



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOÃO PAULO SILVA MONTEIRO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aspergillus*
SEÇÕES *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, EM ALHO**

Londrina
2019

JOÃO PAULO SILVA MONTEIRO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aspergillus*
SEÇÕES *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, EM ALHO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Sartori

Londrina
2019

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

Silva Monteiro, João Paulo.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aspergillus* SEÇÕES *Cremei*, *Circumdati* e *Flavi*, EM ALHO / João Paulo Silva Monteiro. - Londrina, 2019.
72 f. : il.

Orientador: Daniele Sartori.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2019.

Inclui bibliografia.

1. Identificação de *Aspergillus* em alho - Tese. 2. Avaliação enzimática - Tese. 3. *Aspergillus europaeus* - Tese. I. Sartori, Daniele. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . III. Título.

JOÃO PAULO SILVA MONTEIRO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aspergillus*
SEÇÕES *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, EM ALHO**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gislayne Fernandes Lemes
Trindade Vilas-Boas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Viviane Monteiro e Alexandre Monteiro, pelo apoio e incentivo durante todas as etapas desta jornada. Aos meus avós Irene Prado e Benedito Silva, que tornaram viável este sonho. E a minha orientadora Daniele Sartori, com quem tive a oportunidade de trabalhar e aprender valiosos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

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

À Capes por financiar este sonho.

Aos meus pais, Viviane Monteiro e Alexandre Monteiro, que não mediram esforços para garantir a melhor educação possível, por acreditarem neste sonho e estarem ao meu lado nos momentos de fraqueza, sempre me ajudando a escolher o caminho certo.

A minha orientadora, Dra. Daniele Sartori, pela oportunidade, apoio e constante orientação no desenvolvimento deste trabalho. Sou grato pela confiança, amizade e compreensão.

Ao técnico de laboratório, Nelson Janeiro Rodriguez, pela ajuda em diversas etapas desta jornada, tornando o dia de todos um pouco melhor, sou grato pela amizade.

A todos os meus amigos presentes durante este percurso, pela ajuda, amizade e companheirismo.

A Professora Dra. Maria Helena Pelegrine Fungaro, por dar o suporte para que esse trabalho pudesse ser concretizado.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, por todo ensinamento compartilhado, pela dedicação e atenção.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a realização e concretização desse trabalho.

MONTEIRO, J. P. S. **ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aspergillus* SEÇÕES *Cremei*, *Circumdati* e *Flavi*, EM ALHO**. 72f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O Brasil é um dos maiores consumidores de alho (*Allium sativum* L.) do mundo e seu uso como tempero representa uma prática habitual na culinária. A presença de fungos em produtos de origem biológica, pode representar fator de risco para a saúde, visto a potencial produção de micotoxinas nocivas. No alho é relatada uma maior incidência de infecção pelo gênero de fungos *Aspergillus*, se destacando a espécie *A. niger* da seção *Nigri* como predominante na especiaria. No entanto, há poucos relatos de infecção do alho brasileiro por espécies de outras seções de *Aspergillus*. Neste sentido, este estudo teve como objetivo: isolar espécies de *Aspergillus* em alhos comercializados em 12 estados brasileiros, verificar a incidência, identificar as espécies e avaliar o potencial biotecnológico, das espécies descritas como não toxigênicas, para produção de lipases e amilases. A contaminação fúngica foi verificada após incubar os bulbilhos do alho em meio (DG18), com um total 422 Unidades Formadoras de Colônia (UFC), representando 3 seções de espécies de *Aspergillus*. A partir deste total, 94 (UFC) foram isoladas e 44 isolados selecionados para análise de variabilidade genética. A 30 % de similaridade, o dendrograma apresentou 3 grupos (clusters I, II e III) e entre os grupos formados foram selecionados um total de 8 isolados para identificação da espécie, através do sequenciamento de regiões parciais do gene da β -tubulina (*BenA*). Os isolados do grupo I foram identificados como *A. europaeus* e *A. dimorphicus*, ambos da seção *Cremei* e descritos pela primeira vez no alho, com alta incidência (77%) da espécie *A. europaeus*. Já as espécies do grupo II, foram identificadas como *A. ochraceus* e *A. melleus* da seção *Circumdati*, juntas as espécies representam (13,6%) do total de 44 isolados, sendo a segunda seção mais incidente neste estudo. Quanto ao grupo III, ficaram as espécies identificadas com *A. flavus* e/ou *A. oryzae* da seção *Flavi*, sendo a seção menos presente neste estudo, representando (6,8%) dos isolados. Além da alta incidência, (56%) das linhagens de *A. europaeus* demonstraram potencial lipolítico satisfatório. Desta forma, foi possível avaliar a situação atual de infecção do alho brasileiro, relatando espécies como *A. europaeus* e *A. dimorphicus*, encontradas pela primeira vez no alho, bem como espécies descritas pela produção de aflatoxinas (*A. flavus*) e ocratoxinas (*A. ochraceus*) que apesar da baixa incidência, representam um fator de risco para os consumidores desta especiaria.

Palavras-chave: *Allium sativum* L. *Aspergillus europaeus*. *Aspergillus dimorphicus*. Spices. β -tubulina. Lipase. Amylase.

MONTEIRO, J. P. S. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Aspergillus* SECTIONS *Cremeri*, *Circumdati* AND *Flavi*, IN GARLIC. 72p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest consumers of garlic (*Allium sativum* L.) in the world and its use as a spice is a habitual practice in cuisine. The presence of fungi in products of biological origin may represent a risk factor for health, considering the potential production of harmful mycotoxins. In garlic is reported a higher incidence of infection by fungi of the genus *Aspergillus*, especially the *A. niger* species from the section *Nigri*. However, there are few reports of infection of Brazilian garlic by other *Aspergillus* sections. In this sense, the objective of this study was to isolate *Aspergillus* species in garlic commercialized in 12 Brazilian states, verify the incidence, identify the species and evaluate the biotechnological potential, of the species described as nontoxigenic, for the production of lipases and amylases. The fungal infection was verified after incubating the garlic bulbs in (DG18) medium, with a total of 422 Colony Forming Units (CFU), representing 3 sections of *Aspergillus*. From this total, 94 (CFU) were isolated and 44 isolates selected for analysis of genetic variability. At 30% similarity, the dendrogram presented 3 groups (clusters I, II and III) and among the groups formed a total of 8 isolates were selected for identification of the species, through the sequencing of partial regions of the β -*tubulin* gene (*BenA*). The isolates of group I were identified as *A. europaeus* and *A. dimorphicus*, both of the section *Cremeri* and described for the first time in garlic, with a high incidence (77%) of *A. europaeus* species. The species of group II were identified as *A. ochraceus* and *A. melleus* from the section *Circumdati*, together the species represent (13.6%) of the total of 44 isolates, the second section more incident in this study. While the group III had species identified as *A. flavus* and/or *A. oryzae* from the section *Flavi*, this section was the less incident in this study, representing (6.8%) of the total isolates. In addition to the high incidence, (56%) of *A. europaeus* strains demonstrated satisfactory lipolytic potential. Thus, it was possible to evaluate the current infection situation of Brazilian garlic, reporting species such as *A. europaeus* and *A. dimorphicus*, found for the first time in garlic, as well as species described by the production of aflatoxins (*A. flavus*) and ochratoxins (*A. ochraceus*) that despite the low incidence, represent a risk factor for the consumers of this spice.

Key words: *Allium sativum* L. *Aspergillus europaeus*. *Aspergillus dimorphicus*. Spices. β -*tubulin*. Lipase. Amylase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E QUADROS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 -	Morfologia do alho. (A) Planta de alho com bainhas e pseudocaule. (B) Caule verdadeiro. (C) Bulbilhos. (D) Bulbo.....	12
Quadro 1 -	Composição nutricional do alho.....	13
Figura 2 -	Morfologia de <i>Aspergillus</i> seção Flavi	18
Figura 3 -	Morfologia de <i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i>	21
Figura 4 -	Morfologia de <i>Aspergillus</i> seção <i>Cremeri</i>	23

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 -	From RAPD using primers OPX7 and OPX1 a dendrogram was constructed based on data profile of 44 isolates of <i>Aspergillus</i> sections <i>Cremeri</i> , <i>Circumdati</i> and <i>Flavi</i> , collected from garlic marketed in Brazil. The UPGMA method was used based on the similarity matrix, at 30% similarity the isolates were grouped into 3 clusters (I, II and III). The highlighted isolates* were selected for species sequencing and identification	65
Figure 2 -	Phylogenetic tree constructed based on data for partial sequences for the β -tubulin gene (<i>BenA</i>) for <i>Aspergillus</i> section <i>Cremeri</i> . Parameter of Kimura model (K2 + G), using distance data from the Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates (70% bootstrap values are represented), having <i>A. glaucus</i> as outgroup.....	66
Figure 3 -	Phylogenetic tree constructed based on data for partial sequences for the β -tubulin gene (<i>BenA</i>) for <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> . Parameter of Kimura model (K2 + G), using distance data from the Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates (70% bootstrap values are represented), having <i>A. muricatus</i> as outgroup.....	67

Figure 4 - Phylogenetic tree constructed based on data for partial sequences for the β -tubulin gene (BenA) for *Aspergillus* section *Circumdati*. Parameter of Kimura model (K2 + G), using distance data from the Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates (70% bootstrap values are represented), taking *A. robustus* as outgroup.....68

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 -	Selected isolates from the representative geographic region and morphology, previously grouped in the sections <i>Cremei</i> , <i>Circumdati</i> and <i>Flavi</i>	64
Table 2 -	Evaluation of the potential production of lipases and amylases by strains of <i>Aspergillus</i> section <i>Cremei</i>	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	CULTURA E COMERCIALIZAÇÃO DO <i>Allium sativum</i> L.	12
3.2	INCIDÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM ALHO (<i>Allium sativum</i>).....	14
3.3	ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Aspergillus</i>	17
3.3.1	Taxonomia de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	18
3.3.2	Taxonomia de <i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i>	21
3.3.3	Taxonomia de <i>Aspergillus</i> seção <i>Cremei</i>	22
3.4	ENZIMAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS	24
3.4.1	Produção de lipases por microrganismos	25
3.4.2	Produção de amilases por microrganismos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	INCIDÊNCIA E ISOLAMENTO DE <i>Aspergillus</i> SEÇÕES <i>Cremei</i> , <i>Circumdati</i> E <i>Flavi</i>	30
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	31
4.3	TRATAMENTO DO DNA GENÔMICO COM RNase	32
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO	32
4.5	ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Aspergillus</i> SEÇÕES <i>Cremei</i> , <i>Circumdati</i> E <i>Flavi</i>	32
4.6	ANÁLISE DE DADOS DO RAPD	33
4.7	AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE REGIÕES PARCIAIS DO GENE DA β -tubulina DE ISOLADOS SELECIONADOS DE <i>Aspergillus</i> SEÇÕES <i>Cremei</i> , <i>Circumdati</i> e <i>Flavi</i>	34
4.8	SEQUENCIAMENTO E PURIFICAÇÃO DE REGIÕES PARCIAIS DO GENE β -tubulina DE ISOLADOS	

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores consumidores de alho (*Allium sativum* L.) do mundo, seu uso como condimento representa uma prática habitual na culinária brasileira. De origem Asiática, o alho, destaca-se pelo aroma, sabor e propriedades medicinais, sendo considerado uma das horticulturas mais antigas do mundo. A produção desta especiaria no Brasil é realizada em duas safras anuais, sendo uma no Sul do país, com temperaturas mais baixas, nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, e outra no Cerrado, com temperaturas mais elevadas, nos 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 rústicas com menor valor comercial.

O consumo do alho normalmente ocorre em pequenas porções, principalmente, utilizado como condimento no preparo de alimentos, no entanto mesmo que consumido em pequenas quantidades, há um potencial fator de risco à saúde humana, visto a eventual infecção por microrganismos produtores de toxinas. Especiarias como o alho, normalmente tem contato com estes microrganismos durante a estocagem. Galpões úmidos e pouco ventilados propiciam o ambiente ideal para a multiplicação de espécies de fungos, como os do gênero *Aspergillus*, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.* Espécies do gênero *Aspergillus*, destacam-se pela alta incidência no alho, *A. niger* da seção *Nigri* e *A. flavus* da seção *Flavi* estão entre as espécies do gênero frequentemente descritas no alho.

Entre as espécies de *Aspergillus*, *A. flavus* se destaca, dado os frequentes relatos acerca da produção de micotoxinas por linhagens desta espécie. Estas micotoxinas, metabólitos secundários, quando ingeridas podem ocasionar uma série de efeitos prejudiciais a saúde e estão relacionadas principalmente a danos funcionais e estruturais ao fígado. Entre as micotoxinas relevantes do ponto de vista da saúde pública, estão as aflatoxinas (AFs) e ocratoxinas (OTs). Entre as aflatoxinas, a aflatoxina B1, é descrita como a mais tóxica e destaca-se pelas propriedades carcinogênicas. Já entre as ocratoxinas, destaca-se a ocratoxina A, relatada pelos efeitos imunossupressores, neurotóxicos e hepatotóxicos. Ambas (AFs) e (OTs), são sintetizadas principalmente por espécies de fungos do gênero *Aspergillus*. As etapas

de processamento e armazenamento do alho, estão entre os principais fatores envolvidos na contaminação e desenvolvimento destes microrganismos.

Além de abrigar espécies toxigênicas, algumas espécies de *Aspergillus* também apresentam alta aplicabilidade na indústria biotecnológica. Dentre as espécies de *Aspergillus*, *A. niger* destaca-se como potencial produtor de enzimas hidrolíticas como lipases e amilases com ampla aplicação industrial. Fungos deste gênero apresentam vantagens na produção de enzimas hidrolíticas, como fácil recuperação do produto, visto que são capazes de produzir enzimas extracelulares, o custo reduzido com matérias primas, dado a capacidade dos fungos em se desenvolver em variados substratos, e o alto rendimento apresentado por estas linhagens.

Tendo em vista os trabalhos que relatam a presença de espécies toxigênicas de *Aspergillus* em alho, pode-se concluir que o consumo de alho contaminado por estes microrganismos representa um potencial fator de risco a população brasileira, a qual utiliza esta especiaria diariamente na culinária. Desta forma, a identificação de espécies do gênero *Aspergillus* bem como a análise de incidência destas no alho, agregaria dados de grande importância acerca da situação atual de contaminação do alho brasileiro. Aliado a estas informações e ao fato de que algumas linhagens de *Aspergillus* são produtoras de enzimas como amilases e lipases, este estudo teve como objetivo verificar a incidência, isolar e identificar espécies de *Aspergillus* seções *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, presentes no alho coletado em diferentes estados brasileiros, avaliando a potencial produção de lipases e amilases pelas espécies não toxigênicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a incidência e isolar *Aspergillus* seções *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi* em alho comercializado, analisar a variabilidade genética e identificar as espécies de *Aspergillus* das referidas seções, além de verificar o potencial de produção de amilases e lipases.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Verificar a incidência e isolar *Aspergillus* seções *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, em amostras de alho comercializados no Brasil;
- Analisar a variabilidade genética e identificar os isolados de *Aspergillus* seções *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*;
- Verificar o potencial de produção de amilases e lipases nas espécies identificadas e descritas como não produtoras de micotoxinas.

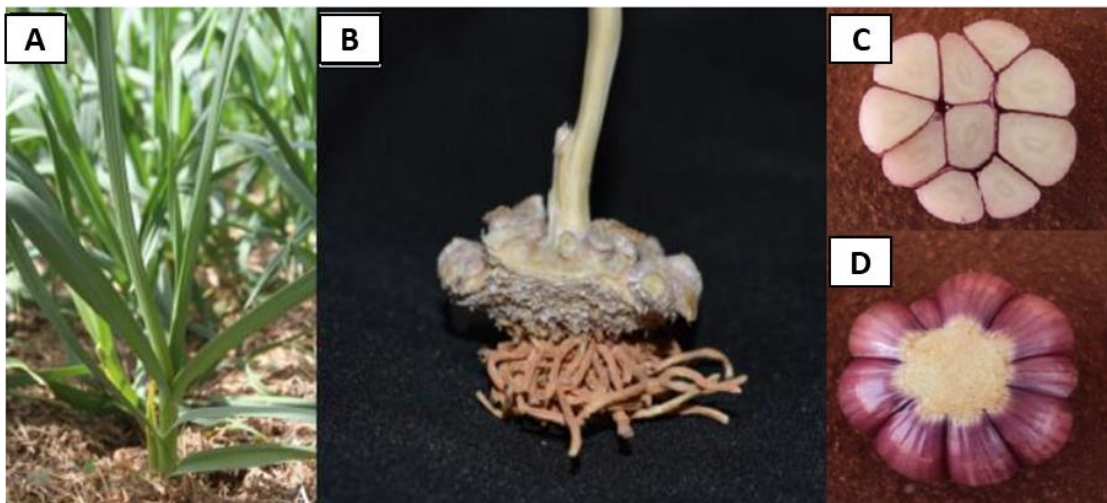
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CULTURA E COMERCIALIZAÇÃO DO *Allium sativum* L.

O alho (*Allium sativum*) vem sendo utilizado como condimento, agente aromatizante e para fins medicinais por mais de 5.000 anos. Conhecido como uma das horticulturas mais antigas do mundo, sua origem, foi inicialmente em regiões da Ásia Central e mais tarde seu cultivo se expandiu por todo o mar Mediterrâneo (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2017).

Da família Amaryllidaceae, o gênero *Allium*, abriga cerca de 750 espécies. Esta planta perene bulbosa, atinge de 0,40 a 0,70 m de altura, possui folhas lanceoladas e limbo medindo de 0,20 a 0,30 m de comprimento (Figura 1A). Seu pseudocaulé é formado pelas bainhas das folhas as quais estão implantadas em um pequeno caule com característica achatada (Figura 1B). As gemas do caule desenvolvem-se formando os bulbilhos, popularmente conhecido como “Dente do Alho” (Figura 1C), e o agregado de bulbilhos forma o bulbo, “Cabeça do alho” (Figura 1D). Estes bulbilhos se encontram ligados ao caule pela base e são recobertos por folhas as quais constituem a túnica, que pode ser de coloração branca, arroxeadada ou marrom. As raízes do tipo fasciculado e presentes na base do caule (Figura 1B), podem atingir de 40 a 82 cm de profundidade no solo. As folhas se desenvolvem na parte superior do caule podendo ser estreitas ou largas, lisas ou cerosas, e o escapo floral tem origem no centro do bulbo (BUSO et al., 2008; RESENDE et al., 2016)

Figura 1. Morfologia do alho. (A) Planta de alho com bainhas e pseudocaulé. (B) Caule verdadeiro. (C) Bulbilhos. (D) Bulbo



Fonte: Resende et al. (2016)

Sua aplicação com propósitos medicinais data de 1.500 A.C, quando os egípcios constataram seus benefícios para inúmeras doenças (LAMM; RIGGS, 2001). Dentre os benefícios farmacológicos apresentados pelo alho, pode-se destacar seu emprego no tratamento de doenças cardiovasculares, diminuição da pressão arterial, inibição de plaquetas e diminuição da atividade fibrinolítica. Além disso, pode ser empregado também como antioxidante, imunoestimulante, antifúngico, anti-histamínico, anticoagulante, expectorante, antibacteriano, antiparasitário, diaforético e diurético (RIVLIN, 2001; ADAKI et al., 2014).

Sabe-se que os principais fitoquímicos envolvidos nestas atividades farmacológicas, presentes no alho fresco, são compostos organossulfurados, oligoelementos e compostos fenólicos. Com base na solubilidade desses compostos, existem dois grupos, os solúveis em lipídeos tais como o dissulfureto de dialilo (DADS) e trissulfeto de dialilo (DATS), os compostos solúveis em água como o G-glutamil S-alilcisteína (SAC) e S-alilmercaptocisteína (SAMC) (THOMSON; ALI, 2003; BERGS et al., 2004). Além das propriedades fitoterápicas, o alho apresenta alto valor nutricional, com ampla composição de nutrientes (Quadro 1), vitaminas (B e C), antioxidantes, flavonoides e minerais (ferro, selênio, potássio, fósforo, cálcio) (NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, 2011).

Quadro 1. Composição nutricional do alho

Componente	Concentração em 100 gramas
Umidade	67,5%
Proteína	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	0,025 g
Manganês	0,00167 g
Fósforo	0,153 g
Ferro	0,0017g
Potássio	0,401 g
Selênio	0,0142 g
Zinco	0,00116 g
Tiamina	0,0002 g
Riboflavina	0,00011 g
Niacina	0,00070 g
Piridoxina	0,00124 g
Vitamina E	0,0001 g
Vitamina B	0,00123 g
Vitamina C	0,03123 g

Fonte: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (2011).

Esta cultura geralmente exige temperaturas em torno de 18 a 20 °C na fase inicial de cultivo, no período de bulbificação temperaturas entre (10 a 15 °C) e temperaturas um pouco mais elevadas (20 a 25 °C) durante a fase de maturação, além de baixas temperaturas é necessário um fotoperíodo longo para a formação do bulbo, com cerca de 13 horas diárias de luz (SOUZA; MACÊDO, 2009; RESENDE et al., 2016).

O Brasil possui duas safras de alho por ano, sendo a maior delas na região Sudeste no estado de Minas Gerais (48.139 toneladas em 2016), com início nos meses de março e abril, e término no final de julho a outubro. Seguido pelo Estado de Goiás (28.881 toneladas), Santa Catarina (26.016 toneladas) e Rio Grande do Sul (15.542 toneladas), onde a safra tem início em junho e julho, finalizando em dezembro e janeiro (CARVALHO; KIST, 2017).

No Brasil são comercializados dois tipos principais, o alho nobre contendo bulbos uniformes de coloração roxa intensa e poucos bulbilhos (menos de 20) sendo destinado ao mercado formal. O tipo semi-nobre, apresenta numerosos bulbilhos dispostos de maneira não organizada no bulbo que apresenta coloração mais clara e aparência menos atrativa quando comparado ao tipo nobre (LUCINI, 2008).

Segundo a associação nacional dos produtores de alho ANAPA (2018) a demanda por esta especiaria vem aumentando, o consumo nacional de alho no ano de 2017 foi de 285.000 toneladas. O consumo “per cápita” foi de 1,40 Kg/habitante/ano, um pouco menor que o consumo do ano anterior (2016) que foi de 1,50 Kg/habitante/ano (ANAPA, 2018).

3.2 INCIDÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM ALHO (*Allium sativum*)

O consumo do alho, bem como outros alimentos *in natura*, pode representar um fator de risco a saúde do consumidor, visto a eventual presença de microrganismos com potencial produção de toxinas, como os fungos (HAMMAMI et al., 2014; KŁĘBUKOWSKA; ZADERNOWSKA; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, 2015; SINGH; COTTY, 2017).

A contaminação e proliferação de microrganismos no alho e em outras especiarias, geralmente está associada ao manejo durante as etapas de colheita no campo, transporte e no decorrer do seu processamento e estocagem. 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. No entanto, a presença de microrganismos no alho acelera os processos de deterioração, com conseqüente redução na qualidade (MAZIERO; BERSOT, 2010; KONG et al., 2014).

No Brasil 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 (RESENDE et al., 2016). As condições Inadequadas de armazenamento como umidade, má ventilação e temperatura em que normalmente se encontram os galpões de armazenamento, constituem os principais fatores envolvidos na contaminação por fungos filamentosos (GERMANO; GERMANO, 1998; FURLANETO; MENDES, 2004).

Estudos relativos a fungos contaminantes de alimentos como o alho, cebola, pimenta do reino, gengibre, pimenta Chilli entre outras especiarias, apontam para maior incidência de contaminações por fungos do gênero *Aspergillus* pertencentes a seção *Nigri* e *Flavi* (GNONLONFIN et al., 2013; SHABAN, 2014; CAPCAROVA et al., 2016).

O gênero *Aspergillus* é descrito por abrigar uma série de espécies com potencial produção de micotoxinas. Estas toxinas são metabólitos secundários produzidas por algumas espécies fúngicas, sob condições ambientais favoráveis e substrato ideal. Sabe-se que as mesmas, quando ingeridas, apresentam uma gama de efeitos prejudiciais à saúde humana e animal (MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017). Entre as micotoxinas contaminantes de produtos agroindustriais, de maior impacto e relevância do ponto de vista da saúde pública, estão as aflatoxinas (AFs) e fumonisinas (FBs), destacando-se entre estas a aflatoxina B1 (AFB1) descrita como altamente carcinogênica e a fumonisina B₂ (FB₂) também relatada pelas propriedades carcinogênicas e envolvidas em uma série de distúrbios, como edema pulmonar, anomalias carnofaciais, entre outros (BENNETT; KLICH; MYCOTOXINS, 2003; AMARAL et al., 2006).

Na maioria dos estudos, o alho é pouco representado pelo fato dos mesmos contemplarem várias especiarias ou outros produtos alimentares (GNONLONFIN et al., 2013; TOMA; ABDULLA, 2013; SHABAN, 2014). Dentre os poucos trabalhos voltados à microbiota em alhos, está o estudo de Ghangaonkar (2013), que avaliou

amostras de bulbos de alho do campo e armazenadas em galpões na Índia. O autor identificou um total de 14 espécies fúngicas nas amostras de alho, dentre elas destacam-se *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina Phaseolina*, *Botrytis alli*, *Penicillium corymbiferum*, *Rhizopus stolonifer*, *Chaetomium globosum*. *A. niger* e *A. flavus* foram encontrados com 90% de frequência nas amostras de alho roxo armazenadas em galpões, no entanto, a presença de micotoxinas não foi avaliada.

Shaban (2014), também investigou a micobiota do alho exclusivamente, as amostras foram obtidas de pontos comerciais na China e Índia. As espécies fúngicas presentes com maior incidência foram *A. niger* (53%), *Botrytis allii* (47%) e *Fusarium* (34%).

Já Toma e Abdulla (2013), avaliaram a micobiota de outras especiarias além do alho, como noz-moscada, sementes de cominho, cravo, gengibre, pimenta do reino, tomilho, canela, hortelã e açafrão, coletadas no Iraque. Os autores evidenciaram a presença de fungos dos gêneros *Alternaria alternata*, *Aspergillus spp.*, *Gliocladium sp.*, *Hyalodendron diddeus*, *Memmoniella sp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Syncephalastrum sp.*, *Cladosporium lignicolum* e *Ulocladium botryti*. Sendo os gêneros com maior incidência *Aspergillus* e *Penicillium*. No alho, estiveram presentes as espécies *A. flavus* e *Penicillium spp.*

Gnonlonfin et al. (2013), avaliaram a micobiota em especiarias como gengibre, alho e pimenta do reino comercializadas na África e identificaram espécies do gênero *Aspergillus* como: *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. ustus* e *A. terreus*.

A presença de fungos do gênero *Aspergillus* no alho, também foi reportada pelos autores Fontenele et al. (2015), onde compararam a incidência de fungos em amostras de alho, oriundas de mercados públicos no estado do Piauí, com amostras importadas. Os dados apontaram para uma maior frequência de *Aspergillus* em amostras importadas, com cerca de 31,81 %, e nas amostras nacionais esta frequência de contaminação foi de 21,83%.

Oh et al. (2016), avaliaram a micobiota fúngica de alho fresco, coletado na Coreia. A presença do gênero *Aspergillus* foi predominante, com o uso de meios de cultura seletivos e metodologias moleculares, os autores relataram pela primeira vez *A. awamori* como fungo patogênico desta especiaria.

Dados como os supracitados sugerem a ampla disseminação de fungos deste gênero através de uma variedade de especiarias além do alho, fomentando estudos relativos a micobiota do alho.

3.3 ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspergillus*

Aspergillus são fungos filamentosos anamórficos e pertencentes à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes, e filo Ascomycota, caracterizando-se pela produção de fiálides e conídios em cadeia. O gênero apresenta conidióforo simples, usualmente aseptado, terminando em vesículas onde estão inseridas as fiálides, algumas espécies produzem esclerócios ou células de Hülle, além de poder apresentar telemorfos e se reproduzir sexuadamente (KLICH; PETERSON, 2003).

A morfologia de fungos deste gênero, é ampla, apresentando colônias de colorações variadas, principal característica utilizada pelos estudiosos, antes do emprego de técnicas moleculares, para identificação das espécies pertencentes a tal gênero. As colônias podem apresentar cores variadas como: verde, amarelo, cinza, preto, branco, marrom e laranja. A partir da similaridade de caracteres, espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, foram subdivididas em seções: *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Aspergillus*, *Restricti*, *Fumigati*, *Nidulans*, *Ochraceorosei*, *Jani*, *Ornati*, *Aenei*, *Cervini*, *Candidi*, *Terrei*, *Usti*, *Versicolores*, *Clavati*, *Flavipedes*, *Cremeri* e *Sparsi* (GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016). Estudos recentes como de Houbraken et al (2014) e Hubka et al., (2014) apresentaram 4 subgêneros principais: *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*, nos quais dividem-se as demais seções.

Apesar de ter sido descrito por Pietro Micheli, o gênero só foi validado em 1768, por Haller. Em 1832, Fries, placitou *Aspergillus glaucus* (L.) como o nome genérico deste gênero (VISAGIE et al., 2014a). Tom e Church em 1926, publicaram a primeira monografia sobre o gênero. Em 1965 Rapper e Fennel, realizaram uma ampla descrição acerca do gênero, com o reconhecimento de cerca de 132 espécies. De acordo com Pitt & Samson (1993), novas espécies entraram na lista, totalizando para 185 nomes de *Aspergillus* anamórficos e 72 teleomórficos, aceitos. Em 2000, Pitt et al., realizaram uma atualização nesta lista de espécies do gênero *Aspergillus*,

aceitando 184 *Aspergillus* e 70 nomes teleomórficos relacionados. Segundo Gautier, Normand e Ranque (2016), o gênero *Aspergillus* conta com 339 espécies válidas.

Os estudos taxonômicos acerca deste gênero, estão em um estado de constante evolução, com frequentes novas descobertas através de métodos polifásicos onde são empregadas um conjunto de técnicas avaliando aspectos como o perfil de metabólitos secundários, morfologia e perfil genético (VISAGIE et al., 2014a).

3.3.1 Taxonomia de *Aspergillus* seção *Flavi*

Visto a complexa taxonomia das espécies de *Aspergillus*, o gênero foi subdividido em seções, as quais apresentam espécies com características morfológicas, molecular e bioquímica, similares. Como a seção *Flavi* que abriga espécies caracterizadas pelas colônias em tons de amarelo esverdeado à marrom e esclerócio escuro. Esta seção contém algumas das espécies de maior importância no gênero, com alta relevância para a saúde, alimentos e indústria biotecnológica (FRISVAD et al., 2018).

Figura 2. Morfologia de *Aspergillus* seção *Flavi*



Fonte: O autor, 2018.

A taxonomia da seção *Flavi*, está em constante atualização, a seção conta com 33 espécies (FRISVAD et al., 2018), havendo relatos frequentes de novas espécies como *A. novoparasiticus* (GONÇALVES et al., 2012), *A. mottae*, *A. transmontanensis*, *A. sergii* (SOARES et al., 2012), *A. bertholletius* (TANIWAKI et al., 2012), *A. hancockii* (PITT et al., 2017), e *A. korhogoensis* (CARVAJAL-CAMPOS et al., 2017).

Esta taxonomia tem sido esclarecida através de análises filogenéticas, como demonstrado por Frisvad et al. (2018), que baseados em sequências de porções dos

genes da *calmodulina* (*CaM*), *β-tubulina* (*BenA*) e espaço interno transcrito (ITS), identificaram 8 clados principais associados a seção *Flavi* (clados - grupos de espécies com características semelhantes dentro de uma seção), sendo eles: *A. alliaceus*, *A. avenaceus*, *A. bertholletius*, *A. coremiiformis*, *A. flavus*, *A. leporis*, *A. nomius* e *A. tamaritii*.

Entre os 8 clados principais associados a seção *Flavi*, o clado *A. flavus*, apresenta o maior número de espécies com um total de 15 espécies, deste total (5 espécies), foram identificadas pela primeira vez (*A. aflatoxiformans*, *A. austwickii*, *A. cerealis*, *A. pipericola*, *A. subflavus*). Já o clado *A. tamaritii* foi descrito por abrigar 4 espécies principais (*A. caelatus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudotamaritii* and *A. tamaritii*), enquanto o clado *A. alliaceus* abrigou as espécies *A. alliaceus*, *A. lanosus* e as duas novas espécies *A. neoalliaceus* e *A. vandermerwei* (FRISVAD et al., 2018).

A seção *Flavi*, ainda conta com inúmeras espécies descritas como potenciais produtoras de micotoxinas, que são metabólitos secundários tóxicos sintetizados sob condições ideais de temperatura, umidade e substrato (BARKAI-GOLAN, 2008; BENNETT, 2010). Entre as espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*, relatadas como potenciais produtoras de aflatoxinas B1 e B2, destacam-se: *A. flavus*, *A. aflatoxiformans*, *A. austwickii*, *A. cerealis*, *A. arachidicola*, *A. minisclerotigenes*, *A. mottae*, *A. luteovirescens*, *A. nomius*, *A. novoparasiticus*, *A. parasiticus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. sergii* e *A. transmontanensis*. Três das quatro espécies do clado *A. alliaceus*, também são descritas como produtoras da micotoxina ocratoxina A, são elas: *A. neoalliaceus*, *A. vandermerwei* e *A. alliaceus*. Apesar do potencial toxigênico apresentado por grande parte das espécies agrupadas a esta seção, as formas domesticadas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, *A. oryzae* e *A. sojae*, respectivamente, perderam a capacidade de produzir aflatoxinas, e possuem aplicações na indústria. Entre as demais espécies filogeneticamente relacionadas (pertencentes aos clados *A. flavus*-, *A. tamaritii*-, *A. bertholletius*- e *A. nomius*-), apenas *A. caelatus*, *A. subflavus* e *A. tamaritii*, não produzem aflatoxinas (FRISVAD et al., 2018).

Em relação as aflatoxinas de maior relevância, sintetizadas por fungos desta seção, destaca-se a aflatoxina B1 (AFB1), descrita por suas propriedades carcinogênicas e relatada como a mais tóxica entre os metabólitos secundários, produzida principalmente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*. Entre os efeitos colaterais, ocasionados pela ingestão de alimentos contaminados por esta toxina,

estão danos funcionais e estruturais no fígado, incluindo hemorragias, necrose celular, lesões, fibrose e cirrose (EATON et al., 1993; MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017; FRISVAD et al., 2018).

Dentre os poucos relatos a cerca da infecção do alho por espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi*, potenciais produtoras de aflatoxinas, estão os trabalhos de Toma e Abdulla (2013), Gnonlonfin et al. (2013) e Ghangaonkar (2013). Ambos os autores identificaram a espécie *A. flavus* em amostras de alho comercializadas e/ou mantidas em galpões de armazenamento. O estudo de Toma e Abdulla (2013), foi o único que avaliou a concentração de aflatoxinas em amostras de alho infectadas por *A. flavus*, os isolados foram positivos para produção da toxina e constatou-se 1.4 (ppb) de aflatoxinas nas amostras de alho desidratadas. Já Gnonlonfin et al. (2013), avaliaram a produção de aflatoxinas por meio de análise qualitativa, verificando a presença dos genes (*afID*, *afIO*, *afIP*, *afIQ*, *afIR*) do cluster envolvido na síntese de aflatoxinas e os isolados de *A. flavus* foram positivos para presença dos genes. Ghangaonkar (2013), relatou isolados de *A. flavus* com frequência de 90% em amostras de alho roxo armazenadas em galpões, no entanto a presença de micotoxinas não foi avaliada.

Além da produção de agentes toxigênicos, algumas espécies desta seção, são relatadas como fitopatógenos, relacionadas a doenças como podridão da orelha (milho) e mofo amarelo (amendoim), entre as principais espécies fitopatogênicas da seção *Flavi*, estão: *A. parasiticus* e *A. flavus* (AMAIKE; KELLER, 2011).

Em contraste a produção de toxinas e ao potencial patogênico, algumas linhagens da espécie domesticada de *A. flavus*, *A. oryzae*, são utilizadas para produção de enzimas, incluindo a lactase, lipase, protease e xilanase, e ácidos orgânicos como ácido kójico e ácido málico (PARIZA; JOHNSON, 2001; YANG; LÜBECK; LÜBECK, 2017). Das e colaboradores (2017), também empregam linhagens de *A. tamarii* seção *Flavi*, para produção de lipases.

Estudos apontam uma grande dificuldade na identificação das diversas espécies relacionadas a seção *Flavi*, havendo conflitos nas identificações quando baseadas somente em características morfológicas, Godet e Munaut (2010), por sua vez, apresentam uma estratégia de identificação molecular de seis passos, usando análises em PCR em tempo real, padrões de RAPD e perfis de restrição do DNA genômico com a enzima *SmaI*, baseado nos genes *afIT*, *afIR*, regiões do rDNA ITS e gene da *calmodulina*. Essa estratégia proporcionou identificar nove de onze espécies

de *Aspergillus* da seção *Flavi*, entre elas *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. nomius*, *A. arachidicola* e *A. parvisclerotigenus*, no entanto os autores Godet e Munaut (2010) e Amaike e Keller (2011), reconhecem que a composição das espécies membro da seção *Flavi* ainda é taxonomicamente variável.

3.3.2 Taxonomia de *Aspergillus* seção *Circumdati*

Já as espécies de *Aspergillus* seção *Circumdati*, podem ser tanto anamórficas quanto telemórficas. Fungos desta seção incluem espécies com conídios bisseriados e se caracterizam por produzir colônias de coloração amarelada a marrom, podendo ser encontrados no solo, alimentos estocados ou no campo em culturas de importância econômica (FRISVAD; FRANK; HOUBRAKEN, 2004; VISAGIE et al., 2014b).

Figura 3. Morfologia de *Aspergillus* seção *Circumdati*



Fonte: O autor, 2018.

A seção *Circumdati*, inclui espécies amplamente descritas como potenciais produtoras de micotoxinas. Entre as toxinas produzidas por fungos desta seção, destacam-se as ocratoxinas, grupo de metabólitos secundários tóxicos composto por 3 classes (A, B, C), dos quais a ocratoxina A (OTA) é a mais tóxica e apresenta efeitos imunossupressores, neurotóxicos e hepatotóxicos (FRISVAD; FRANK; HOUBRAKEN, 2004; GIL-SERNA et al., 2011). Entre as espécies fúngicas produtoras de (OTA) pode-se destacar as abrigadas pela seção *Circumdati* como (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae* e *A. elegans*). Visagie e colaboradores (2014), ressaltam três espécies *A. ochraceus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae*, reportadas pelos autores como as principais produtoras de (OTA).

Como apresentado por Gil Serna et al. (2011), os autores avaliaram a produção de (OTA) por linhagens de *A. steynii*, *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*, ambas as linhagens foram positivas para produção da toxina.

Já Visagie et al. (2014), em um estudo mais aprofundado, avaliaram a taxonomia da seção *Circumdati*. A partir dos dados do perfil de metabólitos produzidos, sequencias parciais dos genes da calmodulina, β -tubulina e regiões ITS do DNA ribossomal, foram identificadas 7 novas espécies: *A. occultus*, *A. pallidofulvus*, *A. pulvericola*, *A. salwaensis*, *A. sesamicola*, *A. subramanianii* e *A. westlandensis*. Tendo esta seção 27 espécies aceitas, são elas: *A. affinis*, *A. auricomus*, *A. bridgeri*, *A. cretenses*, *A. elegans*, *A. fresenii*, *A. insulicola*, *A. melleus*, *A. muricatus*, *A. neobridgeri*, *A. occultus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. pallidofulvus*, *A. persii*, *A. pseudoelegans*, *A. pulvericola*, *A. robustus*, *A. roseoglobulosus*, *A. salwaensis*, *A. sclerotiorum*, *A. sesamicola*, *A. steynii*, *A. subramanianii*, *A. tanneri* e *A. westerdijkiae*. Das 27 espécies submetidas aos testes para produção de ocratoxina, 13 (*A. affinis*, *A. cretensis*, *A. fresenii*, *A. muricatus*, *A. occultus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. ochraceus*, *A. pseudoelegans*, *A. pulvericola*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae*) foram positivas para alta produção desta toxina.

Além disso, espécies desta seção, também estão relacionadas a uma variedade de doenças, *A. ochraceus* e *A. sclerotiorum* por exemplo, são descritos como causadores de onicomicose (GARCIA-MARTOS et al., 2001), aspergilose broncopulmonar (PEIXINHO et al., 2003), otomicose (BARATI et al., 2011) e antropomicose (KEEHN et al., 2007). Espécies como *A. sclerotiorum*, *A. ochraceus*, *A. melleus* e *A. persii*, também já foram relatadas como causadoras de infecções nasais (ZOTTI et al., 2010).

Neste sentido, além do potencial toxigênico e patogênico apresentado por algumas espécies, a seção *Circumdati* também conta com linhagens relatadas pela produção de enzimas hidrolíticas, como proteases, produzidas por linhagens de *A. sclerotiorum* e *A. melleus* (LUISETTI et al., 1991). *A. ochraceus* e *A. melleus*, também já foram descritas pela síntese de aspirona, metabólito com atividade nematicida, antimicrobiana e propriedades antibióticas fracas de largo espectro (SUGIYAMA et al., 1995; KIMURA; NAKAHARA; FUJIOKA, 1996)

3.3.3 Taxonomia de *Aspergillus* seção *Cremeri*

Quanto as espécies de *Aspergillus*, alocadas junto a seção *Cremeri*, apresentam conídios bisseriados, com colônias de coloração marrom escuro a amarelo e conidióforos longos. Em alguns casos há grande quantidade de micélio produzido em relação aos conídios, característica apresentada pela espécie *A. wentii*. Espécies desta seção são geralmente encontradas no solo, em alimentos como cereais, uvas e nozes, encontradas com pouca frequência em ambientes internos e raramente são descritas como agentes etiológicos (RAPER; FENNEL, 1965; PETERSON, 1995; RAINER; PEINTNER; PÖDER, 2001; DÍAZ et al., 2009; HUBKA et al., 2016).

Figura 4. Morfologia de *Aspergillus* seção *Cremeri*



Fonte: O autor, 2018.

A seção *Cremeri* aparenta como um todo ser filogeneticamente bem definida, no entanto, sua posição dentro do gênero *Aspergillus* continua controversa. O grupo de espécies *A. cremeus*, descrito por Raper & Fennel (1965), incluem espécies com colônias em tons de amarelo a marrom, características as quais foram associadas a seção *Cremeri* posteriormente. Peterson (1995) investigou a seção *Cremeri* em detalhes, transferindo com base em análises moleculares cerca de 9 espécies para a seção *Cremeri*, entre elas estão *A. wentii* (da seção *Wentii*); *A. dimorphicus* (da seção *Circumdati*) e *A. gorakhpurensis*, *A. pulvinus* (da seção *Versicolores*).

Anos depois, Varga e colaboradores (2000) também transferiram a espécie de *A. sepultus* para esta seção. Peterson (2008), verificou que a espécie de *A. brunneouniseriatus* (alocado a seção *Ornati*) também pertencia a seção *Cremeri*. Houbraken e Samson (2011), constataram através de análises filogenéticas que a espécie *Cristaspora arxii*, se encontra em clado, juntamente com as espécies da seção *Cremeri* (*A. pulvinus*, *A. wentii*, *A. brunneouniseriatus*).

Com o decorrer dos anos e através de um conjunto de estudos filogenéticos, as espécies *A. tardus* e *A. arxii* (*Cristaspora arxii*), foram transferidas para a seção *Cremeri* (PETERSON, 2008; HOUBRAKEN; SAMSON, 2011; SAMSON et al., 2014). Além da transferência da espécies do gênero *Cristaspora* para a seção *Cremeri*, Houbraken e Samson (2011), demonstram que espécies dos gêneros *Polypaecilum* e *Phialosimplex* estão relacionadas geneticamente com membros da seção *Cremeri* como *A. wentii*, sendo esses gêneros (*Polypaecilum* e *Phialosimplex*) sinônimos do conceito clássico de *Aspergillus*.

Além disto, espécies alocadas ao gênero *Chaetosartorya*, são associadas a espécies de *Aspergillus* seção *Cremeri*. Dentre as espécies abrigadas pelo gênero *Chaetosartorya* que foram transferidas para o gênero *Aspergillus* seção *Cremeri*, estão: *Aspergillus chrysellus* (*Chaetosartorya chrysellata*); *Aspergillus cremeus* (*Chaetosartorya cremeria*) e *Aspergillus stromatoides* (*Chaetosartorya stromatoides*) (PETERSON, 2008; HOUBRAKEN; SAMSON, 2011; SAMSON et al., 2014). A seção *Cremeri* ainda conta com a espécie *A. inflatus*, previamente descrita como *Penicillium inflatum*, que baseado em caracteres filogenéticos e perfil quimiotaxonômico, também foi transferida para o gênero *Aspergillus* seção *Cremeri*, totalizando 13 espécies a seção (GAMS, W., CHRISTENSEN, M., ONIONS, A. H. S., PITT, J. I. & SAMSON, 1985; SAMSON et al., 2014).

Entre as espécies descritas na seção *Cremeri*, *A. wentii* se destaca, pela potencial produção de enzimas (β -glucosidade, amilases, pectinases) e ácidos orgânicos (ácido málico, ácido glucônico), utilizadas na indústria alimentícia e na fermentação de alimentos de origem asiática como substrato koji (BENNETT; KLICH, 1992; SHURTLEFF; AOYAGI, 2012; HUBKA et al., 2016). Segundo Hubka et al. (2016), as espécies de *A. wentii*, *A. dimorphicus* e *A. chrysellus*, estão intimamente relacionados a espécie recentemente descrita *A. europaeus*, caracterizada por Du e colaboradores (2018) como produtora de uma variedade de policetídeos, metabólitos secundários com diversas atividades biológicas e propriedades farmacológicas. Com relação a produção de micotoxinas, a seção abriga poucos representantes, entre as espécies descritas como toxigênicas estão *A. inflatus* e *A. tardus*, produtores de esterigmatocistina (RANK et al., 2011); *A. wentii* e *A. stromatoides* produtores de emodina (GONZÁLEZ-ANDRADE et al., 2013) e *A. inflatus* produtor de patulina (VISAGIE et al., 2014a).

3.4 ENZIMAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores para o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado e com menor agressão ao meio ambiente. Estas enzimas possuem ampla aplicação na indústria biotecnológica, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana. As enzimas de origem microbiana, apresentam algumas vantagens como aplicação industrial, pois são facilmente manipuladas, possuem alto rendimento e especificidade, sendo produzidas em larga escala (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

De acordo com Kumar et al. (2014), o valor global de mercado estimado para enzimas industriais aumentou substancialmente para um valor atual de US\$ 5,1 bilhões, valor superior ao apresentado em 2012 de US\$ 4,0 bilhões. O autor afirma que de acordo com pesquisas de mercado a demanda global por enzimas está prevista para crescer à taxa de 6,9%, com previsões da valorização do mercado de US \$ 5,1 bilhões para US \$ 11,3 bilhões entre 2010 - 2020. A produção de enzimas tem sido relativamente concentrada em poucos países desenvolvidos, como Dinamarca, Suíça, Alemanha, Holanda e EUA. As empresas Novozymes e Danisco representam cerca de 70% do total de enzimas no mercado (KUMAR et al., 2014).

As enzimas hidrolíticas se destacam do ponto de vista industrial, entre elas estão: as proteases utilizadas na indústria alimentícia, produção de detergentes e no tratamento de resíduos industriais (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004), as amilases aplicadas em indústrias têxteis, na produção de bebidas destiladas e cerveja (TANG; LI, 2016), as pectinases aplicadas na indústria de vinhos e processamento de sucos de frutas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; PANDEY et al., 2000), as celulases, aplicadas em diversos setores, dentre eles, produção de ração para animais e na produção de biocombustíveis (MONTEIRO, 2012), e por fim, as lipases, amplamente utilizada na indústria alimentícia, de detergentes, farmacêuticos e cosméticos, sendo produzidas principalmente por fungos filamentosos (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; KUMAR et al., 2014).

Entre as principais enzimas comercialmente disponíveis estão as amilases, proteases, lipases, celulases, xilanases e catalases. Dentre estas enzimas as α -amilases, proteases e lipases são as mais versáteis no setor de enzimas industriais, devido à abundância de substrato, matéria-prima e variedade de aplicações (KUMAR et al., 2014).

A produção de enzimas hidrolíticas de interesse comercial, vem sendo manifestada por uma ampla variedade de espécies fúngicas. Os fungos se destacam entre os microrganismos produtores de enzimas, já que são capazes de produzir enzimas extracelulares, o que facilita o processo de recuperação do produto. Dentre os fungos, descritos pela produção de enzimas, destacam-se algumas linhagens de espécies abrigadas pelo gênero *Aspergillus* como *Aspergillus niger* (utilizado para a produção de amilases, lipases, fitases, proteases, xilanases, entre outras), *A. oryzae* e *A. tamarii* (lipases), *A. wentii* (Celulase e β -Glucosidase), entre outros (BENNETT, 2010; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; KANDARI et al., 2013).

3.4.1 Produção de lipases por microrganismos

As enzimas lipolíticas, lipases (glicerol ester hidrolases, E.C. 3.1.1.3), e esterases, constituem um grupo de enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise e síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. São de grande importância fisiológica e biotecnológica, uma vez que hidrolisam óleos e gorduras em ácidos graxos livres, os quais são essenciais aos processos metabólicos (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; DOBREV et al., 2015).

Os microrganismos produtores destas enzimas, estão amplamente distribuídos e atuam sob uma variedade de substratos como resíduos de óleos vegetais, laticínios, resíduos industriais, solos contaminados com óleos, sementes e alimentos deteriorados. Estas enzimas apresentam grande importância econômica, com ampla aplicabilidade na indústria (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; REIS et al., 2009).

A capacidade de realizar biotransformação, apresentada pelas lipases, torna sua aplicação frequente nos diversos setores industriais, como na indústria alimentícia, no tratamento de água, de detergentes, do couro, oleoquímica, farmacêuticos e cosméticos. Seu elevado potencial de aplicação se deve a capacidade das lipases em catalisar reações tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico, onde o teor de água é restrito (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; REIS et al., 2009). As lipases são responsáveis por cerca de 10% do mercado global de enzimas, e estão em terceiro lugar entre o grupo de enzimas mais vendidas no mundo, atrás das proteases e celulases (TACIN et al., 2018).

Dentre as vantagens do uso de microrganismos para produção em larga escala, pode-se destacar o alto rendimento, estabilidade e seletividade ao substrato (GUPTA et al., 2015).

Assim, o estudo de novas lipases, a partir da seleção de microrganismos com características desejáveis, pode guiar promissoras perspectivas científicas e comerciais. Os fungos destacam-se entre os produtores desta classe de enzimas, uma das principais vantagens apresentada pelos fungos, é a capacidade em produzir enzimas extracelulares, visto que 90 % da biocatálise é feita a partir da fermentação submersa (FS), o que facilita as etapas posteriores de recuperação do produto, barateando o custo de produção (CONTESINI et al., 2010). As lipases produzidas por fungos, além de termoestáveis, atuam em faixas mais amplas de pH quando comparado a lipases de outras fontes (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Algumas das principais espécies de fungos produtores de lipases, se encontram abrigadas pelos respectivos gêneros: *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.* e *Rhizomucor sp.*, sendo que nos gêneros *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.* e *Aspergillus sp.*, destacam-se as espécies *Mucor pusillus*, *Rhizopus homothallicus* e *Aspergillus terreus*, conhecidos pela produção de lipases extracelulares (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; DOBREV et al., 2015).

Entre os estudos avaliando a produção destas enzimas por espécies do gênero *Aspergillus*, Das et al. (2016, 2017), reportaram a produção de lipases pela espécie *A. tamarii* da seção *Flavi*, em meio líquido suplementado com óleo de coco e azeite de oliva, demonstrando o potencial lipolítico de fungos deste gênero em uma variedade de substratos.

Quanto ao potencial lipolítico para espécies de *Aspergillus* seção *Cremeri*, Chander et al. (1980), constataram que pode-se atingir a máxima produção de lipases pela suplementação do substrato com micronutrientes. O uso de cálcio e citrato de sódio (0,1%) resultou em um incremento do rendimento das enzimas.

Linhagens da seção *Flavi* como *A. oryzae*, também se mostraram hábil na produção de lipases sob fermentação submersa, segundo os autores o uso de óleo de soja incrementou a produção da enzima (OHNISHI; YOSHIDA; SEKIGUCHI, 1994)

Neste sentido, o potencial lipolítico apresentado por algumas espécies de *Aspergillus*, aliado à necessidade de inserção comercial de linhagens que sejam boas produtoras de lipases, fomentam estudos de identificação e avaliação do potencial lipolítico de novas espécies.

3.4.2 Produção de amilases por microrganismos

As amilases são enzimas hidrolíticas capazes de romper ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 do amido, resultando em diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (GUPTA et al., 2003; PANDEY, 2005).

O primeiro relato de enzimas capazes de degradar amido foi feito em 1811 por Kirchoff, seguido de uma série de relatos de enzimas digestivas. Mais tarde, em 1930, Ohlsson classificou este tipo de enzima de acordo com o tipo de açúcar liberado durante a reação de hidrólise de amido no malte, classificando estes grupos de enzimas como α -amilase e β -amilases (GUPTA et al., 2003).

De acordo com Gupta et al. (2003), os dois grupos ainda podem ser divididos em endoamilases e exoamilases. As endoamilases quebram o amido no interior de sua molécula de forma aleatória, rompendo as ligações glicosídicas α -1,4, das cadeias de amilose ou amilopectina, gerando ramos lineares de oligossacarídeos de vários comprimentos. Já as exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1, 4, nas unidades das extremidades não redutoras do substrato como a β -amilase (E.C. 3.2.1.2), ou ambas as ligações α -1,4 e α -1,6, como a amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3) e a glicosidase (E.C. 3.2.1.20). Outros exemplos de exoamilases são a ciclodextrina glicosiltransferase (E.C. 2.4.1.19) e a α -amilase maltogênica (glicano 1,4- α -glicanohidrolase, E.C. 3.2.1.133) (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Estas enzimas se encontram amplamente distribuídas e podem ser produzidas por plantas, animais e microrganismos. Tendo ampla aplicabilidade na indústria, as amilases podem ser empregadas na produção de bebidas destiladas e cerveja, panificação, alimentos para bebês, indústria têxtil, ração animal, indústria química e farmacêutica (GUPTA et al., 2003; MALAJOVICH, 2016).

A produção de amilases em larga escala, geralmente é feita a partir de microrganismos, que apresentam vantagens como maior rendimento, variedade na fonte de carbono utilizada e facilidade para na manipulação e recuperação do produto (GUPTA et al., 2003).

Segundo Pandey (2005), as espécies de microrganismos mais utilizadas para produção de amilase são os fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*. Espécies como *A. niger*, *A. oryzae* e *A. awamori*, são descritas como produtoras de α -amilase,

enquanto algumas espécies de *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. saitri*, *A. terreus* e *A. foetidus*, são utilizadas para a produção de amiloglucosidase.

A produção de amilases por microrganismos geralmente é conduzida sob fermentação em estado sólido, visto o preço elevado de meios de cultura líquido e a ampla disponibilidade de resíduos amiláceos pelas agroindústrias. Além da fonte de carbono, parâmetros físico-químicos e nutricionais, como pH, temperatura, concentração de oxigênio, agitação, fonte de nitrogênio (orgânico e/ou inorgânico), afetam diretamente o rendimento de produção destas enzimas (MONTEIRO DE SOUZA, 2010).

A produção de amilases por espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* é amplamente reportada na literatura (HUNTER; JIN; KELLY, 2011; KHAN; YADAV, 2011; SUGANTHI et al., 2011; SETHI et al., 2016). Suganthi et al. (2011) apontam em seu estudo que isolados *A. niger* são bons produtores da enzima, utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato.

Sethi e colaboradores (2016), também descrevem isolados do gênero *Aspergillus* como bons produtores da enzima, os autores investigaram a produção de amilases pela espécie *A. terreus* utilizando uma ampla variedade de substratos.

Da mesma forma, Khan e Yadav (2011) também trabalharam com um isolado de *A. niger*, que foi avaliado quanto a produção de α -amilase sob fermentação em estado sólido, o meio suplementando com vários substratos (resíduos vegetais, casca de arroz e casca de banana) mostrou-se adequado para a produção da enzima.

A expansão do mercado de enzimas, os frequentes relatos de novas espécies do gênero *Aspergillus* com alto potencial para a produção de enzimas variadas e a busca por substratos alternativos, com custo reduzido, tem estimulado pesquisas no emprego efetivo de diferentes resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, bagaço de cana, palha de centeio, palha de trigo, bolos de óleo, folhas de sabugo entre outros, para a biossíntese de amilases (KRISHNA, 2008; SETHI et al., 2016)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INCIDÊNCIA E ISOLAMENTO DE *Aspergillus* SEÇÕES *Cremeri*, *Circumdati* E *Flavi*

A incidência e isolamento de *Aspergillus* seções *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, foi feita a partir de 36 amostras de alho coletadas em mercados e feiras livres 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 coletadas foram imediatamente transportadas para análise à temperatura ambiente.

Para tanto, as 36 amostras, aproximadamente 250 gramas de alho (bulbos, bulbilhos e raízes) foram desinfetados superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio a 0,4% durante 1 minuto, e 50 bulbilhos com aparência saudável (dos 12 estados brasileiros) foram distribuídos sob placas de Petri contendo meio Dicloram 18% - DG18 (10 g de glicose, 5 g de peptona, 1 g de KH_2PO_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 dicloram, 100 mg de clorafenicol, 1 L de água destilada) e incubados por 10 dias a 28 °C (PITT; HOCKING, 2009).

Após o período de incubação os isolados identificados morfológicamente como *Aspergillus* e com coloração característica das seções *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, foram contados como Unidade Formadora de Colônias (UFC) e UFCs representativas foram isoladas em meio Czapek Yeast Extract Agar - CYA [1 g de K_2HPO_4 , 10 mL de concentrado de Czapek (30 g de 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 metais (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 sacarose, 1 L de água destilada] e incubadas a 28 °C durante 7 dias (PITT; HOCKING, 2009). Com base em critérios morfológicos e representatividade da amostra, foram selecionados isolados (44 isolados) para identificação das espécies (Tab.1)

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Amostras de DNA genômico foram obtidas como descrito por Azevedo et al. (2000). Inicialmente, os isolados monospóricos foram incubados em ágar de extrato de malte - MEA (extrato de malte 20 g; peptona 1 g; glicose 20 g; 15 g ágar; H₂O destilada 1 L) durante 7 dias a 28 °C. Após este período e com o objetivo de obter o micélio dos isolados para a extração, aproximadamente 10⁷ conídios das colônias monospóricas, foram suspensos em solução com (0,750 mL) – Água ultrapura e (0,250 mL) - Tween 80, contados em câmara de Neubauer e transferidos para um Erlenmeyer contendo 60 mL de meio líquido MEA (extrato de malte 20 g; peptona 1 g; glicose 20 g; H₂O destilada 1L), sendo incubado a 28 °C por 7 dias a 180 rpm em Shaker ct-720 (Cientec®). Em seguida, o micélio foi coletado por filtração a vácuo. O micélio obtido foi então macerado com o uso de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Aproximadamente 0,5 g do micélio foi transferido para um microtubo (2 mL), com adição imediata de 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 e incubados em banho Maria a 65 °C durante 20 minutos com homogeneização a cada 5 minutos. Após este período, adicionou-se 800 µL de fenol (Invitrogen®), seguido de homogeneização por inversão do tubo e centrifugação *NanoSpinPlus* (Loccus®) a 12.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa (superior) foi transferida para outro microtubo de 2 mL e foram adicionados 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, com adição de 800 µL de clorofórmio (Merck®) e álcool isoamílico (Vetec®), na proporção 24:1, respectivamente, seguida da homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. À fase aquosa resultante, adicionou-se 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 500 µL de etanol 70 % seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Após a secagem a temperatura ambiente, o microtubo contendo o *pellet* foi ressuscitado em

aproximadamente 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.

4.3 TRATAMENTO DO DNA GENÔMICO COM RNASE

Após extração, o DNA genômico total, foi purificado com o uso de enzimas RNases. Para tanto, 50 µL do volume total de DNA extraído foram transferidos para um novo microtubo (2 mL), adicionou-se 2,5 µL de RNase 20 mg/mL (Invitrogen®) e 50 µL de água ultrapura, sendo homogeneizado e incubado em banho Maria a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação 0,1 volumes de NaCl 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto (gelado) foram adicionados ao microtubo, permanecendo durante 15 minutos a -4 °C. Após este período o DNA foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante obtido após a centrifugação foi descartado, 100 µL de álcool 70% foram adicionados ao *pellet*, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, sendo esta última etapa repetida duas vezes. O sobrenadante novamente foi descartado e o pellet seco a temperatura ambiente, em seguida o pellet foi ressuspenso em 50 µL de água ultrapura e armazenado em freezer a -20 °C.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A quantificação do DNA genômico foi realizada através da leitura em espectrofotômetro UV/Vis Biodrop µLite (Biochrom®) nos comprimentos de onda 260/280 nm. Além disso, foi feita a quantificação por eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v), com tampão SuperBuffer 50x (NaOH 8 g; H₃BO₃ 45 g; H₂O destilada 400 mL; pH 8), diluído 1x. Como DNA padrão utilizou-se o DNA do fago lambda com as concentrações de 50 a 200 ng/µL. Após a quantificação, todos os DNAs foram diluídos a uma concentração padrão de 5 ng/µL para uso nas demais etapas.

4.5 ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Aspergillus* SEÇÕES *Cremeri*, *Circumdati* E *Flavi*

A análise da variabilidade genética dos isolados morfológicamente identificados como *Aspergillus* seção *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, foi realizada pela técnica de RAPD

(*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990) utilizando-se *primers* com sequencia arbitrárias de 10 a 12 nucleotídeos (Operon, Technologies, CA). As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 25 μ L composto por: 2,5 μ L de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl 10x concentrado), 2,5 μ L de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 2,5 μ L de *primers* de sequência arbitrária 10 nucleotídeos (OPX7 e OPX13) (Operon Technologies, CA – 2,5 μ M), 7,5 μ L de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 10 mM), 0,1 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, USA – 5 U/ μ L), 2 μ L da amostra de DNA (5 ng/ μ L) e 7,9 μ 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 PTC-100® Thermal Cycler (MJ Research, USA) 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), com tampão de corrida SuperBuffer 50x (NaOH 8 g; H₃BO₃ 45 g; H₂O destilada 400 mL), diluído 1x. Fotografado utilizando transiluminador UV e Sistema de Imagem Digital, Alpha Imager MINI (Cell Biosciences ®).

4.6 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 44 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.

4.7 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE REGIÕES PARCIAIS DO GENE DA β -tubulina DE ISOLADOS SELECIONADOS DE *Aspergillus* SEÇÕES *Cremei*, *Circumdati* e *Flavi*

As amostras de DNA dos isolados representativos, selecionados a partir dos grupos formados na análise de variabilidade genética, foram submetidas a amplificação de regiões parciais do gene da β -tubulina, a fim de identificar a qual espécie o isolado pertence. Para tanto, foram utilizados os *primers* *Bt2a* (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e *Bt2b* (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') (GLASS; DONALDSON, 1995). A reação foi preparada em um volume final de 25 μ L composto por: 2,5 μ L de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM; Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl 10x concentrado), 2,5 μ L de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 1 μ L de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA – 10 pmol/ μ L), 1 μ L de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 50 mM), 0,1 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA – 5 U/ μ L), 2 μ L da amostra de DNA (5 ng/ μ L) e 14,9 μ L de água ultrapura. Uma reação controle foi realizado a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura. A reação foi submetida a um termociclador PTC-100® Thermal Cycler (MJ Research, USA), 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 60 °C 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 através de eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v), corados com brometo de etídio e fotografados utilizando transiluminador UV e Sistema de Imagem Digital, Alpha Imager MINI (Cell Biosciences ®).

Os produtos obtidos após amplificação, foram purificados para posterior sequenciamento. Para tanto, cerca de 20 μ L do produto da PCR, foram transferidos para um novo microtubo (1,5 mL), seguido da adição de 0,1 volume (2 μ L) de acetato de amônio 7,5 M e 3 volumes (60 μ L) de álcool absoluto os quais foram homogeneizados e incubados em temperatura ambiente por 20 minutos. Após o período de incubação a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos à 4 °C, descartando o sobrenadante e adicionando 100 μ L de álcool 70% (gelado), centrifugando novamente por 10 minutos a 12.000 rpm, 4 °C. Nesta etapa o sobrenadante foi retirado. O procedimento de adição dos 100 μ L de álcool 70% (gelado), centrifugação a 12.000 rpm foi repetido por duas vezes. O pellet formado foi

seco em estufa a 37 °C por 15 minutos e 10 µL de água ultrapura foram adicionados e homogeneizados junto ao pellet. A amostra, foi quantificada em espectrofotômetro UV/Vis Biodrop µLite (Biochrom®) e em gel de agarose 1,0 % (p/v).

4.8 SEQUENCIAMENTO E PURIFICAÇÃO DE REGIÕES PARCIAIS DO GENE *β-tubulina* DE ISOLADOS SELECIONADOS DE *Aspergillus* SEÇÕES *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*

Os produtos de PCR foram sequenciados com base no método de Sanger et al. (1977), utilizando-se os mesmos pares de *primers* descritos previamente para a obtenção dos respectivos fragmentos. As reações de sequenciamento foram preparadas em um volume final de 10 µL sendo composta por: 1 µL de tampão, 1 µL de *primer* forward ou reverse (10 pmol/ µL), 2 µL de DNA (20 ng/µL), 2 µL do Kit BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e 4 µL de água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram submetidas ao termociclador PTC-100® Thermal Cycler (MJ Research, 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 purificação do produto sequenciado. Com adição inicial de 1 µL de acetato de amônio a 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, 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. Posteriormente, 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 ressuspensionado em 10 µL de formamida, e em seguida a placa foi submetida ao sequenciador ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.9 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DE ISOLADOS DE *Aspergillus* SEÇÕES *Cremeri*, *Circumdati* E *Flavi*

O processamento das sequências obtidas foi realizado através do software de qualidade Phred – Phrap (EMBRAPA), considerando valor de alta qualidade para as bases, de ≥ 80 . As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de *Aspergillus* seções *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI. A análise filogenética foi realizada através do software MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2015), 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.

4.10 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Aspergillus* SEÇÃO *Cremeri* COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE LIPASES

Para seleção das linhagens de *Aspergillus* seção *Cremeri*, quanto ao potencial lipolítico, utilizou-se a metodologia de Sierra (1957) modificada. As linhagens agrupadas junto a seção *Cremeri*, foram inoculadas no centro da placa de Petri, contendo meio de cultura (10 g/L de peptona bacteriológica; 5 g/L de NaCl; 0,1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 15 g/L de ágar e 10 mL/L de Tween 20, suplementado com Tween 20, para verificação da atividade enzimática. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. As placas foram incubadas em B.O.D. EL202 (Eletro Lab®) a 28 °C por 8 dias. Após o período de incubação as placas foram transferidas para câmara fria e incubadas a 4 °C por 12 horas e avaliadas quanto a formação do halo de precipitação, indicativo de atividade lipolítica, o qual foi quantificado através do Índice Enzimático (IE).

O (IE) foi expresso pela medida da relação entre o diâmetro do halo + diâmetro da colônia dividido pelo diâmetro de crescimento da colônia, onde $(\text{IE}) \geq 2$ representa isolados com boa atividade lipolítica, os ensaios foram conduzidos em triplicata (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

4.11 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Aspergillus* SEÇÃO *Cremeri* COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE AMILASES

Para tanto, as linhagens de *Aspergillus* seção *Cremeri*, foram inoculadas no centro de placas de Petri, contendo Czapeck-Dox Ágar (CDA) como meio de cultura para verificação da atividade amilásica. O (CDA) foi suplementado com amido solúvel (1 g/L NaNO₃; 1 g/L KH₂PO₄; 0,5 g/L MgSO₄; 0,01 g/L FeSO₄; 15 g/L Ágar; 20 g/L de amido solúvel) e teve seu pH ajustado para 4,5 (BALKAN; ERTAN, 2005) .

As placas foram incubadas em estufa B.O.D a 28 °C por 7 dias, após o período de crescimento, as placas foram coradas com a solução de iodina a 1 % (1 g/100 mL KI; 0,5 g/ 100 mL I₂). Em seguida, as placas foram incubadas por 10 dias em B.O.D a 28 °C, a fim de verificar a formação do halo de coloração clara, indicando o consumo do amido presente no meio e consequente produção de amilases extracelulares, estas quantificadas através da relação, expressa anteriormente, de índice enzimático, os ensaios foram conduzidos em triplicata (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

REFERÊNCIAS

- ADAKI, S.; ADAKI, R.; SHAH, K.; KARAGIR, A. Garlic: Review of literature. **Indian Journal of Cancer**, v. 51, n. 4, p. 577, 2014.
- AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 107–133, 2011.
- AMARAL, K. A. S. DO; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JRS, M.; MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 26, n. 2, p. 336–342, jun. 2006.
- ANAPA. Conjuntura do alho brasileiro em 2017. **Revista Nosso Alho**, v. 28, p. 32–39, 2018.
- BACKES, C.; DE LIMA, C. P.; DE GODOY, L. J. G.; BOAS, R. L. V.; IMAIZUMI, I. Coloração verde nas folhas da cultura do alho vernalizado em resposta à adubação nitrogenada. **Bragantia**, v. 67, n. 2, p. 491–498, 2008.
- BALKAN, B.; ERTAN, F. Production and properties of alpha-amylase from *Penicillium chrysogenum* and its application in starch hydrolysis. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 35, p. 169–178, 2005.
- BARATI, B.; OKHOVVAT, S. A R.; GOLJANIAN, A; OMRANI, M. R. Otomycosis in central iran: a clinical and mycological study. **Iranian Red Crescent medical journal**, v. 13, n. 12, p. 873–6, 2011.
- BARKAI-GOLAN, R. *Aspergillus* Mycotoxins. In: **Mycotoxins in Fruits and Vegetables**. p. 115–151, 2008.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. A. *Aspergillus*: Biology and industrial applications. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 23, p. 1–404, 1992.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M.; MYCOTOXINS, M. Mycotoxins. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.
- BENNETT, W. J. An Overview of the Genus *Aspergillus*. **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics**, p. 1–17, 2010.
- BERGS, R.; SIESS, M. H.; ARNAULT, I.; AUGER, J.; KAHANE, R.; PINNERT, M. F.; VERNEVAUT, M. F.; LE BON, A. M. Comparison of the chemopreventive efficacies of garlic powders with different alliin contents against aflatoxin B1 carcinogenicity in rats. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 10, p. 1953–1959, 2004.
- BUSO, G. S. C.; PAIVA, M. R.; TORRES, A. C.; RESENDE, F. V.; FERREIRA, M. A.; BUSO, J. A.; DUSI, A. N. Genetic diversity studies of Brazilian garlic cultivars and quality control of garlic-clover production. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 534–541, 2008.

CAMARGO FILHO, W.; CAMARGO, F. A quick review of the production and commercialization of the main vegetables in Brazil and the world from 1970 to 2015. **Horticultura Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 160–166, 2017.

CAPCAROVA, M.; ZBYNOVSKA, K.; KALAFOVA, A.; BULLA, J.; BIELIK, P. Environment contamination by mycotoxins and their occurrence in food and feed: Physiological aspects and economical approach. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 51, n. 4, p. 236–244, 2016.

CARVAJAL-CAMPOS, A.; MANIZAN, A.; TADRIST, S.; AKAKI, D.; KOFFI-NEVRY, R.; MOORE, G.; FAPOHUNDA, S.; BAILLY, S.; MONTET, D.; OSWALD, I.; LORBER, S.; BRABET, C.; PUEL, O.; CARVAJAL-CAMPOS, A.; MANIZAN, A. L.; TADRIST, S.; AKAKI, D. K.; KOFFI-NEVRY, R.; MOORE, G. G.; FAPOHUNDA, S. O.; BAILLY, S.; MONTET, D.; OSWALD, I. P.; LORBER, S.; BRABET, C.; PUEL. *Aspergillus korhogoensis*, a Novel Aflatoxin Producing Species from the Côte d'Ivoire. **Toxins**, v. 9, n. 11, p. 353, 31 out. 2017.

CARVALHO, C.; KIST, B. B. Alho: tempero exótico. In: Anuário Brasileiro de Hortaliças 2017. **Gazeta**, p. 56, 2017.

CHANDER, H.; BATISH, V. K.; SANNABHADTI, S. S.; SRINIVASAN, R. A. FACTORS AFFECTING LIPASE PRODUCTION IN *Aspergillus wentii*. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 3, p. 598–600, 1980.

CHEN, K. C.; YIN, W. S.; TIU, C.; HOUNG, J. Y. 11 alpha-hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 7, p. 551–5, 1994.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R. A.; DE LIMA, M.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 461–467, 2016.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. DA G.; CARVALHO, P. DE O. *Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3–4, p. 163–171, 2010.

DAS, A.; BHATTACHARYA, S.; SHIVAKUMAR, S.; SHAKYA, S.; SOGANE, S. S. Coconut oil induced production of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamarii* under submerged fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 114–120, 2017.

DAS, A.; SHIVAKUMAR, S.; BHATTACHARYA, S.; SHAKYA, S.; SWATHI, S. S. Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamarii* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 131, dez. 2016.

DAYANANDAN, A.; RANI, S. H. V.; SHANMUGAVEL, M.; GNANAMANI, A.; RAJAKUMAR, G. S. Enhanced production of *Aspergillus tamarii* lipase for recovery

of fat from tannery fleshings. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1089–95, 2013.

DEY, M.; MAYO, J. A.; SAVILLE, D.; WOLYNIAK, C.; KLONTZ, K. C. Recalls of foods due to microbiological contamination classified by the U.S. Food and Drug Administration, fiscal years 2003 through 2011. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 6, p. 932–8, 2013.

DÍAZ, G. A.; TORRES, R.; VEGA, M.; LATORRE, B. A. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 195–9, 2009.

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.

DU, X.; LIU, D.; HUANG, J.; ZHANG, C.; PROKSCH, P.; LIN, W. Polyketide derivatives from the sponge associated fungus *Aspergillus europaeus* with antioxidant and NO inhibitory activities. **Fitoterapia**, v. 130, n. August, p. 190–197, 2018.

EATON, D. L.; RAMSDELL, S.; NEAL, G. E.; GROOPMAN, J. D. Biotransformation of aflatoxins. **The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance.**, p. 45–72, 1993.

FINEFIELD, J. M.; FRISVAD, J. C.; SHERMAN, D. H.; WILLIAMS, R. M. Fungal Origins of the Bicyclo[2.2.2]diazaoctane Ring System of Prenylated Indole Alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 812–833, 27 abr. 2012.

FONTENELE, L.; AZEVEDO, M.; CARDOSO FILHO, F.; MURATORI, M.; SÁ, L.; PEREIRA, M. Qualidade microbiológica do alho (*Allium sativum*) produzido e comercializado em mercados públicos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 4, p. 420–425, 2015.

FOSTER, J. W. METABOLISM OF FUNGI. **Annual Review of Microbiology**, v. 5, p. 101–120, 1951.

FRISVAD, J. C.; HUBKA, V.; EZEKIEL, C. N.; HONG, S. B.; NOVÁKOVÁ, A.; CHEN, A. J.; ARZANLOU, M.; LARSEN, T. O.; SKLENÁŘ, F.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 1–63, 2018.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. New ochratoxin producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 23–43, 2004.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1,

sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 442–453, 2005.

FURLANETO, L.; MENDES, S. Análise Microbiológica De Especiarias Comercializadas Em Feira Livre E Em Hipermercados. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 87–91, 2004.

GAMS, W., CHRISTENSEN, M., ONIONS, A. H. S., PITT, J. I. & SAMSON, R. A. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. **Plenum Publishers, London & New York**, p. 483, 1985.

GARCIA-MARTOS, P.; GUARRO, J.; GENE, J.; MIRA, J.; LINARES, M.; ORTONEDA, M. Onychomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum*. **Journal De Mycologie Medicale**, v. 11, n. 4, p. 222–224, 2001.

GERMANO, P. M.; GERMANO, M. I. S. Importância e riscos das especiarias. **Revista Higiene Alimentar**, p. 23–31, set. 1998.

GAUTIER, M.; NORMAND, A.-C.; RANQUE, S. Previously unknown species of *Aspergillus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 662–669, 2016.

GHANGAONKAR, N. M. Incidence of Mycoflora on Garlic (*Allium Sativum* L.) Bulbs. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 7, p. 64–66, 2013.

GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; SARDIÑAS, N.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; PATIÑO, B. Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 343–345, 2011.

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, n. 4, p. 1323–1330, 1995.

GNONLONFIN, G. J. B. et al. Mycobiota and identification of aflatoxin gene cluster in marketed spices in West Africa. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 115–120, 2013.

GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*: RESEARCH LETTER. **FEMS Microbiology Letters**, v. 304, n. 2, p. 157–168, 2010.

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, n. 2, p. 152–160, 1 fev. 2012.

GONZÁLEZ-ANDRADE, M.; DEL VALLE, P.; MACÍAS-RUBALCAVA, M. L.; SOSA-PEINADO, A.; DEL CARMEN GONZÁLEZ, M.; MATA, R. Calmodulin inhibitors from *Aspergillus stromatoides*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 3, p. 328–337, mar. 2013.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B.

Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 30 jun. 2003.

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**, 2015.

HAMMAMI, W.; FIORI, S.; AL THANI, R.; ALI KALI, N.; BALMAS, V.; MIGHELI, Q.; JAOUA, S. Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 177–181, mar. 2014.

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, 1975.
HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase fúngica. **Bioquímica das Fermentações**, p. 56, 1982.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: Human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, 2007.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 1–51, 1 set. 2011.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A.; YILMAZ, N. Taxonomy of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* and its Significance for Biotechnology. In: *Aspergillus* and *Penicillium* in the Post-genomic Era. **Caister Academic Press**, p. 1–16, 2016.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1–3, p. 155–170, 2004.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SKLENÁŘ, F.; VARGA, J.; KOLARÍK, M. *Aspergillus europaeus* sp. nov., a widely distributed soil-borne species related to *A. wentii* (section *Cremeri*). **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, n. 6, p. 641–650, 2016.

HUNTER, A. J.; JIN, B.; KELLY, J. M. Independent duplications of α -amylase in different strains of *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 4, p. 438–444, 2011.

KACHAPULULA, P. W.; AKELLO, J.; BANDYOPADHYAY, R.; COTTY, P. J. *Aspergillus* section *Flavi* community structure in Zambia influences aflatoxin contamination of maize and groundnut. **International Journal of Food Microbiology**, v. 261, p. 49–56, 16 nov. 2017.

KANDARI, V.; VAJPAYEE, I.; KUMAR, D.; GUPTA, S. Cellulase and β -Glucosidase Production by *Trichoderma viride* and *Aspergillus wentii* in Sub-Merged Fermentation Utilizing pretreated Lignocellulosic Biomass. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 63–78, 2013.

KEEHN, C. A.; BELONGIE, I. P.; SHISTIK, G.; FENSKE, N. A.; GLASS, L. F. The diagnosis, staging, and treatment options for mycosis fungoides. **Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 14, n. 2, p. 102–11, 2007.

KHAN, J. A.; YADAV, S. K. PRODUCTION OF ALPHA AMYLASES BY ASPERGILLUS NIGER USING CHEAPER SUBSTRATES EMPLOYING SOLID STATE FERMENTATION R & D Division, MRD LifeSciences (P) LTD. Isolation of Fungi from Soil. **International Journal of Plant, Animal And Environmental Science**, v. 1, n. 3, p. 100–108, 2011.

KIMURA, Y.; NAKAHARA, S.; FUJIOKA, S. Aspyrone, a nematocidal compound isolated from the fungus, *Aspergillus melleus*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 8, p. 1375–1376, 12 jan. 1996.

KŁĘBUKOWSKA, L.; ZADERNOWSKA, A.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. Microbiological contamination of dried and lyophilized garlic as a potential source of food spoilage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1802–1807, 2015.

KLICH, M. A.; PETERSON, S. W. Identification of Common *Aspergillus* species. **Mycologist**, v. 17, n. 3, p. 128–128, ago. 2003.

KONG, W.; WEI, R.; LOGRIECO, A. F.; WEI, J.; WEN, J.; XIAO, X.; YANG, M. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets. **Food Chemistry**, v. 146, p. 320–326, 1 mar. 2014.

KRISHNA, C. **Solid-state fermentation systems - An overview** **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 1-30, 10 jan. 2008.

KUMAR, V.; SINGH, D.; GILL; SANGWAN, P.; KAUR, P. Global market scenario of industrial enzymes In: **Industrial Enzymes: Trends, Scope and Relevance**. **Nova Science**, p. 173–196, 2014.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. **Molecular biology and Evolution**, 2015.

LAMM, D. L.; RIGGS, D. R. Enhanced Immunocompetence by Garlic: Role in Bladder Cancer and Other Malignancies. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 1067–1070, 1 abr. 2001.

LUCINI, M. A. Alho roxo no Brasil: um pouco da história dos números desse nobre. **Revista Nosso Alho**, v. 1, n. 1, 2008.

LUISETTI, M. et al. Some Properties of the Alkaline Proteinase from *Aspergillus melleus*. **International Journal of Tissue Reactions-Experimental and Clinical Aspects**, v. 13, n. 4, p. 187–192, 1991.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**. v. 2, p. 67-72, 2016.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. D. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010.

MIDORIKAWA, G. E. O. **Aspergillus seção Flavi : Caracterização molecular de espécies aflatoxigênicas da castanha do Brasil e análise do Transcritoma de Aspergillus oryzae em relação a degradação enzimática do bagaço da cana-de-açúcar**. 2014, Tese (Doutorado em Biologia molecular)- Universidade de Brasília, Brasília. 2014

MIKUSOVA, P.; SULYOK, M.; SANTINI, A.; SROBAROVA, A. *Aspergillus* spp. and their secondary metabolite production in grape berries from Slovakia. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 311–317, 2014.

MONTEIRO, M. C. P. *Aspergillus e Penicillium Em Solos Preservados Do Cerrado*. 2012, Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. D. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, p. 9–23, 2009.

MONTEIRO DE SOUZA, P. APPLICATION OF MICROBIAL-AMYLASE IN INDUSTRY-A REVIEW. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850–861, 2010.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. Mycotoxins: An underhand food problem. In: *Methods in Molecular Biology*. **Humana Press**, p. 3–12, 2017.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. Mycotoxins: An underhand food problem. In: **Methods in Molecular Biology**: Humana Press, New York, v. 1542p. 3–12, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Sarvier**, 2011.

NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. **UNICAMP**, p. 161, 2011.

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.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 490–495, 1 jan. 1994.

PANDEY, A. Enzyme Technology. **Interciencia**, p. 760, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 2000.

- PARIZA, M. W.; JOHNSON, E. A. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 173–186, 2001.
- PEIXINHO, P.; SABINO, T.; DUARTE, C.; CRUZ, T.; BRAGANÇA, N. Aspergilose Pulmonar Invasiva. **Acta Medica Portuguesa**, v. 16, n. 2, p. 97–99, 2003.
- PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremeri* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. **Mycological Research**, v. 99, n. 11, p. 1349–1355, 1995.
- PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, v. 100, n. 2, p. 205–226, 1 mar. 2008.
- PITT, J. I.; LANGE, L.; LACEY, A. E.; VUONG, D.; MIDGLEY, D. J.; GREENFIELD, P.; BRADBURY, M. I.; LACEY, E.; BUSK, P. K.; PILGAARD, B.; CHOOI, Y.-H.; PIGGOTT, A. M. *Aspergillus hancockii* sp. nov., a biosynthetically talented fungus endemic to southeastern Australian soils. **Plos One**, v. 12, n. 4, p. e0170254, 5 abr. 2017.
- RAINER, J.; PEINTNER, U.; PÖDER, R. Biodiversity and concentration of airborne fungi in a hospital environment. **Mycopathologia**, v. 149, n. 2, p. 87–97, 2001. 2018.
- RANK, C.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; VARGA, J.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. **Fungal Biology**, v. 115, n. 4–5, p. 406–420, 1 abr. 2011.
- RAPER, K.; FENNEL, D. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins Baltimore. **Science**, v. 150, n. 3697, p. 736 LP-737, 5 nov. 1965.
- REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, p. 237–250, mar. 2009.
- RESENDE, F. V.; HABER, L. L.; PINHEIRO, J. B.; MELLO, A. F. S. Produção de alho-semente: parte I. **Embrapa Hortaliças**, p. 45–55, 2016.
- RIVLIN, R. S. Historical perspective on the use of garlic. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 951S–954, 2001.
- ROEHR, M.; KUBICEK, C. P. Further Organic Acids. In: **Biotechnology**, n.9, p. 363–379, 2001.
- ROHLF, F. J. **NTSYpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1 User Guide**. p. 44, 2000.
- SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 1 jun. 2014.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.

SETHI, B. K.; JANA, A.; NANDA, P. K.; DASMOHAPATRA, P. K.; SAHOO, S. L.; PATRA, J. K. Production of α -Amylase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 Using Pearl Millet and Its Structural Characterization. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 639, 2016.

SHABAN, W. I. Studies on some Garlic Diseases during Storage in Egypt. **Journal of Plant Protection**. v. 2, p.25-30, 2014.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. **History of Soy Sauce (160 CE to 2012): Extensively Annotated Bibliography and Sourcebook**. p. 167-172, 2012.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15–22, 1957.

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

SOARES, C.; RODRIGUES, P.; PETERSON, S. W.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. **Mycologia**, v. 104, n. 3, p. 682–697, 20 maio 2012.

SOUZA, R.; MACÊDO, F. Cultura do alho: técnicas modernas de produção. **Lavras: UFLA**. p.181, 2009.

SUGANTHI, R.; BENAZIR, J. F.; SANTHI, R.; KUMAR, V. R.; HARI, A.; MEENAKSHI, N.; NINDHIYA, K. A.; KAVITHA, G.; LAKSHMI, R. Amylase Production by *Aspergillus niger* Under Solid State Fermentation Using Agroindustrial Wastes. **International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)**, v. 3, n. 2, p. 1756–1763, 2011.

SUGIYAMA, T.; MURAYAMA, T.; YAMASHITA, K.; ORITANI, T. Synthesis of Chiral Aspyrone, A Multi-functional Dihydropyranone Antibiotic. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 10, p. 1921–1924, 12 jan. 1995.

TACIN, M. V.; MASSI, F. P.; FUNGARO, M. H. P.; TEIXEIRA, M. F. S.; DE PAULA, A. V.; DE CARVALHO SANTOS EBINUMA, V. Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp from Amazon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 30 nov. 2018.

TANG, K.; LI, Q. Biochemistry of Wine and Beer Fermentation. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry**. p. 281–304, 2016.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; COPETTI, M. V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M. H. P.; FRISVAD, J. C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov.

from Brazil nuts. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1-7, 2012.

THOMSON, M.; ALI, M. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. **Current cancer drug targets**, v. 3, n. 1, p. 67–81, 2003.

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, n. 3, p. 131–138, 2013.

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

VARGA, J.; TÓTH, B.; RIGÓ, K.; TÉREN, J.; HOEKSTRA, R. F.; KOZAKIEWICZ, Z. Phylogenetic Analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* Based on Sequences of the Internal Transcribed Spacer Regions and the 5.8 S rRNA Gene. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, n. 1, p. 71–80, 1 jun. 2000.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 343–371, jun. 2014a.

VISAGIE, C. M.; VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; MEIJER, M.; KOCSUBÉ, S.; YILMAZ, N.; FOTEDAR, R.; SEIFERT, K. A.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow *aspergilli* (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 1–61, jun. 2014b.

WEHMER, C. **Bulletin De La Societe Chimique De France**. p. 789, 1893

YANG, L.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 33–49, jan. 2017.

ZOTTI, M.; MACHETTI, M.; PEROTTI, M.; BARABINO, G.; PERSI, A. A new species, *Aspergillus persii*, as an agent of onychomycosis. **Medical mycology**, v. 48, n. 4, p. 656–60, 2010.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de artigo científico:

Artigo: "HIGH INCIDENCE OF *Aspergillus europaeus* IN BRAZILIAN GARLIC."

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

MONTEIRO, J. P. S. **HIGH INCIDENCE OF *Aspergillus europaeus* IN BRAZILIAN GARLIC.** Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest consumers of garlic (*Allium sativum* L.) in the world and its use as a spice is a habitual practice in cuisine. The presence of fungi in products of biological origin may represent a risk factor for health, considering the potential production of harmful mycotoxins. In garlic is reported a higher incidence of infection by fungi of the genus *Aspergillus*, especially the *A. niger* species from the section *Nigri*. However, there are few reports of infection of Brazilian garlic by other *Aspergillus* sections. In this sense, the objective of this study was to verify the incidence and isolate *Aspergillus* species from garlic commercialized in 12 Brazilian states, verify the incidence, identify the species and evaluate the biotechnological potential, of the species described as nontoxigenic, for the production of lipases and amylases. The fungal infection was verified after incubating the garlic bulbs in (DG18) medium, with a total of 452 Colony Forming Units (CFU), representing 3 sections of *Aspergillus*. From this total, 94 (CFU) were isolated and 44 isolates selected for analysis of genetic variability. At 30% similarity, the dendrogram presented 3 groups (clusters I, II and III) and among the groups formed a total of 8 isolates were selected for identification of the species, through the sequencing of partial regions of the β -tubulin gene (*BenA*). The isolates of group I were identified as *A. europaeus* and *A. dimorphicus*, both of the section *Cremeri* and described for the first time in garlic, with a high incidence (77%) of *A. europaeus* species. The species of group II were identified as *A. ochraceus* and *A. melleus* from the section *Circumdati*, together the species represent (13.6%) of the total of 44 isolates, the second section more incident in this study. While the group III had species identified as *A. flavus* and/or *A. oryzae* from the section *Flavi*, this section was the less incident in this study, representing (6.8%) of the total isolates. The enzymatic analyzes demonstrated the lipolytic potential presented by a large part (56%) of *A. europaeus* strains. Thus, it was possible to evaluate the current infection situation of Brazilian garlic, reporting species such as *A. europaeus* and *A. dimorphicus*, found for the first time in garlic, as well as species described by the production of aflatoxins (*A. flavus*) and ochratoxins (*A. ochraceus*) that despite the low incidence, represent a risk factor for the consumers of this spice.

Key words: *Allium sativum* L. *Aspergillus europaeus*. *Aspergillus dimorphicus*. Spices. β -tubulin. Lipase. Amylase.

INTRODUCTION

The use of garlic as a condiment represents a habitual practice in Brazilian cuisine. Brazil is considered one of the countries with the highest consumption of this spice, and its use has increased, reaching 1500 g / inhabitant / year (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2017). Its production in Brazil is composed of two harvests, in the regions of the Cerrado with warmer climate and in the South of the country with a colder climate (CARVALHO; KIST, 2017).

The consumption of garlic usually occurs in small portions and even if used in small quantities there is a potential health risk factor, considering the possible presence of microorganisms producing toxins (MEDINA; GARCIA, 2007).

Spices such as garlic are mainly infected during the storage period. Favorable environments generally humid and poorly ventilated, propitiate the multiplication of contaminant species of fungi. Among the fungi with the highest incidence in garlic, can be highlight the species of the genus *Aspergillus*, which hosts strains with potential production of harmful toxins (GERMANO; GERMANO, 1998; TONTI et al., 2017).

Some studies evaluating the genetic variability of garlic contaminating species point to the species *A. niger* from the section *Nigri* and *A. flavus* from the section *Flavi*, as frequent contaminants of this spice (GHANGAONKAR, 2013; SHABAN, 2014 and ALIM et al., 2018). Previous data on isolation and identification of genus *Aspergillus* in Brazilian garlic, reported a higher incidence of the *Aspergillus* section *Nigri* (Vanzela, 2018), about to be published. According to the author, of 2,049 Colony Forming Units / (CFU) obtained from 34 garlic samples, 50.3% CFU were identified as genus *Aspergillus*. Among the (1,031) CFUs of the genus *Aspergillus*, 63% (649/1,031) were identified as *Aspergillus* section *Nigri*, followed by the sections *Flavi/Cremeri* with 19.5% (201/1,031) and *Circumdati* with 17.5% (181/1,031).

A. niger strains are mainly described as able in the production of lipases and amylases, compounds with wide applicability in various industry sectors (SUGANTHI et al., 2011; NAJAFPOUR, 2015; COLLA et al., 2016).

In this way, the identification and evaluation of the incidence of species of the genus *Aspergillus*, contaminants of Brazilian garlic, as well as the analysis of genetic variability among these species. Coupled with the fact of few studies contemplating the mycobiota of Brazilian garlic exclusively, and the broad applicability of enzymes produced by species of this genus, support the development of this study.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Fungal colony counts and isolation of *Aspergillus* section *Cremeri*, *Circumdati* and/or *Flavi*

The isolation and identification of fungi of the genus *Aspergillus* were obtained from 36 samples of garlic collected in 12 Brazilian states (Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Bahia, São Paulo, Amazonas, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Goiás, Paraíba, Distrito Federal and Minas Gerais). A total of 36 samples, approximately 250 grams of garlic/sample (bulbils and roots) were collected in supermarkets or street markets and immediately transported for analysis at room temperature. The samples had the surface disinfected by immersion in 0.4% sodium hypochlorite for 1 minute, and 50 bulbils fragments and root of the bulbs were plated in Dichloran 18% (DG18) as described by Pitt and Hocking (2009). The samples were incubated at 28 °C for 10 days.

The quantity of *Aspergillus* per sample with characteristic staining of the *Cremeri*, *Circumdati* and/or *Flavi* sections, were counted as Colony Forming Unit (CFU) and CFUs representative of sample were isolates in Czapek Yeast Extract agar (CYA) (PITT and Hocking, 2009) and incubated at 28 °C. Based on morphological criteria and sample representativity, isolates (44 isolates) were selected for identification of the species.

2.2 Extraction of DNA genomic

A suspension of 10^7 conidia (in Tween 80 – 2.5 mL) of each isolate (44) were grown in (60 mL) Malt Extract (20 g/L of malt extract; 1 g/L of peptone; 20 g of glucose/L) at 28 °C, 180 rpm for 7 days. The resulting mycelium were collected for filtration and approximately 0.5 g of mycelium was macerated with liquid nitrogen for DNA extraction as described by Azevedo et al. (2000).

2.3 Genetic variability analysis and sequencing of the partial region of the β -*tubulin* gene

The RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) method was used as described by Fungaro et al. (1996) with primers OPX13 and OPX7 (Operon, Technologies). The

amplifications were developed in termocycler PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc).

The data obtained from the 44 isolates 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), with Jaccard coefficient and UPGMA method (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*).

The dendrogram analysis allowed the selection of representative isolates from the partial region amplification and sequencing of the β -tubulin gene (*BenA*).

The reaction was prepared in a final volume of 25 μ L, containing 2,5 μ L of buffer (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM; Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl 10x); 2,5 μ L of dNTP's (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM); 1 μ L of primer *Bt2a* and *Bt2b* (10 pmol/ μ L) (GLASS; DONALDSON, 1995); 1 μ L of MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 50 mM); 0,1 μ L of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, USA – 5 U/ μ L); DNA sample (5 ng/ μ L). The fragments were amplified in a termocycler PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc), programmed for an initial denaturation cycle at 95 °C for 1 min, 34 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 60 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min, followed by a final extension cycle at 72 °C for 5 min.

PCR products were sequenced based on the method of Sanger et al. (1977), using the same pairs of primers described above to obtain the respective fragments. Sequencing reactions were prepared in a final volume of 10 μ l consisting of: 1 μ l buffer, 1 μ l forward primer or reverse (10 μ mol / μ L), 2 μ l DNA (20 ng / μ L), 1 μ l BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) and 5 μ l of ultrapure water to complete the reaction volume. The sequences were amplified in a termocycler (PTC-100™) programmed for an initial denaturation denaturation at 95 °C for 60 s, 30 cycles of denaturations at 95 °C for 20 s, annealing 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 (10 μ L) 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 (KUMAR;

STECHER; TAMURA, 2015). The phylogenetic tree was constructed using the distance method Neighbor Joining (NJ).

2.4 Evaluation of the potential production of lipases and amylases by *Aspergillus* section *Cremeri*

The lipolytic potential of the *Aspergillus* section *Cremeri* strains was verified according to Sierra (1957), with modifications. A total of 35 strains were inoculated in the center of the Petri dish containing culture medium (10 g/L of peptone; 5g/L of NaCl; 0.1 g/L of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L of agar), supplemented with Tween 20 (10mL/L) as substrate. The strains were incubated at 28 °C for 7 days following for 12 hours at 4 °C. The enzymatic potential was measured by formation of a precipitation halo around the colony, indicative of lipolytic activity, which was quantified through the enzymatic index (EI) to according Hankin and Anagnostakis (1975).

The verification of the amylolytic potential was assessed in the same manner using the Czapeck-Dox Agar (CDA) (1 g/L NaNO_3 ; 1 g/L KH_2PO_4 ; 0.5 g/L MgSO_4 , 0.01 g/L of FeSO_4 ; 15 g/L of Agar and 20 g/L of starch) culture medium supplemented with starch 2%. The strains were incubated at 28 °C for 7 days, then stained with 1% iodine and incubated for 10 days at 28 °C. The lipolytic potential was verified with the enzymatic index (EI). The statistical analysis of the data for comparison of means was performed by Tukey test, at a significance level of 5%, using R software (CORE TEAM, 2016).

3 RESULTS

3.1 Occurrence of fungal colony and isolation of *Aspergillus Cremei*, *Circumdati* and/or *Flavi* sections

The 36 analyzed garlic samples from 12 Brazilian states, 30 samples (83%) had CFUs representing the *Cremei*, *Circumdati* and *Flavi* sections. A total of 452 CFUs were reported representing the *Cremei*, *Circumdati* and *Flavi* sections, with predominance of CFUs belonging to the section *Cremei* (417 CFUs) followed by the *Circumdati* (23 CFUs) and *Flavi* (12 CFUs) sections. The highest frequency of *Aspergillus* section *Cremei* occurred in the São Paulo, Goiás, and Santa Catarina states, respectively.

Among the 452 CFUs, were isolated 94 CFUs representing the *Cremei*, *Circumdati* and *Flavi* sections and the CFUs isolated were selecting 44 isolados for identification of species, according morphological, and geographic origin of collection (Table 01). The isolates of *Aspergillus* section *Cremei* were widely distributed in the Brazilian states and therefore, 35 of 44 isolates selected for molecular identification belonged to this section.

3.2 Analysis of genetic variability and identification of *Aspergillus* species sections *Cremei*, *Circumdati* and *Flavi*

With 30% similarities, the 44 isolates were grouped into 3 clusters (I, II, and III) (Fig. 1). Most of the isolates morfophologically identified as *Aspergillus* section *Cremei* were grouped into cluster I. The cluster II was composed of 3 isolates morfophologically identified as *Aspergillus* section *Flavi* and cluster III (6 isolates) harbored the isolates morfophologically identified as *Aspergillus* section *Circumdati* (Fig. 01).

With morphological data and analysis of genetic variability of the isolates, representative isolates of each cluster were selected for the sequencing of partial regions of the *BenA* gene. The selected isolates were: cluster I - UEL As 21.301, UEL As 8.201, UEL As 14.251, and UEL As 22.316, cluster II - UEL As 27.399 and UEL As 7.198 and cluster III - UEL As 6.175 and UEL As 6.162 (Fig. 01). The sequences

obtained for the respective representative isolates, when compared to those available in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

The partial *BenA* sequence of representative isolates belonging to cluster I was similar to *Aspergillus europaeus* species, except the UEL As 22.316 that were similar to *Aspergillus dimorphicus* also of the *Cremeri* section (Fig.02). The partial sequence of *BenA* from the representatives of cluster II were similar to *Aspergillus flavus* or *A. oryzae*, *Flavi* section. The distinction between both species was not possible with the partial sequence of *BenA* (Fig.03).

On the other hand, the sequence of isolates to the cluster III were similar to *Aspergillus ochraceus*, except UEL As 6.162 similar to *Aspergillus melleus*, *Circumdati* section (Fig. 4).

3.3 Evaluation of the potential production of lipases and amylases by *Aspergillus* section *Cremeri* strains

The strains identified as *A. europaeus* (34 strains) were selected for evaluation of the lipase and amylases production potential (Table 02).

The 34 strains of *A. europaeus* showed potential for amylases production, with a range of $1.18 \text{ EI} \pm 0.05$ – $2.36 \text{ EI} \pm 0.01$. However, only the UEL As 26.379 strain showed significant Enzymatic Index (EI) (2.36 ± 0.01) in the studies conditions (Table 02).

Likewise, the potential production of lipases was detected by all 34 strains of *A. europaeus* with a range of $0.62 \text{ EI} \pm 0.01$ - $2.49 \text{ EI} \pm 0.01$. A total of 19 strains showed significant EI in the evaluated conditions (Table 02).

4 DISCUSSION

Several studies have found the prevalence of *Aspergillus* in garlic (GNONLONFIN et al., 2013; FONTENELE et al., 2015; VANZELA, 2018), with a higher frequency of *Aspergillus* section *Nigri*, followed by *Aspergillus* section *Flavi* (GHANGAONKAR, 2013; GNONLONFIN et al., 2013; TOMA, ABDULLA, 2013; SHABAN, 2014). However, most of the works analyze the garlic along with other spices and may not represent the true contamination situation of the garlic. Another factor to be considered is that these studies have identified *Aspergillus* only with morphological characters, which makes it difficult to identify the *Aspergillus* species, since some species are not morphologically distinguishable and may still be characterized as being potential producers of mycotoxins. The few reports that exclusively evaluated garlic found a high frequency of *Aspergillus* section *Nigri* (GHANGAONKAR, 2013; SHABAN, 2014; VANZELA, 2018). In fact, our group found a higher frequency of *Aspergillus* section *Nigri* in Brazilian garlic (data in the process of publication) (VANZELA, 2018). Only the studies of Ghangaonkar (2013), Gnonlonfin et al. (2013) and Toma and Abdulla (2013) found another section of *Aspergillus* as *Aspergillus* section *Flavi*, however, in small frequency in garlic.

These sections are reported as common in a wide range of habitats such as soil, agricultural crops and stored foods, being the section *Flavi* described with more frequency, when compared to the reports of the section *Circumdati* as a garlic contaminant (TOMA; ABDULLA, 2013; CAPCAROVA et al., 2016; MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017). But in contrast to the literature reports, in this study we found a higher frequency of section *Cremeri* and lower frequency of section *Flavi*.

However, after *Aspergillus* section *Nigri*, in this study was found *Aspergillus* section *Cremeri*, *Aspergillus* section *Circumdati* and *Aspergillus* section *Flavi* in garlic. The isolates grouped by the section *Cremeri* were found more frequently in this study, representing (79.5%) of the 44 isolates evaluated. The section *Circumdati* was the second most frequent representing (13.6%) of the total isolates. The species grouped in the section *Flavi* represented only (6.8%) of the isolates, being the section found less frequently in this study.

The presence of *Aspergillus* section *Cremeri* in foods such as grains and spices are poorly described in the literature, this section used to contain soil-borne species that generally have limited importance for humans (PITT; HOCKING, 2009). The

species most well described in this section is *A. wentii*, this widely distributed species is frequently found in soil and foods and less incident in indoor environments or clinical material (PETERSON, 1995; HUBKA et al., 2016).

According to the analysis of genetic variability, the largest cluster (I) grouped the isolates of the section *Cremeri* with 30% similarity. The divergence of the isolates from 30% of similarity showed that there is no possibility of these isolates having the same genetic constitution, once the garlic is produced in Brazil twice a year and during the year this product is stored to meet the demand (CARVALHO, KIST, 2017). The species representative of the section *Cremeri* (grouped in cluster I, Fig. 1), were identified as *A. europaeus* and only the isolated UEL As 22.316 as *A. dimorphicus*. The *A. europaeus* was described by Hubka et al (2016) and was isolated from soil samples close to caves in Europe. Du et al. (2018) also found *A. europaeus* in marine sponge samples collected in the China Sea. This is the first report of *A. europaeus* in garlic. The UEL As 22.316 identified as *A. dimorphicus* was described in 1969 by Mehrotra and Prasad isolated in the Indian soil and recently reported by Silva; Batista and Schwan (2008), in coffee beans. To date, both species *A. europaeus* and *A. dimorphicus* have not been described as producing mycotoxins.

The isolates grouped in cluster II were identified as *A. flavus* / *A. oryzae* and were not distinguished by the partial region of the *BenA* gene. There are few reports of *Aspergillus* section *Flavi* in garlic (GHANGAONKAR, 2013, GNONLONFIN et al., 2013, TOMA, ABDULLA, 2013). However, when found in garlic were mycotoxin producers, 1.4 (ppb) - aflatoxins (TOMA; ABDULLA, 2013).

On the other hand, the isolates grouped in cluster III were identified as *A. ochraceus* and *A. melleus*, both from the section *Circumdati* and described as producers of mycotoxins such as ochratoxins and mellein (VISAGIE et al., 2014). The infection of garlic and other spices by toxigenic species such as *A. ochraceus*, has already been described by Gnonlonfin et al. (2013).

Among the *Aspergillus* species identified in this study, there was a predominance of *A. europaeus* (77%), which showed no potential for mycotoxin production (HUBKA et al., 2016), but showed potential for amylases and lipases production (Table 2). Among the few species of *Aspergillus* section *Cremeri* described by the potential production of hydrolytic enzymes, we can highlight *A. wentii*, reported by the production of amylases and pectinases (HUBKA et al., 2016). However, the potential production of hydrolytic enzymes by species of *A. europaeus*, has not been

contemplated by other authors. These new data demonstrate the high lipolytic potential presented by (56%) of *A. europaeus* strains.

In conclusion, this study revealed that that 83% of the samples were positive for *Aspergillus* presence, problem mainly associated with storage methods. The section *Cremeri* was more frequent in garlic, and *A. europaeus* was the predominant species. *A. europaeus* and *A. dimorphicus* were described for the first time in garlic. *Aspergillus* section *Circumdati* and *Flavi* were found with less frequency in garlic, although the identified species are described as producing mycotoxins.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta dissertação permitiram relatar a alta incidência (83%) de fungos do gênero *Aspergillus* em alho comercializado em estados brasileiros. A qualidade microbiológica duvidosa do alho, é um alerta para a população, habituada ao consumo desta especiaria. A análise de variabilidade genética dos isolados não foi associada à origem geográfica do hospedeiro e permitiu identificar grupos com características distintas, os grupos formados ainda apresentaram variabilidade genética entre as espécies. Quanto a identificação das espécies de *Aspergillus* seções *Cremeri*, *Circumdati* e *Flavi*, houve predomínio da espécie *A. europaeus* seção *Crème* (34 linhagens), identificada pela primeira vez no alho juntamente com a única linhagem de *A. dimorphicus*, também abrigado pela seção *Cremeri*. A seção *Circumdati*, segunda maior incidente, abrigou 6 linhagens identificadas como *A. ochraceus* (5 linhagens) e *A. melleus* (1 linhagem). Quanto a seção com menor frequência neste estudo, seção *Flavi*, estão as linhagens identificadas como *A. flavus* e/ou *A. oryzae*, que não puderam ser distinguidas através das sequências parciais para o gene da β -tubulina, com 3 linhagens entre as 44 avaliadas e maior frequência no estado do Amazonas. Entre a seção *Cremeri*, 19 linhagens se destacaram na produção de lipases, no entanto todas foram produtoras de lipases e amilases.

REFERÊNCIAS

ALIM, M.; IQBAL, SZ.; MEHMOOD, Z.; ASI, M.R.; ZIKAR, H.; CHANDA, H. MALIK, N. Survey of mycotoxins in retail market cereals, derived products and evaluation of their dietary intake. **Food Control**, v. 84, p. 471-477, 1 Feb. 2018.

BENNETT, W. J. An Overview of the *Aspergillus* Genus. **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics**, p. 1-17, 2010.

CAMARGO FILHO, W.; CAMARGO, F. A quick review of the production and commercialization of the main vegetables in Brazil and the world from 1970 to 2015. **Horticultura Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 160-166, 2017.

CAPCAROVA, M.; ZBYNOVSKA, K.; KALAFOVA, A.; BULLA, J.; BIELIK, P. I. Environment contamination by mycotoxins and their occurrence in food and feed: Physiological aspects and economical approach. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 51, n. 4, p. 236-244, 2016.

CHANDER, H.; BATISH, V. K.; SANNABHADTI, S. S.; SRINIVASAN, R. A. Factors affecting lipase production in *Aspergillus wentii*. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 3, p. 598–600, 1980.

CARVALHO, C.; KIST, B. B. Garlic: exotic seasoning. In: Brazilian Yearbook of Vegetables 2017. **Gazeta**, p. 56, 2017.

COLLA, L.M.; PRIMAZ, A.L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R.A.; DE LIMA, M.; REINEHR, C.O.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 461-467, 1 Apr. 2016.

DU, X.; LIU, D.; HUANG, J.; ZHANG, C.; PROKSCH, P.; LIN, W. Polyketide derivatives from the sponge associated fungus *Aspergillus europaeus* with antioxidant and NO inhibitory activities. **Phytotherapy**, v. 130, n. August, p. 190-197, 2018.

FONTENELE, L.; AZEVEDO, M.; CARDOSO FILHO, F.; MURATORI, M.; SÁ, L.; PEREIRA, M. Microbiological quality of garlic (*Allium sativum*) produced and marketed in public markets. **Revista Adolfo Lutz**, v. 74, n. 4, p. 420-425, 2015.

FOSTER, J. W. Metabolism of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 5, p. 101-120, 1951.

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

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; DE AZEVEDO, J.L. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 389-392, 1996.

GERMANO, P.M.; GERMANO, M. I. S. Importance and risks of spices. **Food Hygiene Magazine**, P. 23-31, set. 1998.

GHANGAONKAR, N. M. Incidence of Mycoflora on Garlic (*Allium Sativum* L.) Bulbs. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 7, p. 64-66, 2013.

GONZÁLEZ-ANDRADE, M.; DEL VALLE, P.; MACÍAS-RUBALCAVA, M.L.; SOSA-PEINADO, A.; DEL CARMEN GONZÁLEZ, M.; MATA, R. Calmodulin inhibitors from *aspergillus stromatoides*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 3, p. 328-337, 1 March. 2013.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycology**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HONG SB, CHO HS, SHIN HD, FRISVAD JC, SAMSON RA. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 56:477-486, 2006.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; SAMSON, RA.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SKLENÁŘ, F.; VARGA, J.; KOLAŘÍK, M. *Aspergillus europaeus* sp. a widely distributed soil-borne species related to *A. wentii* (section *Cremeri*). **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, n. 6, p. 641-650, 2016.

KANDARI, V.; VAJPAYEE, I.; KUMAR, D.; GUPTA, S. Cellulase and β -Glucosidase Production by *Trichoderma viride* and *Aspergillus wentii* in Sub-Merged Fermentation Utilizing pretreated Lignocellulosic Biomass. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 63–78, 2013.

MEDINA, J. de la C.; GARCIA, H. S. Garlic, Post Harvest operations. **FAO**. P.56, 2006.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. Mycotoxins: An underhand food problem. In: *Methods in Molecular Biology*. **Humana Press**, New York, NY, 2017. 1542p. 3-12.

MUHAMMAD, M.T.; ABDULLAHI, A.; JAFARU, S.; LEMA, SY. A Survey of Mycoflora of Garlic Cloves (*Allium sativum* L.) In Sokoto Available online at <http://abiosci.com/archive.html>. **Annals of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2016.

PARIZA, M. W.; JOHNSON, E. A. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 173-186, 2001.

PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycology**, v. 100, n. 2, p. 205-226, 1 March. 2008.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and Food Spoilage*. Boston, MA: **Springer US**, 2009.

RANK, C.; NIELSEN, K.F.; LARSEN, T.O.; VARGA, J.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. **Fungal Biology**, v. 115, n. 4-5, p. 406-420, 1 Apr. 2011.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J.C. Studies in Mycology. 2014. 78 CBS **Fungal Biodiversity Center**, 2014.

SHABAN, W. I. Studies on some Garlic Diseases during Storage in **Egypt Journal of Plant Protection**. v. 302, n, 6, p.641-650, 2016.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica L.*) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 521-526, set. 2008.

SUGANTHI, R.; BENAZIR, J.F.; SANTHI, R.; KUMAR, V.R.; HARI, A.; MEENAKSHI, N.; NINDHIYA, K.A.; KAVITHA, G.; LAKSHMI, R. Amylase Production by *Aspergillus niger* Under Solid State Fermentation Using Agroindustrial Wastes. **International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)**, v. 3, n. 2, p. 1756-1763, 2011.

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, n. 3, p. 131-138, 2013.

TONTI, S.; MANDRIOLI, M.; NIPOTI, P.; PISI, A.; TOSCHI, T.G.; PRODI, A. Detection of Fumonisin in Fresh and Dehydrated Commercial Garlic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 32, p. 7000-7005, 2017.

VANZELA, D. O. A. Isolation and identification of *Aspergillus Nigri* section, potential for production of mycotoxins and lipases in garlic marketed in Brazil. (Dissertation of master in Biotechnology) State University of Londrina, 2018.

VISAGIE, A. **Studies in Mycology**: Foreword. Studies in Mycology, v. 2004, n. 49, p. 1-61, 2004.

VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; HONG, S.B.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON R.A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 343-371, Jun. 2014a.

VISAGIE, C.M.; VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; MEIJER, M.; KOCSUBÉ, S.; YILMAZ, N.; FOTEDAR, R.; SEIFERT, K.A.; FRISVAD, J.C.; SAMSON R.A. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow *Aspergillus* (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 1-61, jun. 2014b.

XU, R.; XU, G.M.; LI, X.M.; LI, C.S.; WANG, B.G. Characterization of a Newly Isolated Marine Fungus *Aspergillus dimorphicus* for Optimized Production of the Anti-Tumor Agent Wentilactones. **Marine Drugs**, v. 13, n. 11, p. 7040-7054, Nov. 19, 2015.

YANG, L.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 33-49, Jan. 2017.

Table 1. Selected isolates from the representative geographic region and morphology, previously grouped in the sections *Cremei*, *Circumdati* and *Flavi*.

ISOLATED	ORIGIN	SECTION	SPECIES
UEL As 05.126	São Paulo	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 05.130	São Paulo	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 06.175	São Paulo	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>
UEL As 06.162	São Paulo	<i>Circumdati</i>	<i>A. melleus</i>
UEL As 06.137	São Paulo	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 06.179	São Paulo	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>
UEL As 07.188	Rio Grande do Sul	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 07.198	Rio Grande do Sul	<i>Flavi</i>	<i>A. flavi/oryzae</i>
UEL As 08.202	Goiás	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 08.204	Goiás	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 08.201	Goiás	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 08.213	Goiás	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 08.207	Goiás	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 12.234	São Paulo	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 12.246	São Paulo	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>
UEL As 12.242	São Paulo	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>
UEL As 14.251	São Paulo	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 14.258	São Paulo	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 15.268	Santa Catarina	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>
UEL As 15.270	Santa Catarina	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 19.286	Rio de Janeiro	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 20.289	Rio de Janeiro	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 20.295	Rio de Janeiro	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 20.291	Rio de Janeiro	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 21.301	Paraíba	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 22.315	Paraíba	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 22.316	Paraíba	<i>Cremei</i>	<i>A. dimorphicus</i>
UEL As 23.320	Amazonas	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 25.362	Santa Catarina	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 25.344	Santa Catarina	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 25.355	Santa Catarina	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 26.372	Santa Catarina	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 26.386	Santa Catarina	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 26.379	Santa Catarina	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 27.408	Amazonas	<i>Flavi</i>	<i>A. flavi/oryzae</i>
UEL As 27.399	Amazonas	<i>Flavi</i>	<i>A. flavi/oryzae</i>
UEL As 28.419	Paraná	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 28.421	Paraná	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 29.439	Bahia	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 29.453	Bahia	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 29.447	Bahia	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 29.440	Bahia	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 34.461	Santa Catarina	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>
UEL As 34.464	Santa Catarina	<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>

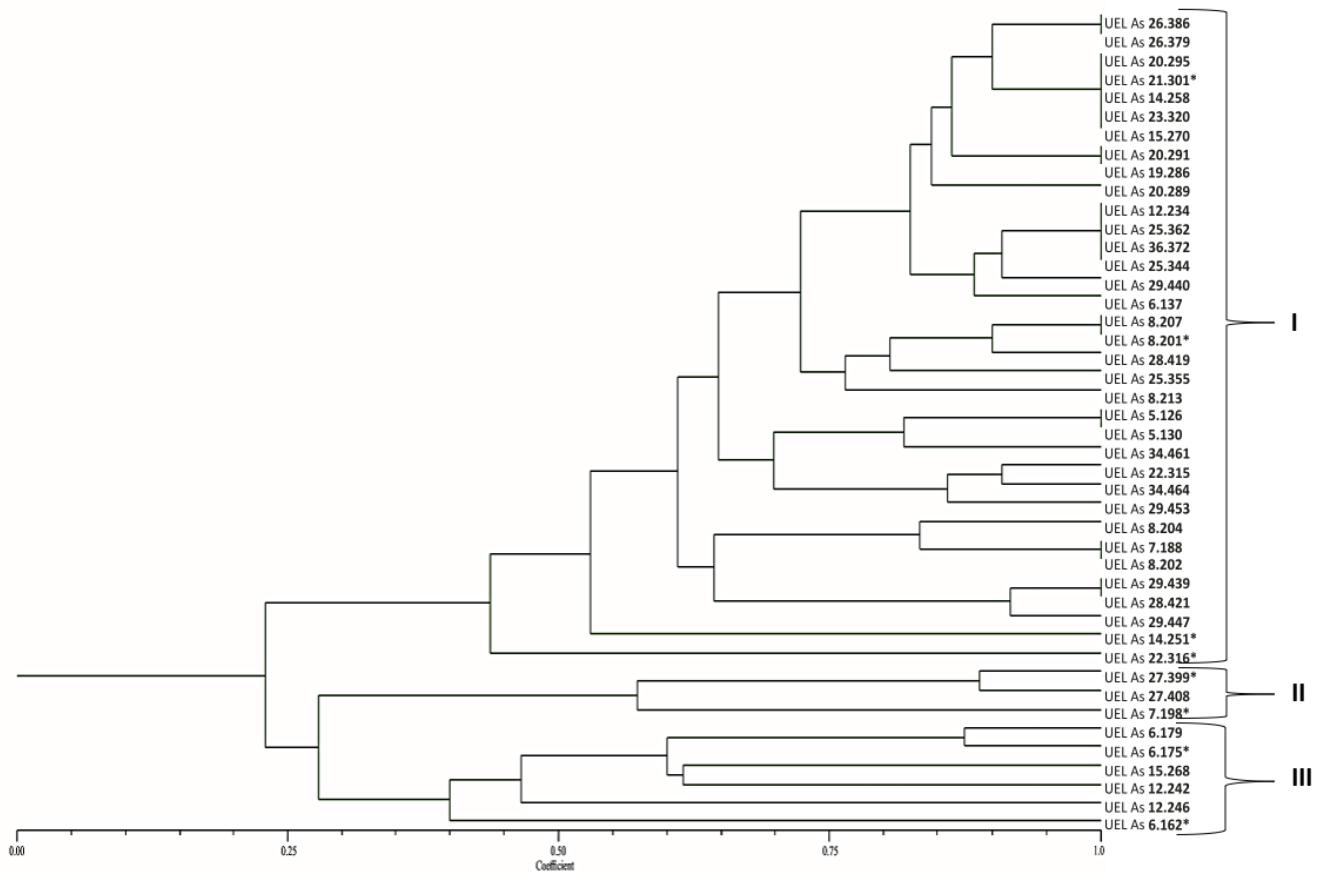


Figure 1. From RAPD using primers OPX7 and OPX1 a dendrogram was constructed based on data profile of 44 isolates of *Aspergillus* sections *Cremei*, *Circumdati* and *Flavi*, collected from garlic marketed in Brazil. The UPGMA method was used based on the similarity matrix, at 30% similarity the isolates were grouped into 3 clusters (I, II and III). The highlighted isolates* were selected for species sequencing and identification.

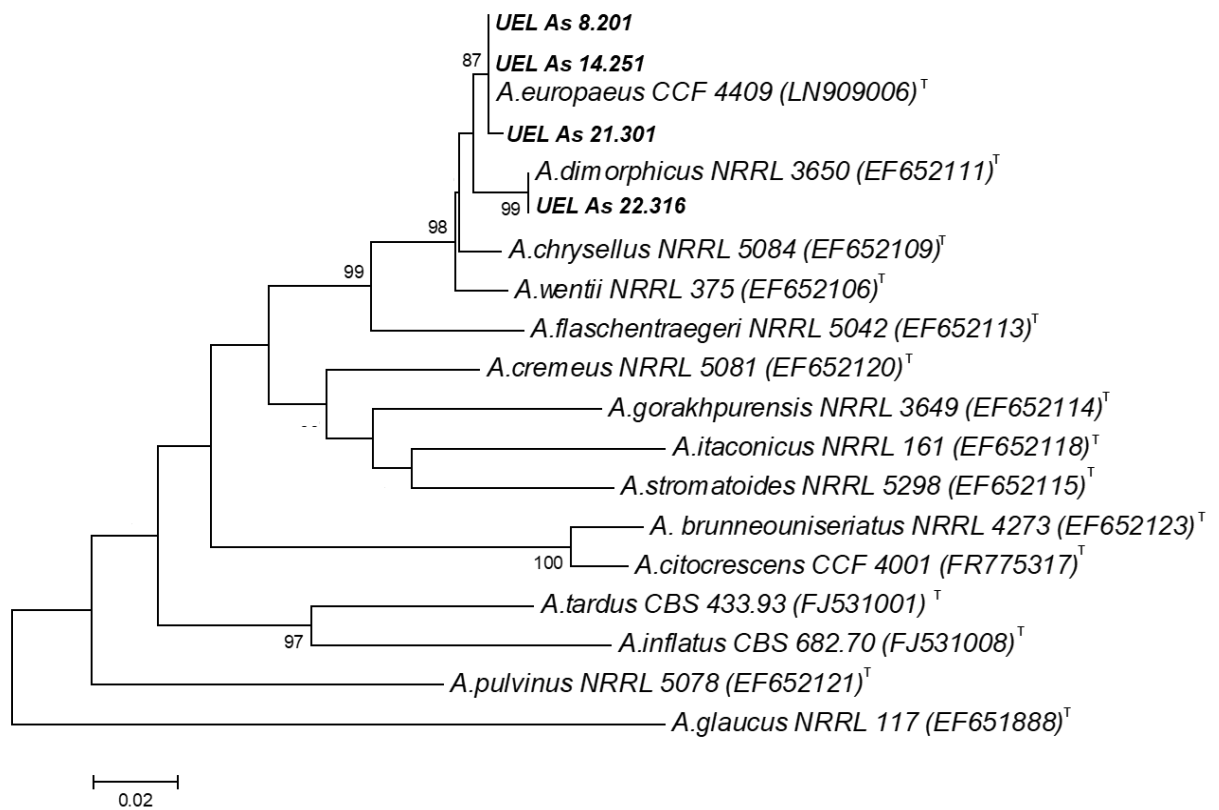


Figure 2. Phylogenetic tree constructed based on data for partial sequences for the β -tubulin gene (*BenA*) for *Aspergillus* section *Cremei*. Parameter of Kimura model (K2 + G), using distance data from the Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates (70% bootstrap values are represented), having *A. glaucus* as outgroup.

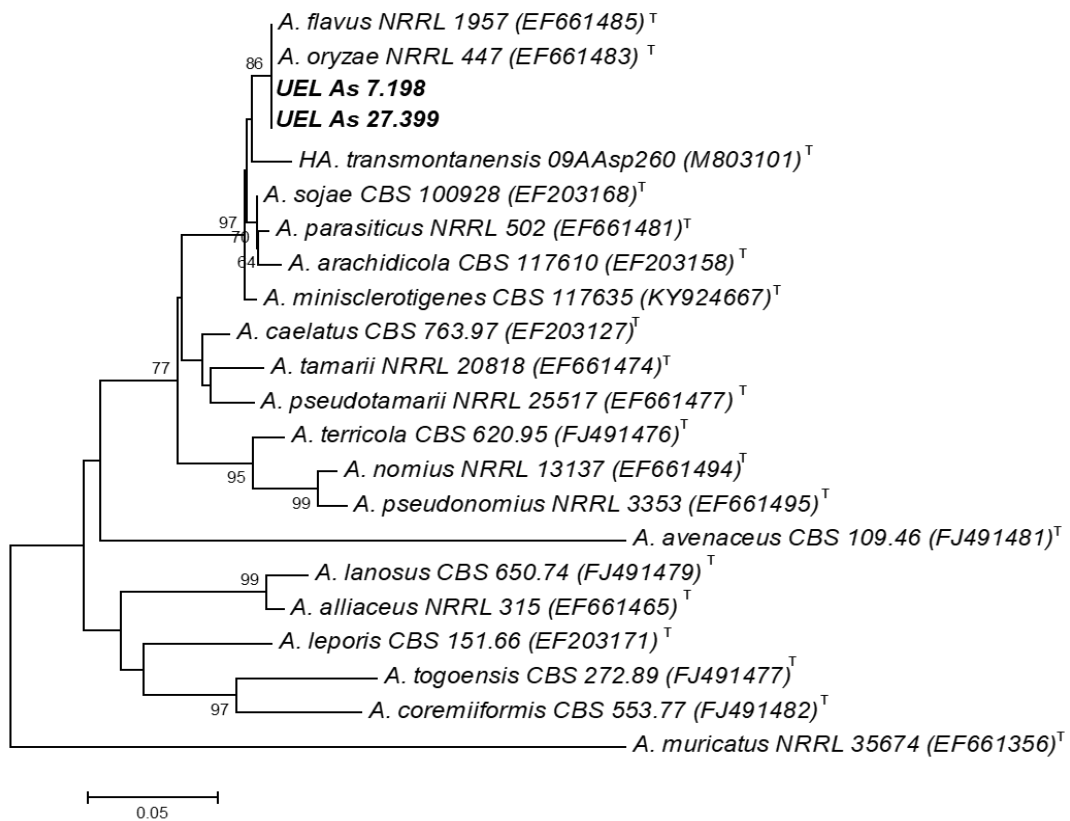


Figure 3. Phylogenetic tree constructed based on data for partial sequences for the β -tubulin gene (*BenA*) for *Aspergillus* section *Flavi*. Parameter of Kimura model (K2 + G), using distance data from the Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates (70% bootstrap values are represented), having *A. muricatus* as outgroup

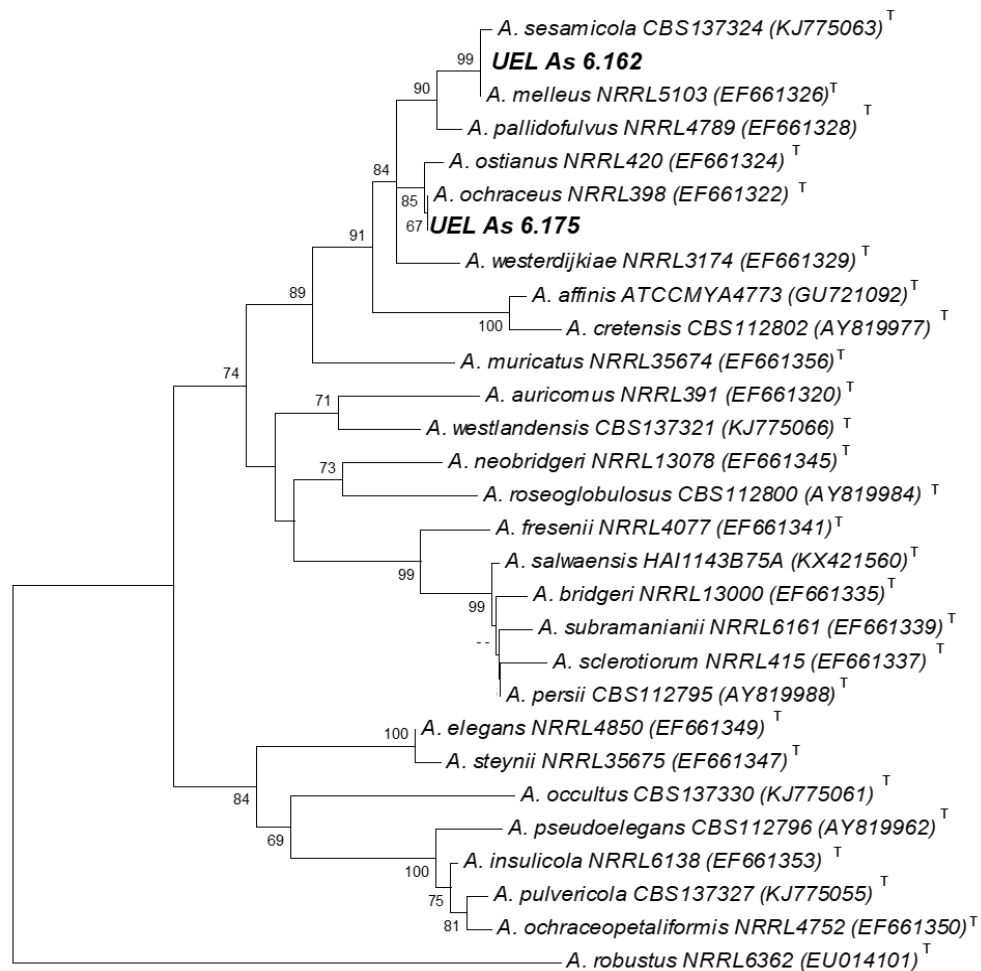


Figure 4. Phylogenetic tree constructed based on data for partial sequences for the β -*tubulin* gene (*BenA*) for *Aspergillus* section *Circumdati*. Parameter of Kimura model (K2 + G), using distance data from the Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates (70% bootstrap values are represented), having *A. robustus* as an outgroup.

Table 2. Evaluation of the potential production of amylases and lipases by strains of *Aspergillus* section *Cremeri*.

Strain	Amylase (EI)*	Lipase (EI)**
UEL As 5.126	1.43 ± 0.01 ^d	2.11 ± 0.01 ^b
UEL As 5.130	1.51 ± 0.00 ^d	1.91 ± 0.01 ^c
UEL As 6.137	-	0.62 ± 0.00 ^e
UEL As 7.188	1.44 ± 0.00 ^b	2.49 ± 0.00 ^a
UEL As 8.201	1.38 ± 0.00 ^c	1.98 ± 0.00 ^c
UEL As 8.202	1.49 ± 0.05 ^b	2.28 ± 0.00 ^b
UEL As 8.204	1.52 ± 0.00 ^d	2.09 ± 0.00 ^b

UEL As 8.207	1.55 ± 0.00 ^d	1.92 ± 0.00 ^c
UEL As 8.213	1.63 ± 0.00 ^c	2.20 ± 0.11^b
UEL As 12.234	1.41 ± 0.00 ^c	1.92 ± 0.02 ^c
UEL As 14.251	1.34 ± 0.01 ^d	2.46 ± 0.00^a
UEL As 14.258	1.18 ± 0.05 ^f	1.91 ± 0.00 ^c
UEL As 15.270	1.55 ± 0.00 ^c	1.96 ± 0.00 ^c
UEL As 19.286	1.40 ± 0.00 ^{ci}	2.00 ± 0.03^c
UEL As 20.289	1.50 ± 0.00 ^d	2.22 ± 0.00^b
UEL As 20.291	1.76 ± 0.00 ^d	1.88 ± 0.00 ^c
UEL As 20.295	1.48 ± 0.00 ^c	1.97 ± 0.01 ^c
UEL As 21.301	1.54 ± 0.03 ^c	1.86 ± 0.00 ^c
UEL As 22.315	1.44 ± 0.00 ^c	1.99 ± 0.01 ^c
UEL As 22.316	1.36 ± 0.00 ^a	2.46 ± 0.00^a
UEL As 23.320	1.54 ± 0.00 ^c	1.64 ± 0.00 ^d
UEL As 25.344	1.59 ± 0.00 ^c	1.98 ± 0.00 ^c
UEL As 25.355	1.59 ± 0.01 ^d	1.88 ± 0.00 ^c
UEL As 25.362	1.64 ± 0.00 ^c	2.19 ± 0.04^b
UEL As 26.372	1.26 ± 0.00 ^d	1.90 ± 0.01 ^c
UEL As 26.379	2.36 ± 0.01^c	2.09 ± 0.01^b
UEL As 26.386	1.77 ± 0.00 ^c	1.78 ± 0.01 ^c
UEL As 28.419	1.48 ± 0.00 ^d	2.12 ± 0.02^b
UEL As 28.421	1.26 ± 0.03 ^f	2.19 ± 0.10^b
UEL As 29.439	1.33 ± 0.00 ^c	2.16 ± 0.00^b
UEL As 29.440	1.47 ± 0.00 ^b	2.19 ± 0.01^b
UEL As 29.447	1.53 ± 0.00 ^c	2.14 ± 0.00^b
UEL As 29.453	1.45 ± 0.00 ^d	2.26 ± 0.00^b
UEL As 34.461	1.53 ± 0.00 ^c	2.23 ± 0.03^{bf}
UEL As 34.464	1.85 ± 0.01 ^c	2.19 ± 0.00^b

The values in bold represents the best producers for each compound. * Enzymatic index (EI) for the production of amylases; ** Enzymatic index (EI) for lipase production.