 2007; HONG et al., 2013). *A. niger* é frequentemente detectado em uvas e produtos derivados de uva (Varga et al 2010), e a principal espécie da seção *Nigri* em milhos e produtos agrícolas (SUSCA et al., 2014), além de grãos de café (FRISVAD et al., 2007). Enquanto *A. welwitschiae* está sendo encontrado em uvas (PERRONE et al., 2011), cebolas (VARGA et al., 2012), alhos (OH et al., 2016) e milhos (SUSCA et al., 2014).

Nem todos os isolados de *A. niger* e *A. welwitschiae* são capazes de produzir FBs, entretanto a maioria dos isolados de *A. welwitschiae* são relatados como produtores de grandes quantidades de FBs, sendo que o melhor produtor de

FB<sub>2</sub>, FB<sub>4</sub> e FB<sub>6</sub>, relatado por Frisvad et al. (2011), é a estirpe NRRL 567, identificada como *A. welwitschiae*, aplicada na produção de ácido cítrico. Além disso, Frisvad et al., (2011), mostraram que aproximadamente 80% de isolados de *A. niger*, incluindo estirpes industriais tinham capacidade de produzir FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub>.

O genoma de *A. niger* é composto por um *cluster* de pelo menos 10 genes, ortólogos a *Fusarium verticillioides*, envolvidos na biossíntese de FBs: *fum6*, citocromo P450 monoxigenase; *fum10*, acil-CoA sintetase; *fum7*, desidrogenase; *fum3*, dioxigenase; *fum8*, aminotransferase; *fum13*, desidrogenase de cadeia curta; *fum14*, peptídeo sintase não ribossomal com o domínio de condensação; *fum15*, citocromo P450 monoxigenase; *fum19*, transportador ABC; e *fum1*, policetídeo sintase (PEL et al., 2007).

Palumbo e O’Keeffe (2013) relataram que os padrões de expressão dos genes envolvidos na síntese de FBs em diferentes cepas de *A. niger* e *A. welwitschiae* variam, entretanto, os genes *fum8*, *fum3* e *fum13* são expressos pela maioria das cepas. Sendo que o gene *fum8* também é encontrado em cepas não produtoras de FB<sub>2</sub>. Baseado nos estudos realizados, os autores relatam que a ausência de um gene na via de biossíntese de FB<sub>2</sub> pode indicar a não produção de FB<sub>2</sub>. Por outro lado, a presença de todos os genes da via de síntese, por PCR multiplex, não prevê de forma confiável a capacidade de produção de FB<sub>2</sub> por determinada cepa (PALUMBO; O’KEEFFE; 2013)

Em contraste, Shimizu et al. (2015) relataram que o gene *fum8* que codifica para a enzima  $\alpha$ -oxoamina sintase, é essencial na biossíntese de FB<sub>2</sub> em *A. niger*, pois ao interromper esse gene na via de síntese, a estirpe perde a capacidade de síntese de FB<sub>2</sub>.

Diante da necessidade comprovada, deste gene na biossíntese de FB<sub>2</sub> por *A. niger*, Massi et al. (2016) desenvolveram um método de PCR multiplex com a finalidade de identificar espécies *A. niger* e *A. welwitschiae*, com genótipo para produção de FB<sub>2</sub> utilizando o gene *fum8* como meio dessa identificação.

### 3.5 ENZIMAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana, destacando-se as de origem microbiana por apresentar elevado potencial de aplicação industrial, pois são facilmente produzidas em grande escala através de

processos fermentativos, e oferecem o benefício de produção ilimitada (GANDHI, 1997; SENA et al., 2006).

As enzimas agem como biocatalizadores e apresentam grande importância industrial em diversos processos biotecnológicos, além de apresentar menor impacto ambiental, menor consumo energético, e garantir a obtenção de um produto final de melhor qualidade que o produto tradicional, contribuindo para a melhoria do processo de produção, reduzindo os custos laboratoriais e acarretando na produção de novos produtos no mercado (ORLANDELLI et al., 2012).

Cabe ressaltar que, para a obtenção de uma enzima com aplicabilidade industrial, são necessários investimentos, que muitas vezes resultam em custo elevado do processo. Sendo um fator determinante para a viabilização da aplicação biotecnológica industrial, a redução de custos na linha de produção. Desta forma, percebe-se um crescente aumento nas linhas de pesquisa, buscando a descoberta de novos microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que apresentem enzimas com alta produtividade, especificidade e estabilidade para o desenvolvimento de novos produtos e melhoramento dos processos e produtos já existentes (SANTOS et al., 2013; GRIEBELER et al., 2015).

Há uma grande variedade de enzimas aplicadas em diferentes setores industriais, como nas indústrias têxteis, cervejaria e bebidas destiladas onde são empregadas as amilases (GUIMARÃES et al., 2006; GRIEBELER et al., 2015); na indústria de vinhos, processamento de sucos de frutas onde são empregadas pectinases (PANDEY, et al., 2005; BARATTO et al., 2011); indústrias alimentícia, de detergentes e tratamento de resíduos industriais onde são aplicadas proteases (ROJAS et al., 2009; ORLANDELLI et al., 2012); na indústria de detergentes e couro onde são empregadas lipases (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; SOARES, 2010; PASHA et al., 2013; GRIEBELER et al., 2015); na produção de biocombustível onde são empregadas celulases (XING-HUA et al., 2009; GRIEBELER et al., 2015).

Dentre as espécies pertencentes a *Aspergillus* da seção *Nigri*, o *A. niger* (Tabela 2) se destaca como potencial produtor de enzimas com aplicação industrial. Uma vez que é capaz de produzir uma série de enzimas lignocelulolíticas a partir de substratos de baixo valor comercial (SANTOS et al., 2013). Mesmo essa espécie sendo capaz de produzir toxinas como a OTA e FB<sub>2</sub> (NIELSEN et al., 2009), linhagens melhoradas de *A. niger* são consideradas pela *Food and Drug Administration* (FDA) como GRAS - Geralmente Reconhecida Como Segura - e não

tóxica em condições industriais; representando uma grande vantagem nas aplicações industriais de fermentação, resultando na produção de ácido cítrico, enzimas industriais (Tabela 2) (NIELSEN et al., 2009; SUSCA et al., 2014).

**Tabela 2** – Enzimas comerciais obtidas a partir de fungos do gênero *Aspergillus*

Fungo produtor	Enzimas comerciais
<i>Aspergillus aculeatus</i>	$\beta$ -glucanase, pectinase
<i>Aspergillus melleus</i>	Protease
<i>Aspergillus niger</i>	Aminopeptidase, $\alpha$ -amilase, $\alpha$ -galactosidase, catalase, celulase, fitase, $\beta$ -glucanase, glucoamilase, hemicelulase, inulinase, lipase, pectinase, protease, xilanase
<i>Aspergillus oryzae</i>	Aminopeptidase, $\alpha$ -amilase, lactase, protease
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	Pectinase

**Fonte:** adaptado de Orlandelli et al., 2012

### 3.5.1 Características de Lipases Produzidas Por Microrganismos e Aplicações Industriais

As lipases (glicerol ester hidrolases, E.C. 3.1.1.3), fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas responsáveis por catalisar a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (SHARMA et al., 2001; TREICHEL et al., 2010). A função biológica desencadeada por essas enzimas é primordialmente catalisar a hidrólise de triglicerídeos insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol. Por outro lado, em condições restritas de água, catalisam a reação de esterificação com síntese de ésteres de ácidos graxos, além de possuir estabilidade em solventes orgânicos, grande variedade de substratos e apresentar a capacidade de catalisar reação de síntese tão eficiente quanto a de hidrólise (DOBREV et al., 2015; GUPTA et al., 2015; CASTRO et al., 2017).

As lipases são enzimas onipresentes, encontradas na natureza em animais, vegetais e microrganismos. Entretanto, há um interesse maior pelas lipases microbianas para usos biotecnológicos, devido principalmente à sua maior estabilidade, seletividade, ampla especificidade ao substrato, e diversidade quando comparadas a lipases de outras fontes. Assim, a descoberta de novas lipases, a

partir da seleção de microrganismos, com características desejáveis, pode guiar promissoras perspectivas científicas e comerciais (BJORKLING et al., 1991; COTENSINI et al., 2010; DOBREV et al., 2015).

As lipases apresentam uma característica interessante a indústria: a capacidade de realização de biotransformação. Transformação química que acontece de forma muito específica e que vem fazendo com que essas enzimas se tornem cada vez mais populares nos ramos de alimentos, detergentes, química e farmacêutica. De modo que, as lipases de origem fúngica ganham o mercado com a finalidade de agir como biocatalisadores naturais pelas muitas vantagens apresentadas quando comparadas a outros microrganismos, além de serem encontradas em muitos ambientes, incluindo solos contaminados com resíduos de óleos, alimentos deteriorados e indústrias de produtos lácteos (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Algumas das principais espécies de fungos produtores de lipases fazem parte dos gêneros *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.* e *Rhizomucor sp.* Nos gêneros *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.* e *Aspergillus sp.* pode-se destacar as espécies *Mucor pusillus*, *Rhizopus homothallicus* e *Aspergillus terreus*, por serem conhecidos como fungos termofílicos e possuírem a capacidade de sintetizar lipases extracelulares termoestáveis (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; REINEHR et al., 2014; DOBREV, et al., 2015).

As lipases sintetizadas a partir de fungos são principalmente extracelulares, além de outras vantagens que as lipases fúngicas apresentam quando comparadas a lipases de outras fontes, como a atuação em faixas mais amplas do processo como pH e temperatura, (REINEHR et al., 2014; DOBREV, et al., 2015) e apresentarem seletividade e ampla especificidade ao substrato (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Podem estar aderidas ao micélio dos fungos, o que proporciona maior eficiência, rapidez, maior precisão e rendimento, além da vantagem de estar de modo natural imobilizadas e apresentarem grande estabilidade (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Podendo ser aplicadas na indústria de biodiesel, como propõe De Castro et al. (2017), ao relatarem a imobilização natural, como meio de diminuir custos na aplicação de lipases para produção de biodiesel. Baseado nos resultados do grupo a descoberta de uma lipase naturalmente imobilizada, aderida ao micélio de

*Aspergillus westerdijkiae* capaz de catalisar a síntese de oleato de etila, podendo ser uma opção para a produção de biodiesel, com baixo custo de produção.

De forma geral muitos fungos são relatados como bons produtores de lipases extracelulares com aplicações industriais em diferentes âmbitos, como apresentada na Tabela 3, apresentando alguns fungos produtores de lipases utilizadas comercialmente e suas aplicações.

**Tabela 3** – Lipases fúngicas utilizadas comercialmente

<b>Microrganismo</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Indústria produtora</b>
<i>Humicola lanuginosa</i>	Aditivo de detergente	Novo Nordisk
<i>C. cylindracea</i>	Processamento de alimentos	Atlas Biologics Amano, Meito Sangyo, Boehringer Mannheim, Biocatalysts.
<i>C. rugosa</i>	Síntese orgânica	Amano, Novozymes.
<i>R. miehei</i>	Processamento de alimentos	Novozymes
<i>T. lanuginosus</i>	Aditivo de detergente	Novozymes
<i>A. niger</i>	Processamento de alimentos	Amano, Lyven
<i>Rhizopus oryzae</i>	Processamento de alimentos	Amano
	oleoquímica	Biocatalysts
<i>R. niveus</i>	Oleoquímica	Amano
<i>M. miehei</i>	Processamento de alimentos	Gist-Brocades, Novo Nordisk
<i>M. javanicus</i>	Processamento de alimentos	Amano
<i>Penicillium roquefortii</i>	Oleoquímica Processamento de alimentos	Biocatalysts
<i>Penicillium camemberti</i>	Processamento de alimentos e oleoquímica	Amano
<i>Penicillium</i> sp.	Processamento de alimentos	Biocatalysts
<i>Candida antarctica</i> A/B	Síntese orgânica	Boehringer Mannheim e Nova-Nordisk
<i>G. candidum</i>	Oleoquímica	Boehringer Mannheim e Nova-Nordisk

**Fonte:** Singh; Mukhopadhyay (2012).

As lipases são produzidas em grande quantidade por *Aspergillus niger*. De forma que, são enzimas induzíveis por diferentes substratos e sua produção é influenciada por fatores nutricionais e fisicoquímicos como temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio (orgânico e/ou inorgânico), presença de lipídeos e sais orgânicos, agitação e concentração de oxigênio (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

*Aspergillus niger* destaca-se pela sua robustez, alto rendimento em enzimas extracelulares, não patogenicidade e não toxicidade, além de apresentarem alto rendimento em técnicas de fermentação, e chegam a representar até 10 % do mercado de enzimas, sendo amplamente utilizadas em diferentes processos de importância industrial, isso devido a sua capacidade de catalisar ambas as reações sintéticas e hidrolíticas (SALIHU et al., 2016).

Técnicas são desenvolvidas para que novas linhagens de fungos com capacidade de produção de lipases, desempenhem a produção dessas enzimas altamente específicas para as diferentes aplicações (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Dessa forma, serão aplicáveis em produção de biocombustível, formulação de detergente, síntese química fina, perfumaria e cosméticos, processamento de couro, produtos farmacêuticos e diagnósticos médicos, além de processamento de alimentos e rações (PIZARRO; PARK, 2003; SALIHU et al., 2016). Também são utilizadas na produção de leites e derivados para modificar as propriedades funcionais das proteínas do leite, desenvolver sabores característicos, alterar a gordura da manteiga utilizada no preparo de caramelos, requeijões e condimentos (RAMOS-SÁNCHEZ et al. 2015). Além de serem fundamentais para a produção de gelatina, pois são adicionadas a ossos moídos para que estes sejam desengordurados previamente antes de servirem de matéria prima para a produção (VITOLLO, 2001; SETHI et al., 2016). Também são aplicadas para o tratamento de efluentes compostos de gorduras e síntese de biossurfactantes, sendo as enzimas em detergentes representantes de 32 % das vendas de lipases (SETHI et al., 2016).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ISOLAMENTO DE *Aspergillus* DE AMOSTRAS DE ALHO

Foram coletadas 36 amostras de alho roxo de 12 estados brasileiros - Paraná (n = 07), Santa Catarina (n = 05), Rio de Janeiro (n = 04), Bahia (n = 01), São Paulo (n = 07), Amazonas (n = 03), Rio Grande do Sul (n = 01), Mato Grosso do Sul (n = 01), Pernambuco (n = 01), Goiás (n = 02), Paraíba (n = 02) e Minas Gerais (n = 02). As amostras de alho roxo foram coletadas em supermercados ou feiras.

Aproximadamente 250 gramas de alho (bulbos, bulbos e raízes) foram desinfetados superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio a 0,4% durante 1 minuto, e 50 fragmentos de bulbilhos e raízes foram plaqueados em Dicloran 18 % - DG18 (10 g de glicose, 5 g de peptona, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 220 g de glicerol, 15 g de ágar, 2 mg de dicloran, 100 mg de clorafenicol, 1 L de água destilada), descrito para Pitt e Hocking (2009) e incubadas 7 a 10 dias a 28 °C.

Todos os fungos identificados morfologicamente como *Aspergillus* foram isolados em Czapek Yeast Extract Agar - CYA [1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10 mL de concentrado de Czapek (30 g de  $\text{NaNO}_3$ , 5 g de KCL, 5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 100 mL água destilada), 1 mL de solução metálica (1 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 100 mL de água destilada), 5 g de extrato de levedura, 15 g ágar, 30 g de sucrose, 1L de água destilada] (PITT; HOCKING, 2009) e incubados durante 7 dias a 25 °C.

### 4.2 MATERIAL BIOLÓGICO PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para a identificação molecular das espécies do gênero *Aspergillus*, previamente identificados como pertencentes a seção *nigri* (PITT; HOCKING, 2009), foram selecionados 60 isolados obtidos a partir de alhos comercializados em diferentes estados brasileiros (Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, São Paulo, Bahia, Rio Grande do Sul, Amazonas, Goiás, Paraíba e Rio de Janeiro), adquiridos comercialmente das prateleiras dos supermercados.

### 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Inicialmente os isolados foram cultivados em meio de cultivo MEA - Malt Extract Agar (Extrato de malte 20 g/L; peptona 1 g/L; glicose 20 g/L e ágar 20 g/L) por 7 dias a 28 °C.

Foi preparada uma suspensão de aproximadamente  $10^7$  conídios, coletados a partir do cultivo inicial, em 2 mL de Tween 80 %. A suspensão foi vertida em frascos Erlenmeyer 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido de extrato de malte (Extrato de malte 20 g/L; peptona 1 g/L; glicose 20 g/L), incubado a 28 °C, sob agitação constante de 180 rpm por 16 horas. Posteriormente, o micélio formado foi coletado por filtração para extração de DNA.

A extração de DNA genômico foi realizada como descrito por Azevedo et al. (2000). O micélio coletado foi macerado em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Aproximadamente 60 mg do macerado foi transferido para microtubos (2 mL) e imediatamente adicionado 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 1 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; NaCl 5 M; SDS 10% e água ultrapura). Os componentes foram homogeneizados por inversão dos microtubos e incubados em banho Maria a 65°C durante 20 minutos com homogeneização a cada 5 minutos. Após este período, foi adicionado 800 µL de fenol (Invitrogen®), seguido de homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos.

A fase aquosa (superior) foi transferida para outro microtubo de 2 mL, e em seguida adicionado 800 µL da mistura fenol (Invitrogen®), clorofórmio (Merck®) e álcool isoamílico (Vetec®), na proporção 25:24:1, respectivamente, com posterior homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Novamente a fase aquosa recuperada foi transferida para outro microtubo de 2 mL, e adicionado 800 µL de clorofórmio (Merck®) e álcool isoamílico (Vetec®), na proporção 24:1, respectivamente, com posterior homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. À fase aquosa resultante foi adicionado 1:10 do volume de NaCl 3 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado seguido de incubação a -20 °C por 60 minutos para a precipitação dos ácidos nucleicos.

Decorrido o período, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos e o *pellet* lavado com 300 µL de etanol 70 % seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, repetindo esse processo de purificação por 2 vezes. Após a secagem

dos ácidos nucleicos o *pellet* foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0 e q.s.p. de água destilada) e armazenado a -20 °C.

#### 4.4 TRATAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS COM RNASE A

Ao volume de DNA (50 µL) foi adicionado 2,5 µL de RNase (20 mg/mL) (Invitrogen®) e 50 µL de água ultrapura, seguido de homogeneização por inversão do microtubo e incubação em banho-Maria a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação foi adicionado 0,1 volume de NaCl 3 M e 2,5 volumes de álcool absoluto gelado e homogeneizado por inversão de microtubo, seguida de incubação a -4 °C por 15 minutos. Após esse período o DNA foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 100 µL de álcool 70% seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, repetindo essa última etapa por duas vezes. O sobrenadante foi descartado, e após a secagem do *pellet* em temperatura ambiente, ele foi ressuspenso em 50 µL de água ultrapura.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A quantificação do DNA genômico foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis Biodrop µLite no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina – Paraná.

#### 4.6 ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD

A análise da variabilidade genética dos isolados morfologicamente identificados como *Aspergillus* seção *Nigri*, foi realizada pela técnica de RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990) utilizando-se *primers* com sequências arbitrárias de 10 a 12 nucleotídeos (Operon, Technologies, CA).

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 25 µL composto por: 2,5 µL de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCL 10x concentrado), 2,5 µL de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 2,5 µL de *primers* de sequências arbitrárias de 10 nucleotídeos (Operon Technologies, CA – 2,5 µM), 7,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen Life

Technologies, USA – 10 mM), 0,1 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL da amostra de DNA (5 ng/µL) e 8,9 µL de água ultrapura. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura.

As reações foram submetidas a um termociclador MJ Research PTC-100™ Thermal Cycler (MJ Research, Inc), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 92°C por 5 minutos, 39 ciclos composto por desnaturação a 92°C por 40 segundos, pareamento a 40°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Após o término da reação de amplificação, os produtos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,4% (p/v) em tampão Super Buffer 1x (4 g NaOH, 22,5 g ácido bórico, q.s.p. 1 litro de água, diluído 10 vezes). As amostras de DNA foram coradas em solução de brometo de etídeo 10 mg/mL diluídos em tampão super buffer 1x e fotografadas utilizando transiluminador UV e Sistema de Imagem Digital LPIX (Loccus®).

#### 4.7 ANÁLISE DE DADOS DO RAPD

Os dados obtidos a partir do RAPD, foram analisados considerando a presença (1) ou ausência (0) das bandas na eletroforese, para os 60 isolados. A análise dos agrupamentos foi realizada através do programa NTSYS-PC versão 2.2 (“*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*”) (ROHLF, 2000). Com o auxílio de uma matriz de similaridade e coeficiente de Jaccard. Os dados obtidos foram utilizados, através do programa, para a construção de um dendograma pelo método de UPGMA (*International Rice Research Institute, Manila, Philippines*) determinando os limites de confiança a partir dos agrupamentos observados.

#### 4.8 AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES PARCIAIS DO GENE DA *CALMODULINA*

Alguns isolados de possíveis grupos representativos, formados após análise de RAPD, foram selecionados e submetidos à amplificação e posterior sequenciamento de DNA, a fim de identificar a qual espécie o isolado pertence. Para as reações de amplificação foram utilizados os *primers* cmd5 (5' CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC 3') e cmd6 (5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3') para amplificar parte do gene que codifica para *calmodulina* (HONG et al., 2006).

As reações foram preparadas com volume final de 25  $\mu\text{L}$ , composto por: 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCL 10x concentrado), 2  $\mu\text{L}$  de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 1  $\mu\text{L}$  de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA – 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen Life Technologies, USA – 50 mM), 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase, 1  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA (5 ng/ $\mu\text{L}$ ) e 17,4  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura.

As reações foram submetidas a um termociclador MJ Research PTC-100™ Thermal Cycler (MJ Research, Inc), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, 34 ciclos composto por desnaturação a 94 °C por 1 minuto, pareamento a 56 °C para região parcial do gene da calmodulina por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 minutos. Após o término da reação de amplificação, os produtos foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v). As amostras de DNA foram coradas em solução de brometo de etídeo 10 mg/mL diluídos em tampão super buffer 1x e fotografados utilizando transiluminador UV e Sistema de Imagem Digital LPIX (Loccus®).

#### 4.9 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR COM EXOSAP-IT®

Para a purificação dos produtos de PCR, utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  do produto de reação e 1  $\mu\text{L}$  de reagente EXOSAP-IT®, incubação a 37 °C por 15 minutos para degradação dos primers e nucleotídeos remanescentes. Seguido de outro período de incubação a 80 °C por 15 minutos para inativação o reagente EXOSAP-IT®.

#### 4.10 SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES PARCIAIS DO GENE DA CALMODULINA

Os produtos de PCR foram sequenciados baseados no método de Sanger et al. (1977), utilizando-se os mesmos pares de *primers* descritos anteriormente para a obtenção dos respectivos fragmentos.

As reações de sequenciamento foram preparadas em um volume final de 10  $\mu\text{L}$  sendo composta por: 1  $\mu\text{L}$  de tampão, 1  $\mu\text{L}$  de *primer* forward ou reverse (10 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de DNA (20 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  do Kit BigDye Terminator V 3.1 Cycle

Sequencing (Applied Biosystems, USA) e 5 µL de água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram submetidas ao termociclador VERITI® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), previamente programado para um ciclo de desnaturação inicial de 95 °C a 1 minuto, seguido de 30 ciclos de amplificação constituídos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, pareamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 1 minuto e 30 segundos seguido de extensão final de 60°C por 1 minuto e 30 segundos.

Após o término da reação de sequenciamento foi realizada a precipitação do produto sequenciado. Inicialmente foi adicionado 1 µL de acetato de amônio e 7,5 M e 27,5 µL de etanol absoluto. O material foi mantido a temperatura de -20 °C por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 4.000 rpm, por 45 minutos, a 20 °C. Ao *pellet* resultante foi adicionado 130 µL de etanol 70 % seguido de centrifugação a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 20 °C. Subsequentemente, foi acrescentado 0,2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 80 µL de isopropanol 80%, mantendo a placa por 10 minutos a 25 °C, seguido de centrifugação a 4.000 rpm, 20°C por 40 minutos. Logo após foi adicionado 80 µL de álcool 70 % ao *pellet* seguido de nova etapa de centrifugação a 4.000 rpm, por 15 minutos a 20 °C. Após a secagem do *pellet* o material foi ressuspendido em 10 µL de formamida, e em seguida a placa foi submetida ao sequenciador ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

#### 4.11 ANÁLISE DE DADOS DO SEQUENCIAMENTO

O processamento das sequências obtidas foi realizado através do software de qualidade Phred – Phrap (EMBRAPA), considerando valor de alta qualidade para as bases, de  $\geq 80$ . As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências tipo da seção *Nigri* disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI. A análise filogenética foi realizada através do software MEGA 7, com construção de árvore filogenética modelo Kimura de 2 parâmetros (K2+G), utilizando dados de distância do Método *Neighbor-Joining* (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições.

#### 4.12 ANÁLISE DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A E FUMONISINA B<sub>2</sub>

O potencial de produção de ocratoxina e fumonisina foi analisado pelo sistema de PCR multiplex desenvolvido pelo Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentos da Universidade Estadual de Londrina – Paraná, utilizando *primers* específicos para amplificação de regiões parciais dos genes policetídeo sintase (*pks*), halogenase flavina-dependente (*radH*) e  $\alpha$ -oxoamina sintase (*fum8*). O sistema de mPCR também contém um par de primer (*benA-An/Aw*), específico para a amplificação das espécies *A. niger* e *A. welwitschiae* (MASSI et al., 2016).

#### 4.13 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Aspergillus* SEÇÃO *Nigri* PRODUTORAS DE LIPASES

Linhagens de *Aspergillus* seção *nigri* foram inoculadas no centro da placa de Petri, contendo meio de cultura para verificação da atividade lipolítica (10g/L de peptona bacteriológica, 5g/L de NaCl, 0,1g/L CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 15g/L de ágar e 10mL/L de Tween 20 adicionado ao meio esterilizado). As placas foram incubadas em BOD a 28°C por 96 horas. Após o período de crescimento das colônias, as placas foram incubadas a 4°C por 12 horas, seguido da análise de formação do halo de atividade enzimática, indicativo de atividade lipolítica.

O Índice Enzimático (IE) foi expresso pela medida da relação entre o diâmetro do halo + colônia e o diâmetro do crescimento da colônia (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.14 AVALIAÇÃO DA MELHOR TEMPERATURA E PH PARA PRODUÇÃO DE LIPASES

Foram selecionadas as três linhagens que apresentaram maiores índices enzimáticos, sendo esses maiores que 2, para identificação da temperatura ideal para produção de lipases.

As três linhagens foram inoculadas no centro da placa de Petri, contendo meio de cultura para verificação da atividade lipolítica (10 g/L de peptona bacteriológica, 5 g/L de NaCl, 0,1 g/L CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 15 g/L de ágar e 10 mL/L de Tween 20 % adicionado ao meio esterilizado). As placas foram incubadas em BOD em oito temperaturas diferentes (25 °C, 28°C, 30 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C) por 96 horas. Após o período de crescimento das colônias, as placas foram

incubadas a 4°C por 12 horas, seguido da análise de formação do halo de atividade enzimática, indicativo de atividade lipolítica.

Posteriormente à identificação da melhor temperatura, as três linhagens foram submetidas a avaliação do melhor pH para produção de lipases, variando o pH do meio de cultivo em 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0. Utilizando a mesma metodologia citada na avaliação da temperatura.

O Índice Enzimático (IE) foi expresso pela medida da relação entre o diâmetro do halo + colônia e o diâmetro do crescimento da colônia (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados para comparação das médias foi realizada por teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %, utilizando o software R (R CORE TEAM, 2016).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigos científicos:

Artigo 1: “Isolation and identification of *Aspergillus* section *Nigri*, and genotype for ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub> production in garlic marketed in Brazil. ”

Artigo 2: “Potencial de produção de lipases por linhagens de *Aspergillus niger* e *Aspergillus welwitschiae* isolados de alhos. ”

## 5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

### ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Aspergillus* SECTION *Nigri*, AND GENOTYPE FOR OCHRATOXIN A AND FUMONISIN B<sub>2</sub> PRODUCTION IN GARLIC MARKETED IN BRAZIL.

#### RESUMO

Garlic (*Allium sativum* L.), considered a highly consumed spice in the world, can be considered a risk factor for health, since it presents high rate of fungal infection during storage. Studies have shown that the *Aspergillus* genus is predominant in this product due to the long and inadequate storage period of garlic. Some species of the genus *Aspergillus*, including those belonging to section *Nigri*, commonly found in spices, are characterized by producing mycotoxins such as ochratoxin A (OTA) and fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>). Both mycotoxins when ingested can bring various problems to human health. In this context, a total of 36 garlic samples were collected in supermarkets or street markets from twelve Brazilian states. The fungi do gênero *Aspergillus* were isolated and previously identified morphologically. Of 36 garlic samples (bulbils and root), 32 samples showed infection with fungi while 4 samples did not presente fungi infection. The predominant genus were *Aspergillus* 50.3 %, *Penicillium* 34.7 % and *Fusarium* 11 %. A total of 63 % (649 / 1.031) of infection with *Aspergillus* section *Nigri*, of which 60 isolates were selected for analysis of genetic variability. The 60 isolates were grouped into 4 clusters and isolated representatives of each cluster had the calmodulin (*CaM*) region sequenced. Isolates belonging to I, II and III clusters were grouped with *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* and only isolate belonging to IV cluster was identified as *Aspergillus luchuensis*. The analysis of nucleotide polymorphisms of *cmd* sequences the isolates *A. niger* and *A. welwitschiae* (I, II, and III clusters) discriminated the sub cluster (IA) of I-cluster as *A. niger*. The analysis of genotypes for the production of OTA and FB<sub>2</sub> by multiplex PCR, from *A. niger* and *A. welwitschiae* showed that no isolates presented genotype for OTA production, whereas 15 *A. niger* and 19 *A. welwitschiae* presented genotype for FB<sub>2</sub>. In conclusion, this is the first report showing that the highest incidence of infection of marketed garlic in Brazilian states occurs by species of *Aspergillus* section *Nigri*. The species with the highest frequency was *A. welwitschiae*.

**Keywords:** Garlic. Fumonisin B<sub>2</sub>. Ochratoxin A. *Aspergillus niger*. *Aspergillus welwitschiae*.

## 1 INTRODUCTION

Brazil is considered the largest consumer of garlic worldwide. The harvest in the country is carried out twice a year, in two regions with very distinct climates: the South with a cooler climate and the Cerrado with a hot climate (FREDDO, 2016).

Although the use of garlic is small in food, it is considered a recognized risk factor for health due to possible contamination by microorganisms during storage periods (AMAGASE, 2006; VERÍSSIMO et al., 2010). Among the microorganisms, fungi stand out for the ability to synthesize mycotoxins that are highly harmful to health (DE OLIVEIRA et al., 2002; BENNETT; KLICH, 2003). Garlic safety depends heavily on the processing methods implemented and especially on the storage conditions of this product (AMAGASE, 2006; VERÍSSIMO et al., 2010). Among the species of fungi reported as having a high potential in the production of mycotoxins, some species of the genus *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., and *Penicillium* spp. (SWEENEY; DOBSON, 1998). The genus *Aspergillus* has been found more frequently in spice samples (PATEL, 1996; MACDONALD; CASTLE, 1996; GNONLONFIN et al., 2013; TOMA; ABDULLA, 2013; TANCINOVÁ et al., 2014).

These mycotoxins produced by the *Aspergillus* species have a great agricultural, epidemiological and economic impact because they are associated with the common microbial flora of many agronomic cultures, so that when the spores meet the necessary nutrients and favorable environmental conditions, the fungus colonizes rapidly and can produce several toxins (ABBAS et al., 2009).

Two important mycotoxins are produced by species of *Aspergillus* from the section *Nigri*: the ochratoxins A (OTA) and fumonisins B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>). A OTA was mainly indicated for its nephrotoxicity, followed by immunosuppressive, neurotoxic, hepatotoxic and teratogenic properties (VARGA et al., 2001; FUNGARO; SARTORI, 2009). However, the fumonisins are mainly neurotoxic as a potential risk factor for neural tube defects, craniofacial anomalies and other congenital defects arising from neural crest cells (MARASAS et al., 2004; MISSMER et al., 2006).

In this way, the present work aimed to isolate and verify the incidence of fungi present in garlic marketed in different Brazilian regions, as well as identify the main species of *Aspergillus Nigri* section contaminants of this product and verify the potential production of OTA and FB<sub>2</sub>.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Garlic samples and mycological analysis

A total of 36 garlic samples were collected from twelve Brazilian states – Paraná (n=07), Santa Catarina (n=05), Rio de Janeiro (n=04), Bahia (n=01), São Paulo (n=07), Amazonas (n=03), Rio Grande do Sul (n=01), Mato Grosso do Sul (n=01), Pernambuco (n=01), Goiás (n=02), Paraíba (n=02) and Minas Gerais (n=02). The samples of purple garlic were collected in supermarkets or street markets. Approximately 250 grams of garlic (bulbs, bulbils and roots) were disinfected superficially by immersion in 0.4% sodium hypochlorite for 1 min., and 50 bulbils fragments and roots of the bulbs were plated in Dichloran 18% (DG18), described for Pitt and Hocking (2009) and incubated 7 to 10 days at 28 °C. All *Aspergillus* fungi were isolated to Czapek Yeast Extract agar (CYA) (PITT; HOCKING, 2009) and incubated for 7 days at 25 °C. Of total fungi isolated and identified morphologically as *Aspergillus* section *Nigri* were selected 60 isolates for molecular identification.

### 2.2 DNA extraction

A suspension of  $10^7$  conidios (in Tween 80 – 2.5 mL) of each isolates (60 isolates) were grown in Malt Extract Agar (50 mL - MEA) liquid medium at 28 °C, 180 rpm for 24 h. Approximately 0.5 g of resulting mycelium was harvested and filtrated for DNA extract as described Azevedo et al. (2000). The mycelium was ground in liquid nitrogen and transferred to microtube with 800 µL of DNA extraction buffer (100 mM Tris–HCl, pH 8.0; 25 mM EDTA, 1 % SDS, 25 mM NaCl) and incubated at 65 °C for 20 min. The mixture was deproteinized by adding a volum of phenol, followed by equal volum of choroform: isoamylalcohol (24:1). The DNA was precipitated by addition of two volums of ice-cold etanol and 10 % 3M NaCl. The DNA was resuspended in TE (10 mM Tris–HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) buffer.

### 2.3 Genetic variability analysis

The RAPD procedures was used as described by Fungaro et al. (1996).

Primers OPX3, OPX7 and OPX11 (Operon, Technologies) were used. The amplifications were developed in termocycler PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc).

The data were analyzed considering presence (1) or absence (0) of the amplified fragments. The dendrogram was constructed with the NTSYS-PC software version 2.2 ("*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*") (ROHLF, 2000), using the Jaccard coefficient and UPGMA method (*International Rice Research Institute*, Manila, Philippines).

#### **2.4 Amplification and sequencing of the partial region of the *calmodulin* gene**

Representative isolates of groups formed after RAPD analysis were subjected to partial region amplification and sequencing of the *calmodulin* gene (*CaM*). The *calmodulin* fragments of the 9 isolates were amplified a termocycler PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc), with the primer pair *cmd5* and *cmd6* described by Hong et al., (2006).

The amplicons were sequencing with a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standard Kit Version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following conditions: denaturation at 95 ° C for 60 s, 30 cycles of denaturations at 95 ° C for 20 s, aneling at 50 ° C for 15 s, extension at 60 ° C for 1 min and 30 s, and a final extension at 60 ° C for 1 min and 30 s. HiDi formamide (µL) was added to the final reaction and the products were submitted to ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The sequences were aligned with sequences of type species deposited in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the software MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net/>). The phylogenetic tree was constructed using the distance method Neighbor Joining (NJ).

#### **2.5 Analysis of the production potential of ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub> and identification of species *A. niger*/*A. welwitschiae***

The production potential of OTA and FB<sub>2</sub>, and identification of *A. niger* /*A. welwitschiae* species of the 60 isolates were developed by multiplex PCR system (MASSI et al., 2016).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Isolation of fungi of the genus *Aspergillus* and selection of *Aspergillus* section *Nigri* of garlic marketed in Brazil

Of 36 garlic samples (bulbils and root), 32 samples showed infection with fungi after plating on DG18 (Tab.1). Samples UELAs03, UELAs13 (state of São Paulo), UELAs16 and UELAs18 (state of Minas Gerais), did not present fungal infection. A total of 2.049 fungi were counted (32 samples), and the predominant genus were *Aspergillus* 50.3%, *Penicillium* 34.7% and *Fusarium* 11%. Concerning the genus *Aspergillus*, considering bulb and root was found specifically in samples of garlic, 63% (649/1.031) of infection with *Aspergillus* section *Nigri*, 19.5% (201/1.031) *Aspergillus* section *Flavi* and 17.5% (181/1.031) *Aspergillus* section *Circumdati*. In the 32 infected garlic samples, all roots were infected with *Aspergillus* section *Nigri*.

Of the 649 *Aspergillus* section *Nigri*, 60 were selected for molecular identification, according to the criteria: geographical region, sample representation, bulb and garlic root (Tab. 1).

Prevalence of the incidence of the *Aspergillus* genus was found by Gnonlonfin et al., (2013), when evaluating Togo (100% of samples) and Southern Benin spices (48.5% samples), including dehydrated garlic. Tancinová et al. (2014), verified infection in 50% of the samples including garlic powder and other spices, with a predominance of the *Aspergillus* section *Nigri*.

#### 3.2 Analysis of genetic variability and identification of species of *Aspergillus* section *Nigri*

The analysis of genetic variability of the 60 isolates from the *Aspergillus* section *Nigri* generated 24 RAPD loci with 3 random primers, 79.2 % were polymorphic.

With 45% similarity the 60 isolates were grouped into 4 clusters (I, II, III, IV) (Fig. 1). Most of the isolates were in clusters I and II, whereas cluster III and IV were formed by only one isolate (UELAs7.195 and UELAs29.441, respectively). The genetic variability of the 60 isolates is not associated with the geographical origin of the host.

Representatives isolated of each RAPD cluster were selected (I-cluster UELAs32.459, UELAs25.336, UELAs17.271 and UELAs22.309; II – cluster UELAs28.430, UELAs32.460 and UELAs31.456; III – cluster UELAs7.195; IV – cluster UELAs29.441) for nucleotide analysis of partial regions of the *calmodulin* gene (*cmd*), established by Samson et al. (2014). Sequences obtained from the *Aspergillus* section *Nigri* when compared to those sequences, available in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), showed that isolates belonging to I, II, III clusters (I-cluster UELAs32.459, UELAs25.336, UELAs17.271 and UELAs22.309; II – cluster UELAs28.430, UELAs32.460 and UELAs31.456; III – cluster UELAs7.195, respectively) were grouped with *Aspergillus welwitschiae* and *Aspergillus niger* (Fig 2). The only isolate belonging to IV cluster was identified as *A. luchuensis*.

*A. niger* and *A. welwitschiae* are species belonging to the "niger aggregate", are very similar and morphologically indistinguishable (PERRONE et al., 2011). However, the both species can be distinguished by presence of three SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) of *A. welwitschiae* in relation to *A. niger*: 202 - T position; 209 - T position and 519 – T position (SAMSON et al., 2014).

Partial alignment of *cmd* sequences the isolates of this study with *A. niger* and *A. welwitschiae* from database sequences, including sequences of type species allowed to use two of the three SNPs described by Samson et al. (2014). Isolates belonging to I, II and III clusters were identified as *A. welwitschiae*, however, isolates belonging to a sub cluster (IA) of I-cluster were identified as *A. niger* (Fig. 3).

In this study it was possible to observe that of the 60 isolates analyzed, 16 are *A. niger*, 43 *A. welwitschiae* and 1 *A. luchuensis*. The highest frequency of *A. welwitschiae* species is in agreement with studies by Oh et al. (2016) who first found *A. awamori* (= *A. welwitschiae*) in garlic.

### **3.3 Identification of *Aspergillus niger* / *Aspergillus welwitschiae* and genotype for ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub> production**

The results obtained with mPCR (Tab. 1) demonstrated that 98.3% of the isolates (59 isolates) were identified as *A. niger* / *A. welwitschiae*, (Fig 4) confirm the identification the partial region of the *calmodulin* gene. None of the 59 isolates presented a genotype for OTA production and 57.6% (34 isolates), identified as *A. niger* / *A. welwitschiae*, presented genotype for FB<sub>2</sub> production (Fig 4A). The data are

in agreement with Massi et al. (2016) who analyzed 175 *A. niger* / *A. welwitschiae* strains isolated from onions, coffee, dried fruits and grapes, and found 51.5 % of strains with genotype for FB<sub>2</sub> production. *A. niger* and *A. welwitschiae* have recently been reported as potential producers of FB<sub>2</sub> (FRISVAD et al. 2007; SAMSON et al 2007; FRISVAD et al. 2011; HONG et al., 2013). However, in this work, of the 34 isolates with genotype for FB<sub>2</sub> production, 15 (44.1 %) were identified as *A. niger* (IA-cluster).

In conclusion, this is the first report showing that the highest incidence of infection of marketed garlic in Brazilian states occurs by species of *Aspergillus* section *Nigri*. The species with the highest frequency was *A. welwitschiae*, of which 44.2 % presented genotype for FB<sub>2</sub> production.

## REFERENCES

- ABBAS, H.K., WILKINSON, J.R., ZABLOTOWICZ, R.M., ACCINELLI, C.; ABEL, C. A.; BRUNS, H A.; WEAVER, M. A. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. **Toxin Reviews**, v. 28, p.142–153, 2009.
- AMAGASE, H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. **Journal of nutrition**, v.136, p. 7165-7255, 2006.
- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOZA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 729-732, 2000.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M.; MYCOTOXINS, M. Mycotoxins. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.
- FREDDO, A. R. L. F. Alho. **Conjuntura mensal**. CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, maio, 2016.
- FUNGARO, M. H.P.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L. de. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Applied Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1996.
- FUNGARO, M. H. P.; SARTORI, D. An overview on molecular markers for detection of ochratoxigenic fungi in coffee beans. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.1-9, 2009.
- FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R. A.; LARSEN, T. O.; THRANE, U. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9727–9732, 2007.
- FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; THRANE, U.; MEIJER, M.; VARGA, J.; SAMSON, R. A.; NIELSEN, K. F. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 2-7, 2011.
- GNONLONFIN, G. J. B.; ADJOVI, Y. C.; TOKPO, A. F.; AGBEKPONOU, E. D.; AMEYAPOH, Y.; DE SOUZA, C.; BRIMER, L.; SANNI, A. Mycobiota and identification of aflatoxin gene cluster in marketed spices in West Africa. **Food Control**, v.34, p.115-120, 2013.
- HONG, S. B.; CHO, H. S.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 477–486, 2006.

HONG, S.B.; LEE, M.; KIM, D. H.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; GOMI, K.; YAMADA, O.; MACHIDA, M.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. **Plos One**, v. 8, n. 5, e63769, maio 2013.

MACDONALD, S.; CASTLE, L. A UK retail survey of aflatoxin in herbs and spices and their fate during cooking. **Food Additives and Contaminants**, v.13, p.121-128, 1996.

MASSI, F. P.; SARTORI, D.; FERRANTI, L. DE S.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; VIEIRA, M.L. C.; FUNGARO, M. H. P. Data on the presence or absence of genes encoding essential proteins for ochratoxin and fumonisin biosynthesis in *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **Data in Brief**, v. 7, p. 704–708, 2016.

MASSI, F. P.; SARTORI, D.; FERRANTI, L. DE S.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; VIEIRA, M.L. C.; FUNGARO, M. H. P. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.221, p. 19-28, 2016.

MARASAS, W.F.; RILEY, R. T.; HENDRICKS, K. A.; STEVENS, V. L.; SADLER, T. W.; GELINEAU-VAN WAES, J.; MISSMER, S. A.; CABRERA, J.; TORRES, O.; GELDERBLOM, W.C.; ALLEGOOD, J.; MARTÍNEZ, C.; MADDOX, J.; MILLER, J. D.; STARR, L.; SULLARDS, M. C.; ROMAN, A. V.; VOSS, K. A.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Jr. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 711–716, abr. 2004.

Molecular Evolutionary genetics analysis - MEGA 7. Disponível em:  
<http://www.megasoftware.net/>

MISSMER, S.A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Jr.; ROTHMAN, K. J.; HENDRICKS, K. A. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2, p. 237-241, fev.2006.

OH, J. Y.; MANNAA, M.; HAN, G. D.; CHUN, S.C.; KIM, K. D. First report of *Aspergillus awamori* as a fungal pathogen of garlic (*Allium sativum* L.). **Crop Protection**, v. 85, p. 65–70, 2016.

DE OLIVEIRA, C. M.; MOTA, J. H.; YURI, J. E.; DE SOUZA, R. J.; DE RESENDE, G. M. Determinação do potencial de armazenamento em cultivares de alho. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, jul. 2002.

PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M.; MORTBY, E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.13, p.833-841, 1996.

PERRONE, G.; STEA, G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSOM, R. A. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *Aspergillus awamori*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 11, p. 1138–1150, 2011.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. **Food Science & Nutrition**, v.3, New York, 2009.

ROHLF, F. J. NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 2000.

SAMSON, R. A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, K.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. **Studies in Mycology**, v. 59, p.129-145, 2007.

SAMSON, R.A., VISAGIE C.M., HOUBRAKEN, J. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141-158, 1998.

TANCINOVÁ, D.; MOKRÝ, M.; BARBORÁKOVÁ, Z.; MASKOVÁ, Z. Mycobiota of spices and aromatic herbs. **Potravinárstvo Scientific Journal for Food Industry**, v.8, n.1, p.172-177, 2014.

TOMA, F.M.; ABDULLA, N.Q.F. Isolation and identification of fungi from spices and medicinal plants. **Research Journal of Environmental and Earth Sciences**, v.5, p.131-138, 2013.

VERÍSSIMO, T., ALMEIDA, I., CIDADE, H., PINTO, M., AZEVEDO, S., OLIVEIRA, B., & CUNHA, L.M. Evaluation of antioxidant activity of minimally processed garlic cloves. **XXVIII International Horticultural Congress - IHC2010**, 77-178, 2010.

VARGA J, RIGÓ K, TÉREN J, MESTERHÁZY Á. Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. **Cereal Research Communications**, v. 29, p. 85-92, 2001.

**Table 1** - Profile presented by the isolates in Multiplex PCR. *A. niger* / *A. welwitschiae* strains found in garlic commercially purchased in several Brazilian states, as well as the presence (+) or absence (-) of the genes that identify the genotype for OTA and FB<sub>2</sub> production.

Isolated	Source	<i>A. niger</i> / <i>A. welwitschiae</i> <sup>a</sup>	<i>fum8</i> <sup>b</sup>	<i>radH</i> <sup>c</sup>	<i>pks</i> <sup>d</sup>
AS 1.01	Paraná	+	+	-	-
AS 1.05	Paraná	+	-	-	-
AS 2.14	Paraná	+	-	-	-
AS 2.22	Paraná	+	+	-	-
AS 4.41	Mato Grosso do Sul	+	+	-	-
AS 4.63	Mato Grosso do Sul	+	+	-	-
AS 4.82	Mato Grosso do Sul	+	-	-	-
AS 5.90	São Paulo	+	+	-	-
AS 5.105	São Paulo	+	+	-	-
AS 5.132	São Paulo	+	+	-	-
AS 6.136	São Paulo	+	-	-	-
AS 6.144	São Paulo	+	-	-	-
AS 6.153	São Paulo	+	-	-	-
AS 7.182	Rio Grande do Sul	+	-	-	-
AS 7.195	Rio Grande do Sul	+	+	-	-
AS 7.200	Rio Grande do Sul	+	-	-	-
AS 8.203	Goiás	+	+	-	-
AS 8.215	Goiás	+	+	-	-
AS 10.217	Rio de Janeiro	+	+	-	-
AS 10.224	Rio de Janeiro	+	+	-	-
AS 11.225	Rio de Janeiro	+	-	-	-
AS 11.228	Rio de Janeiro	+	-	-	-
AS 11.230	Rio de Janeiro	+	+	-	-
AS 12.233	São Paulo	+	+	-	-
AS 12.247	São Paulo	+	-	-	-
AS 15.262	Santa Catarina	+	-	-	-
AS 15.269	Santa Catarina	+	+	-	-
AS 17.271	Distrito Federal	+	+	-	-
AS 17.278	Distrito Federal	+	+	-	-
AS 19.280	Rio de Janeiro	+	+	-	-
AS 19.288	Rio de Janeiro	+	+	-	-
AS 20.290	Rio de Janeiro	+	-	-	-
AS 21.300	Paraíba	+	+	-	-
AS 21.306	Paraíba	+	+	-	-
AS 22.309	Paraíba	+	+	-	-
AS 22.314	Paraíba	+	+	-	-
AS 23.321	Amazonas	+	+	-	-
AS 23.318	Amazonas	+	+	-	-
AS 24.323	Amazonas	+	-	-	-

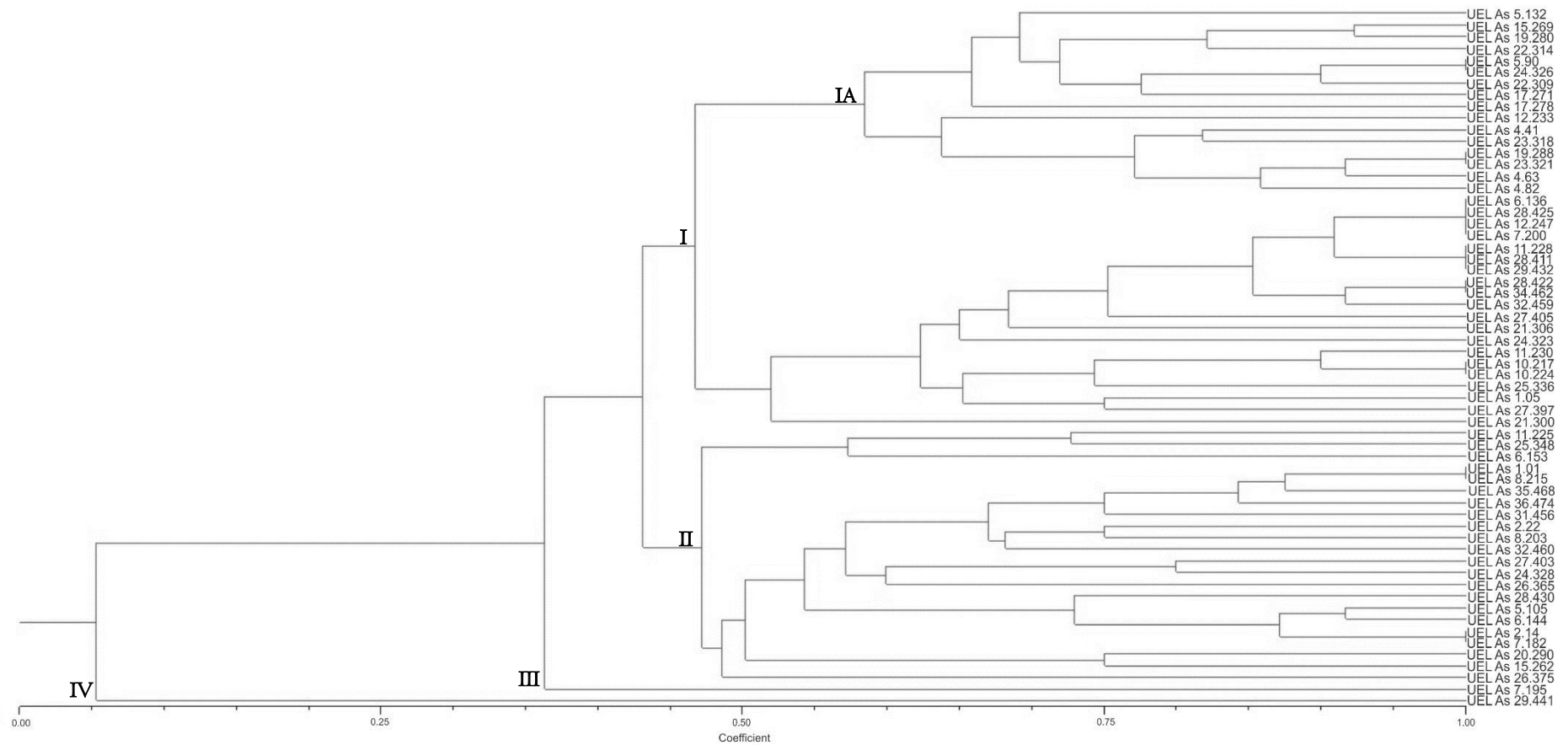
AS 24.328	Amazonas	+	+	-	-
AS 24.326	Amazonas	+	+	-	-
AS 25.336	Santa Catarina	+	+	-	-
AS 25.348	Santa Catarina	+	-	-	-
AS 26.375	Santa Catarina	+	+	-	-
AS 26.365	Santa Catarina	+	-	-	-
AS 27.403	Amazonas	+	+	-	-
AS 27.405	Amazonas	+	-	-	-
AS 27.397	Amazonas	+	-	-	-
AS 28.411	Paraná	+	-	-	-
AS 28.430	Paraná	+	-	-	-
AS 28.425	Paraná	+	-	-	-
AS 28.422	Paraná	+	-	-	-
AS 29.432	Bahia	+	-	-	-
AS 29.441	Bahia	-	-	-	-
AS 31.456	Paraná	+	+	-	-
AS 32.460	Pernambuco	+	+	-	-
AS 32.459	Pernambuco	+	-	-	-
AS 34.462	Santa Catarina	+	-	-	-
AS 35.468	Paraná	+	+	-	-
AS 36.474	Paraná	+	+	-	-

<sup>a</sup> Identified by the presence of *benA* – 192 pb

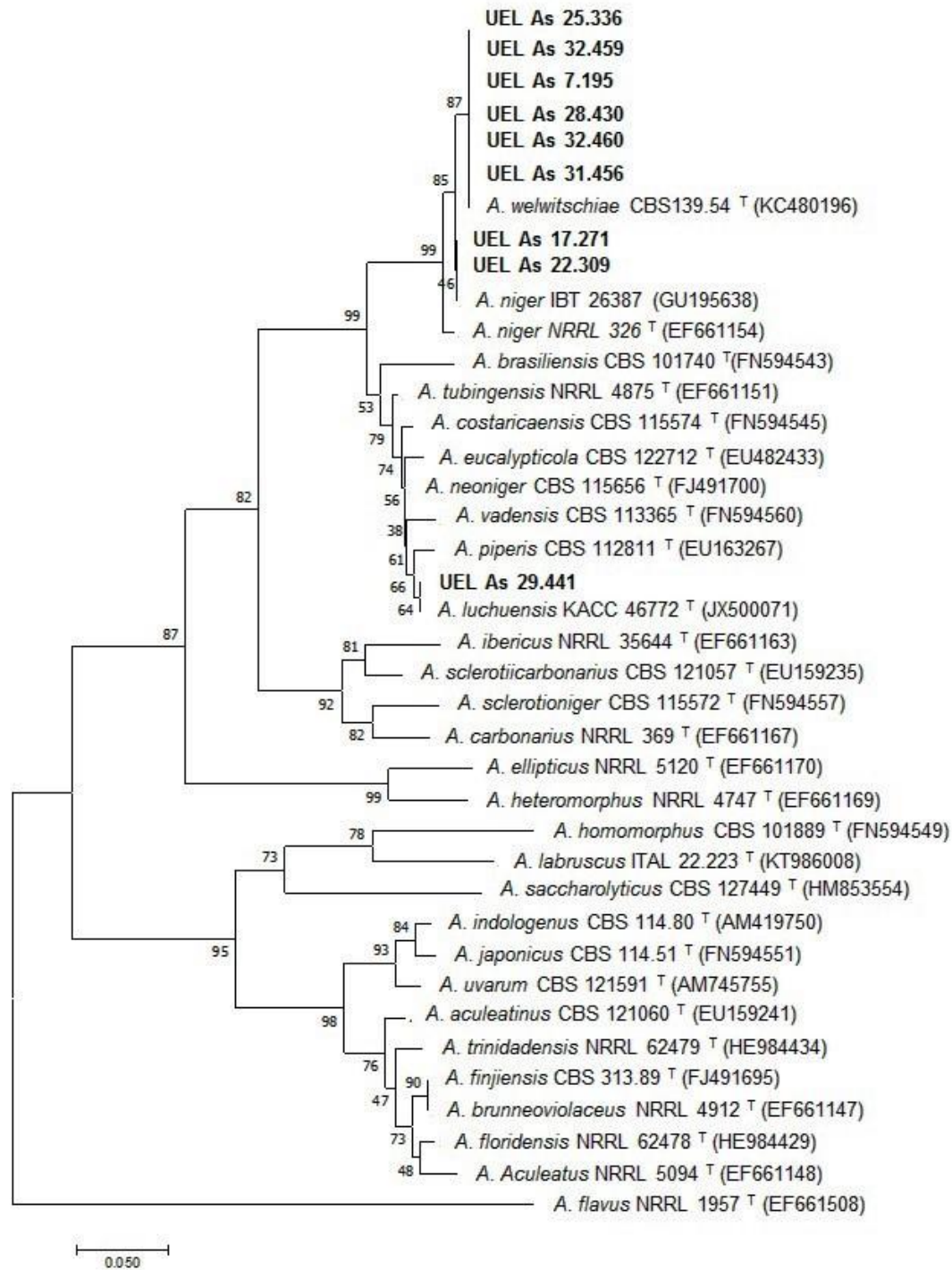
<sup>b</sup> Identified by presence or absence of *fum8* – 128 pb

<sup>c</sup> Identified by presence or absence of *radH* – 328 pb

<sup>d</sup> Identified by presence or absence of *pks* – 554 pb



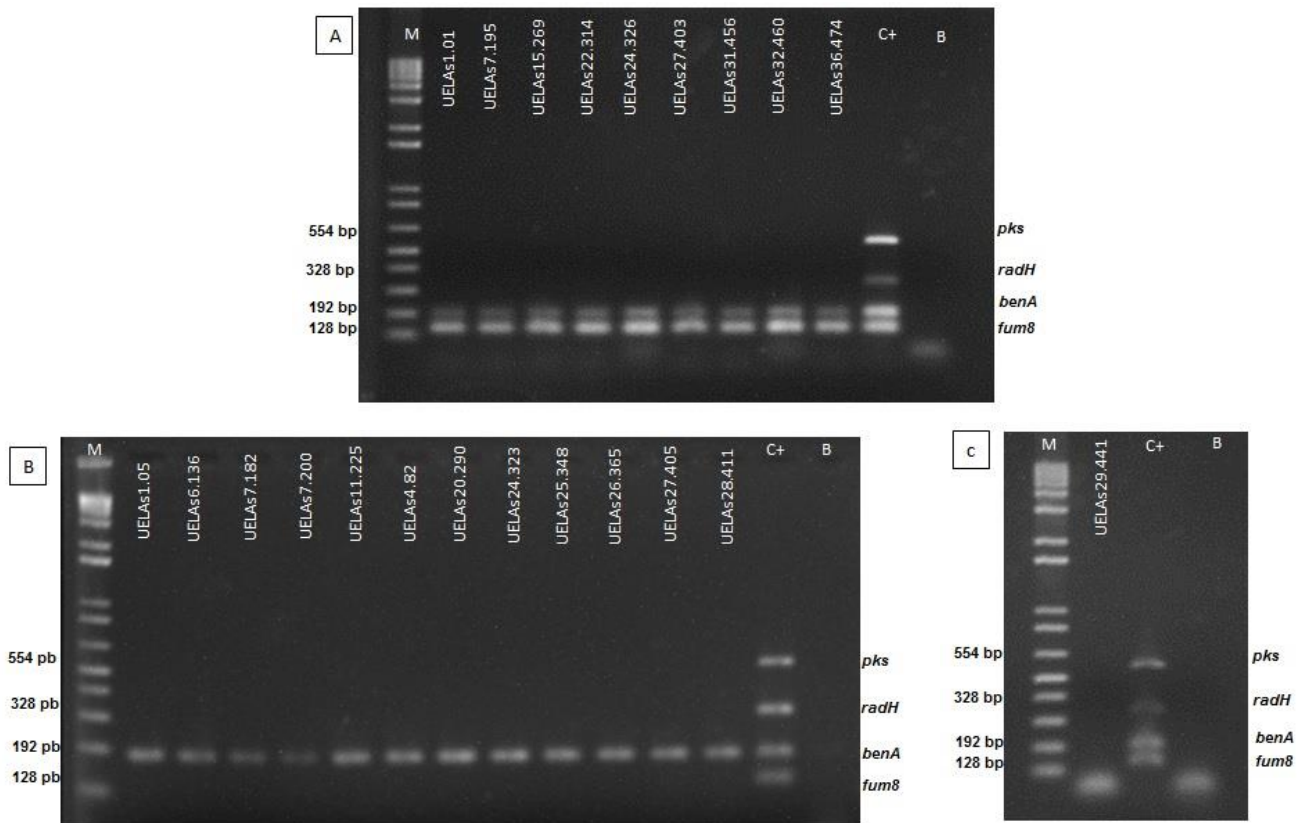
**Figure 1** - Dendrogram constructed from 60 isolates of *Aspergillus* section *Nigri* collected of the garlic marketed in Brazil. The UPGMA method was used based in a similarity matrix, using Jaccard coefficient. The isolates were grouped into 4 clusters and 1 sub cluster (Clusters I, II, III and IV. Sub cluster IA).



**Figure 2** - Phylogenetic tree constructed based on partial sequence data from the calmodulin (*CaM*) gene for *Aspergillus* section *Nigri*. Kimura 2-parameter model (K2 + G), using distance data from the Neighbor-Joining Method (NJ) and bootstrap analysis of 1000 replicates, using *Aspergillus flavus* as outgroup.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	65	75	85	95	105	115
A. <i>niger</i> NRRL 326 T	TCGATCCGAC	TGCGGGATTT	CGACAGCATT	TTCCAGAACG	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>niger</i> IBT 26387	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCCAGAAATG	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>niger</i> UEL As17.271	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCCAGAAATG	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>niger</i> UEL As22.309	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCCAGAAATG	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>welwitschiae</i> CBS 139.54 T	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCTCAGAATT	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>welwitschiae</i> UEL As32.459	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCTCAGAATT	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>welwitschiae</i> UEL As7.195	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCTCAGAATT	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>welwitschiae</i> UEL As25.336	TCGATC-GAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCTCAGAATT	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>welwitschiae</i> UEL As32.460	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCTCAGAATT	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>welwitschiae</i> ITAL 15.931	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCTCAGAATT	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>welwitschiae</i> UEL As28.430	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCTCAGAATT	ATTTGGATCA	TAATACTAAT
A. <i>welwitschiae</i> UEL As31.456	TCGATCCGAC	CGCGGGATTT	CGACAGCATT	TCTCAGAATT	ATTTGGATCA	TAATACTAAT

**Figure 3** - Partial region alignment of the calmodulin gene from *A. niger* and *A. welwitschiae* strains isolated from garlic with *A. niger* and *A. welwitschiae* strains taken from NCBI. It indicates two regions with possible SNPs of differentiation between *A. niger* and *A. welwitschiae* species, where *A. welwitschiae* presents "T" and *A. niger* "C" at position 93, and *A. welwitschiae* presents "T" and *A. niger* "G" at position 100.



**Figure 4** - Representative image of the profiles of the isolates found in mPCR.

**A** - Profile found in 34 isolates. Amplicons of 192 bp and 128 bp, indicating *A.niger* / *A.welwitschiae* species and genotype for FB<sub>2</sub> production, respectively. **B** - Profile found in 59 isolates. Amplicon in 192 bp, identifying species *A.niger* / *A.welwitschiae*. **C** - Profile found in 1 isolated. No amplified fragment. M- ladder molecular weight marker 1kb (*Invitrogen Life Technologies*, USA). C + (positive control) - *A. niger* isolated from coffee. B - White (DNA replaced by water).

Primers: *fum8* - involved in the synthesis of FB<sub>2</sub>, *pks* and *radH* - (involved in the synthesis of OTA) *benA* - (identification of species *A. niger* / *A. welwitschiae*).

## 5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

### **POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR LINHAGENS DE *Aspergillus niger* e *Aspergillus welwitschiae* ISOLADOS DE ALHOS**

#### **RESUMO**

As lipases (glicerol ester hidrolases, E.C. 3.1.1.3), fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas responsáveis por catalisar a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. São enzimas aplicáveis em diversos setores industriais, podendo ser obtidas de fontes microbianas, como *A. niger* que recebe *status* GRAS, e é amplamente utilizado na indústria biotecnológica. Desta forma, o presente estudo avaliou, 1 linhagem de *A. niger* e 24 linhagens de *A. welwitschiae* isoladas de amostras de alho coletado em estados brasileiros. As 25 linhagens avaliadas quanto à produção de lipases, cuja atividade foi determinada pelo índice enzimático (IE), foram produtoras destas enzimas. As linhagens UEL As 2.14, UEL As 4.82 e UEL As 15.262 apresentaram maior atividade com IE de  $2,18 \pm 0,02$ ;  $2,12 \pm 0,01$ ;  $2,09 \pm 0,06$ , respectivamente. Estas linhagens foram submetidas a análises quanto ao melhor potencial de produção de lipases extracelulares em temperaturas de 25 °C a 42 °C e pH de cultivo de 5,5 a 9,0. As três linhagens apresentaram melhor IE em temperaturas elevadas e pH alcalino, destacando a linhagem *A. welwitschiae* UEL As 15.262 com IE  $6,93 \pm 0,11$  em pH 9,0 a 40 °C, seguida por *A. welwitschiae* UEL As 2.14 (IE  $5,75 \pm 0,12$ ; pH 9,0 a 42 °C) e *A. niger* UEL As 4.82 (IE  $3,31 \pm 0,27$ ; pH 8,0 a 42 °C). Desta forma, as linhagens UEL As 15.262, UEL As 2.14 e UEL As 4.82 são candidatas à futuras aplicações

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*. *Aspergillus welwitschiae*. Lipases. Alho.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de enzimas microbianas extracelulares cada vez mais vem ganhando espaço no mercado industrial devido a ampla aplicabilidade e desenvolvimento de novas tecnologias. A aplicação de engenharia genética na melhoria de linhagens selvagens busca suprir a demanda e a emergência de produção perante novos campos de aplicação (REINEHR et al., 2014). Nesse sentido, as lipases (glicerol ester hidrolases, E.C. 3.1.1.3), destacam-se por sua diversidade em aplicações. Fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas responsáveis por catalisar a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (SHARMA et al., 2001; TREICHEL et al., 2010). A função biológica desencadeada por essas enzimas é primordialmente catalisar a hidrólise de triglicerídeos insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol. Por outro lado, em condições restritas de água, catalisam a reação reversa de síntese de ésteres de ácidos graxos, além de possuir estabilidade em solventes orgânicos, atuar em grande variedade de substratos e apresentar a capacidade de catalisar reações de síntese tão eficientemente quanto as de hidrólise (DOBREV et al., 2015; GUPTA et al., 2015; CASTRO et al., 2017).

Essas enzimas se tornam cada vez mais empregadas nos ramos de alimentos, detergentes, indústria química e farmacêutica (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Assim, as lipases de origem fúngica ganham o mercado pelas muitas vantagens apresentadas quando comparadas a outros microrganismos, são encontrados em muitos ambientes, incluindo solos contaminados com resíduos de óleos, alimentos deteriorados e indústrias de produtos lácteos (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Atuam também em ampla faixa de pH e temperatura, são secretadas (REINEHR et al., 2014; DOBREV, et al., 2015) e apresentam seletividade e ampla especificidade ao substrato (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Podem estar aderidas ao micélio fúngico, o que as torna imobilizadas naturalmente e apresentam grande estabilidade (DE CASTRO et al., 2017).

Algumas das principais espécies de fungos produtores de lipases fazem parte dos gêneros *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.* e *Rhizomucor sp.* Nos gêneros *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.* e *Aspergillus sp.* destacam-se as espécies *Mucor pusillus*, *Rhizopus homothallicus* e *Aspergillus terreus*, por possuírem a capacidade de sintetizar lipases extracelulares

termoestáveis (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; REINEHR et al., 2014; DOBREV, et al., 2015).

*Aspergillus niger*, destaca-se pela robustez, alto rendimento, enzimas, não patogenicidade e não toxicidade, além de apresentarem alto rendimento em condições de fermentação em estado sólido (SALIHU et al., 2016). Possuem o status GRAS - Geralmente Reconhecida Como Segura - e não tóxica em condições industriais pela *Food and Drug Administration* (FDA) (NIELSEN et al., 2009; SUSCA et al., 2014).

As lipases ocupam cerca de 10 % do mercado de enzimas, sendo aplicáveis em produção de biocombustível, formulação de detergente, síntese química fina, perfumaria e cosméticos, processamento de couro, produtos farmacêuticos e diagnósticos médicos, além de processamento de alimentos e rações (PIZARRO; PARK, 2003; SALIHU et al., 2016). Também são utilizadas na produção de leites e derivados, são fundamentais para a produção de gelatina, (VITOLLO, 2001; SETHI et al., 2016), tratamento de efluentes, e síntese de biossurfactantes, sendo as enzimas detergentes representantes de 32% das vendas de lipases (SETHI et al., 2016).

Desse modo, o estudo objetivou, avaliar o potencial de produção de lipases de linhagens selvagens de *A. niger* e *A. welwitschiae*, isoladas de alho, com a finalidade de selecionar linhagens com características favoráveis à futuras aplicações.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos

As linhagens de fungos do gênero *Aspergillus* seção *Nigri*, previamente identificadas (Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina) como *Aspergillus niger* / *Aspergillus welwitschiae*, foram isoladas de alhos adquiridos comercialmente de diversos estados brasileiros.

Os fungos foram isolados em meio de cultivo MEA (SAMSON et al., 2014), a 28 °C por 7 dias e mantido em 4 °C durante o período de estudo.

### 2.2 Seleção de linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* produtoras de lipases

Uma linhagem de *A. niger* e 24 linhagens de *A. welwitschiae* foram inoculadas, individualmente, no centro de placa de Petri, contendo meio de cultura para verificação da atividade lipolítica (10g/L de peptona bacteriológica, 5g/L de NaCl, 0,1g/L CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 15g/L de ágar e 10mL/L de Tween 20 adicionado ao meio esterilizado). As placas foram incubadas em 28 °C por 96 horas. Após o período de crescimento das colônias, as placas foram incubadas a 4°C por 12 horas, seguido da análise de formação do halo de precipitação, indicativo de atividade lipolítica.

O Índice Enzimático (IE) foi expresso pela medida da relação entre o diâmetro do halo de atividade enzimática + crescimento da colônia pelo diâmetro do crescimento da colônia (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 2.3 Avaliação da temperatura ótima para produção de lipases

Foram selecionadas uma linhagem de *A. niger* e duas linhagens de *A. welwitschiae* que apresentaram maiores IE (Item 2.1), para determinação da melhor temperatura para produção de lipases.

Foi seguido o mesmo procedimento do item 2.2, variando somente a temperatura de incubação das três linhagens em estudo. As temperaturas de incubação avaliadas foram 25 °C, 28°C, 30 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C, e 42 °C

por 96 horas. Após este período as placas foram incubadas a 4 °C por 12 horas, foi determinado o IE.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **2.4 Avaliação do pH ótimo para produção de lipases**

Na melhor temperatura de produção de lipases selecionada, cada linhagem foi avaliada quanto ao melhor pH para produção destas enzimas. A faixa de pH utilizada foi de 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0. As placas foram incubadas na melhor temperatura de produção para cada linhagem por 96 horas. Após o período de crescimento das colônias, as placas foram incubadas a 4°C por 12 horas, seguido da análise de formação do halo de atividade enzimática, para determinação do IE.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **2.5 Análise estatística**

A análise estatística dos dados para comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %, utilizando o software R (R CORE TEAM, 2016).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Lipases provenientes de microrganismos apresentam vantagens por se tratar de microrganismos de fácil manipulação, apresentar alto rendimento de produção e por realizar catálise em temperaturas adversas e pHs alcalinos (GANDHI, 1997; SENA et al., 2006; SALIHU et al., 2016).

Neste estudo as 25 linhagens analisadas, (1 linhagem da espécie *A. niger* e 24 linhagens da espécie *A. welwitschiae*), isoladas de alho, foram produtoras de lipases (Tabela 1), com variações significativas de IE de 2,18 a 1,50. Somente 20 % (5) das linhagens apresentaram índice enzimático (IE) maior que 2, consideradas satisfatórias quanto à produção de lipases. Foi relatado que a variação na produção de lipases extracelulares é dependente da linhagem utilizada, e influenciada pela

composição do meio de cultivo, do pH do meio, da temperatura, entre outros fatores (TREICHEL et al., 2010).

Dentre as 25 linhagens estudadas, as 5 linhagens (UEL As 2.14 – IE  $2,18 \pm 0,02$ ; UEL As 4.82 - IE  $2,12 \pm 0,01$ ; UEL As 15.262 - IE  $2,09 \pm 0,06$ ; UEL As 28.430 - IE  $2,03 \pm 0,03$  e UEL As 11.228 – IE  $2,02 \pm 0,09$ ), apresentaram resultados satisfatórios (IE  $\geq 2$ ). Por apresentarem os maiores IE, as linhagens de *Aspergillus welwitschiae* UEL As 2.14, *Aspergillus niger* UEL As 4.82 e *Aspergillus welwitschiae* UEL As 15.262 foram selecionadas para avaliação quanto ao efeito da temperatura na produção de lipases extracelulares.

### 3.1 Efeito da temperatura na produção de lipases por *A. niger* e *A. welwitschiae*

Os resultados obtidos mostram que nas temperaturas de incubação estudadas (25 °C - 42 °C) houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na produção de lipases para todas as linhagens (Tabela 2). Pode-se observar maior produção de lipases com o aumento da temperatura de incubação (Figuras 1, 2, 3). Os maiores IE para as 3 linhagens selecionadas foi em temperaturas entre 40 a 42 °C. A temperatura de 42 °C foi otimizada para a detecção de produção de lipases em duas linhagens (UEL As 2.14 e UEL As 4.82), com a linhagem UEL As 2.14 apresentando maior IE ( $4,15 \pm 0,01^a$ ), seguido pela linhagem UEL As 4.82 com IE  $2,56 \pm 0,10^a$ . Quanto a linhagem UEL As 15.262, houve maior produção de lipases extracelulares em temperatura de 40 °C, com IE de  $2,38 \pm 0,04^a$ .

Quanto ao diâmetro de crescimento das colônias, houve decréscimo do diâmetro das colônias com o aumento de temperatura de incubação, comparando a temperatura inicial de incubação (25 °C) com temperatura final de incubação (42 °C) (Tabela 2).

Estes dados estão de acordo com relatos da literatura que demonstraram maior produção de lipases extracelulares em temperaturas de incubação mais elevadas (GULATI et al., 1999; MAHADIK et al., 2002; MATASSOLI et al., 2009; NATH; HINDUMATHY, 2012; SETHI et al., 2016). Sethi et al., 2016, demonstraram que a temperatura de incubação ótima para a produção de lipases pela linhagem NCFT 4269.10 de *Aspergillus terreus* foi de 60 °C. Enquanto que Nath; Hindumathy (2012), encontraram temperatura ótima de 37 °C para *Myroides odoratimus*. Haq et al. (2002) relataram temperatura ótima de cultivo para produção de lipases em 30 °C

por *R. oligosporous* em estado sólido. E Falony et al. (2006) relataram temperatura ótima de produção de 40 °C para *A. niger*.

As produzidas em altas temperaturas são de grande importância no âmbito comercial. Essas são empregadas na síntese enzimática de surfactantes a partir de temperaturas mais elevadas 60 – 80 °C, para a produção de emolientes utilizados em produtos de higiene pessoal, como é o caso da empresa Unichem International (EUA), que utilizou *C. cylindracea* para essa finalidade (VAKHLU; KOUR, 2006; RAMOS-SANCHEZ et al., 2015).

A maior demanda do uso de lipases é na indústria de detergentes, entretanto faz-se necessário que essas enzimas apresentem termoestabilidade e sejam ativas em meios com pH alcalino, pois em condições de uso precisam atuar em pHs 10 a 11 e manter-se ativa em temperaturas variando de 30 a 60 °C (COLLA et al., 2012).

### 3.2 Efeito do pH na produção de lipases por *A. niger* e *A. welwitschiae*

Os resultados obtidos mostram que o pH do meio de cultivo influenciou significativamente a produção de lipases extracelulares (Tabela 3). As três linhagens selecionadas apresentaram maior produção de lipases extracelulares em pHs alcalinos, especificamente pHs 8 e 9 (Figuras 4, 5 e 6). A linhagem UEL As 15.262, destacou-se dentre as três linhagens estudadas, produzindo o maior IE ( $6,93 \pm 0,11^a$ ) em pH 9, seguida pela linhagem UEL As 2.14 com IE  $5,75 \pm 0,12^a$  em pH 9, e a linhagem UEL As 4.82 com IE  $3,31 \pm 0,27^a$  em pH 8.

Quanto ao diâmetro de crescimento da colônia, foi observado decréscimo do diâmetro nas três linhagens, quanto mais alcalino o pH (Tabela 3). Por outro lado, o IE foi maior quanto mais alcalino o pH do meio. As características físicas obtidas neste estudo são satisfatórias para a indústria biotecnológica, que buscam linhagens produtoras de enzimas em altas temperaturas e pHs alcalinos (COLLA et al, 2012; REINEHR et al., 2014; DOBREV, et al., 2015).

Haq et al. (2002) relataram pH 6 como ótimo para produção de lipases por *R. oligosporous*. Enquanto que para os microrganismos *A.cinnamomea*, *R. glutinis* e *C. rugosa* foram reportados pHs ótimos de 5,5; 8,0 e 7,0, respectivamente (LIN; WANG; SUNG, 2006; COLLA et al., 2012). Enquanto que para *A. niger*, Falony et al. (2006) relatam pH 6 como ótimo de produção destas enzimas.

Lipases estáveis em condições de alta temperatura e meios alcalinos são escassas no mercado (RODRIGUES et al., 2016), no entanto os resultados obtidos demonstraram que as linhagens UEL As 2.14 e UEL As 15.262 de *A. welwitschiae*, apresentaram os melhores IE em temperaturas de 40 e 42 °C e pH 9,0, consideradas boas candidatas à futuras aplicações.

#### 4 CONCLUSÃO

Em conclusão, foi possível verificar que o alho é um bom substrato para linhagens de *A. niger* e *A. welwitschiae* com potencial para produção de lipases extracelulares. Duas linhagens de *A. welwitschiae* e uma de *A. niger* apresentaram melhor produção de lipases extracelulares em temperaturas elevadas e pH alcalino, características satisfatórias à futuras aplicações.

## REFERENCIAS

- DE CASTRO, F. F.; PINHEIRO, A. B. P.; NASSUR, C. B.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijkiae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 321–328, jan. 2017.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.
- DOBREV, G.; ZHEKOVA, B.; DOBREVA, V.; STRINSKA, H.; DOYKINA, P.; KRASTANOV, A. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 77–82, 2015.
- FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 235-240, 2006.
- GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 621-634, jun. 1997.
- GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, W.S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 459-464, 1999.
- GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v.57, p.40-54, 2015.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.
- HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M.I.; Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637–641, 2002.
- LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 98-102, 2006.
- MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GORHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MATASSOLI, L. F.; CORREA, I. N. S.; PORTILHO, M. F.; VELOSO, C. O.; LANGONE, M. A. P. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.155, p. 347–355, 2009.
- NATH, M.; HINDUMATHY, C. K. Isolation, optimization and purification. **International Journal of Latest Research in Science and Technology**, v. 1, n. 3, p. 239–246, 2012.

NIELSEN, K.F., MOGENSEN, J.M., JOHANSEN, M., LARSEN, T.O., FRISVAD, J.C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1225–1242, 2009.

R CORE TEAM. A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2016. Disponível em: < <https://www.R-project.org/>.>

RAMOS-SANCHEZ, L. B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; JULIAN-RICARDO, M. C.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal lipase production by solid-state fermentation. **Journal of Bioprocess and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 203-211, 2015.

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D. de; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Production of lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* through solid state fermentation: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions. **Quimica Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.

SALIHU, A.; BALA, M.; ALAM, M. Z. Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. **Journal of Taibah University for Science**, Taibah University, v. 10, n. 0, 2016.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONES, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBE, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 343–371, 2014.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do Semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, jul./dez, 2006.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 143–149, 2016.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advance**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486–520, 2012.

SUSCA, A.; MORETTI, A.; STEA, G.; VILLANI, A.; HAIDUKOWSKI, M.; LOGRIECO, A.; MUNKVOLD, G. Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 75–82, 2014.

PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

RODRIGUES, C.; CASSINI, S. T.; ANTUNES, P. W. KELLER, R. P.; GONÇALVES, R. F. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 507-518, jul./set. 2016.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. de; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M. Di; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal Biotechnology**, v. 9, p. 69-85, 2006.

VITOLLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coords.). Biotecnologia na produção de alimentos. **Edgard Blücher Ltda**, p. 387-420, São Paulo, 2001.

**Tabela 1** – Produção de lipases de linhagens de *A. niger* e *A. welwitschiae* isoladas de alho.

<b>Isolado</b>	<b>Índice enzimático</b>
<b>UEL As 2.14</b>	<b>2,18± 0,02<sup>a</sup></b>
<b>UEL As 4.82</b>	<b>2,12 ± 0,01<sup>a</sup></b>
<b>UEL As 15.262</b>	<b>2,09 ± 0,06<sup>ab</sup></b>
UEL As 28.430	2,03 ± 0,03 <sup>abc</sup>
UEL As 11.228	2,02 ± 0,09 <sup>abc</sup>
UEL As 25.348	1,96 ± 0,04 <sup>abcd</sup>
UEL As 7.182	1,91 ± 0,03 <sup>bcde</sup>
UEL As 6.136	1,85 ± 0,04 <sup>cdef</sup>
UEL As 11.225	1,82 ± 0,07 <sup>defg</sup>
UEL As 26.365	1,80 ± 0,08 <sup>defgh</sup>
UEL As 27.397	1,79 ± 0,18 <sup>defgh</sup>
UEL As 29.432	1,74 ± 0,03 <sup>efghi</sup>
UEL As 12.233	1,72 ± 0,01 <sup>efghi</sup>
UEL As 28.411	1,69 ± 0,11 <sup>fghij</sup>
UEL As 1.05	1,68 ± 0,03 <sup>fghij</sup>
UEL As 20.290	1,67 ± 0,05 <sup>fghij</sup>
UEL As 28.425	1,65 ± 0,0 <sup>ghij</sup>
UEL As 27.405	1,65 ± 0,03 <sup>ghij</sup>
UEL As 28.422	1,65 ± 0,01 <sup>ghij</sup>
UEL As 24.323	1,63 ± 0,05 <sup>ghij</sup>
UEL As 34.462	1,62 ± 0,07 <sup>hij</sup>
UEL As 7.200	1,62 ± 0,01 <sup>hij</sup>
UEL As 32.459	1,58 ± 0,02 <sup>ij</sup>
UEL As 12.247	1,55 ± 0,04 <sup>ij</sup>
UEL As 6.144	1,50 ± 0,04 <sup>j</sup>

\*Médias de IE obtidas nos ensaios realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância de acordo com o teste de Tukey. Isolados em negrito, são as linhagens selecionadas por terem apresentado os maiores valores de IE. A análise foi realizada em triplicata experimental e as placas foram incubadas a 28 °C por 96 horas.

**Tabela 2** – Produção de lipases e avaliação do crescimento das colônias das linhagens UEL As 2.14, UEL As 4.82 e UEL As 15.262 de *A. niger*/*A. welwitschiae*, sob diferentes temperaturas de incubação

<b>Linhagem</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Índice enzimático</b>	<b>Diâmetro da colônia (cm)</b>
<i>A. welwitschiae</i> UEL As 2.14	25 °C	1,52 ± 0,02 <sup>e</sup>	2,86±0,11 <sup>c</sup>
	28 °C	2,18 ± 0,02 <sup>d</sup>	2,76±0,05 <sup>c</sup>
	30 °C	1,57 ± 0,02 <sup>e</sup>	3,83±0,05 <sup>a</sup>
	32 °C	1,76 ± 0,04 <sup>d</sup>	3,33±0,05 <sup>b</sup>
	35 °C	1,87 ± 0,08 <sup>d</sup>	3,30±0,10 <sup>b</sup>
	37 °C	2,36 ± 0,13 <sup>c</sup>	2,33±0,05 <sup>d</sup>
	<b>40 °C</b>	<b>2,79 ± 0,09<sup>b</sup></b>	1,80±0,10 <sup>e</sup>
	<b>42 °C</b>	4,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	<b>0,7±0,01<sup>f</sup></b>
<i>A. niger</i> UEL AS 4.82	25 °C	1,48 ± 0,06 <sup>e</sup>	3,1±0,10 <sup>b</sup>
	28 °C	2,12 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,56±0,05 <sup>c</sup>
	30 °C	1,54 ± 0,01 <sup>e</sup>	3,70±0,10 <sup>a</sup>
	32 °C	1,91 ± 0,06 <sup>c</sup>	2,93±0,11 <sup>b</sup>
	35 °C	1,64 ± 0,01 <sup>de</sup>	3,70±0,01 <sup>a</sup>
	37 °C	1,78 ± 0,12 <sup>cd</sup>	2,43±0,05 <sup>c</sup>
	40 °C	2,39 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,25±0,25 <sup>c</sup>
	<b>42 °C</b>	<b>2,56 ± 0,10<sup>a</sup></b>	<b>1,26±0,05<sup>d</sup></b>
<i>A. welwitschiae</i> UEL As 15.262	25 °C	1,91 ± 0,02 <sup>bc</sup>	2,60±0,02 <sup>e</sup>
	28 °C	2,10 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,76±0,20 <sup>de</sup>
	30 °C	1,62 ± 0,05 <sup>d</sup>	3,96±0,05 <sup>b</sup>
	32 °C	1,76 ± 0,01 <sup>cd</sup>	3,60±0,02 <sup>c</sup>
	35 °C	1,74 ± 0,05 <sup>cd</sup>	4,35±0,05 <sup>a</sup>
	37 °C	1,65 ± 0,13 <sup>d</sup>	2,90±0,10 <sup>d</sup>
	<b>40 °C</b>	<b>2,38 ± 0,04<sup>a</sup></b>	2,86±0,05 <sup>d</sup>
	<b>42 °C</b>	2,33 ± 0,08 <sup>a</sup>	<b>1,43±0,05<sup>f</sup></b>

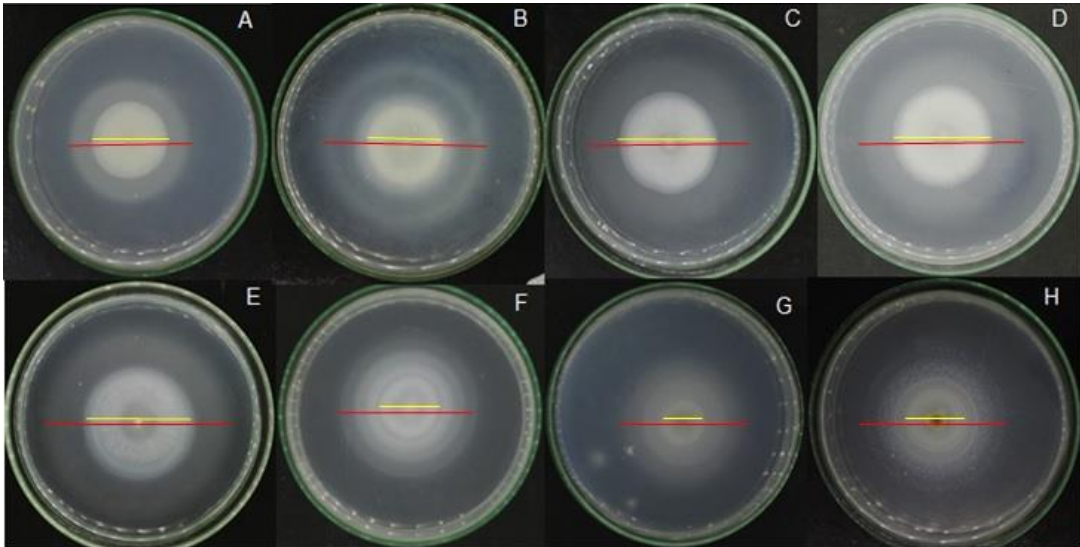
\*Médias de IE obtidas nos ensaios realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de Tukey. Isolados em negrito, são as linhagens selecionadas por terem apresentado os maiores valores de IE e menores diâmetros de crescimento da colônia.

**Tabela 3** – Produção de lipases e avaliação do crescimento das colônias das linhagens UEL As 2.14, UEL As 4.82 e UEL As 15.262 de *A. niger*/*A. welwitschiae*, em temperatura ótima de incubação encontrada para cada linhagem e diferentes pHs

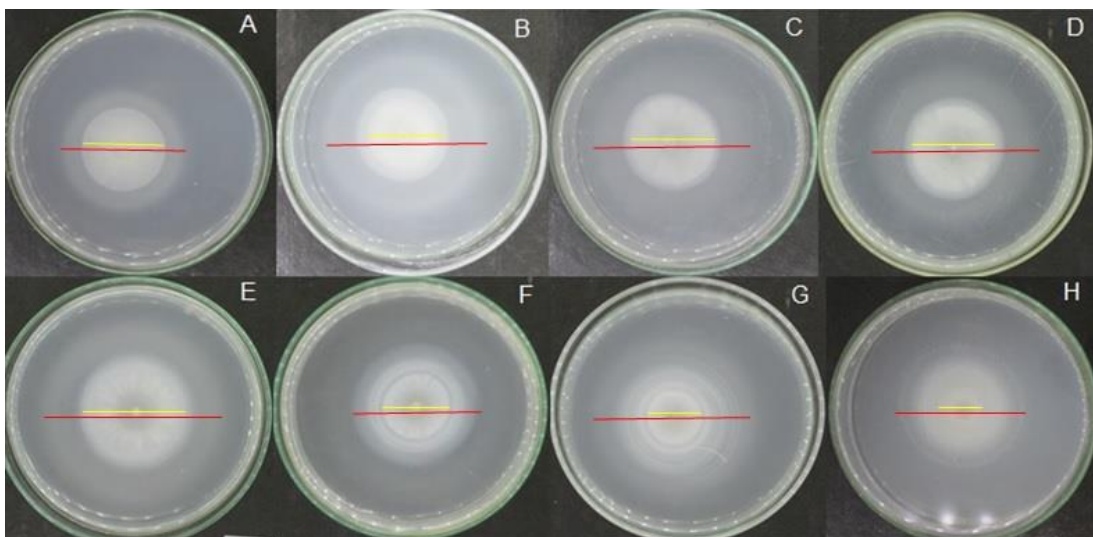
Linhagem	Temperatura	pH	Índice enzimático	Diâmetro da colônia (cm)
<i>A. welwitschiae</i> UEL As 2.14	42 °C	5,5	1,29 ± 0,09 <sup>f</sup>	2,36±0,11 <sup>ab</sup>
		6	1,32± 0,01 <sup>f</sup>	2,40±0,05 <sup>ab</sup>
		6,5	1,56 ± 0,09 <sup>ef</sup>	2,53±0,15 <sup>a</sup>
		7	1,99 ± 0,35 <sup>e</sup>	2,66±0,15 <sup>a</sup>
		7,5	2,45 ± 0,15 <sup>d</sup>	2,06±0,15 <sup>b</sup>
		8	2,95 ± 0,15 <sup>c</sup>	1,60±0,17 <sup>c</sup>
		<b>8,5</b>	<b>3,81 ± 0,07<sup>b</sup></b>	<b>1,33±0,28<sup>c</sup></b>
		<b>9</b>	<b>5,75 ± 0,12<sup>a</sup></b>	<b>0,83±0,05<sup>d</sup></b>
<i>A. niger</i> UEL AS 4.82	42 °C	5,5	1,54 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,91±0,01 <sup>b</sup>
		6	1,55 ± 0,17 <sup>c</sup>	1,98±0,03 <sup>ab</sup>
		6,5	1,61 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,21±0,07 <sup>a</sup>
		7	1,65 ± 0,05 <sup>c</sup>	1,83±0,15 <sup>b</sup>
		7,5	3,27± 0,27 <sup>a</sup>	1,26±0,11 <sup>c</sup>
		8	3,31 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,86±0,05 <sup>d</sup>
		<b>8,5</b>	<b>2,75 ± 0,25<sup>b</sup></b>	<b>0,46±0,05<sup>e</sup></b>
		9	2,67 ± 0,28 <sup>b</sup>	0,56±0,05 <sup>e</sup>
<i>A. welwitschiae</i> UEL As 15.262	40 °C	5,5	2,16 ± 0,08 <sup>de</sup>	2,5±0,10 <sup>b</sup>
		6	2,65 ± 0,15 <sup>bc</sup>	2,33±0,23 <sup>b</sup>
		6,5	2,02 ± 0,14 <sup>e</sup>	3,08±0,07 <sup>a</sup>
		7	2,08 ± 0,01 <sup>e</sup>	2,35±0,05 <sup>b</sup>
		7,5	2,61 ± 0,03 <sup>bc</sup>	2,2±0,10 <sup>b</sup>
		8	2,42 ± 0,03 <sup>cd</sup>	2,13±0,10 <sup>ab</sup>
		8,5	2,83 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,26±0,05 <sup>c</sup>
		<b>9</b>	<b>6,93 ± 0,11<sup>a</sup></b>	<b>0,5±0,01<sup>d</sup></b>

\*Médias de IE obtidas nos ensaios realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância de acordo com o teste de Tukey. Isolados em negrito, são as linhagens selecionadas por terem apresentado os maiores valores de IE e menores diâmetros de crescimento da colônia.

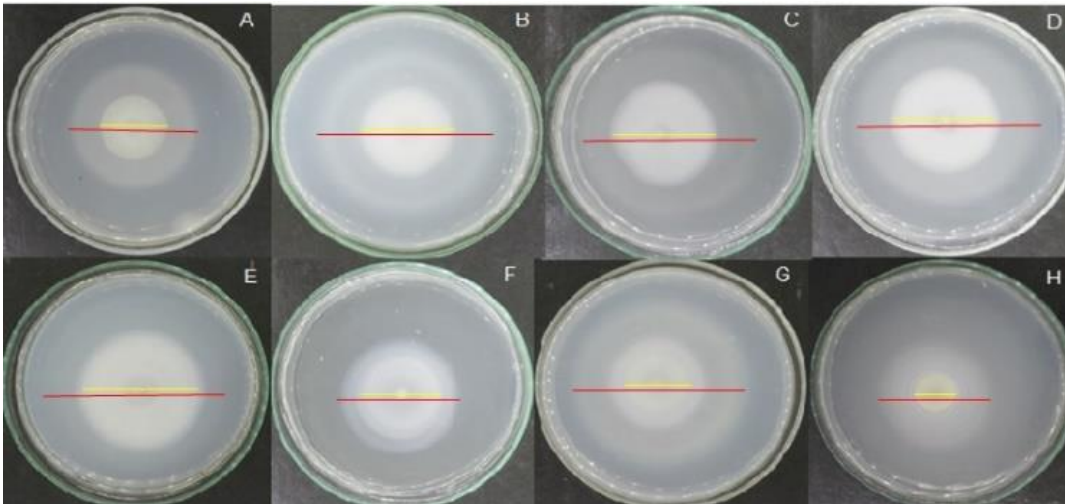
**Figura 1** – Halo de atividade enzimática de lipases da linhagem UEL As 2.14 de *A. welwitschiae* em diferentes temperaturas de incubação. A - 25 °C; B - 28 °C; C - 30 °C; D - 32 °C; E - 35 °C; F - 37 °C; G - 40 °C; H - 42 °C. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento



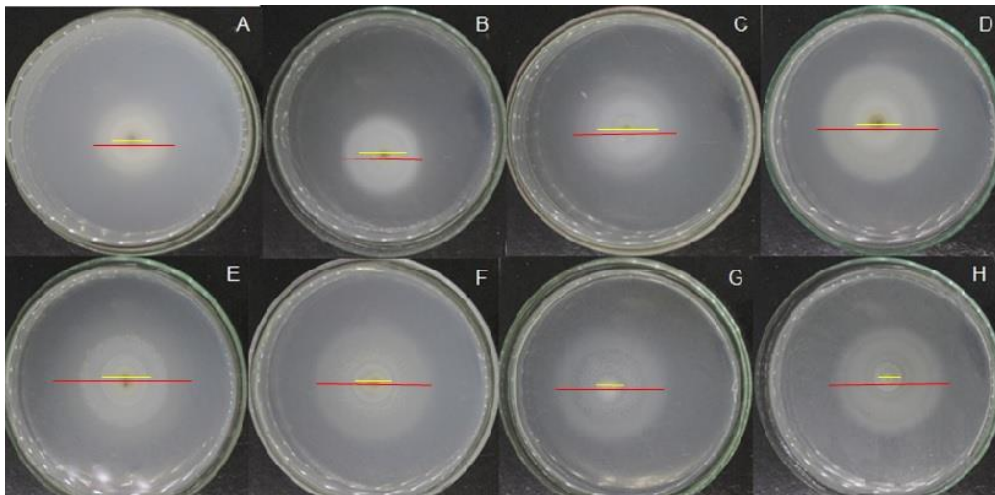
**Figura 2** – Halo de atividade enzimática de lipase do isolado UEL As 4.82 em diferentes temperaturas de incubação. A - 25 °C; B - 28 °C; C - 30 °C; D - 32 °C; E - 35 °C; F - 37 °C; G - 40 °C; H - 42 °C. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento



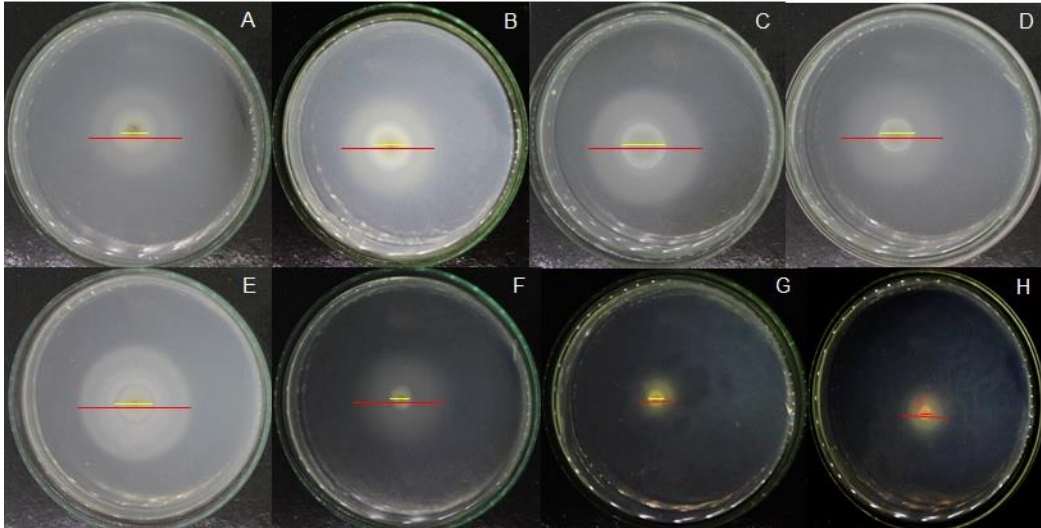
**Figura 3** – Halo de atividade enzimática de lipase do isolado UEL As 15.262 em diferentes temperaturas de incubação. A - 25 °C; B - 28 °C; C - 30 °C; D - 32 °C; E - 35 °C; F - 37 °C; G - 40 °C; H - 42 °C. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento.



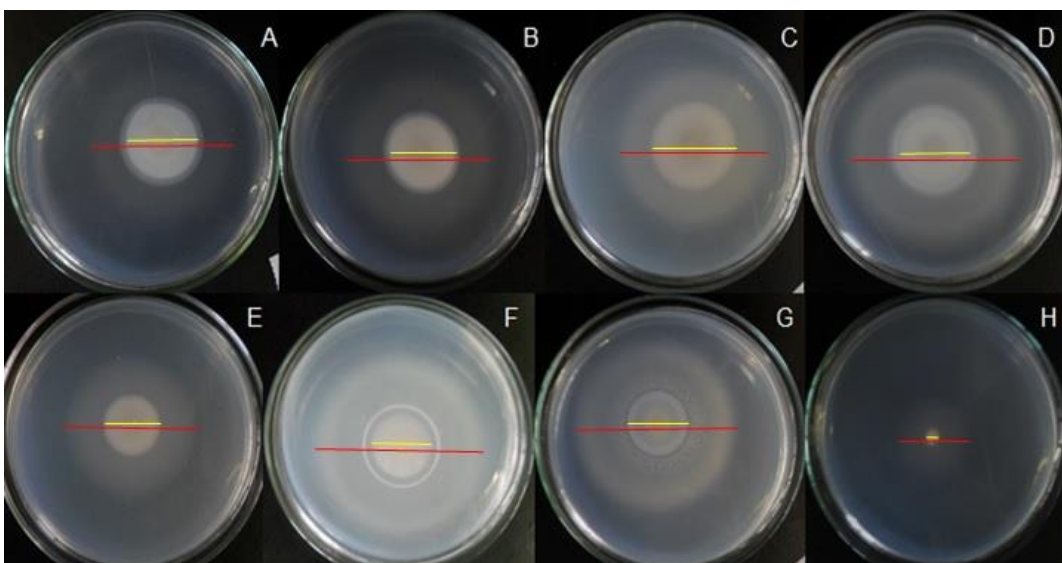
**Figura 4** – Avaliação de produção de lipase do isolado UEL As 2.14 em 42 °C e diferentes pHs. A – pH 5,5; B – pH 6,0; C – pH 6,5; D – pH 7,0; E – pH 7,5; F – pH 8,0; G – p 8,5; H – pH 9,0. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento.



**Figura 5** – Avaliação de produção de lipase do isolado UEL As 4.82 em temperatura de 42 °C e diferentes pHs. A – pH 5,5; B – pH 6,0; C – pH 6,5; D – pH 7,0; E – pH 7,5; F – pH 8,0; G – p 8,5; H – pH 9,0. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento.



**Figura 6** – Avaliação de produção de lipase da linhagem UEL As 15.262 em temperatura de 40 °C e diferentes pHs. A – pH 5,5; B – pH 6,0; C – pH 6,5; D – pH 7,0; E – pH 7,5; F – pH 8,0; G – p 8,5; H – pH 9,0. Traços vermelhos – diâmetro do halo de atividade enzimática + diâmetro de crescimento da colônia; traços amarelos – diâmetro da colônia de crescimento.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta dissertação permitiram relatar a incidência de infecção fúngica nos alhos comercializados em estados brasileiros. Com exceção das amostras do estado de Minas Gerais e São Paulo, que não apresentaram infecção fúngica, 11 estados brasileiros mostraram infecção fúngica principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Com predominância do gênero *Aspergillus*, destacando a seção *Nigri*. A análise de variabilidade genética dos isolados não foi associada à origem geográfica do hospedeiro. Quanto à identificação das espécies de *Aspergillus* section *Nigri* isoladas de alhos, houve predomínio das espécies *A. niger*/*A. welwitschiae*, com 43 linhagens de *Aspergillus welwitschiae* e 16 linhagens de *Aspergillus niger*, sendo relatado 1 linhagem de *Aspergillus luchuensis*. Quanto ao potencial de produção de FB<sub>2</sub> e OTA, concluiu-se que mais de 50% das espécies apresentaram genótipo para produção de FB<sub>2</sub> e nenhuma linhagem apresentou genótipo para produção de OTA. Em contraste, as espécies de *A. niger* e ou *A. welwitschiae* isoladas do alho e que não apresentaram genótipo para produção OTA e ou FB<sub>2</sub>, se destacaram quanto à produção de lipases. Três linhagens se destacaram com potencial de produção de lipases em condições alcalinas e temperaturas elevadas. Dessa forma, este estudo relata pela primeira vez a incidência de *Aspergillus* seção *Nigri* em alhos comercializados no Brasil e seleciona linhagens com perfis satisfatórios à indústria para futuras aplicações.

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CASTELLÁ G., CABAÑES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied Environmental and Microbiology**, p. 2650-2652. 1994.
- ABBAS, H.K., WILKINSON, J.R., ZABLOTOWICZ, R.M., et al. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. **Toxin Reviews**, v. 28, p.142–153, 2009.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, 2017.
- AMAGASE, H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. **Journal of nutrition**, v.136, p. 7165-7255, 2006.
- AMÉZQUETA, S.; SCHORR-GALINDO, S.; MURILLO-ARBIZU, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GUIRAUD, J. P. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 259–268, 2012.
- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOZA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina Hyphomycetes) isolates. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 729-732, 2000.
- BARATTO, C.M.; SALAMONI, S. P.; COSTA. R.; OLIVEIRA, C. B. DE; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, Joaçaba, v. 11, n. 2, p. 15–28, julho/dezembro, 2011.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, Jun, 2003.
- BJÖRKLING, F.; GODTFEDSEN, S.E.; KIRK, O. The future impact of industrial lipases. **Trends in Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 360-363, jan. 1991
- BRASIL, Agência Nacional De Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC 276, de 22 de setembro de 2005. **Aprova o Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília (DF), 2005.
- BRASIL, Agência Nacional De Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da União; Brasília (DF), 4p. 2011.
- CARVALHO, C. de; KIST, B. B. Alho: tempero exótico. In: **Anuário Brasileiro de Hortaliças 2017**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 56p. 2017.

DE CASTRO, F. F.; PINHEIRO, A. B. P.; NASSUR, C. B.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijkiae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 321–328, jan. 2017.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

COLE, R.J., JARVIS, B.B. SCHWEIKERT, M.A. Handbook of Secondary Fungal Metabolites. **Academic Press**, New York, v. 3, 2003.

CORZO-MARTÍNEZ, M. et al. Biological properties of onions and garlic. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.12, p.609-25, 2007.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163–171, 2010.

DOBREV, G.; ZHEKOVA, B.; DOBREVA, V.; STRINSKA, H.; DOYKINA, P.; KRASTANOV, A. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and by products from the oleochemical industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 77–82, 2015.

EMBRAPA. Electropherogram quality analysis. Disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 235-240, 2006.

FARIAS, A. X. de; ROCHA, E. S. da; COSTA, P. P. Fumonisinias em Milho: um Risco à Saude Humana e Animal. **Comunicado Técnico 51**. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, 2002.

FONTENELE, L. M. dos S.; AZEVEDO, M. L. X.; CARDOSO FILHO, F. das C.; MURATORI, M. C. S.; SÁ, L. R. S. de; PEREIRA, M. M. G. Qualidade microbiológica do alho (*Allium sativum*) produzido e comercializado em mercados públicos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 4, jan./mar. 2015.

FREDDO, A. R. L. F. Alho. **Conjuntura mensal**. CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, maio, 2016.

FRISVAD, J.C., NIELSEN, F.K., SAMSON, R.A. Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxinogenic fungi associated with foods and feeds. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 571, p. 33–46, 2006.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R. A.; LARSEN, T. O.; THRANE, U. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9727–9732, 2007.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; THRANE, U.; et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 2-7, 2011.

FUNGARO, M. H.P.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L. de. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Applied Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1996.

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

FUNGARO, M. H. P.; FERRANTI, L. S.; MASSI, F. P.; SILVA, J.J. da; SARTORI, D.; TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; IAMANAKA, B. T. *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6203, 2017.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 621-634, jun. 1997.

GEISER, D. M.; PITT, J. I.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 95, n. 1, p. 388- 393, 1998.

GELDERBLOM, W.C.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N. P. Fumonisin novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p.1806-1811, 1988.

GHANGAONKAR, N.M. Incidence of mycoflora on garlic (*Allium sativum* L.) bulbs. **International Research Journal of Biological Sciences**, v.2, n.7, p.64-44, 2013.

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.

GUTLEB, A.C.; MORRISON, E.; MURK, A. J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 309–320, 2002.

GNONLONFIN, G. J. B.; ADJOVI, Y. C.; TOKPO, A. F.; AGBEKPONOU, E. D.; AMEYAPOH, Y.; DE SOUZA, C.; BRIMER, L.; SANI, A. Mycobiota and identification of aflatoxin gene cluster in marketed spices in West Africa. **Food Control**, v.34, p.115-120, 2013.

GONÇALVES, S.S.; STCHIGEL, A. M.; CANO, J. F.; GODOY-MARTINEZ, P. C.; COLOMBO, A. L.; GUARRO. J. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. **Medical Mycology**, v. 50, p. 152-160, 2012.

GRIEBELER, N. E.; BORTOLI, V. de; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 13, p. 15–24, jan. 2015.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. de L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 474-480, out./dez. 2006.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, W.S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 459-464, 1999.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; & RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p.763–781, 2004.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v.57, p.40-54, 2015.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, maio/jun. 1975.

HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M.I.; Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637–641, 2002.

HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, New York, v.58, n.5, p.709-716, nov. 2001.

HARVEY, M.J. Onion and other cultivated Alliums. In: SMARTT & SIMONDS. **Evaluation of Crop Plant**. Londres-Inglaterra, v. 2, p. 445-448, 1995.

HONG, S. B.; CHO, H. S.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 477–486, 2006.

HONG, S.B.; LEE, M.; KIM, D. H.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; GOMI, K.; YAMADA, O.; MACHIDA, M.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. **Plos One**, v. 8, n. 5, e63769, maio 2013.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P. de; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 86, p.199-249, 2014.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.118, n. 1-3, p.157–170, jul./set. 2004.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; KOLARIK, A.; JURJEVIC, Z.; PETERSON, S. W. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. **Mycologia**, V. 107, n. 1, p. 169-208, 2014.

IARC (International Agency for Research on Cancer). In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, Naphthalene and Styrene, **IARC** (ed.), v. 82, 171 Genebra, fev. 2010.

KARBANCIOGLU-GULER, F., HEPERKAN, D. Natural occurrence of fumonisin B1 in dried figs as an unexpected hazard. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 289-292, 2009.

KLICH, M. A. Relation of plant water potential at flowering to subsequent cottonseed infection by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 77, p. 739-741, 1987.

KLICH, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Utrecht, v. 17, n.3, p. 128, ago. 2002.

KLICH, M. A.; PITT, J. L. Differentiation of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 91, n. 1, p. 99-108, abr. 1988.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.34, p.283-300, 2003.

KRSKA, R., WELZIG, E., BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241-264, 2007.

LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 98-102, 2006.

LINO, C.M., SILVA, L.J.G., PENA, A.S., SILVEIRA, M.I. Determination of fumonisins B1 and B2 in Portuguese maize and maize-based samples by HPLC with fluorescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 1214-1220, 2006.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, v.4, p. 512, 2002.

LUCINI, M.A. Alho roxo no Brasil: um pouco da história dos números desse nobre. In: Alho roxo, sua história em números. **Revista Nosso Alho**, v.1, n.1, p. 16-22, 2008.

LUCINI, M. A. Acompanhamento conjuntural do alho. Resumo do mercado, preços, importações e da produção nacional de alho de janeiro a julho. **ANAPA - Associação Nacional de Produtores de Alho**. Jul. 2016.

LUCINI, M. A. Acompanhamento conjuntural do alho. De janeiro a outubro de 2016. **ANAPA - Associação Nacional de Produtores de Alho**. Out. 2016.

LUCINI, M. A. Acompanhamento conjuntural do alho. De janeiro a outubro de 2017. **ANAPA - Associação Nacional de Produtores de Alho**. Ago. 2017

MACDONALD, S.; CASTLE, L. A UK retail survey of aflatoxin in herbs and spices and their fate during cooking. **Food Additives and Contaminants**, v.13, p.121-128, 1996.

MACÊDO, F. S.; SOUZA, R. J. D.; PEREIRA, G. M. Controle de superbrotamento e produtividade de alho vernalizado sob estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 629-635, 2006.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GORHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MANSSON, M.; KLEJNSTRUP, M. L.; PHIPPS, R. K.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; GOTFREDSEN, C. H.; LARSEN, T. O. Isolation and NMR characterization of fumonisin B2 and a new fumonisin B6 from *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 949-953, 2009.

MARASAS, W. F. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 239-243, maio 2001.

MARASAS, W.F.; RILEY, R. T.; HENDRICKS, K. A; STEVENS, V. L.; SADLER, T. W.; GELINEAU-VAN WAES, J.; MISSMER, S. A.; CABRERA, J.; TORRES, O.; GELDERBLOM, W.C.; ALLEGOOD, J.; MARTÍNEZ, C.; MADDOX, J.; MILLER, J. D.; STARR, L.; SULLARDS, M. C.; ROMAN, A. V.; VOSS, K. A.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Jr. Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin- contaminated maize. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 711–716, abr. 2004.

MARIN, S., RAMOS, A.J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food Chemical Toxicology**, n. 60, p. 218-237, 2013.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. **Food Chemistry**, v. 211, p. 41–50, 2016.

MASSI, F. P.; SARTORI, D.; FERRANTI, L. DE S.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; VIEIRA, M.L. C.; FUNGARO, M. H. P. Data on the presence or absence of genes encoding essential proteins for ochratoxin and fumonisin biosynthesis in *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **Data in Brief**, v. 7, p. 704–708, 2016.

MASSI, F. P.; SARTORI, D.; FERRANTI, L. DE S.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; VIEIRA, M.L. C.; FUNGARO, M. H. P. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.221, p. 19-28, 2016.

MATASSOLI, L. F.; CORREA, I. N. S.; PORTILHO, M. F.; VELOSO, C. O.; LANGONE, M. A. P. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.155, p. 347–355, 2009.

MEGA 7. Molecular Evolutionary genetics analysis - Disponível em:  
<<http://www.megasoftware.net/>>

MERRILL, A.H.JR.; VAN ECHTEN, G.; WANG, E.; SANDHOFF, K. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 27299-27306, 1993.

MISSMER, S.A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL, A. H. Jr.; ROTHMAN, K. J.; HENDRICKS, K. A. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2, p. 237-241, fev.2006.

MOTA, J. H.; SOUZA, R.J.D.; YURI, J.E.; REZENDE, G.M.D.; TEIXEIRA, I.R. Similaridade morfológica de cultivares de alho (*Allium sativum* L.). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, V.4, n.8, 2005.

MOTA, L.D.C.; DELLA VECCHIA, M. G. S.; GIORIA, R.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A.; AMORIM, L. Pfaffia mosaic virus: a new potyvirus found infecting *Pfaffia glomerata* in Brazil. **Plant Pathology**, Londres, v. 53, p. 368-373. 2004.

MOTA, J.H.; YURI, J. E.; RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J. Similaridade genética de cultivares de alho pela comparação de caracteres morfológicos, físico-químicos, produtivos e moleculares. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.156-160, 2006.

NATH, M.; HINDUMATHY, C. K. Isolation, optimization and purification. **International Journal of Latest Research in Science and Technology**, v. 1, n. 3, p. 239–246, 2012.

NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela brasileira de composição de alimentos. **NEPA - Unicamp**, p. 161, 2011.

- NIELSEN, K.F., MOGENSEN, J.M., JOHANSEN, M., LARSEN, T.O., FRISVAD, J.C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1225–1242, 2009.
- OH, J. Y.; MANNAA, M.; HAN, G. D.; CHUN, S.-C.; KIM, K. D. First report of *Aspergillus awamori* as a fungal pathogen of garlic (*Allium sativum* L.). **Crop Protection**, v. 85, p. 65–70, 2016.
- DE OLIVEIRA, C. M.; MOTA, J. H.; YURI, J. E.; DE SOUZA, R. J.; DE RESENDE, G. M. Determinação do potencial de armazenamento em cultivares de alho. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, jul. 2002.
- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.
- PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L. Multiplex PCR analysis of fumonisin biosynthetic genes in fumonisin-non producing *Aspergillus niger* and *A. awamori* strains. **Mycologia**, v. 105, n.2, p. 277-284, 2013.
- PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L. Detection and discrimination of four *Aspergillus Nigri* species by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 188-195, 2015.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 135-152, 2005.
- PASHA, K. M.; ANURADHA, P.; RAO, D.S. Screening of a pectinolytic fungal strain; *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 for the production of multiple enzymes of industrial importance. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n.2, p.1205-1209, 2013.
- PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M.; MORTBY, E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.13, p.833-841, 1996.
- PEL, H.J.; de WIND, J. H.; ARCHER, D. B.; et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 221-231, 2007
- PERRONE, G.; STEA, G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSOM, R. *A. Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *Aspergillus awamori*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 11, p. 1138–1150, 2011.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. **Food Science & Nutrition**, v.3, New York, 2009.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Names in current use in the family *Trichocomaceae*. In: Greuter W., editor. Names in current use in the family *Trichocomaceae*, *Cladoniaceae*, *Pinaceae*, and *Lemnaceae*. Koeltz **Scientific Books**, Konigstein, Germany, p.13–57, 1993.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family *trichocomaceae*. In: SAMSON R.A.; PITT, J.I. editors. Integration of modern taxonomic methods for *penicillium* and *Aspergillus* classification. **Harwood academic publishers**, Amsterdam, p.9-79, 2000.

PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

R Core Team. A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2016. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAMOS-SÁNCHEZ, L. B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; JULIAN-RICARDO, M. C.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal lipase production by solid-state fermentation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 2, 2015.

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

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D. de; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Production of Lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* Through Solid State Fermentation: Evaluation of Substrate Specificity And Use in Esterification and Alcoholysis Reactions. **Quimica Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.

RESENDE, F. V.; HABER, L. L.; PINHEIRO, J. B. **A cultura do Alho**. Brasília, DF: Embrapa-CNPQ, 2015.

RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., VISMER, H.F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2101-2105, 2002.

ROCHA, M.E.B. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159–165, 2014.

RODRIGUES, C.; CASSINI, S. T.; ANTUNES, P. W. KELLER, R. P.; GONÇALVES, R. F. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 507-518, jul./set. 2016.

ROHLF, F. J. NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 2000.

- ROJAS, J. A.; CRUZ, C. MIKÁN, J. F.; VILLALBA, L. S.; GARCÍA, M. C. C. de; RESTREPO, S. Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 63, n. 2, p. 169-175, fev. 2009.
- SALIHU, A.; BALA, M.; ALAM, M. Z. Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. **Journal of Taibah University for Science**, Taibah University, v. 10, n. 0, 2016.
- SAMSON, R. A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, K.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. **Studies in Mycology**, v. 59, p.129-145, 2007.
- SAMSON, R.A., VISAGIE C.M., HOUBRAKEN, J. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain: terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS, T. C. DOS; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; FILHO, G. A.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 1, p. 65–71, 2013.
- SCF** (Scientific Committee on Foods of the European Union). Updated opinion of the Scientific Committee on Foods on Fumonisin B1, B2 and B3. Expressed on 4 April 2003. SCF/CS/CNTM/MYC/28 FINAL. Directorate - Scientific Opinions. European Commission, Brussels, Belgium, 2003.
- SCOTT, P.M. Recent research on fumonisins: a review. **Food Additives & Contaminants**, v. 29, p. 242–248, 2012.
- SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do Semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, jul./dez, 2006.
- SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, Sociedade Brasileira de Microbiologia, v. 47, n. 1, p. 143–149, 2016.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advance**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, D. M.; BATISTA, L. R.; REZENDE, E. F.; FUNGARO, M. H. P; SARTORI, D.; ALVES, E. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 761–773, 2011.

SILVA, F. C. DA; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção *Flavi*: uma revisão. **Revista Ifes Ciência**, v. 1, n. 1, p. 18–40, 2015.

SIMON, A. A.; SANTOS, A. A.; MASSIGNAM, A. M. et al. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina**. Agropecuária – Brasil SC – Periódico. I. Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina, Florianópolis, SC. II Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/ Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola – Epagri/Cepa, Florianópolis, SC. v. 1, p. 2013-2014, Florianópolis, 2014.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486–520, 2012.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; et al. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Stanbury, v.30, n.3, p.700- 705, 2010.

SOUZA, R. J. DE; MACÊDO, F. S. Vernalização de cultivares de alho nobre na região de Lavras. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 651–654, jul./ set. 2004.

SHIMIZU, K.; NAKAGAWA, H.; HASHIMOTO, R.; HAGIWARA, D.; ONJI, Y.; ASANO, K.; KAWAMOTO, S.; TAKAHASHI, H.; KOJI, Y. The  $\alpha$ -oxoamine synthase gene *fum8* is involved in fumonisin B2 biosynthesis in *Aspergillus niger*. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 301–308, 2015.

SPERB, J. G. C.; COSTA, T. M.; VAZ, D. A.; VALLE, J. A. B.; VALLE, R. de C. S. C.; TAVARES, L. B.B. Lipases e biossurfactantes por fungos. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385–397, 2015.

SUSCA, A.; MORETTI, A.; STEA, G.; VILLANI, A.; HAIDUKOWSKI, M.; LOGRIECO, A.; MUNKVOLD, G. Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 75–82, 2014.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141-158, 1998.

SZÉCSI, Á., SZEKERES, A., BARTÓK, T., OROS, G., BARTÓK, M., MESTERHÁZY, Á. Fumonisin B<sub>1-4</sub> -producing capacity of Hungarian *Fusarium verticillioides* isolates. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, p. 67-76, 2010.

TANCINOVÁ, D.; MOKRÝ, M.; BARBORÁKOVÁ, Z.; MASKOVÁ, Z. Mycobiota of spices and aromatic herbs. **Potravinárstvo Scientific Journal for Food Industry**, v.8, n.1, p.172-177, 2014.

THOM, C., RAPER, K.B. **Manual of the aspergilli**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1945.

TOMA, F.M.; ABDULLA, N.Q.F. Isolation and identification of fungi from spices and medicinal plants. **Research Journal of Environmental and Earth Sciences**, v.5, p.131-138, 2013.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. de; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M. Di; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal Biotechnology**, v. 9, p. 69-85, 2006.

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* Wilh. **Nature**, v. 205, p.1112-1113, 1965.

VARGA J, RIGÓ K, TÉREN J, MESTERHÁZY Á. Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. **Cereal Research Communications**, v. 29, p. 85-92, 2001.

VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SURI, K., SZIGETI, G., SZEKERES, A., VARGA, M., TÓTH, B., BARTÓK, T. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p. 143-149, 2010.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R. A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1–17, 2011.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; GY SZIGETI; MAN, V.; TÓTH, B.; VÁGVOLGYI, CS.; BARTÓK. Black *Aspergilli* and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. **Acta Alimentaria**, v. 41, n. 4, p. 414–423, 2012.

VARGA, J.; BARANYI, N.; CHANDRASEKARAN, M.; VÁGVÖLGYI, C.; KOCSUBÉ, S. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 59, n. 2, p. 151–167, 2015.

VERÍSSIMO, T.; ALMEIDA, I.; CIDADE, H.; PINTO, M.; AZEVEDO, S.; OLIVEIRA, B.; CUNHA, L.M. Evaluation of antioxidant activity of minimally processed garlic cloves. **XXVIII International Horticultural Congress - IHC2010**, p. 77-178, 2010.

VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coords.). Biotecnologia na produção de alimentos. **Edgard Blücher Ltda**, p. 387-420, São Paulo, 2001.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

XING-HUA, L.; HUA-JUN, Y.; BHASKAR, R.; DAN, W.; WAN-FU, Y.; LI-JUN, J.; ENOCH, Y. P.; YUN-GEN, M. The most stirring technology in future: cellulase enzyme and biomass utilization. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 8, n. 11, p. 2418-2422, nov. 2009.

## **ANEXOS**

### Anexo A

Perfil de RAPD das Linhagens de *Aspergillus niger* (subgrupo A), *Aspergillus Welwitschiae* (Grupos I, II e III) e *Aspergillus Luchuensis* (Grupo IV)

