



UNICAMP

ALINE DE SOUZA LOPES

**CATALOGAÇÃO DAS ESPÉCIES POTENCIALMENTE
TOXIGÊNICAS DE *Aspergillus*: OCORRÊNCIA, TAXONOMIA
POLIFÁSICA, DISTRIBUIÇÃO E PRESERVAÇÃO.**

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALINE DE SOUZA LOPES

**CATALOGAÇÃO DAS ESPÉCIES POTENCIALMENTE
TOXIGÊNICAS DAS *Aspergillus*: OCORRÊNCIA, TAXONOMIA
POLIFÁSICA, DISTRIBUIÇÃO E PRESERVAÇÃO.**

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Pereira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ALINE DE SOUZA
LOPES E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ LUIZ PEREIRA**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Lopes, Aline de Souza, 1979-
L881c Catalogação das espécies potencialmente toxigênicas
de *Aspergillus*: ocorrência, taxonomia polifásica, distribuição e
preservação / Aline de Souza Lopes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Jose Luiz Pereira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Aspergillus*. 2. Coleção de culturas de fungos. 3.
Micotoxinas. 4. Identificação. 5. Polifásica. I. Pereira,
Jose Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Cataloging species of *Aspergillus* toxigenic potential:
occurrence, polyphasic taxonomy, distribution and preservation

Palavras-chave em inglês:

Aspergillus

Culture collection of fungi

Mycotoxins

Identification

Polyphasic

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

José Luiz Pereira [Orientador]

Marta Cristina Teixeira Duarte

Marta Hiromi Taniwaki

Data da defesa: 17-12-2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimento

Campinas, _____ de _____ de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Luiz Pereira (Orientador)

Universidade Estadual de Campinas – Titular

Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Universidade Estadual de Campinas – Titular

Dra. Marta Hiromi Taniwaki

Instituto de Tecnologia de Alimentos – Titular

Dr. Hector Abel Palacios Cabrera

Instituto de Tecnologia de Alimentos – Suplente

Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes

Faculdade de Jaguariúna – Suplente

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, pelo carinho e orientação, sem esta grande oportunidade, eu não conseguiria fazer o mestrado na área de Microbiologia.

À Dra. Beatriz Thie Iamanaka, por me aceitar, confiar e me orientar.

À Dra. Marta Taniwaki, por me aceitar e confiar.

Agradeço imensamente estas duas pesquisadoras do ITAL, pois acreditaram na minha capacidade, aceitaram minha experiência e minhas ideias, passaram seu conhecimento e me receberam não só com as portas abertas, mas com a bagagem científica, que inspira. Estou mais que completa e orgulhosa, por elas terem me dado este espaço, deixado trabalhar junto e confiado às culturas para que eu fizesse esta dissertação.

Agradeço ao Dr. Jens C. Frisvad da DTU pelas análises de metabólitos e a Dra. Maria Helena P. Fungaro pelas análises moleculares.

Ao Programa de pós-graduação de Ciência dos Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de ingresso no curso.

Ao Cosme e ao Marcos por sempre me auxiliar nas minhas dificuldades sobre os procedimentos a serem seguidos no programa da pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Fundação “André Tosello”, por ser a instituição que fez à Microbiologia ser parte da minha vida, Dra. Silvia, Inácia, Dra. Gisele, Fernanda e Patrícia (época de estágio) e Vilma, Dra. Iracema e Dr. Rodrigo (época de Analista), um agradecimento especial a Josiane Conti por encarar a viagem de ida e volta para ESALQ todos os dias, trabalhar comigo e por ser a grande incentivadora para que ingressasse no mestrado.

A Juliana Assunção que insistiu para que eu fizesse o curso Técnico de Alimentos e hoje são 8 anos de formação na área.

A Ligia Martins, da UEL, por ajudar nos momentos finais desta dissertação.

A Gisele Urbano, Marina Copetti e Thaianne Calderari.

Ao Instituto Tecnológico de Alimentos ITAL e a todas as pessoas que me ajudaram a completar esta caminhada: Camila, Larissa, Natalia, Raquel, Ana Valéria, Matheus, Silvia, Luciana, Victor, Adelaide, Gabriela, Fabiana, Sirene, Margarete, Daniela, Regina e a todos do ITAL.

A meu marido Junior, pela paciência e por ter assumido as responsabilidades da casa para que eu alcançasse mais este objetivo.

A minha família.

RESUMO

O gênero *Aspergillus* é um grupo de fungos que possui diversas espécies produtoras de micotoxinas, distribuídas principalmente em três seções denominadas de *Nigri*, *Flavi* e *Circumdati*. Estudos para isolamento destas espécies estão sendo executados para se conhecer a micobiota e atuar na prevenção e redução da contaminação dos alimentos, principalmente por micotoxinas, como também são úteis nas descobertas de novas espécies. A identificação de fungos, como o gênero *Aspergillus* sp foi, por muito tempo, realizada através de suas características morfológicas, sendo hoje amparadas por técnicas como a Biologia Molecular, fisiologia e detecção de metabólitos específicos produzidos pelos microrganismos. Com este objetivo, este trabalho apresenta o início do levantamento de dados relacionado à ocorrência, caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares, assim como a distribuição geográfica. A partir do isolamento de 10.048 cepas potencialmente toxigênicos de amostras de café, cacau, castanha do Brasil e frutas secas (tâmaras, uvas passas, figos e ameixas), matérias-primas de projetos desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 5.069 destes isolados foram preservadas em sílica gel, exigindo a catalogação dos dados. Neste acervo, a section *Flavi* predominou com o número de 2.507 culturas (32% destas cepas foram produtoras de aflatoxinas), seguida da section *Nigri* com 2.078 e 463 da section *Circumdati* que, somando, contribuíram com 11% de fungos produtores de ocratoxina A. Os *Aspergillus* da section *Nigri* apareceram em número considerável em todos os substratos, confirmando a sua predominância destes como contaminantes de alimentos. As amostras de castanha do Brasil contribuíram com o maior número de isolados, principalmente pela biodiversidade da floresta e colheita extrativista. Fungos que apresentaram estruturas diferenciadas, representantes de grupos com mesmas características, toxicidade ou espécies novas foram encaminhados para outros tipos de identificação. Duzentos e setenta e seis culturas foram identificadas por análise molecular, 435 pela extração de seus metabólitos e 87 espécies foram classificadas através da identificação polifásica. A distribuição das culturas apresentou representantes do Norte, Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil, sendo que o Pará e Amazonas contribuíram com 2.759, como também culturas originárias de amostras de outros países como Irã, Turquia, Tunísia, EUA, México, Espanha e Argentina. A rotina de uma coleção consiste em novos isolamentos, manutenção do acervo e atualização do banco de dados, um trabalho enriquecedor para a ciência e que nunca se encerra.

ABSTRACT

The genus *Aspergillus* is part of a fungi group with several species that produce mycotoxins, mainly distributed in three sections named *Nigri*, *Flavi* and *Circumdati*. Studies to isolate these microorganism types are being made to know the mycobiota and their function in prevention and reduction of food contamination, mainly by mycotoxins and also to discover new species. The *Aspergillus* fungi identification was for a long time made by morphological characteristics but now it is supported by techniques such as molecular biology, physiology and detection of microorganism metabolites. With the objective this work presents the beginning of data collection related to the occurrence, morphological, physiological, biochemical and molecular, as well as the geographic distribution. From the potentially toxigenic strains isolation of 10,048 samples of coffee, cocoa, Brazil nuts and dried fruit (dates, raisins, figs and prunes) raw materials for projects developed in the Laboratory of Microbiology, Institute of Food Technology (ITAL), 5069 of these isolates were preserved in silica gel, requiring cataloging data. In this collection section *Flavi* predominates with 2,507 cultures (32% of these strains are aflatoxin producers) followed by section *Nigri* with 2,078 and 463 of section *Circumdati* that together, contributes 11% of ochratoxin A fungi producing. The *Aspergillus* section *Nigri* showed a considerable number of all substrates, confirming its predominance and resistance as a food contaminant. Brazil nut samples contributed with the largest number of strains due to forest biodiversity and harvest extraction. Fungi that had differentiated structures, group representatives with similar characteristics, toxicity or new species were referred to other types of identification. Two hundred and seventy six isolates were identified by molecular analysis with 435 metabolites, 88 species of *Aspergillus* showed the two forms, being classified by polyphasic identification. The genus *Aspergillus* was identified widely from countries such as Iran, Turkey, Tunisia, USA, Mexico, Spain and Argentina. In Brazil there are representatives from the North, Northeast, South and Southeast, and Para and Amazonas states that contributed to 2,759 cultures. The collection routine consists of new insolation, collection maintenance and updating of the database, which is an undending task for the enrichment of science.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Gênero <i>Aspergillus</i>	2
2.1.1. <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	4
2.1.2. <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	5
2.1.3. <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	5
2.2. Micotoxina.....	6
2.2.1. Parâmetros Crescimento de Fungos e a Produção de Micotoxinas.....	7
2.2.1.1. Capacidade Genética - Estrutura Biológica.....	7
2.2.1.2. Composição Nutricional.....	8
2.2.1.3. Temperatura e Atividade de Água	8
2.2.1.4. Umidade	9
2.2.1.5. Interação com Outros Microrganismos.....	9
2.2.1.6. Potencial Hidrogeniônico (pH).....	10
2.2.1.7. Requerimento de Oxigênio	10
2.2.2. Estratégias de Controle – Micotoxinas	10
2.2.3. Aflatoxina	12
2.2.3.1. Efeitos Toxicológicos	13
2.2.3.2. Fungos Produtores de Aflatoxina	14
2.2.4. Ocratoxina	15
2.2.4.1. Efeitos Toxicológicos	17
2.2.4.2. Fungos Produtores de Ocratoxina A	17
2.3. <i>Aspergillus</i> em Alimentos	18
2.3.1. Café	19
2.3.2. Frutas Secas.....	20
2.3.3. Cacau	21
2.3.4. Castanha do Brasil	22
2.4. Métodos de Identificação Gênero <i>Aspergillus</i>	23
2.4.1. Métodos de Isolamento de Fungos	25
2.4.2. Morfologia.....	26
2.4.3. Identificação Molecular.....	27
2.4.4. Extração de Metabólitos Secundários	29

2.5. Catalogação de Dados	32
2.6. Métodos de Preservação para Fungos Filamentosos	33
2.6.1. Manutenção da Viabilidade do Microrganismo	34
2.6.1.1. Mudança da População por Seleção	34
2.6.1.2. Mutação Genética	34
2.6.1.3. Pureza	34
2.6.1.4. Custo	35
2.6.1.5. Número de Culturas a Serem Preservadas	35
2.6.1.6. Valor das Culturas	35
2.6.1.7. Fornecimento e Distribuição das Culturas	35
2.6.1.8. Frequência de Utilização das Culturas	35
2.6.2. Preservação Utilizando Secagem	36
2.6.2.1. Sílica Gel	36
2.6.2.2. Solo Estéril	36
2.6.2.3. Liofilização	36
2.6.3. Preservação Utilizando Congelamento	37
2.6.4. Preservação Utilizando Repiques	38
2.6.4.1. Método de Castellani	38
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo Principal	38
3.2. Objetivos Secundários	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Amostras	39
4.2. Isolamento dos Fungos Toxigênicos	39
4.3. Identificação Morfológica	39
4.4. Detecção da Produção de Aflatoxinas e Ocratoxina pelos Isolados	40
4.5. Extração e Identificação de Metabólitos	40
4.6. Identificação Molecular	41
4.6.1. Extração de DNA	41
4.6.2. Análise de RAPD	42
4.6.3. Amplificação Parcial dos Genes de β -Tubulina e Calmodulina	42
4.7. Técnicas de Preservação por Sílica Gel	43
4.8. Catalogação dos Dados	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

5.1. Levantamento dos Dados – Catalogação.....	44
5.1.1. <i>Aspergillus</i> Isolados e Preservados.....	45
5.1.1.1. <i>Aspergillus</i> subgênero <i>Circumdati</i>	46
5.1.2. Fungos Produtores de Micotoxinas	49
5.1.3. Identificação dos Fungos Isolados	50
5.1.4. Distribuição das Culturas.....	62
5.1.5. Biodiversidade	64
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	77
8. ANEXOS.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das Aflatoxinas.....	13
Figura 2. Estrutura das Ocratoxinas	16
Figura 3. Estrutura do estoque de culturas preservadas. Tubos com as culturas preservadas por sílica gel.....	44
Figura 4. Número de espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas e substratos	45
Figura 5. Número de <i>Aspergillus</i> distribuídos pelas seções <i>Nigri</i> , <i>Flavi</i> e <i>Circumdati</i>	46
Figura 6. Número de <i>Aspergillus</i> alocados nas section <i>Nigri</i> , <i>Flavi</i> e <i>Circumdati</i> preservados na coleção.....	47
Figura 7. <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> por tipo de amostra	47
Figura 8. <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> por tipo de amostra.	48
Figura 9. <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> por tipo de amostra	48
Figura 10. Porcentagem de <i>Aspergillus</i> produtores de micotoxinas relacionado ao total de isolados.....	49
Figura 11. Porcentagem de <i>Aspergillus</i> depositados produtores de micotoxinas. 50	
Figura 12. Distribuição dos <i>Aspergillus</i> Isolados em diferentes estados do Brasil que foram preservados.....	62
Figura 13. Distribuição mundial dos <i>Aspergillus</i> Isolados e preservados.....	63
Figura 14. <i>Aspergillus acidus</i> número ITAL 160 cB (castanha do Brasil).....	64
Figura 15. <i>Aspergillus aculeatus</i> número ITAL 1247 cc (cacau)	64
Figura 16. <i>Aspergillus carbonarius</i> número ITAL 1375 cB (castanha do Brasil)...	65
Figura 17. <i>Aspergillus bertholletius</i> número ITAL 7191 cB (castanha do Brasil)...	65
Figura 18. <i>Aspergillus foetidus</i> número ITAL 325 fs (frutas secas)	66
Figura 19. <i>Aspergillus bombycis</i> número ITAL 246 cB (castanha do Brasil).....	66
Figura 20. <i>Aspergillus ibericus</i> número ITAL 526 fs (frutas secas)	67
Figura 21. <i>Aspergillus caelatus</i> número ITAL 95 cB (castanha do Brasil)..	67
Figura 22. <i>Aspergillus melleus</i> número isolamento ITAL 151 cc (cacau).....	68
Figura 23. <i>Aspergillus flavus</i> número ITAL 62A cc (cacau).....	68
Figura 24. <i>Aspergillus niger</i> número ITAL 632 cc (cacau).....	69
Figura 25. <i>Aspergillus nomius</i> número isolamento ITAL 193 cB (castanha do Brasil)	

.....	69
Figura 26. <i>Aspergillus ochraceus</i> número ITAL 150 cc (cacau)	70
Figura 27. <i>Aspergillus parasiticus</i> número isolamento ITAL 720 cc (cacau)	70
Figura 28. <i>Aspergillus tubingensis</i> número ITAL 460 fs (frutas secas).	71
Figura 29. <i>Aspergillus pseudotamarii</i> número isolamento ITAL 791 cB (castanha do Brasil).....	71
Figura 30. <i>Aspergillus westerdijkiae</i> número ITAL 118 cf (café)	72
Figura 31. <i>Aspergillus tamarii</i> número ITAL 76 cB (castanha do Brasil).	72
Figura 32. <i>Aspergillus foetidus</i> – Imagem A - número ITAL 325 ³ fs (frutas secas), Imagem B - número ITAL 466* cf (café), Imagem C - número ITAL 479* cf (café)	73
Figura 33. <i>Aspergillus niger</i> - Imagem A - número ITAL 632* cc (cacau), Imagem B número ITAL 268 ² cB (castanha do Brasil).....	73
Figura 34. <i>Aspergillus caelatus</i> - Imagem A, B, C – números ITAL respectivamente 562*, 95 ² e 79 ¹ cB (castanha do Brasil) Imagem D – número ITAL 681 ¹ cc (cacau)	74
Figura 35. <i>Aspergillus flavus</i> - Imagem A e B - números ITAL respectivamente 58 ² e 31 ¹ cB (castanha do Brasil); Imagens C e D – números ITAL respectivamente 1216* e 62A ³ cc (cacau).....	74
Figura 36. <i>Aspergillus nomius</i> - Imagem A, B e C – números ITAL respectivamente 1325*, 193 ¹ e 1299* cB (castanha do Brasil)	75
Figura 37. <i>Aspergillus westerdijkiae</i> – Imagem A - número ITAL 118* cf (café) ; Imagem B número ITAL 94* cc (cacau).....	75
Figura 38. Árvore filogenética (castanha do Brasil), reconstruído a partir do gene β -tubulina sequências correspondentes de <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> - bancos de dados públicos.....	103
Figura 39. Árvore filogenética (castanha do Brasil), reconstruído a partir do gene calmodulina, sequências correspondentes de <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> - bancos de dados públicos	104
Figura 40. Árvore filogenética (frutas secas), reconstruído a partir do gene β -tubulina, sequências correspondentes de <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri Flavi</i> - bancos de dados públicos.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Novas espécies de <i>Aspergillus</i> das três principais seções micotoxigênicas descobertas desde 2000.....	3
Tabela 2. Medidas preventivas e corretivas para controle de micotoxinas.	11
Tabela 3. Fungos produtores de aflatoxinas.	15
Tabela 4. Possíveis métodos utilizados para identificação de fungos filamentos .	25
Tabela 5. Características para identificação fenotípica do gênero <i>Aspergillus</i>	26
Tabela 6. Resumo dos principais metabólitos secundários extraídos de espécies de <i>Aspergillus</i>	30
Tabela 7. Número de espécies identificadas por caracterização morfológica.....	51
Tabela 8. Espécies de <i>Aspergillus</i> Isolados identificados pelo método molecular	52
Tabela 9. Espécies de <i>Aspergillus</i> Isolados, identificados pelo método de extração de metabólitos secundários	54
Tabela 10. Espécies de <i>Aspergillus</i> Isolados com identificação polifásica..	59
Tabela 11. Principais características morfológica do gênero <i>Aspergillus</i>	101
Tabela 12. Extrólitos encontrados nas espécies de <i>Aspergillus</i>	102

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da distribuição de fungos toxigênicos em alimentos é uma ferramenta importante porque fornece parâmetros para o controle e a prevenção da produção de micotoxinas.

Os fungos do gênero *Aspergillus* estão distribuídos amplamente e são responsáveis por deteriorar alimentos e causar doenças em humanos e animais, mas por outro lado são microrganismos úteis na fermentação e em aplicações tecnológicas (SAMSON; VARGA, 2009). Várias espécies apresentam a característica de produzir metabólitos secundários importantes como esterigmatocistina, ácido ciclopiazônico, ácido kójico, sendo a mais recente descoberta a produção de fumonisina B2 por *Aspergillus niger* (FRISVAD *et al.*, 2007). Mas devido a ampla ocorrência, em diversos tipos de alimentos, duas micotoxinas se destacam para este gênero: as aflatoxinas, em especial a do tipo B1, considerada a micotoxina mais tóxica (FRISVAD *et al.*, 2006), e a ocratoxina A.

Embora o gênero, com mais de 260 espécies, seja estudado por vários séculos, a sistemática de identificação ainda está em fluxo (SAMSON; VARGA, 2009). Novas ferramentas estão sendo elaboradas para fornecer uma taxonomia mais estável às espécies difíceis de identificar, complementando a técnica por morfologia (CHALFON; BATISTA, 2003). A metodologia discutida atualmente é a utilização da combinação dos caracteres fenotípicos (morfologia, fisiologia e produção de extrólitos) com os dados moleculares das espécies, denominada de taxonomia polifásica. Estes métodos analisados separadamente podem gerar ocasionalmente resultados equivocados, sendo que juntos eles são muito eficazes para descoberta de novas espécies (FRISVAD *et al.*, 2007; SAMSON; VARGA, 2009).

Após a identificação das espécies, outro aspecto importante que deve ser levado em consideração para laboratórios que trabalham com fungos é a técnica de manutenção das cepas. Os centros de pesquisa onde microrganismos são isolados, cultivados e armazenados devem estabelecer um protocolo de registro de dados sobre as linhagens, de modo a permitir a busca de informações sobre o histórico, controle de qualidade, identificação, preservação, distribuição e outras características pertinentes ao acervo (WFCC, 1999).

Diversos protocolos e métodos de estocagem e preservação, que garantem a estabilidade da cepa para futuros estudos e utilização em testes estão disponíveis (MURO; LUCHI, 1989; KIRSOP, 1991; UMINO, 2000). Existem métodos como

criopreservação (congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e nitrogênio líquido) e liofilização que necessitam de um investimento alto em equipamentos e muito espaço para armazenar, assim como métodos mais simples que mantêm as características e são fáceis de manipular e ativar, como secagem em solo ou sílica gel, sendo que a sílica é muito indicada para o gênero *Aspergillus*, mantendo a estabilidade após períodos superiores a 10 anos de estocagem (SMITH; ONIONS, 1983).

Desta maneira o presente trabalho tem como objetivo, gerar um banco de dados e catalogar as informações das espécies preservadas de *Aspergillus*, isoladas de diversas amostras, do Laboratório de Microbiologia do ITAL, deixa visível a eficácia das formas de identificação e a junção destas à taxonomia polifásica, assim como a variabilidade da microbiota distribuída nos alimentos em diferentes localidades e a futura utilização destas linhagens para estudos de prevenção da contaminação nos alimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi caracterizado pela primeira vez em 1729 por Michele, na cidade de Florença, surgindo o nome por comparação do rearranjo dos esporos com um dispositivo usado na Igreja Católica para aspergir água benta (KLICH, 2006; SAMSON *et al.*, 2010).

De acordo com Klich e Pitt (1988) o gênero pertence à classe dos hifomicetos, e apresenta colônias em diferentes colorações, a partir das quais podem ser observadas estruturas de frutificação diferenciadas. Os conidióforos emergem de grandes hifas com paredes espessas, e terminam na forma de vesícula (geralmente esférica), de onde surgem somente métulas ou o conjunto de métulas e fiálides, local onde originam os conídios (esporos).

Os *Aspergillus* são capazes de crescer em temperaturas elevadas e em atividade de água mais baixa que os fungos do gênero *Penicillium*, possuem esporos mais resistentes à luz e a substâncias químicas, por isso conseguem competir com outros fungos pelo domínio na contaminação de alimentos (HOCKING, 2006), colonizando e induzindo doenças em plantas e produtos vegetais, podendo produzir metabolitos secundários tóxicos (Micotoxinas).

Tal como acontece com os fungos em geral, a taxonomia dos *Aspergillus* é complexa e em um processo de evolução constante. O gênero é facilmente identificado

pelo conidióforo, mas para a determinação da espécie são necessários especialistas (RODRIGUES *et al.*, 2007). Muitas espécies novas estão sendo descritas (vide Tabela 1) e um número elevado de novos métodos de classificação e identificação estão surgindo (SAMSON *et al.*, 2006).

Tabela 1 - Novas espécies de *Aspergillus* das três principais seções micotoxigênicas descobertas desde 2000.

Section	Espécie	Referência
Circumdati	<i>A. persii</i>	(ZOTTI; CORTI, 2002)
	<i>A. cretenses</i>	(FRISVAD <i>et al.</i> ,2004)
	<i>A. flocculosus</i>	
	<i>A. neobridgeri</i>	
	<i>A. pseudoelegans</i>	
	<i>A. roseoglobosus</i>	
	<i>A. steynii</i>	
	<i>A. westerdijkiae</i>	
Nigri	<i>A. costaricaensis</i>	(SAMSON <i>et al.</i> ,2004)
	<i>A. homomorphus</i>	
	<i>A. lactocoffeatus</i>	
	<i>A. piperis</i>	
	<i>A. sclerotioniger</i>	
	<i>A. vadensis</i>	(VRIES <i>et al.</i> ,2005)
	<i>A. ibericus</i>	(SERRA <i>et al.</i> ,2006)
	<i>A. brasiliensis</i>	(VARGA <i>et al.</i> ,2007)
	<i>A. uvarum</i>	(PERRONE <i>et al.</i> ,2007)
	<i>A. aculeatinus</i>	(NOONIM <i>et al.</i> ,2008)
	<i>A. sclerotiicarbonarius</i>	
	<i>A. eucalypticola</i>	(VARGA <i>et al.</i> ,2011b)
	<i>A. fijiensis</i>	
	<i>A. indologenus</i>	
	<i>A. neoniger</i>	
<i>A. saccharolyticus</i>	(SORENSEN <i>et al.</i> ,2011)	
Flavi	<i>A. bombysis</i>	(PETERSON <i>et al.</i> ,2001)
	<i>A. pseudotamarii</i>	(ITO <i>et al.</i> ,2001)
	<i>A. arachidicola</i>	(PILDAIN <i>et al.</i> ,2008)
	<i>A. minisclerotigenes</i>	
	<i>A. parvisclerotigenus</i>	(FRISVAD <i>et al.</i> ,2005)
	<i>A. pseudocaelatus</i>	(VARGA <i>et al.</i> ,2011)
	<i>A. pseudonomius</i>	
	<i>A. mottae</i>	(SOARES <i>et al.</i> , 2012)
	<i>A. sergii</i>	
	<i>A. transmontanensis</i>	
	<i>A. bertholletius</i>	(TANIWAKI <i>et al.</i> , 2012)

A última monografia completa do gênero *Aspergillus* (RAPER; FENNEL, 1965) continha 132 espécies, subdividida em 18 grupos. Atualmente a mesma apresenta mais 260 espécies (SAMSON; VARGA, 2009; VARGA *et al.*, 2011 a,b), divididos em oito subgêneros, que por sua vez são subdivididos em 18 seções (SAMSON *et al.*, 2010).

O subgênero *Circumdati* apresenta as seções *Nigri*, *Circumdati*, *Flavi* e *Cremeri* (SAMSON *et al.*, 2010), sendo que as três primeiras apresentam as principais espécies potencialmente toxigênicas (KLICH, 2006).

2.1.1. *Aspergillus* section *Nigri*

O grupo *Aspergillus* section *Nigri* são importantes em micologia de alimentos, biotecnológica e na área de saúde, são causadores de deterioração nos alimentos, e produtores de ocratoxina (algumas espécies), mas também são usados em processos fermentativos originando produtos como: antioxidantes (FANG *et al.*, 2007), enzimas hidrolíticas (amilases, lipases), ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido glucônico) (MAGNUSON; LASURE, 2004) e como catalisadores em processos de biotransformações de compostos químicos (SCHAUER; BORIS, 2004). *A. niger* é um fungo que possui o estatus de GRAS (“*Generally Recognized as Safe*” - Geralmente Reconhecido como Seguro) pelo “*Food and Drug Administration*” (E.U.A.) no que se refere a seu uso industrial (ABARCA *et al.*, 2004; SAMSON *et al.*, 2004; FRISVAD *et al.*, 2007; SAMSON *et al.*, 2007b; VARGA *et al.*, 2011b).

Embora a principal fonte de *Aspergillus* section *Nigri* seja o solo, os membros desta section foram encontrados em grãos, frutos, vegetais, entre outros.

A section *Nigri* é um dos grupos mais difíceis de classificação e identificação, e por causa disto foram propostos diversos esquemas taxonômicos. As recentes abordagens moleculares têm mostrado que há uma elevada biodiversidade de espécies, aumentando o uso do conceito de identificação polifásica (SAMSON *et al.*, 2006).

As principais características fenotípicas desta section são a coloração negra das colônias, sendo que o subgrupo unisseriado difere significativamente na morfologia e na fisiologia do subgrupo bisseriado (NOONIM *et al.*, 2008; PERRONE *et al.*, 2008; SAMSON; VARGA, 2009).

Em 2008, os *Aspergillus* section *Nigri* possuíam 19 espécies reconhecidas (FRISVAD *et al.*, 2007; PERRONE *et al.*, 2007; NOONIM *et al.*, 2008) e atualmente, com as novas descobertas, existem 26 (VARGA *et al.*, 2011b).

2.1.2. *Aspergillus section Flavi*

Aspergillus section Flavi, algumas espécies podem ser unisseriados e outras são bisseriados (métula e fialíde), com conídios geralmente nas colorações de verde amarelado ao marrom escuro e são capazes de produzir esclerócio. Algumas espécies são produtoras de micotoxina, incluindo aflatoxina, ácido ciclopiazônico, ocratoxina e ácido kójico (substância que tem a capacidade de clarear manchas na pele, usada em cosméticos) (VARGA *et al.*, 2011a). São também utilizadas em processos fermentativos e como hospedeiro para expressão de genes heterólogo (CAMPBELL-PLATT; COOK, 1989). Cepas geneticamente modificadas de *A. oryzae*, são utilizadas para a produção de enzimas, incluindo a lactase, pectina esterase, lipase, protease e xilanase (PARIZA; JOHNSON, 2001).

A taxonomia deste grupo de fungos é ainda muito complexa. A classificação até espécie pode ser difícil devido a extensas divergências de caracteres morfológicos com o nível elevado de variabilidade genética (KUMEDA; ASAO 1996; FRISVAD *et al.*, de 2005, PILDAIN *et al.*, 2008).

Raper e Fennell (1965) descreveram, principalmente com base nos ornamentos e na cor dos conídios, o grupo dos *Aspergillus flavus* com duas variáveis, totalizando 9 espécies. Em 2006, eram reconhecidas 18 espécies, sendo duas destas “domesticadas” (podem ser utilizadas para fermentação, não produtores de micotoxina) (SAMSON *et al.*, 2006). Atualmente, a seção está agrupada em sete subtipos com 22 espécies (VARGA *et al.*, 2011a).

2.1.3. *Aspergillus section Circumdati*

Os membros de *Aspergillus section Circumdati* (o grupo do *Aspergillus ochraceus* de Raper e Fennell 1965) são importantes devido à produção de micotoxinas, incluindo a ocratoxina A, ácido penicílico, xantomegnina, viomeleína e vioxantina (FRISVAD *et al.*, 2004). Algumas das espécies estão sendo usadas na indústria de biotecnologia, especialmente para biotransformações (MISKI; DAVIS, 1988).

São fungos que tem como habitat o solo, principalmente de áreas tropicais e subtropicais. Em alimentos, foram encontrados em frutos, grãos (cereais e sementes) e ambientes de secagem. As principais características fenotípicas apresentadas são a coloração de ocre a amarelada das colônias, a cabeça conidial bisseriada e a capacidade de produzir esclerócio, algumas espécies (CHALFON; BATISTA, 2003).

O grupo foi taxonomicamente revisto por Christensen (1982), após o descobrimento de duas novas espécies *A. bridgeri* e *A. campestris*. Varga *et al.* (2000) apresentou resultados de variabilidade de genética entre *Aspergillus ochraceus*, e Frisvad *et al.* (2004) inseriram sete novas espécies (*A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. neobridgeri*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae*) com os resultados de extrólitos. Atualmente o número de espécies na section *Circumdati* é de 20, incluindo *A. robustus* (SAMSON *et al.*, 2006).

2.2. Micotoxinas

As micotoxinas são produtos tóxicos do metabolismo secundário, produzidas a partir das vias metabólicas dos policetídeos, terpenóides e de alguns processos que usam aminoácidos essenciais. Possuem baixo peso molecular e estruturas químicas diversificadas (BOZZA; 2010).

As toxinas fúngicas diferem muito nas suas propriedades químicas, biológicas e toxicológicas, e possuem como piores efeitos o desencadeamento de diversos tipos de tumores e a imunossupressão (IARC, 1993; PETSKA; BONDY, 1994).

Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina bem como uma única espécie pode produzir mais de um tipo (HUSSEIN; BRASSEL, 2001; MAZIERO; BERSOT, 2010).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana através do consumo dos alimentos contaminados ou indiretamente através de animais que se alimentam com rações previamente contaminadas, excretando os metabólitos hidroxilados no leite, na carne e nos ovos (MAZIERO; BERSOT, 2010). Ao serem ingeridas, apesar da maior parte ser metabolizada e eliminada através de fluidos biológicos, podem se fixar aos tecidos afetando órgãos específicos (sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso os mais atingidos) sem provocar alterações evidentes nos demais (PERAICA *et al.*, 1999; SANTURIO, 2000).

A gravidade de uma intoxicação depende de fatores como: toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, como também efeitos sinérgicos com outros agentes químicos (BHATNAGAR *et al.*, 2002, PERAICA *et al.*, 2000), podendo ser aguda (letal ou não) ou crônica. O efeito agudo é de ação rápida, podendo levar à morte, causa alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses elevadas. O efeito crônico é o resultado de doses menores durante um longo período de tempo, que provocam distúrbios e alterações nos órgãos dos humanos e dos

animais (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003; MURPHY *et al.*, 2006; SHEPHARD, 2008; MAZIERO; BERSOT, 2010).

Embora aproximadamente 300 micotoxinas diferentes tenham sido identificadas, apenas 20 tipos aparecem com frequência e em quantidades suficientes para oferecer risco à saúde (KABAK *et al.*, 2006; SAMSON *et al.*, 2010 ; BOZZA 2010) e somente aflatoxinas, alcalóides (ergotamina), fumonisinas, ocratoxina A, patulina, tricotecenos e zearalenona possuem limites máximos em legislação (SAMSON; VARGA, 2009).

Inúmeras espécies de *Aspergillus* têm sido listadas como capazes de produzir metabólitos tóxicos como as micotoxinas (FRISVAD *et al.*, 2007; SAMSON; VARGA, 2009), destacando-se dois grandes grupos: as aflatoxinas e ocratoxinas.

2.2.1. Parâmetros Ecológicos para o Crescimento de Fungos e a Produção de Micotoxinas

Para os fungos se desenvolverem e produzirem micotoxina é necessário avaliar fatores como:

- Susceptibilidade do substrato à colonização do fungo toxigênico (composição nutricional, pH e potencial de oxido-redução);
- Fatores físicos: temperatura do ambiente, atividade de água, umidade relativa do ar, aeração, composição gasosa e danos mecânicos;
- Fatores biológicos: capacidade genética do fungo de produzir micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos existentes no mesmo substrato, interação de micotoxinas e presença de insetos (CIEGLER, 1978; PEREIRA *et al.*, 2002; AQUINO, 2007; MAZIERO; BERSOT, 2010).

Esses fatores não atuam isoladamente sobre os microrganismos, mas sim de forma combinada (KLISCH, 2007). A seguir estão detalhados os principais fatores que influenciam a produção de toxinas.

2.2.1.1. Capacidade Genética - Estrutura Biológica

O gênero *Aspergillus*, por natureza é um fungo com esporos mais resistentes à luz e a substâncias químicas (HOCKING, 2006), características que possibilitam maior competitividade e permanência no alimento.

A composição genética influencia na possibilidade do fungo produzir, ou não, o tipo e quantidade de micotoxina (SERRA, 2005).

2.2.1.2. Composição Nutricional

Os alimentos sempre foram fonte de crescimento para os microrganismos. Um dos fatores que permite a um tipo proliferar mais intensamente que outros é a composição do substrato (JAY, 2005). As bactérias preferem alimentos com altos teores de proteínas, enquanto para o metabolismo dos fungos, a necessidade maior consiste em um alto teor de carboidratos (PITT; HOCKING, 2009).

No laboratório, para estimular a produção da toxina, são acrescentados aos meios de cultura fontes de nitrogênio, como extrato de levedura e peptona. Em condições naturais, nos alimentos, são vários os nutrientes e sais minerais em estudo que podem desencadear a produção de micotoxinas. As aflatoxinas são produzidas quando o alimento contém glicose, sacarose (carboidratos) e ácidos graxos (KLICH, 2007). A ocratoxina A está geralmente presente em alimentos que possuem uma boa quantidade de proteínas, como prolina e ácido glutâmico (FERREIRA, 1968; HAGGBLOM; GHOSH, 1985; COPPETTI, 2009).

Outro fator relevante em relação à composição dos alimentos é que geneticamente algumas plantas possuem características de defesa, como produção de substâncias inibitórias tanto para o crescimento do fungo toxigênico como para a produção de toxina, agindo na população contaminante, mesmo quando nutricionalmente é susceptível (STRANGE, 1991; PACHECO; SCUSSEL, 2007).

2.2.1.3. Temperatura e Atividade de Água

Existem temperaturas ótimas, mínimas e máximas para o crescimento de fungos toxigênicos, assim como uma temperatura ótima para a produção de toxinas. A maioria dos fungos toxigênicos desenvolvem-se entre 5 e 60°C, enquanto a faixa de temperatura para crescimento e produção de micotoxinas encontra-se geralmente entre 25 e 40°C (MOSS, 1991; PITT; HOCKING, 2009).

Existe uma relação direta entre temperatura e atividade de água para desenvolvimento fúngico. Quando o fungo encontra-se presente na temperatura ótima de crescimento o requerimento de atividade de água pode estar no mínimo. A necessidade de água quando a condição de estresse é a alta temperatura (PITT; HOCKING, 1997; MOSS, 2006; COPETTI, 2009).

A atividade de água está relacionada ao crescimento microbiológico e as reações bioquímicas (PARK *et al.*, 2001), e é o fator ambiental dominante que pode determinar a estabilidade ou a deterioração de um alimento (PITT; HOCKING, 2009). Existe uma diferença entre a atividade de água mínima requerida para crescimento microbiano e para produção de micotoxinas. No caso do *A. ochraceus*, o valor mínimo de atividade de água para crescimento é em torno de 0,77 - 0,80 enquanto a produção de OTA é requerido um mínimo de 0,83 - 0,99, com ótimo a 0,98 - 0,99 (PITT; HOCKING, 1997; CALDERARI, 2011), *A. flavus* necessita de atividade de água de 0,78 – 0,80 para crescimento e 0,83 – 0,87 para a produção da aflatoxina (BULLERMAN *et al.*, 1984).

Para manter a segurança em relação à contaminação por micotoxinas é aconselhado armazenar alimentos com o valor de atividade de água em torno de 0,70, já que poucos fungos conseguem se desenvolver abaixo deste valor (BULLERMAN *et al.*, 1984).

2.2.1.4. Umidade

A umidade dos alimentos, quando elevada, favorece o crescimento de microrganismos, sendo que a preocupação em relação a este fator não está relacionado somente à quantidade de água presente no alimento como também à umidade relativa do ar, pois há uma tendência ao equilíbrio entre as duas, fazendo com que o método de secagem para a preservação seja prejudicado (GAVA *et al.*, 2008).

Os principais fungos produtores de toxinas são capazes de crescer em substrato com 13 a 18% de umidade (BAPTISTA *et al.*, 2004). Trucksess *et al.* (1988), constataram que a umidade mínima para o crescimento do *A. flavus* é em torno de 16 %.

2.2.1.5. Interação com Outros Microrganismos

Os fungos, geralmente, são os últimos colonizadores de um alimento que favorece o crescimento de diversos microrganismos. Há indícios de que a produção de micotoxinas é prejudicada pelo fator ambiental de competição. Bactérias lácticas, como *Lactobacillus casei* ou *Streptococcus lactis* têm a capacidade de diminuir o crescimento fúngico e a produção de aflatoxina do *A. parasiticus* (NORTHOLT; BULLERMAN, 1982), através da inibição da biossíntese da micotoxina (BOVO *et al.*, 2010). Leveduras como *Pichia guilliermondii*, *Kluyveromyces* sp, *Saccharomyces cerevisiae* e os fungos, *A. oryzae*, *A.*

niger e *Rhizopus oryzae*, agem também na inibição do crescimento do gênero *Aspergillus* (PRADO *et al.*, 2008).

2.2.1.6. Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH é um dos fatores determinantes para que os fungos consigam competir melhor por um substrato, principalmente por serem microrganismos que toleram valores baixos.

A.flavus, *A.parasiticus* e *A.carbonarius* conseguem crescer em ambientes com pH 2,0 à 2,4. A produção de aflatoxina, pelo *A.parasiticus*, e ocratoxina A, pelo *A.ochraceus* pode ser iniciada em pH 3,5 e 5,5 respectivamente (PITT; HOCKING, 2009).

2.2.1.7. Requerimento de Oxigênio

Fungos são microrganismos aeróbios, sendo que algumas espécies conseguem crescer em baixas concentrações de oxigênio (até 0,2%). A presença em excesso de nitrogênio e dióxido de carbono prejudica tanto a produção de micotoxina quanto o crescimento fúngico (PASTER; BULLERMAN, 1988; PITT; HOCKING, 2009). *A. flavus* exposto a uma concentração de 20% de oxigênio e 60% de dióxido de carbono não produziram aflatoxinas (LANDERS *et al.*, 1967). A atmosfera modificada de 25 a 50% de dióxido de carbono, não interferiu na produção de ocratoxina A pelo *A. carbonarius*. *A. ochraceus* cresceu em atmosfera de 20% de oxigênio e 60% de dióxido de carbono e a produção de ocratoxina A foi inibida com uma concentração de 30% de dióxido de carbono (PASTER *et al.*, 1983).

2.2.2. Estratégias de Controle - Micotoxinas

As micotoxinas estão em destaque tanto no mercado interno como no externo. Alimentos contaminados são considerados um risco a para saúde humana e animal e por isso vários métodos, não somente para evitar a contaminação, como também para destoxificar os alimentos estão em andamento.

Na Tabela 2 são apresentados as principais estratégias de controle discutidas atualmente. Algumas estão em estudo, ou apresentam certa eficiência para determinadas

toxinas e para outras não, ou ainda têm efeitos indesejáveis para alguns tipos de alimentos.

Tabela 2. Medidas preventivas e corretivas para controle de micotoxinas. Adaptada de: Riley; Norred (1999); Galvano *et al.* (2001); Aziz; Moussa (2002) Bennett; Klich (2003); Dohlman (2003); Lee; Jun-Ho (2006), Abrunhosa (2008); Calderari (2011).

Preventivas	
Pré-Colheita	Correta irrigação, fornecimento de nutrientes e proteção contra insetos (evitar danos).
	Eliminar resíduos agrícolas.
	Rotação de cultura.
	Variedades resistentes à contaminação fúngica.
	Aplicação de agentes químicos – fungicidas.
	Controle biológico na plantação (insetos, microrganismos etc).
Pós-Colheita	Colheitas feitas no tempo seco (chuvas aumentam umidade e favorecem o crescimento dos fungos).
	Remoção dos grãos danificados.
	Secagem adequada (abaixo de 10% umidade) antes da estocagem.
	Manter as condições de temperatura e umidade adequadas durante o armazenamento.
	Controle de pragas e limpeza dos armazéns e máquinas que entram em contato com o alimento.
	Aplicação de agentes químicos – fungicidas como ácido propiônico e acético.
Corretivas	
Físicos	Exposição à lâmpada ultravioleta – grãos que fluorescem devem ser se parados e descartados.
	Microondas (eficiente para tricotecenos), degradação solar (eficiente para aflatoxina), extrusão (eficiente para fumoniosina) e torrefação.
	Moagem úmida.
	Radiação Gama (ainda em estudo).
Químicos	Hidrólise alcalina.
	Utilização de bissulfito, amônia, peróxido de hidrogênio/bicarbonato de sódio.
	Ozônio.
Biológicos	Bactérias lácticas.
	Fermentação.
Adsorventes e intervenção dietética	Aditivos nutricionais como colina, metionina, selênio, vitaminas, proteínas, gorduras, antioxidantes e indutores de enzimas metabólicas, produtos adicionados principalmente em rações para prevenir toxicidade aguda - sequestrar e diminuir a biodisponibilidade das micotoxinas no trato gastrointestinal.
	Adsorventes como aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado, carvão ativado, bentonites, zeólitos e parede celular de levedura.

2.2.3. Aflatoxinas

Aflatoxinas são as micotoxinas mais amplamente estudadas (JAY, 2005), por serem compostos de alto risco à saúde humana e animal (WOOD, 1992; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Em 1960, na Inglaterra, foram relatadas as primeiras pesquisas em relação a esta micotoxina, devido ao caso “Turkey X Disease” onde perus e patos morreram intoxicados após serem alimentados com amendoim (ingrediente base da ração destes animais), provenientes do Brasil e da África, (HUSSEIN; BRASEL, 2001). No ano seguinte, cepas de *A. flavus* foram isoladas destas amostras e a toxina elucidada por técnicas cromatográficas (LEESON *et al.*, 1995; ROSMANINHO *et al.*, 2001; KELLER *et al.*, 2005).

Atualmente, são conhecidos 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém as mais importantes são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (COULOMBE *et al.* 1991; PAYNE; BROWN 1998; BENNETT; KLICH 2003; YU *et al.*, 2004; PERRONE *et al.*, 2007).

Quimicamente, são moléculas de dihidrofuranos unidas a anéis cumarínicos e, assim como outros compostos heterocíclicos fluorescem (luz ultravioleta a 365 nm) e são distinguidos por suas propriedades fluorescentes: AFB1 e AFB2 apresentam fluorescência azul violeta, enquanto as AFG1 e AFG2 apresentam fluorescência azul esverdeada (HUSSEIN; BRASEL, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001; KELLER *et al.*, 2005; KLISCH, 2007; UTPATEL, 2007).

São compostos de natureza cristalina, instáveis à luz, muito estáveis a alta temperatura (termoestáveis) e solúveis em solventes polares como clorofórmio e metanol. Apesar das aflatoxinas serem semelhantes, a AFB1 apresenta o maior grau de toxicidade, sendo o mais potente carcinógeno natural conhecido, e geralmente é o tipo produzido em maior quantidade pelas cepas toxigênicas (FRISVAD *et al.*, 2005; KLISCH, 2007), seguida por AFG1, AFB2 e AFG2 (LEESON *et al.*, 1995). O fígado é o principal órgão atingido após uma ingestão aguda por aflatoxinas, contudo, as mesmas são encontradas em outros tecidos e produtos animais, sendo o exemplo mais efetivo deste tipo de contaminação as aflatoxinas M1 e M2, que são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B1 e B2, presentes no leite e em produtos derivados obtidos de animais que ingeriram ração contaminada com estas micotoxinas (ROSMANINHO *et al.*, 2001).

A estrutura das aflatoxinas é mostrada na Figura 1.

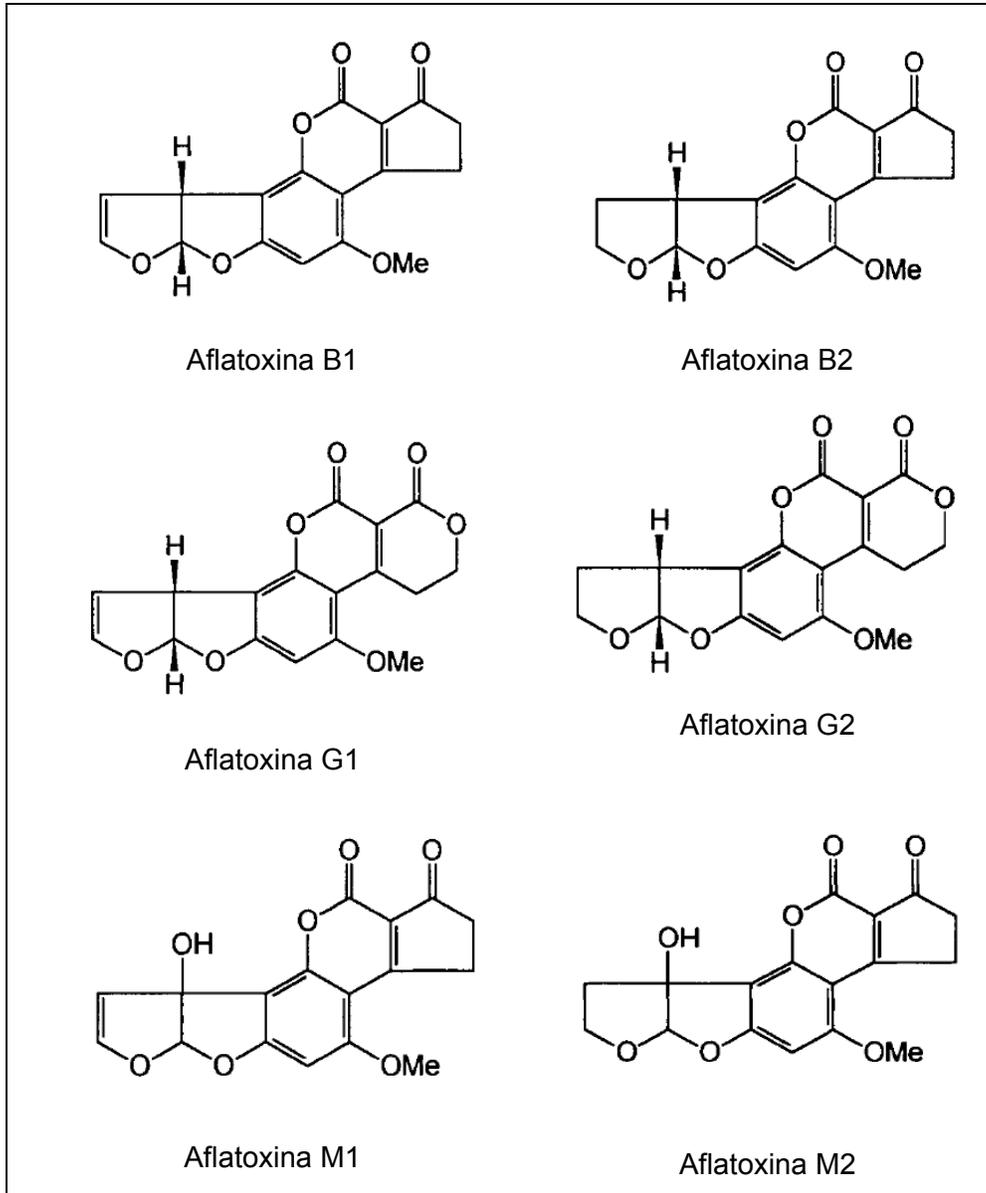


Figura 1. Estrutura Aflatoxinas (COLE; SCHWEIKERT, 2003a).

2.2.3.1. Efeitos Toxicológicos

Aflatoxinas constituem um risco a saúde humana e animal, por causa de seus efeitos tóxicos imediatos, imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (IARC, 2002; BINDER *et al.*, 2007; MAZIERO; BERSOT, 2010), sendo que, infelizmente, ainda não está determinada exatamente uma dose letal para humanos (SANTOS; SILVA, 2010).

Os sintomas agudos e crônicos da intoxicação por aflatoxina incluem diarreia, podendo ser sanguinolenta, cirrose (necrose e aumento do fígado), síndrome de Reye

(encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragia nos rins, diminuição do sistema imunológico (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; MOSS, 2002), perda de apetite e peso e problemas neurológicos. Exposições prolongadas a baixas doses resultam em tumores no fígado, prejudicam o sistema nervoso central, causam doenças de pele e problemas hormonais (PITT, 1989).

Elas são facilmente absorvidas no trato gastrointestinal, caindo na corrente sanguínea (facilidade de se ligar com eritrócitos e proteínas plasmáticas) (PACHECO; SCUSSEL, 2006), chegando a órgãos como rins, músculos, tecidos adiposos e no fígado, onde ocorre a biotransformação, devido à alta permeabilidade da toxina com a membrana do hepatócito (BIEHL; BUCK, 1987; FORRESTER *et al.*, 1990; OLIVEIRA; GERMANO, 1997; FERREIRA *et al.*, 2006; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A biotransformação de AFB₁, particularmente, tem sido estudada com maior interesse. Além de ter a maior ação carcinogênica não somente em humanos e primatas como pássaros, peixes e roedores, do que as outras aflatoxinas (FERREIRA *et al.*, 2006; REDDY *et al.*, 2006; SANTOS; SILVA, 2010), ela também tem a capacidade de se transformar em um reservatório metabólico no organismo, chamado de aflatoxicol, que quando exposta à oxidação transforma-se em um radical de alta covalência ligando-se aos ácidos nucleicos causando alterações genéticas (iniciação do processo tumoral) (DILKLIN, 2002).

2.2.3.2. Fungos Produtores de Aflatoxinas

As espécies produtoras de aflatoxinas são *A. flavus*, produtores de aflatoxinas do grupo B e algumas vezes ácido ciclopiazônico (CPA), *A. parasiticus* e *A. nomius*, produtores de aflatoxinas do grupo B e G e não produtoras de CPA (KLICH; PITT, 1988; PITT, 1993). Frisvad *et al.* (2006) revisaram os fungos produtores de aflatoxinas descritas na literatura e confirmaram as espécies mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Fungos produtores de aflatoxinas confirmadas por Frisvad *et al.* (2006).

Espécie	Micotoxinas
<i>Aspergillus flavus</i>	40% aflatoxina B 50% ácido ciclopiazônico (CPA)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Quase 100% aflatoxina B e G
<i>Aspergillus nomius</i>	Geralmente aflatoxina B e G
<i>Aspergillus bombycis</i>	Aflatoxina B e G
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	Aflatoxina B, CPA
<i>Aspergillus toxicarius</i>	Aflatoxina B e G
<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	Aflatoxina B e G CPA
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Aflatoxina B, esterigmatocistina
<i>Aspergillus rambellii</i>	Aflatoxina B, esterigmatocistina
<i>Emericella astellata</i>	Aflatoxina B, esterigmatocistina
<i>Emericella venezuelensis</i>	Aflatoxina B, esterigmatocistina

2.2.4. Ocratoxinas

Existem, no mínimo, sete compostos relacionados estruturalmente (derivados de isocumarinas) denominados de ocratoxinas, (BUSBY JR; WOGAN, 1981; IAMANAKA, 2004), sendo que as três mais reconhecidos são OTA, OTB e OTC ou etil de OTA. A ocratoxina A (OTA) é a mais encontrada na natureza é a mais tóxica de todas as ocratoxinas, seguida pela ocratoxina B (OTB), que não possui o átomo de cloro na molécula, sendo de 10 a 20 vezes menos tóxica que a OTA, e por último a ocratoxina C (OTC) (O'BRIEN; DIETRICH, 2005).

As ocratoxinas caracterizam-se por possuir uma estrutura molecular composta em uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina, mediante uma ligação amida, tornando-se um composto termoestável, solúvel em solventes orgânicos e fracamente solúvel em água (BOZZA, 2010).

A ocratoxina A apresenta fluorescência verde quando exposta à luz ultravioleta e possui uma molécula de cloro em sua estrutura, responsável por seu caráter tóxico (EDWARDS *et al.*, 2002).

A OTA foi isolada pela primeira vez em 1965, por Van der Merwe, de uma cultura de *A. ochraceus*, derivando daí a sua designação (WELKE *et al.*, 2009). Conhecida por suas características carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas e imunotóxicas em células animais (IARC, 1993; BATISTA *et al.*, 2007), é uma micotoxina que persiste no

organismo por um longo período, tendo uma meia vida de 35 dias em humanos (RIBEIRO, 2007). O elevado tempo médio de vida da OTA em diferentes animais ocorre devido à sua grande afinidade com algumas proteínas do plasma sanguíneo, essencialmente a albumina (BOZZA, 2010).

A estrutura da ocratoxinas é mostrada na Figura 2.

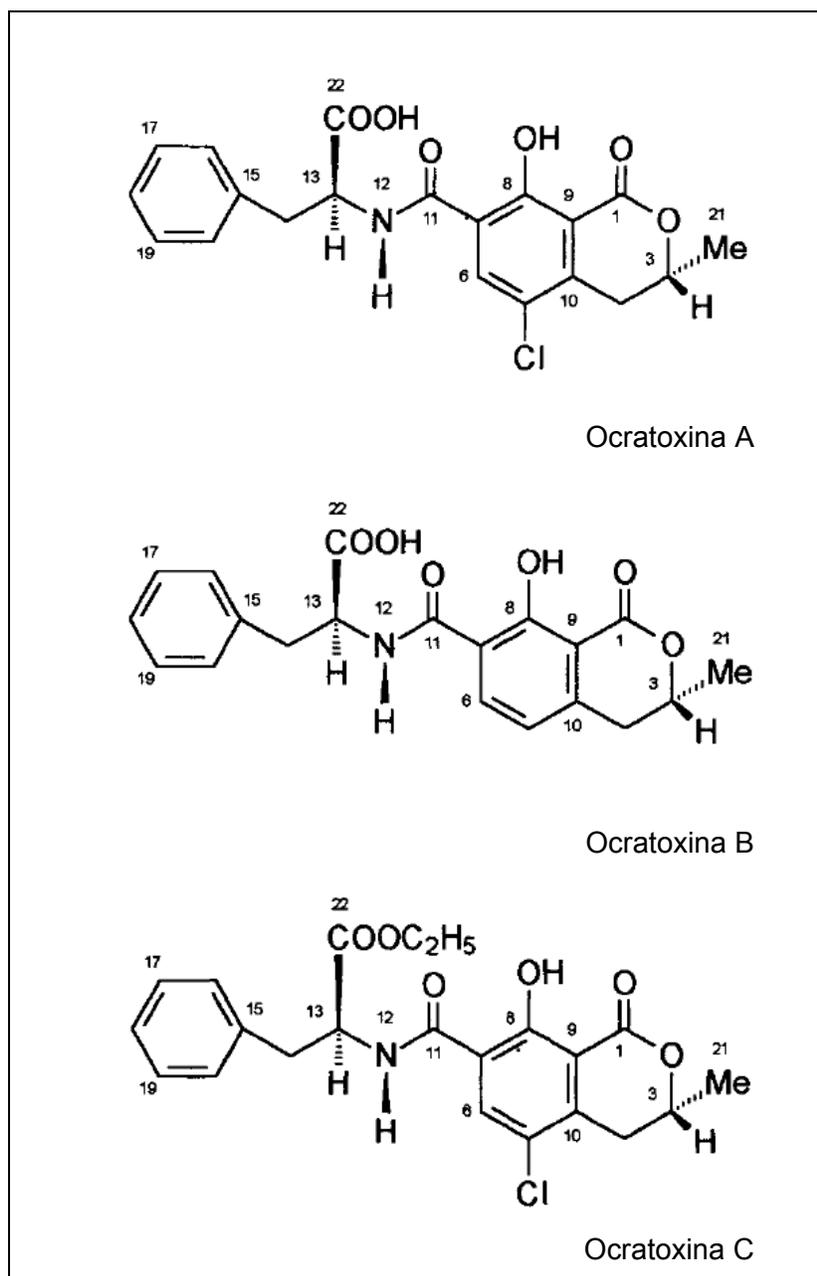


Figura 2. Estrutura Ocratoxina (COLE; SCHWEIKERT, 2003c).

2.2.4.1. Efeitos Toxicológicos

A OTA é considerada um composto tóxico cumulativo, de fácil absorção e lenta eliminação, sendo responsável pela inibição da síntese proteica, pela indução da peroxidação de lipídios, pelo estresse oxidativo e por danos no DNA em diversos tipos de tecidos (BOZZA, 2010).

A fácil absorção no organismo por esta micotoxina se explica pela presença da molécula de fenilalanina e do grupo 8-hidroxilo em sua estrutura molecular, começando a ser digerida no estomago e terminando no intestino, caindo na corrente sanguínea e se espalhando pelo organismo (RIBEIRO, 2007).

Esta micotoxina tem sido associada à nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins que afeta exclusivamente a população adulta rural. Há relatos de uma possível correlação entre a ocratoxina A e o desenvolvimento de tumores do trato urinário em pessoas na Bulgária (DIRHEIMER, 1996; PLESTINA, 1996; PRADO *et al.*, 2000).

A ação tóxica da OTA tem como órgão alvo o rim, causando interferência na síntese de macromoléculas das células do parênquima renal, incluindo DNA, RNA e proteínas, danos ao epitélio dos túbulos renais (diminui a absorção de eletrólitos e aumenta a excreção de água), afetando também o metabolismo de carboidratos (DIRHEIMER; CREPPY, 1991; ROSMANINHO *et al.*, 2001).

2.2.4.2. Fungos Produtores de Ocratoxina A

Em regiões tropicais, o gênero *Aspergillus* são os fungos responsáveis pela contaminação dos alimentos pela OTA, e em regiões de clima temperado, predominam os *Penicillium*, por crescerem em ambiente frio (PITT; HOCKING, 1997; PITT, 2000; TANIWAKI *et al.*, 2003; SAMSON *et al.*, 2002).

Há mais de 20 espécies do gênero *Aspergillus* produtoras de ocratoxina (ABARCA *et al.*, 1997; FRISVAD *et al.*, 2004; SAMSON *et al.*, 2004). No entanto, poucos deles são conhecidos como fonte de contaminação de OTA em alimentos. Recentemente, acreditava-se que os principais fungos eram o *A. ochraceus* e *P. verrucosum*, mas atualmente as pesquisas estão demonstrando que algumas espécies de *Aspergillus* section *Nigri* (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger*) são produtoras, além de outras espécies pertencentes à section *Circumdati* (*A. flocculosus*, *A. neopetromyces*, *A. muricatus*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. westerdijkiae*, *A.*

sulphureus, *A. steynii*, *A. cretensis*, *A. elegans*, *A. pseudoelegans*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii* e *A. petrakii*) e *Flavi* (*A. alliaceus*) (FRISVAD *et al.*, 2007; ABRUNHOSA, 2008; COPETTI *et al.*, 2010; BOZZA, 2010).

2.3. *Aspergillus* em Alimentos

Fungos filamentosos estão presentes em todos os ambientes e são economicamente importantes no campo da medicina, da fitopatologia e da indústria, além de serem ecologicamente corretos com a função de decompositores. No entanto, também podem contaminar os alimentos em diferentes fases, incluindo pré-colheita, colheita, processamento e manuseamento, causando sua deterioração, reduzindo seu valor nutricional, alterando suas qualidades sensoriais (pigmentação, descoloração, apodrecimento e desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis) e tornando-se, em alguns casos, problema de saúde pública (PERRONE *et al.*, 2007; VECCHIA; FORTES, 2007).

Estima-se que 25% da produção anual de vegetais para consumo humano e animal são comprometidas, por causa do crescimento fúngico (GEISEN, 2007).

A principal preocupação em relação à contaminação deste microrganismo em alimentos é a produção de micotoxinas. Algumas destas substâncias possuem toxicidade a um órgão específico e capacidade mutagênica e carcinogênica (JAY, 2005).

Várias espécies de *Aspergillus* têm sido estudadas e relatadas como produtoras de micotoxinas, dentre elas as aflatoxinas e a ocratoxina A (PERRONE *et al.*, 2007).

A ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus*, bem como de suas toxinas em alimentos e rações animais apresentam distribuição mundial, com predomínio nas regiões de clima tropical e subtropical. A contaminação dos produtos vegetais ocorre principalmente através do contato com o solo que apresenta esporos do ambiente, assim como a utilização de práticas agrícolas incorretas, através de lesões na superfície dos grãos (provocadas por insetos), e o armazenamento inadequado em locais úmidos e sem ventilação (CHU, 1991; ROSMANINHO *et al.*, 2001).

Fungos do gênero *Aspergillus* foram encontrados em diversos substratos como vinho, cerveja, arroz, feijão, milho, trigo e outros cereais, uva e outras frutas frescas, nozes, amendoim e castanhas, café e cacau, sendo as espécies mais recorrentes *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. alliaceus* (FRISVAD *et al.*, 2004, PALACIOS-CABRERA *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*; 2006; PERRONE *et al.*, 2007; MAZIERO; BERSOT, 2010).

2.3.1. Café

Historicamente, o café é uma planta original da Etiópia Central, sendo os Árabes os responsáveis pela propagação da cultura e os holandeses os primeiros a iniciar seu cultivo comercial, em 1658. No Brasil, o plantio iniciou-se em Belém do Pará, no ano de 1769, mas somente em 1820 o país foi considerado exportador de café (BOZZA, 2010). Atualmente, continua sendo o maior exportador e produtor deste produto agrícola (MAPA, 2012) à frente do Vietnã, da Indonésia e da Colômbia (CONAB, 2012).

As áreas cafeeiras de maior destaque estão nos estados de Minas Gerais, que corresponde a mais de 50% da produção nacional e Espírito Santo, com aproximadamente 20% de todo o café produzido no país (MAPA, 2012).

Café arábica, de nome científico *Coffea arabica* L., é o produto de melhor qualidade, concentrações mais elevadas de carboidratos, lipídeos e compostos orgânicos como, por exemplo, trigonelina. Predomina nas lavouras de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia, Rio de Janeiro e em parte do Espírito Santo. O café robusta ou conilon, de nome científico *Coffea canephora*, é usado para a obtenção de cafés solúveis, possui menos acidez e é considerado bebida neutra (menos teores de cafeína e compostos fenólicos). Predomina nas lavouras do Espírito Santo, em Rondônia, e em parte da Bahia e de Minas Gerais (MALTA *et al.*, 2002; MAPA, 2012)

Os frutos de café estão expostos à contaminação por uma grande variedade de microrganismos, mas dentre todos os contaminantes o gênero *Aspergillus* desperta motivos de preocupação, por causa da produção de micotoxina, em especial a ocratoxina A (TANIWAKI, 2006; PERRONE *et al.*, 2007). A contaminação na pré e pós colheita, além do problema das toxinas, resulta em perda no rendimento, descoloração e redução do valor nutricional (FUJII *et al.*, 2002).

A intensidade e diversidade da microbiota, assim como a subsequente produção de toxinas são condicionadas pelas etapas de colheita, preparo, transporte e armazenamento (URBANO *et al.*, 2001; URBANO, 2002; TANIWAKI *et al.*, 2003), associadas a condições de teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física (grãos quebrados), nível de inóculo do fungo, conteúdo de oxigênio, tempo de armazenamento dos grãos e ataques de insetos (PEZZINI *et al.*, 2005).

O café proveniente de 31 países produtores apresentou a predominância de *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. tamaritii* e *A. wentii* (MISLIVEC, 1983). Levi

et al. (1974) detectaram também os fungos *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. niger*, entre outros, em amostras de café verde provindas de diferentes países. Urbano *et al.* (2001) constataram contaminação fúngica do gênero (33,2% da população isolada, sendo 10,3% *A. ochraceus* e 22,9% *A. niger*), em café brasileiro dos estados São Paulo, Minas Gerais e Paraná.

A. carbonarius e *A. westerdijkiae* são fungos com propriedade de produzir ocratoxina A que vêm sendo encontrados em grãos de café nos últimos anos (MAGNANI *et al.*, 2005; MORELLO *et al.*, 2007; PERRONE *et al.*, 2007).

2.3.2. Frutas secas

Fruta seca é o produto obtido pela perda parcial da água da fruta madura, inteira ou em pedaços, por processos tecnológicos adequados (BRASIL, 1978). Historicamente, é um alimento muito antigo, sendo que os primeiros relatos escritos sobre o assunto, encontram-se em tábuas de argila da Mesopotâmia, contendo receitas datadas de 1700 a.C. (TRAGER, 1995). Hoje, o consumo de frutas secas está aumentando devido ao apelo funcional (componentes bioativos, prebióticos, fibras e alto valor nutricional) (SPILLER *et al.*, 2003; VINSON *et al.*, 2005; HOOSHMAND; ARJMANDI, 2009; WILLAMSON; CARUGHI, 2010) e também por serem utilizadas como ingredientes em formulações de bolos, pães, cereais matinais, panetones e barras de cereais (IAMANAKA, 2004). Metade das frutas secas vendidas corresponde a uvas passas, seguida de tâmaras, ameixas, figos, damasco, pera, maçãs e pêssegos (HUI, 2006).

A desidratação do fruto pode ocorrer por diferentes processos, como a utilização de ar quente, superfície aquecida, exposição ao sol, vácuo, atomização, liofilização, ou desidratação osmótica. Cada método tem suas vantagens e desvantagens, sendo os principais parâmetros para a escolha de um deles custo do processo, disponibilidade, fácil instalação e operação (MAIA *et al.*, 2009).

A método mais utilizado é por ar quente, mas em alguns lugares ainda se utiliza a secagem ao sol, que por ser um método lento e que depende de fatores climáticos, favorece a contaminação por microrganismos.

Todas as metodologias de processos, se não aplicadas corretamente, podem proporcionar variações no processamento e armazenamento, e com isso o aparecimento de contaminantes como fungos e micotoxinas. Iamanaka *et al.* (2004) analisaram 119 frutas secas (uvas passas, ameixas, figos, damasco e tâmaras) provinda de diversas partes do mundo e constataram a presença de fungos potencialmente toxigênicos como

A. niger, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. flavus*, sendo o damasco ausente de fungos e micotoxinas e uvas passas escuras e figos, as frutas secas com maior contaminação de ocratoxina A. *A. carbonarius*, um fungo extremamente produtor de ocratoxina A, foi isolado de uvas passas provindas da Argentina e Espanha, assim como *A. niger* e *A. tubingensis* (ABARCA *et al.*, 2003; MAGNOLI *et al.*, 2004.; ROMERO *et al.*, 2005; MEDINA *et al.*, 2005; VALERO *et al.*, 2005)

A presença de aflatoxinas em figos e uvas passas claras, foi constatada por Iamanaka *et al.* (2007), assim como figos da Turquia, secos ao sol, apresentaram a presença de aflatoxina e ocratoxina em estudo realizado por Trucksess e Scott (2008).

Damasco, ameixas e tâmaras também apresentaram *Aspergillus* sp e contaminação por aflatoxina e ocratoxina A (ZOHRI; ABDEL-GAWAD 1993; DRUSCH; RAGAB, 2003; IAMANAKA *et al.*, 2005; TRUCKSESS; SCOTT, 2008).

2.3.3. Cacau

O cacau é uma árvore originária das Américas, sendo encontrada na forma nativa, as margens dos rios Amazonas e Orinoco. O gênero foi denominado de *Theobroma*, devido à lenda Asteca que citava o cacau como uma delícia dos deuses: Theo (Deus), Broma (alimento) (LEVANON; ROSSETINI, 2001). Embora sejam conhecidas 22 espécies deste gênero, a *Theobroma cacao* L, é a mais economicamente explorada para produzir sementes que, após secas e beneficiadas, irão compor a base de chocolates e derivados (SODRÉ, 2007).

Os oito países mais importantes na produção mundial de cacau no ano de 2010 foram Costa do Marfim, Indonésia, Gana, Nigéria, Camarões, Brasil, Equador e Togo, que juntos correspondem a 90% de toda a área colhida de cacau. Os países africanos juntos somam 65%, sendo que Costa do Marfim tem 24% e Gana 18%. O Brasil ocupa a sexta posição com uma representatividade de 7,3% (654 mil hectares) (FAO, 2012).

Durante o processamento das sementes de cacau acontecem diversas variações de condições climáticas, temperatura e umidade. Dois pontos críticos que favorecem o aparecimento de fungos são as etapas de secagem e estocagem do cacau (COPETTI *et al.*, 2010). Se o fungo é capaz de se desenvolver há também a possibilidade de produção de micotoxinas.

A presença de *Aspergillus* sp no cacau tem sido documentada em recentes estudos (AMEZQUETA *et al.*, 2008; MOUNJOUENPOU *et al.*, 2008; SANCHEZ-HERVAS *et al.*, 2008). Mounjouenpou *et al.* (2008) isolaram, durante seu estudo, cepas de *A. niger*

e *A. carbonarius* que foram capazes de sintetizar a micotoxina, além de *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. tamarii* e *A. versicolor*. Sanchez-Hervas *et al.* (2008) analisaram amêndoas fermentadas e secas, nas quais o gênero *Aspergillus* correspondia a 88% dos fungos isolados (Flavi 51%, Nigri 32,8%). Copetti (2009) isolou da cadeia produtiva do cacau 1132 espécies potencialmente toxigênicas do gênero *Aspergillus*, sendo as principais espécies: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. carbonarius* e grupo dos *A. ochraceus*. Poucos estudos foram realizados sobre a incidência de ocratoxina A e aflatoxina em grãos de cacau. Os relatos descritos encontraram baixas concentrações (BONVEHI, 2004; AMEZQUETA *et al.*, 2004, COPETTI, 2009), concluindo que fungos toxigênicos estão presentes por falta de boas práticas, mas por causa de outros fatores que ainda não estão bem elucidados, a micotoxina não é produzida intensamente.

2.3.4. Castanha do Brasil

A castanha do Brasil provém da espécie *Bertholletia excelsa* que foi originalmente descrita, em 1807, por Humboldt e Bonpland, e posteriormente reclassificada na família das Lecythidaceae, em 1825, por Poiteau (MORI; PRANCE, 1990). São árvores que preferem regiões onde predominam os tipos climáticos tropicais chuvosos, com a ocorrência de períodos de estiagem definidos (TONINI *et al.*, 2008), sendo por isso encontradas em países como Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia, Suriname, Guianas e no Brasil (LORENZI, 2002). Os principais estados produtores no Brasil são o Acre, seguido por Amazonas, Pará e Rondônia. Mundialmente, a Bolívia lidera, com 65% da produção, seguida pelo Brasil, com 25%, e o Peru com 10% (CALDERARI, 2011).

A castanha do Brasil possui em sua composição lipídeos como ácidos graxos poli-insaturados (oléico e linoleico) e ácidos saturados (palmítico, esteárico e araquidônico) (GONÇALVES *et al.*, 2002), aminoácidos essenciais (isoleucina, leucina, lisina, metionina, cisteína, triptofano, valina e treonina) (SOUZA; MENEZES, 2004), sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, selênio e cobre) e vitaminas (A, B1, B2 e C) (MOODLEY *et al.*, 2007).

Com o aumento do interesse sobre o produto, devido à sua composição nutricional, as exportações cresceram, e neste processo de verificação da qualidade do alimento pelos países importadores houve devoluções de lotes por causa de contaminação por aflatoxina, fazendo com que o Ministério da Agricultura (MAPA) elaborasse um programa de monitoramento da cadeia produtiva, visando prevenir e controlar a contaminação (CALDASA *et al.*, 2002).

Os primeiros relatos de contaminação fúngica em castanha do Brasil ocorreram na década de 60, nas quais foram isoladas espécies do gênero *Aspergillus* que causaram podridão em castanhas (PACHECO; SCUSSEL, 2007).

A ocorrência das aflatoxinas produzidas por *Aspergillus* em castanha do Brasil foram confirmadas por alguns estudos (CASTRILLON; PURCHIO, 1988; STEINER *et al.*, 1992; FREIRE *et al.*, 2000; CALDAS *et al.*, 2002; ARRUSA *et al.*, 2005). Souza (2003) encontrou espécies de *Aspergillus* em várias unidades de beneficiamento. Freire *et al.* (2000) analisaram amostras de Belém e isolaram 27,5% de *A. flavus* e 12% de *A. niger*. Olsen *et al.* (2008) coletaram amostras de castanha do Brasil comercializadas em Nápoles, na Itália, e detectaram cepas do *Aspergillus nomius* como principal fonte produtora de aflatoxina B e G. Bayman *et al.* (2002) encontraram *A. niger* (42%), *A. flavus* (21%), *A. nidulans* (9%) e *A. tamarii* (7%). Calderari *et al.* (2012) realizou um estudo relacionado à cadeia produtiva, beneficiamento e comercialização das castanhas do Brasil e isolou 450 espécies de *A. nomius*, 9 de *A. parasiticus* (ambos apresentaram 100% de capacidade de produção de aflatoxinas B1, B2, G1) e 703 de *A. flavus* (63 % apresentaram a capacidade de produzir aflatoxinas B1 e B2).

2.4. Métodos de Identificação do Gênero *Aspergillus*

Nos últimos anos a taxonomia deste gênero e de seus teleomorfos tem sido discutida (FRISVAD *et al.*, 2004; SAMSON *et al.*, 2004; HONG *et al.*, 2005; GEISER *et al.*, 2007; SAMSON; VARGA, 2007). Pelo fato de possuir uma vasta diversidade biológica, do aumento nas características e de fatores utilizados como “chaves” para a identificação, chegar ao nível de espécies está cada vez mais difícil (SAMSON; VARGA, 2009; FRISVAD *et al.*, 2007; GEISER *et al.*, 2007).

De acordo com Samson e Varga (2009) e Frisvad *et al.* (2007), existem três maneiras independentes de classificar e identificar *Aspergillus*: morfologia combinada com a fisiologia e as características nutricionais, metabólitos secundários e sequenciamento de DNA. Estas três formas de identificar muitas vezes apontam para as mesmas espécies, mas em alguns casos podem ocorrer divergências entre os resultados, apontando o não funcionamento perfeito de todos os métodos de identificação. Nestes casos de divergências é necessário associar pelo menos duas, dentre as maneiras independentes de caracterizar o gênero *Aspergillus*, abordando a taxonomia polifásica (FRISVAD *et al.*, 2007; SAMSON *et al.*, 2007).

A taxonomia polifásica não é uma ideia recente, ela está sendo abordada desde a década de 70 por Colwell (1970), e consiste em um conceito que visa à integração de diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genotípicas e filogenéticas) sobre os microrganismos, utilizando para fechar a identificação um consenso taxonômico (SAMSON *et al.*, 2007).

As espécies de *Aspergillus* foram classificadas principalmente com base em características morfológica (FRISVAD *et al.*, 2007). Somente nos últimos anos foram adicionados dados moleculares e de metabólitos (HONG *et al.*, 2005).

As análises moleculares e de metabólitos secundários atualmente são correlacionados diretamente, devido aos recentes estudos de genomas completos que concluíram que as principais diferenças genéticas entre as espécies são frequentemente relacionadas com o número e a similaridade de síntese de policetídeos e genes não ribossomais na síntese de peptídeos (GALAGAN *et al.*, 2005; PEL *et al.*, 2007).

Todas as três formas de se identificar fungos apresentam problemas, por serem tratadas de seres vivos. A morfologia e a fisiologia são os grandes alvos de alterações desencadeadas por fatores externos, fazendo com que espécies iguais em condições diferentes (estresse, nutrientes, temperatura, etc) sejam capazes de produzir determinado metabólito ou não, ou determinada estrutura morfológica ou não. A identificação molecular apresenta variações também, por causa da quantidade de dados existente e por ainda não existir critérios rigorosos e bem definidos sobre qual local traçar a linha das espécies filogenéticas e a diferenciação das populações (GEISER *et al.*, 2007, PERRONE *et al.*, 2007).

Foi sugerido por Frisvad *et al.* (2007), vide Tabela 4, os possíveis métodos utilizados para identificação de fungos filamentosos, além da estrutura do laboratório, os equipamentos necessários e o poder do diagnóstico. Geralmente alguns laboratórios, devido à sua estrutura, conseguem fazer somente algumas combinações e trabalhar com alguns dados para classificação e identificação, mostrando a dificuldade que alguns pesquisadores encontram para utilizar a ferramenta da identificação polifásica. A fim de tornar as identificações mais rápidas, novos métodos precisam ser discutidos (SAMSON *et al.*, 2006).

Tabela 4. Possíveis métodos utilizados para identificação de fungos filamentosos (FRISVAD *et al.*, 2007a).

Teste	Necessita de equipamento especializado?	Equipamento comum - laboratório de micologia?	Poder de diagnóstico	Frequência de utilização
Micromorfologia	Microscópio	Sim	Bom	Muito
Macromorfologia	Estereoscópio	Sim	Bom	Muito
Fisiologia	Estufas	Sim	Razoável	Às vezes
Testes Nutricionais	Não	Sim	Razoável	Raramente
Metabólitos secundários Voláteis	GC ¹	Raramente	Razoável	Raramente
Metabólitos secundários Não - Voláteis	TLC ²	Ocasionalmente	Bom	Raramente
	HPLC ³ – DAD ⁴	Raramente	Excelente	Raramente
	HPLC ³ – MS ⁵	Raramente	Excelente	Raramente
Enzimas extracelulares	GE ⁶ , CE ⁷	Raramente	Razoável	Raramente
Sequenciamento DNA	PCR ⁸ Sequenciador	Ocasionalmente	Bom	Às vezes

Legenda: 1.GC – Cromatografia gasosa; 2.TLC - Cromatografia camada delgada; 3.HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência; 4.DAD – Detector arranjo de diodo; 5.MS – Espectrofotômetro de massas; 6.GE – Gel de eletroforese; 7.CE – Capilar de eletroforese; 8.PCR – Reação em cadeia da polimerase.

2.4.1. Métodos de Isolamento de Fungos

Existem alguns métodos eficientes para detecção, quantificação e isolamento de fungos em alimentos, dentre estes podemos citar o plaqueamento direto, no qual o resultado é expresso em porcentagem de infecção. A amostra deve passar por um processo de desinfecção com hipoclorito de sódio 0,4% por 2 minutos para remover a contaminação superficial, sendo este método adequado para alimento sólido e/ou particularizado. Outro método muito utilizado que também atende ao propósito de obter colônias para quantificação e isolamento é a análise de diluição, utilizada para alimentos em pó ou líquido, na qual o resultado é expresso em UFC/mL ou UFC/g (unidade formadoras de colônia por mililitro ou gramas) (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON *et al.*, 2002).

A ICFM (Comissão Internacional de Micologia de Alimentos) recomenda, para esta etapa de quantificação, dois tipos de meio de cultura, o Agar Dicloran Glicerol 18% (DG18) para alimentos com atividade de água abaixo de 0,95, e o Agar Dicloran Rosa de Bengala e Cloranfenicol (DRBC), para alimentos com atividade de água acima de 0,95 (KING *et al.*, 1986; SAMSON *et al.*, 1992).

A etapa de isolamento e manutenção do fungo e o meio de cultura a ser utilizado dependem de fatores como: gênero e espécie de interesse, recuperação de microrganismos injuriados e inibição de gêneros indesejáveis para o estudo. No caso do

gênero *Aspergillus*, meios como CYA (Agar Czapek Extrato de Levedura) e MEA (Agar Extrato de Malte) são os mais recomendados (KLICH, 2002; PITT; HOCKING, 2009).

2.4.2. Morfologia

O conceito de morfologia (ou fenotípica) baseia-se na similaridade de caracteres morfológicos e fisiológicos (SAMSON; VARGA, 2009). Anton Bary (1866) elaborou o primeiro livro texto apresentando a evolução e a classificação dos fungos baseada em semelhanças morfológicas (SAMSON *et al.*, 2010). Em 1926 Thom e Church e posteriormente Raper e Fennell (1965) caracterizaram fungos do gênero *Aspergillus* (SAMSON; VARGA, 2009).

O gênero *Aspergillus* está em constante revisão taxonômica e a primeira ferramenta para detectar estas diferenças entre espécies são critérios morfológicos (SAMSON *et al.*, 2006, FRISVAD *et al.*, 2007, GEISER *et al.*, 2007).

As principais características a serem observadas para a realização de uma identificação baseada em critérios morfológicos estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5. Características para identificação fenotípica do gênero *Aspergillus*. Adaptada das seguintes referências: Klich (2002); Rodrigues *et al.* (2007); Pitt; Hocking (2009); Samson; Varga (2009); Samson *et al.* (2010).

Macroscópica	Cor Conídio	Quase todas as espécies de <i>Aspergillus</i> apresentam cores - característica importante para a classificação subgenérica
	Diâmetro da Colônia	O diâmetro da colônia é medido após um período de incubação. Esta característica depende de fatores como: tempo, temperatura e tipos de nutrientes (meio de cultura).
	Cor do Micélio	Micélios são os fios de células vegetativas que dão origem aos conidióforos, geralmente brancos, mas algumas espécies produzem esta estrutura coloridas.
	Exsudatos	Substâncias líquidas em forma de gotículas sobre a superfície do micélio.
	Reverso da Colônia	A cor observada olhando para o fundo do ágar. Esta característica depende do meio de cultura.
	Pigmentos Solúveis	O pigmento, que se difunde no ágar e/ou na margem da colônia.
	Esclerócio	Massa firme de hifas, geralmente esférica, semiesférica ou elipsoidal, não contêm esporos.
	Cleistotécio	São os ascocarpos (corpo de frutificação), que contêm ascos e ascósporos.

Microscópica	Seriação	Refere-se à série de camadas de células entre a parede da vesícula e os conídios, as espécies podem ser unisseriadas - fiálides apenas - e bisseriadas - fiálides e métulas.
	Vesícula	Ápice inchada da estirpe até conidióforo.
	Conídios	São os esporos - forma, tamanho e textura de superfície são características determinantes.
	Estipe	Cor, comprimento e textura da superficial.
	Células Hulle	Paredes espessas, associadas ao cleistotécio em algumas espécies.
	Parede do Cleistotécio	Características que determinam gêneros teleomorfos.
	Ascósporos	Cor, tamanho, ornamentação flanges ou ranhuras que circundam a ascósporos e textura da superfície convexa da parede.

2.4.3. Identificação Molecular

A introdução de técnicas moleculares para estudos taxonômicos permitiu um avanço nas identificações e na incorporação de novas espécies. Fungos que, por metodologia tradicional não eram possíveis de se determinar a espécie (incluindo os microrganismos não cultiváveis), através desta ferramenta estão sendo classificados (SAMSON; VARGA; 2009).

O genoma do gênero *Aspergillus* apresenta mais de 10.000 genes (SMEDSGAARD; NIELSEN, 2004) aproximadamente e muito destes caracteres são necessários para se definir uma espécie (SAMSON; VARGA, 2009).

A infraestrutura da bioinformática permite comunicação e comparação com todo o mundo e produção de resultados que se correlacionam com barreiras reprodutivas e as diferenças fisiológicas, mas também aumentam as variáveis, devido à disponibilidade de dados nos bancos (GEISER *et al.*, 2007).

Amplificação, seguida do sequenciamento do DNA, é uma ferramenta importante em estudos de taxonomia (RODRIGUES *et al.*, 2007). As sequências de DNA devem conter alguns parâmetros para serem utilizadas com êxito para a identificação de espécies como: utilização de genes ortólogos (genes equivalentes em dois organismos diferentes que descendem diretamente do mesmo gene do antecessor comum) com baixos níveis de variação intraespecífica (HEBERT *et al.*, 2003), facilmente acessíveis (universalmente amplificados / sequenciados por primers padronizados a partir de um vasto conjunto de organismos), relativamente curtos (aproximadamente de 500 a 600 bp

(bp - pares de base), sendo que alguns autores utilizam até 1200 bp) (GEISER *et al.*, 2007).

Através da disponibilidade de genomas múltiplos de várias espécies de *Aspergillus* foi possível analisar o genoma inteiro deste gênero (ROKAS *et al.*, 2007). A filogenética (estudo das relações evolutivas entre os organismos) revelou uma especiação restrita em um número de táxons, sugerindo que características morfológicas fornecem um conceito de espécie muito amplo que não reflete a verdadeira extensão da evolução (GEISER, 2004). Infelizmente, ainda não há uma regra única para uso da ferramenta molecular que resolva todos os problemas da taxonomia (SAMSON;VARGA, 2009).

Nos últimos anos, métodos moleculares como RFLP (*Restriction fragment length polymorphism* - Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA), RAPD (*Random amplified of polymorphic DNA* – Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism* - Análise de polimorfismo de fragmentos amplificados), sequências de RNA ribossômico e proteínas de codificação do gene, foram aplicados na identificação do gênero *Aspergillus*.

A técnica de RAPD surgiu independentemente a partir de estudos de dois grupos nos Estados Unidos, um dos grupos nomeou a técnica de RAPD (WILLIAMS *et al.*, 1990) e o outro denominou de AP-PCR (*Arbitrary primed-polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos) (WELSH; MCLELLAND, 1990; BOZZA, 2010).

Na técnica RAPD, a PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase) utiliza apenas um iniciador arbitrário por reação e a amplificação ocorre quando esta mesma sequência reconhece um sítio de homologia em uma das fitas e também o mesmo sítio, com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA (WILLIAMS *et al.*, 1990). Uma das grandes vantagens do RAPD é que não se escolhe *a priori* a região a ser amplificada (FUNGARO; VIEIRA, 2001). Os polimorfismos gerados após amplificação com iniciadores arbitrários são reconhecidos pela ausência ou presença de fragmentos amplificados num genótipo em relação a outro (FUNGARO *et al.*, 2004, BOZZA, 2010).

As sequências recomendadas para caracterização a nível de espécie dos *Aspergillus* são β -tubulina ou calmodulina devido às extensivas bases de dados disponíveis, mas outras regiões genômicas como RNA ribossomal 18S (subunidade grande, com espaçadores interno transcritos) (GEISER *et al.*, 2007), DNA mitocondrial, região do espaço intergênico e regiões espaçadoras internas do DNA ribossomal (ITS - localizadas entre os genes 18S e 28S) também estão sendo utilizadas (BOZZA, 2010).

Para descrições de novas espécies é recomendado examinar a maior quantidade de sequências como ITS, calmodulina, β -tubulina, actina e submetê-las às bases de dados reconhecidas (SAMSON;VARGA, 2009; BOZZA, 2010).

2.4.4. Extração de Metabólitos Secundários

O processo metabólico dos fungos é dividido em duas etapas: primário (endometaboloma) que consiste na obtenção de produtos de regulação (aminoácidos, ácido cítrico, etanol entre outros) essenciais para a vida, sem interesse para a taxonomia, e o secundário (metaboloma) que tem uma distribuição mais restrita (CAMPBELL, 1991; FRISVAD *et al.*, 2007), podendo ser usados para reconhecimento de espécies devido à especificidade (FRISVAD, 1989; LARSEN *et al.*, 2005; SAMSON;VARGA, 2009).

A diversidade metabólica dos fungos vem sendo amplamente explorada nos últimos anos, devido ao fator benéfico para a indústria biotecnológica como também pelo lado da prevenção de toxinas e segurança alimentar. Estes compostos extraídos podem ter atividades redutoras do colesterol, antioxidantes, antitumorais e até ação clareadora em manchas de pele (cosmética) (EHRlich *et al.*, 1982; SMEDSGAARD;NIELSEN, 2004; MIYAKE *et al.*, 2007; OSTRY, 2008; NIELSEN *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2011). Como por outro lado, também podem ser altamente tóxicos aos organismos vivos (animais, plantas e microrganismos) com ação antibiótica, inseticida, teratogênica, mutagênica e imunossupressora (JARVIS; MILLER, 2005).

Metabólitos secundários são produzidos em componentes estruturais e permanecem nos conídios, esclerócios ou em outros propágulos, sendo também denominados de extrólitos por serem substâncias secretadas para o meio de crescimento (FRISVAD *et al.*, 2007). São compostos químicos elaborados através de um determinado substrato (FRISVAD *et al.*, 2008), não formando necessariamente uma categoria química com estrutura molecular comum, por isso são usualmente classificados pela via metabólica pelas quais são produzidos, sendo a maioria sintetizados após o fungo ter completado a fase inicial de crescimento e estar iniciando a reprodução (formação de esporos) (PINHEIRO, 2004). Estes compostos, como também, características de crescimento, diferenciação celular e produção de enzimas, dependem muito do ambiente externo onde o microrganismo está se desenvolvendo (fenótipo) (SMEDSGAARD; NIELSEN, 2004; FRISVAD *et al.*, 2007). Um exemplo é a formação de policetídeos e alcalóides que tem a função de proteger os fungos de serem ingeridos pelos insetos, ácaros e outros animais (ROHLFS *et al.*, 2005), sendo portanto um composto de defesa.

A maioria das espécies de fungos isolados de alimentos produzem entre 10 e 50 metabólitos secundários (SAMSON *et al.*, 2010) e apenas uma fração de todas estas moléculas tem sido utilizada para a taxonomia (FRISVAD *et al.*, 2008).

Praticamente todas as espécies de *Aspergillus* produzem uma combinação de diferentes compostos orgânicos como policetídeos, terpenóides, peptídeos não ribossomais e outros compostos de origem biossintética mista (FRISVAD *et al.*, 2007b; SAMSON; VARGA, 2009). Alguns dos metabólitos secundários são voláteis, especialmente terpenos e álcoois, podendo ser separados e detectados por CG-MS (Cromatografia gasosa com detector de espectrofotometria de massas), enquanto os compostos não voláteis são extraídos por solventes orgânicos e detectados por CLAE-DAD-MS (Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de rearranjo de diodo e espectrofotometria de massas) (FRISVAD *et al.*, 2007). O resultado é expresso através da comparação dos extrólitos, construindo uma matriz binária, denominando 0 (zero) para ausência e 1 (um) para a presença de um composto em particular (ANDERSEN *et al.*, 2008).

O uso de padrões autênticos também é um fator relevante para a eficiência da análise, principalmente para determinação de novas espécies, como também a necessidade de identificação de 4 a 8 extrólitos (SAMSON; VARGA, 2009).

Quimiodiversidade fúngica é uma ferramenta eficiente para identificação e classificação de fungos (SMEDSGAARD; NIELSEN, 2004). Nielsen e Smedsgaard analisaram, em 2003 474 metabólitos como aflatoxinas, tricotecenos, atranona e seus respectivos precursores, ocratoxinas, alcalóides, pigmentos, quinonas, coumarinas, pironas, entre outros. Entretanto, existem ainda alguns compostos, que aparecem com frequência e são importantes para diferenciar as espécies, que infelizmente não foram elucidados como SMIF", "PON", "SEGLAB" (relacionado a piranonigrina) "BAM", "FIB1" e "FIB2", "GLABRINOL", "TRU", "YE1", "YE2", "DERH", etc (NIELSEN *et al.*, 2009; VARGA *et al.* 2011 a, b).

Através da Tabela 6 é possível visualizar alguns dos metabólitos e espécies de *Aspergillus* que os produzem.

Tabela 6. Resumo dos principais metabólitos secundários extraídos de espécies de *Aspergillus* (SAMSON *et al.* 2010).

Metabolito	Espécies Produtoras
Ácido 3-nitropropionico	<i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i>
Aflatoxina	<i>A. arachidicola</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>

Metabolito	Espécies Produtoras
Asperazina	<i>A. tubingensis</i>
Aspirona	<i>A. westerdijkiae</i>
Aspergamida A	<i>A. melleus, A. westerdijkiae, A. ochraceus</i>
Aspergamida B	<i>A. melleus, A. westerdijkiae</i>
Ácido secalônico	<i>A. aculeatinus, A. aculeatus, A. japonicus, A. uvarum</i>
Citreoviridina A	<i>A. terreus,</i>
Ácido ciclopiazônico	<i>A. flavus, A. oryzae</i>
Citochalasina E	<i>A. clavatus</i>
Ditriptofenalina	<i>A. flavus</i>
Fumigaclavina A e B	<i>A. fumigatus,</i>
Funalenona	<i>A. niger, A. tubingensis, A. brasiliensis</i>
Fumitoxinas	<i>A. fumigatus</i>
Fumitremorgina A e B	<i>A. fumigatus</i>
Fumonisinás	<i>A. niger, A. fumigatus</i>
Gliotoxina	<i>A. fumigatus</i>
Ácido kójico	<i>A. arachidicola, A. flavus, A. minisclerotigens, A. oryzae, A. parasiticus, A. sojae</i>
Kotanina	<i>A. niger</i>
Melleína	<i>A. melleus, A. ochraceus</i>
Neoxalina	<i>A. aculeatinus, A. aculeatus, A. japonicus, A. uvarum</i>
Nafto- γ -pironas (grupo)	<i>Nigri</i> , principalmente <i>A. Níger</i>
4 - Hidroxi - melleína	<i>A. ochraceus</i>
Ocratoxina A	<i>A. carbonarius, A. niger, A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae,</i>
Orlandina	<i>A. Níger</i>
Patulina	<i>A. clavatus,</i>
Piranonigrina A	<i>Nigri</i>
Ácido penicílico	<i>A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae,</i>
Esterigmatocistina	<i>A. versicolor</i>
Ácido tenuazônico	<i>A. nomius,</i>
Tensidol A	<i>A. niger, A. tubingensis</i>
Tensidol B	<i>A. niger, A. tubingensis</i>
Triptoquivalinas	<i>A. clavatus, A. fumigatus</i>
Verruculogena	<i>A. fumigatus,</i>
Viomeleína	<i>A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae, A. melleus</i>
Vioxantina	<i>A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae, A. melleus</i>
Xantomegnina	<i>A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae, A. melleus</i>

2.5. Catalogação de Dados

O material biológico representa um novo insumo, tanto no ambiente de pesquisa e desenvolvimento, quanto nos processos produtivos, cujo tratamento requer a estruturação de um sistema que permita assegurar, para todos os efeitos, da pesquisa à produção e comercialização, que um dado material, microrganismos, possuam determinadas características nele identificadas ou a ele atribuídas pelos centros de pesquisa e desenvolvimento onde foram isolados, cultivados ou constituídos (BRASIL, 2002).

Microrganismos são fontes de produtos naturais, sendo utilizados em processos biotecnológicos. O estudo sistemático depende do acesso, do tipo de material, bem como da referência e da diversidade genética de uma espécie. Os microrganismos mantidos atualmente em coleções representam apenas uma fração dos recursos do mundo, e, por exemplo, para fungos, foi calculado que coleções possuem aproximadamente apenas 1% de mais de 1.000.000 espécies que se estima que existam (HAWKSWORT, 1991).

O Isolamento, a identificação, a seleção, a caracterização e a conservação de microrganismos são práticas imprescindíveis para a viabilidade das cepas (UMINO, 2000; YANO, 1993).

Os institutos de pesquisa que querem manter um acervo devem estabelecer protocolos de registro de dados sobre as linhagens, de modo a permitir a busca de informações sobre histórico, controle de qualidade, identificação, preservação, distribuição e outras características (WFCC, 1999).

Dados essenciais de uma linhagem são:

- Número de registro
- Números de registro da linhagem em outras coleções
- Nome do microrganismo
- Data de depósito
- Dados do depositante
- Fonte de isolamento
- Meio de crescimento, temperatura, pH, requerimento nutricional
- Método de preservação

No entanto, descrições de espécies difíceis de caracterizar ou novas devem incluir o maior levantamento de dados possível, compreendendo morfologia, fisiologia e caracteres moleculares que podem ser usados não apenas como ferramenta de identificação, mas também como conhecimento a mais sobre a genética evolutiva e/ou em aspectos gerais no campo da Biologia. Mas tanto o levantamento como a concentração

destas informações requer financiamento e curadoria (SAMSON; VARGA, 2009). O curador é indispensável, pois cabe a este verificar a qualidade dos dados (GEISER *et al.*, 2007).

Pitt e Samson (2007) sugerem, para inserção de novas espécies de *Aspergillus*, que estes microrganismos devem ser depositados em duas coleções de culturas reconhecidas, assim como a sequência genômica estar em banco de dados especializados, devendo haver um limite de tempo (por exemplo, seis meses) entre a publicação e o depósito em coleções e, como ação de boas práticas, o novo táxon ser analisado junto com um microrganismo padrão (espécies relacionadas e com número de referência) (SAMSON; VARGA, 2009).

2.6. Métodos de Preservação para Fungos Filamentosos

Culturas microbianas armazenadas por longos períodos e utilizadas repetidas vezes para pesquisa e/ou produção, apesar de puras, são passíveis de mutação, perda de viabilidade ou contaminação, principalmente se forem mantidas por repiques consecutivos. É possível que as atividades fisiológicas registradas inicialmente se alterem em virtude da frequência de transferências e com o aumento do crescimento celular (UMINO, 2000; KIRSOP, 1991; MURO; LUCHI, 1989).

Técnicas para manter e preservar microrganismos, devido ao fato de algumas culturas não se adaptarem a diversos métodos, tornaram-se um assunto importante a desenvolver, para assegurar a disponibilidade de microrganismos para uso prático dentro da pesquisa e para estudos de taxonomia (HASEGAWA, 1996).

Diversos protocolos e métodos de estocagem e preservação, que não causa alterações nos microrganismos, estão disponíveis (UMINO, 2000; KIRSOP, 1991; MURO; LUCHI, 1989). As principais técnicas recomendadas para fungos filamentosos são: estocagem em solo, estocagem por blocos de ágar em água (Método Castellani), liofilização, congelamento em Nitrogênio e sílica gel (SMITH, 1991; SMITH; ONIONS, 1983), sendo que para fungos com conídios (caso dos *Aspergillus*), o método de sílica gel, por serem microrganismos resistentes, é viável (MURO; LUCHI, 1989).

Segundo Kirsop (1991), alguns itens devem ser analisados e considerados antes da preservação.

Além desses parâmetros, não menos importante é a disponibilidade de mão de obra e equipamentos existentes (competência técnica e suporte financeiro).

2.6.1. Manutenção da Viabilidade do Microrganismo

Durante o processo de preservação é comum haver alguma perda de células (morte). Além disso, durante o armazenamento da cultura preservada, também podem ocorrer perdas celulares, resultando em um nível inaceitável de viabilidade da cultura. Neste caso é necessário reavaliar o método de preservação. Deve-se optar por uma técnica que minimize a perda de viabilidade celular durante a preservação e o armazenamento de modo que a cultura possa sobreviver por longo período de tempo.

2.6.1.1. Mudança da População por Seleção

Se a preservação do microrganismo for iniciada com uma alta concentração celular, a perda de células usual durante o processo de preservação pode parecer insignificante. Entretanto, a redução no número de células viáveis pode resultar em seleção de população de células resistentes, possivelmente alterando as características iniciais da cultura preservada. O método de preservação escolhido deverá manter o maior número de células viáveis possível para que a população resultante mantenha as características originais.

2.6.1.2. Mutação Genética

Muitos microrganismos são preservados devido a características de interesse científico ou industrial. É importante que esses microrganismos preservados não percam tais características ou adquiram outras. O método de preservação para esses microrganismos deve ser aquele que possibilite menores chances de mutação ou perda de plasmídios.

2.6.1.3. Pureza

As culturas preservadas precisam permanecer puras e o método de preservação deve evitar chances de contaminação do microrganismo.

2.6.1.4. Custo

O custo para manutenção de linhagens abrange gastos com equipe, equipamentos, material de consumo, espaço e gasto de energia com armazenamento das culturas.

2.6.1.5. Número de Culturas a serem Preservadas

Um fator importante a ser considerado em relação ao número de culturas é a escolha do método para sua preservação e o tempo operacional exigido no início e, posteriormente, à manipulação. Um método adequado para uma coleção de microrganismos pequena poderá se tornar inviável quando o número de linhagens for maior. A escolha de um método para um elevado número de culturas está relacionada ao espaço disponível para seu armazenamento.

2.6.1.6. Valor das Culturas

Quando se escolhe um método de preservação, deve-se levar em conta o valor da cultura, ou melhor, as consequências de sua eventual perda. Culturas com potencial biotecnológico devem ser preservadas por técnicas que minimizem os riscos de perda. Além disso, para maior segurança, a cultura deverá ser preservada por outro método alternativo. Quando se trata de culturas de menor interesse, o parâmetro custo influi mais na escolha de um método que o fator segurança.

2.6.1.7. Fornecimento e Distribuição das Culturas

É necessário que réplicas sejam preparadas em quantidades adequadas e que sejam armazenadas para distribuição, sempre que solicitadas. Deve-se levar em conta o número de linhagens a serem distribuídas e o meio de transporte a ser utilizado.

2.6.1.8. Frequência de Utilização das Culturas

Algumas culturas, como linhagens de testes industriais ou para controle de qualidade, são frequentemente utilizadas em laboratório. Deve-se considerar, nesses casos, a facilidade de reativação dos microrganismos e o risco de contaminação das culturas estoque.

2.6.2. Preservação Utilizando Secagem

2.6.2.1. Sílica Gel

Considerado como um método de secagem, foi utilizado pelo Centro de estoque e genética de fungos da CMI (“*Commonwealth Mycological Institute*” – Instituto Comunidade Micológica da Inglaterra), para o armazenamento de isolados geneticamente importantes de *Neurospora*, e no Reino Unido pelo Departamento de Genética - Universidade de Leicester. A cultura fica estável em média por 11 anos, e o método apresenta como vantagens: a simplicidade de execução, o baixo custo, a não necessidade de equipamentos especiais, o método não proporciona condições para desenvolvimento de ácaros, além de um mesmo tubo garantir várias ativações do microrganismo. Como sílica gel libera calor quando umedecido com água, a viabilidade do fungo depende de uma temperatura fria o suficiente para não danificar os esporos durante a preparação (MURO; LUCHI, 1989; SMITH; ONIONS, 1983).

2.6.2.2. Solo Estéril

É um método que foi muito utilizado para preservação em coleções de *Fusarium*, mas também os *Aspergillus* se adaptam, por causa dos conídios. Não é um processo de aplicação geral e apresenta como vantagens: estabilidade dos microrganismos, tempo médio de sobrevivência de 5 a 10 anos, baixo custo e várias ativações através do mesmo frasco. Os principais cuidados são a esterilização e a umidade do solo, uso frequente do frasco para reativação (cuidados de contaminação) e, quando se usa suspensão líquida pra inoculação, não se deve utilizar altos volumes para não interferir na umidade do solo (não ocorre a secagem). Para garantir a eficiência do método, as culturas devem ser estocadas em refrigerador (MURO; LUCHI, 1989; SMITH; ONIONS, 1983).

2.6.2.3. Liofilização

Liofilização é um processo de secagem a vácuo que usa o princípio da sublimação (NAKAMURA, 1996). Este processo consiste em: congelamento do produto; o gelo formado é removido do material pela conversão direta do seu estado sólido para vapor num processo denominado sublimação; a água que ainda permaneceu ligada fortemente

aos solutos, denominada água adsorvida, é convertida em vapor e removida do produto, num processo chamado dessorção (SNELL, 1991; MURO; LUCHI, 1989).

As principais vantagens do método são a possibilidade de produção de grande quantidade de ampolas, apresenta praticidade para transporte e estocagem e a estabilidade da cultura, por mais de 20 anos. A principal limitação é a necessidade do equipamento específico e de alto custo (NAKAMURA, 1996).

2.6.3. Preservação Utilizando Congelamento

Criopreservação é o armazenamento de células em temperaturas muito baixas. A utilização de técnicas inadequadas de congelamento pode causar: danos celulares, devido à formação de cristais de gelo; aumento da solubilidade de gases; desidratação; aumento da concentração de íons e eletrólitos, aumento da concentração de sais, carboidratos, lipídios e proteínas; redução de pH; mudanças na condutividade elétrica; aumento e/ou diminuição de atividades enzimáticas; acumulação de metabólitos intermediários; espaço intermolecular reduzido; rompimento de pontes de hidrogênio fracas; desarranjo de emulsões; dobra e distorção de moléculas grandes; danos na integridade da membrana celular; invasão celular por substâncias tóxicas e sais de mutagênicos e solidificação (NAKAMURA, 1996).

O armazenamento de microrganismos em temperaturas ultrabaixas tem sido aplicado com sucesso para a manutenção da viabilidade, pureza e estabilidade, mas possui a desvantagem de utilizar equipamentos caros e, no caso do uso de nitrogênio, o método fica ainda mais oneroso (SNELL, 1991).

As metodologias são classificadas de acordo com as várias temperaturas de estocagem utilizadas, sendo as principais -20°C , -30°C , -40°C , -70°C , -140°C e -196°C . Estas podem ser descritas a partir de três faixas de temperatura:

A - Temperaturas acima de -30°C não originam bons resultados devido à formação de misturas ecléticas que expõem as células a concentrações altas de sal.

B - O armazenamento a -70°C tem sido empregado para uma grande variedade de microrganismos, sendo um processo eficiente.

C - A estocagem em temperaturas ultrabaixas como -140°C (fase de vapor do nitrogênio) e -196°C (fase líquida do nitrogênio) vem crescendo nos últimos anos, devido ao sucesso nos resultados com microrganismos e culturas de células que não se adequam à preservação por outras metodologias (SNELL, 1991; MURO; LUCHI, 1989).

2.6.4. Preservação Utilizando Repiques

2.6.4.1. Método de Castellani

O método consiste em repicar o fungo em um meio de cultura sólido e, após o crescimento, blocos de ágar são retirados e imersos em água estéril. Deve-se tomar cuidado de não sobrecarregar a água, pois isso não reduz a disponibilidade de nutrientes e conseqüentemente não diminui o metabolismo celular. Pelo mesmo motivo, a camada de ágar deve ser fina. Algumas culturas de fungos puderam ser reativadas após 3 anos, sendo que parte delas perderam a capacidade de patogenicidade. Apresenta como risco a contaminação (como qualquer método de repique), mas é um procedimento que requer pouco material e por isso o custo é baixo (MURO; LUCHI, 1989; SMITH; ONIONS, 1983).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Principal

O objetivo deste trabalho foi catalogar espécies de *Aspergillus* isoladas de café, cacau, castanha do Brasil e frutas secas (matérias-primas de projetos desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia do ITAL), quanto a sua ocorrência, caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares, bem como sua distribuição geográfica.

3.2. Objetivos Secundários

Enriquecer a área de pesquisa em alimentos, iniciando a estruturação e a montagem de um acervo de *Aspergillus* spp potencialmente toxigênicas e assim aumentar o conhecimento sobre a biodiversidade neste setor.

Visualizar nos isolados, através dos dados de análises que englobam a taxonomia polifásica, os possíveis grupos de *Aspergillus* com características e comportamentos únicos e/ou espécies novas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras

Cinco mil e sessenta e nove culturas preservadas de *Aspergillus*, potencialmente toxigênicos, isoladas de 1068 amostras analisadas no Laboratório de Microbiologia do ITAL (433 amostras de Café provindas de São Paulo, Paraná, Rondônia e Minas Gerais, 226 de Cacau da Bahia, 290 de Castanha do Brasil dos estados do Pará e Amazonas e 119 de Frutas Secas - Uva passas, Tâmaras, Figos e Ameixas - originários de Argentina, Brasil, México, Tunísia, Chile, Espanha, EUA, Irã e Turquia) foram catalogadas.

Características morfológicas diferenciadas foram usadas como critério de seleção para que os isolados fossem preservados e encaminhados para análises de metabólitos e molecular.

4.2. Isolamento dos Fungos Toxigênicos

Os fungos presentes nas amostras coletadas foram isolados através do método proposto por Pitt e Hocking (2009), no qual 50 pedaços do alimento foram submetidos a desinfecção com hipoclorito de sódio 0,4% por 2 minutos e, logo após esta etapa foram distribuídos de 5 a 10 unidades (em função do tamanho do alimento) por placa, contendo o meio de cultura Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18). As placas foram incubadas em estufa com temperatura de 25 °C por um período de 5 a 7 dias. O DG18 é o meio de cultura recomendado para amostras com atividade de água menor que 0,95.

4.3. Identificação Morfológica

Para identificação dos fungos isolados, as cepas suspeitas de serem *Aspergillus*, através de características de colônia, como cor e esporulação e produção de toxina foram purificadas em Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) e incubadas por 7 dias a 25 °C. Estes isolados foram repicados novamente em CYA em 3 pontos equidistantes e incubados em três temperaturas diferentes, ou seja, 25 °C, 37 °C e 42 °C, por 7 dias. Algumas culturas também foram submetidas ao cultivo em Ágar Extrato de Malte (MEA) a 25 °C por 7 dias. No caso da section *Flavi*, o meio de cultura seletivo Ágar *Aspergillus Flavus Parasiticus* (AFPA) foi utilizado para confirmar as características dos fungos deste grupo através da coloração laranja do reverso da colônia. Este meio foi incubado a 25 °C

por 7 dias. Após o crescimento, foi realizada a medição dos diâmetros das colônias e as estruturas macroscópica e microscópica foram visualizadas e comparadas com chaves de classificação baseadas em Klich e Pitt (1988) e Pitt e Hocking (2009).

O preparo da lâmina para visualização microscópica foi feita de acordo com Samson *et al.* (2010), em que a cultura crescida em CYA ou MEA, incubada a 25 °C por 7 dias, foi raspada da superfície do ágar com auxílio de uma agulha e um pedaço de fungo transferido gentilmente para uma lâmina. Foi adicionada uma gota de álcool, recomendado para lavar e dispersar a massa de conídios hidrofóbicos, e posteriormente uma gota de ácido láctico, finalizando a lâmina com a adição de uma lamínula.

4.4. Detecção da Produção de Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) e Ocratoxina A (OTA) pelos Isolados.

A capacidade toxigênica dos isolados foi determinada pelo método Ágar Plug de Filtenborg *et al.* (1983). Os *Aspergillus* identificados morfológicamente e agrupados nas seções *Nigri*, *Flavi* e *Circumdati* foram inoculados em Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YESA) e incubados a 25 °C por 7 dias. Após o crescimento, pequenos pedaços do micélio fúngico foram cortados com auxílio de bisturi estéril da parte central da colônia (plug). O plug foi aplicado na placa de Cromatografia de Camada Delgada (TLC) silicagel-G de 500 μm de espessura e a toxina extraída com a adição de 3 gotas de solução clorofórmio:metanol (1:1 v:v). Nestas placas, foram adicionados padrões de aflatoxinas e ocratoxina A (Sigma, St Louis, EUA) de modo a comparar com as amostras. A placa foi encaminhada até a cuba contendo a fase móvel constituída da solução de Tolueno, Acetato de Etila, Ácido Fórmico 90% e Clorofórmio, na proporção (7:5:2:5 v:v:v:v). Após a finalização da corrida e secagem dos solventes, o resultado foi revelado em câmara UV (Cole Parmer, Illinois, EUA) utilizando os comprimentos de onda de 365nm e 254nm. O resultado foi expresso através da comparação dos tempos de retenção e coloração da fluorescência das amostras e do padrão da toxina.

4.5. Extração e Identificação de Metabólitos

A metodologia realizada pelo Dr. Jens C. Frisvad, da Universidade Técnica da Dinamarca – DTU, baseada em Smedsgaard (1997). O fungo isolado foi transferido em meio de cultura YESA (Ágar Extrato de Levedura Sacarose) e CYA (Ágar Czapek Extrato de Levedura) e incubado por 14 dias a 25 °C. Após o crescimento, 6 pedaços de

aproximadamente 6 mm (3 de cada meio), do micélio fúngico foram cortados com auxílio de bisturi estéril da parte de fora do centro da colônia (plug). Os plugs foram colocados em frasco de 2 mL e adicionaram-se 500 µL da solução de metanol/diclorometano/acetato de etila (1:2:3 v:v:v) + Ácido fórmico 1%. A homogeneização foi realizada em ultrassom por 30 minutos e os frascos foram deixados para evaporação do solvente por uma noite. Após evaporação, os metabólitos foram ressuspensos em 400 µL de metanol, e submetidos novamente a sonicação por 10 minutos. Este extrato foi filtrado em membrana de 0,45 µm PTFE (Filtros para Seringa de Teflon) e injetado em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). A coluna utilizada, foi a C18 fase reversa 125x2mm - Agilent Hypersil BDS, com gradiente linear de 85% água e 15% acetonitrila com 50 ppm de ácido trifluoroacético por 40 minutos e 100% de acetonitrila por 5 minutos, com de fluxo de 0,3 mL/min, retornando para o inicial por 8 minutos. A detecção foi realizada com arranjo de di-iodos (DAD) e fluorescência 200 a 600 nm. O padrão externo utilizado foi uma série de alquilfenóis incluídos em cada corrida, e o tempo de retenção (TR) foi calculado para cada metabólito (FRISVAD; THRANE, 1987). Os dados de TR foram comparados de acordo com Nielsen e Smedsgaard (2003). Os espectros dos metabólitos encontrados para cada isolado foram comparados com o banco de dados interno do laboratório.

4.6. Identificação Molecular

A análise de identificação molecular foi realizada pela Dra. Maria Helena P.Fungaro da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

4.6.1. Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio sólido de extrato de levedura e lactose (YEL) durante sete dias. A partir deste repique foi realizada uma suspensão de conídios em 2,5 mL de Tween 80, com concentração aproximada de 10^7 por mL. A suspensão foi inoculada em frascos contendo 50 mL de meio líquido YEL, e incubadas em agitador (180 rpm) a 28 °C durante 16 a 24 h. Após a incubação, micélios foram recolhidos por filtração a vácuo e lavados em água estéril.

A extração do DNA foi realizada conforme Azevedo *et al.* (2000), com a maceração de 400 mg de micélio em nitrogênio líquido, suspensos em 800 µL de tampão lise (200 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1% SDS), em banho a 65 °C por 20 minutos. A purificação do DNA foi realizada com fenol: clorofórmio (25:24 v:v) e

clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), precipitação em 3M NaCl - 95% etanol, lavagem com solução de etanol 70% e ressuspensão em água ultrapura, sendo o material genético tratado com ribonuclease A (20 ug / mL) (FERRANCI *et al.*, 2009).

4.6.2. Análise de RAPD

A amplificação do DNA foi realizada utilizando os primers arbitrários OPX 3, OPX 7, e OPX 11 (Invitrogen) em um Termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) de acordo com Fungaro *et al.* (1996). A genotipagem foi realizada com base na análise de loci polimórficos gerados por marcadores RAPD. A matriz de similaridade foi construída através do coeficiente de Jaccard e a análise de agrupamento através de UPGMA (Método de grupos pareados não ponderados com médias aritméticas) com o módulo SAHN (Método de agrupamento, seqüencial, aglomerativo, hierárquico não sobreposto) em NTSYS-PC (Taxonomia Numérica e Sistema de Análise Multivariada) (ROHLF, 2000). Uma Análise da Variância Molecular (ANOVA) foi realizada utilizando o software Arlequin 3.0 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) para examinar os níveis de divergência entre os grupos representados por marcadores RAPD.

4.6.3. Amplificação Parcial dos Genes de β -Tubulina e Calmodulina

O PCR e o sequenciamento foram executados conforme White *et al.* (1990). A amplificação da região do gene β -tubulina foi realizada utilizando os seguintes pares de primers: Bt2a (5 'CAA GGT AAC ATC GCT GGT TTC 3') e Bt2b (5 'ACC GTA CTC AGT GTG ACC GGC CTT 3'), como descrito por Glass e Donaldson (1995). Do mesmo modo, a região do gene calmodulina foi amplificada utilizando os primers cmd5 (5 'CCG ACA AGG AGT AGG CCT TC 3') e cmd6 (5 'CCG GAG ATA GTC ACG ATA TGG 3') de acordo com Hong *et al.* (2005). Após amplificações houve o sequenciamento direto em ambas as direções (frente e verso) em sistema MegaBaceTM Molecular Dynamics 1000 (Amersham, Pharmacia Biotech). A qualidade das sequências foi examinada utilizando o pacote de software Phred / Phrap / Consed. As sequências obtidas foram alinhadas com espécies de *Aspergillus* depositadas na base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e MycoBank (<http://www.mycobank.org>). Alinhamento e edição das sequências foram realizadas através do Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994) e a construção das árvores filogenéticas pelo programa MEGA (TAMURA *et al.*, 2007).

4.7. Técnicas de Preservação por Sílica Gel

Esta metodologia foi descrita por Onions e Smith (1983). Promoveu-se o crescimento do fungo e a suspensão dos esporos em agente protetor constituído de 5% de leite desnatado. Em seguida, a suspensão foi distribuída em tubos com sílica gel estéreis e congelados e agitada para penetração do líquido. A secagem foi realizada em estufa ou lugar escuro por uma semana com agitações constantes. Após este período os tubos foram armazenados em refrigeração ou longe da luz.

4.8. Catalogação dos Dados

Os dados obtidos, das diferentes técnicas de identificação, fonte de isolamento e a distribuição geográfica das culturas de *Aspergillus* isoladas e preservadas, foram levantados e organizados. A partir destas informações foi elaborada uma planilha/catálogo conforme recomendações WFCC (World Federation for Culture Collection – Federação Mundial de Coleções de Cultura) (1999) e Samson *et al.* (2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Levantamento dos Dados - Catalogação

Nas três últimas décadas várias espécies do gênero *Aspergillus* foram reclassificadas e descobertas, por cientistas como Horn, (1998); Ito *et al.* (2001); Peterson *et al.* (2001); Zotti; Corti (2002); Vries *et al.* (2005); Serra *et al.* (2006); Frisvad *et al.* (2007); Noonim *et al.* (2008); Pildain *et al.* (2008); Samson *et al.* (2011); Sorensen *et al.* (2011); Soares *et al.* (2012); Varga, *et al.* (2011); Taniwaki *et al.* (2012). Culturas isoladas e preservadas, há dez anos, podem ser analisadas com a tecnologia de hoje e assim sucessivamente daqui alguns anos.

Hoje, existem no mundo 622 coleções, distribuídas em 71 países, gerando 4.993 funcionários (mão de obra altamente qualificada). O Brasil contribui com 60 coleções e um total de 145.992 culturas. A formulação de dados é algo que vem sendo trabalhado nas coleções, mas não são todas que conseguem organizar as informações do seu acervo. Somente 262 coleções mundiais possuem catálogo (WFCC, 2012).

Em 15 anos de pesquisa realizada no Laboratório de Microbiologia do ITAL com fungos toxigênicos, várias espécies foram isoladas e preservadas (vide Figura 3), iniciando-se uma coleção que, em 2012, abrange 5.069 cepas de *Aspergillus*.

A seguir serão apresentadas as informações inseridas na planilha - catálogo, dos projetos desenvolvidos até o momento, sobre incidência de *Aspergillus* toxigênicos.



Figura 3. Estrutura do estoque de culturas preservadas. Tubos com as culturas preservadas por sílica gel.

5.1.1. *Aspergillus* Isolados e Preservados

Os projetos realizados no Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) desde 1998 geraram dados de identificação e produção de micotoxinas de 10.048 cepas do gênero *Aspergillus* (Figura 4).

As *Aspergillus* spp foram detectadas através da técnica do plaqueamento direto do alimento, sendo as espécies foram isoladas e purificadas.

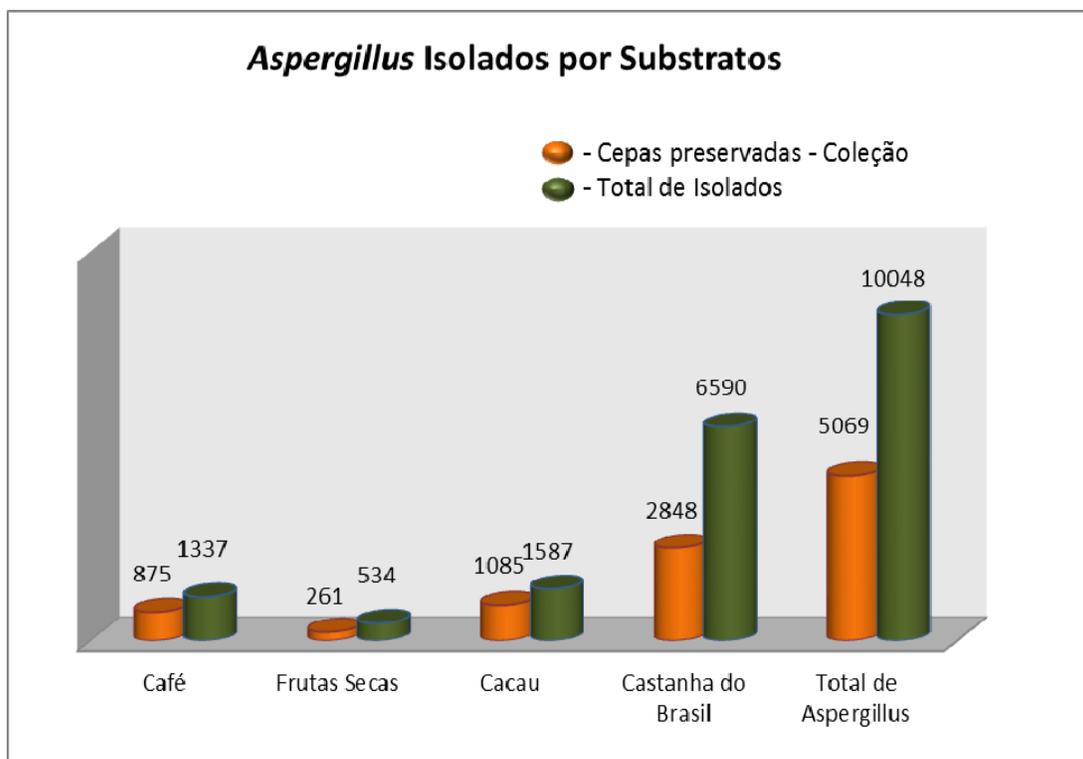


Figura 4 – Número de espécies de *Aspergillus* isoladas e substratos.

A figura 4 apresenta os números de cepas isoladas em cada categoria de alimentos. A castanha do Brasil, mesmo tendo um número menor de amostras que o café, apresentou quantidade superior do gênero *Aspergillus*. Essa diferença pode ser explicada pelo fato deste tipo de amostra ser de origem extrativista, retirada da floresta, onde o manejo é precário, há alta umidade e solo argiloso. Os ouriços são abertos na própria mata, favorecendo a contaminação (FIGUEIREDO *et al.*, 2001, TAVARES *et al.*, 2010; CAMPO/PAS, 2004).

Todos os substratos analisados são favoráveis à contaminação por *Aspergillus* spp, por causa de nutrientes, atividade de água e contato com o solo, mas a principal causa da contaminação é o manejo inadequado e a falta de boas práticas durante o

processamento (CALDERAR *et al.*, 2012, LIMA *et al.*, 2010; COPETTI, 2009; IAMANAKA, 2004; PALACIOS-CABRERA *et al.*, 2003; TANIWAKI *et al.*; 2002; URBANO, 2002).

Algumas destas culturas foram selecionadas por apresentarem características diferenciadas (representantes genuínos das principais cepas toxigênicas, diferenças morfológicas, por serem espécies novas e/ou com classificação recente, local de origem e produção de toxina) e foram preservadas pelo método de sílica gel, que de acordo com Onions e Smith (1983), mantém as culturas deste gênero por um tempo superior a 10 anos.

5.1.1.1. *Aspergillus* subgênero *Circumdati*

Espécies toxigênicas, de acordo com Frisvad *et al.* (2008), estão presentes principalmente dentro de três seções do subgênero *Circumdati*: *Flavi*, *Nigri* e *Circumdati*. As Figuras 5 e 6 ilustram o número de cepas isoladas e distribuídas nestas seções.

Espécies da section *Flavi* foram predominantes nas amostras de cacau e castanha do Brasil. São dois alimentos que apresentam em sua composição maiores quantidades de lipídeos, o cacau aproximadamente 30 a 50% (OETTERER, 2006) e a castanha do Brasil 60 a 70% (FERBERG *et al.*, 2002). Outros fatores que favorecem para a predominância deste tipo de fungo são a temperatura, a variação na umidade e a atividade de água. São alimentos originários da Bahia e da região Norte do Brasil, onde o clima quente é predominante.



Figura 5. Número de *Aspergillus* alocados pelas section *Nigri*, *Flavi* e *Circumdati*

Cepas Preservados

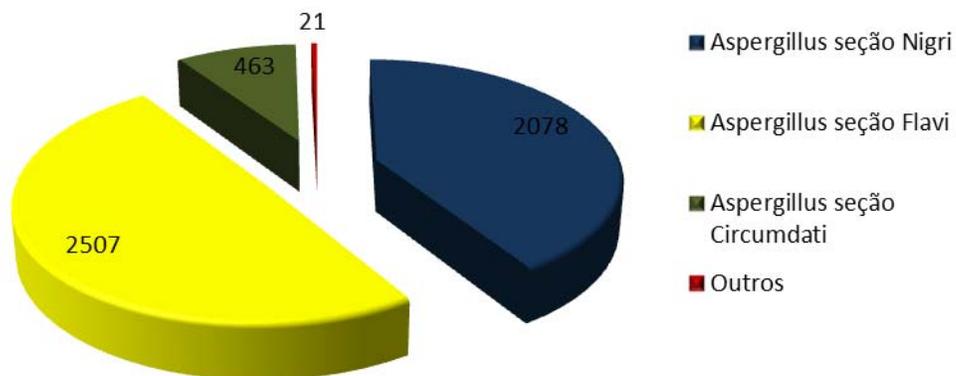


Figura 6. Número de *Aspergillus* alocados nas section *Nigri*, *Flavi* e *Circumdati* preservados na coleção.

Os números de fungos por seção, em cada tipo de amostra estão ilustrados na Figuras 7, 8 e 9.

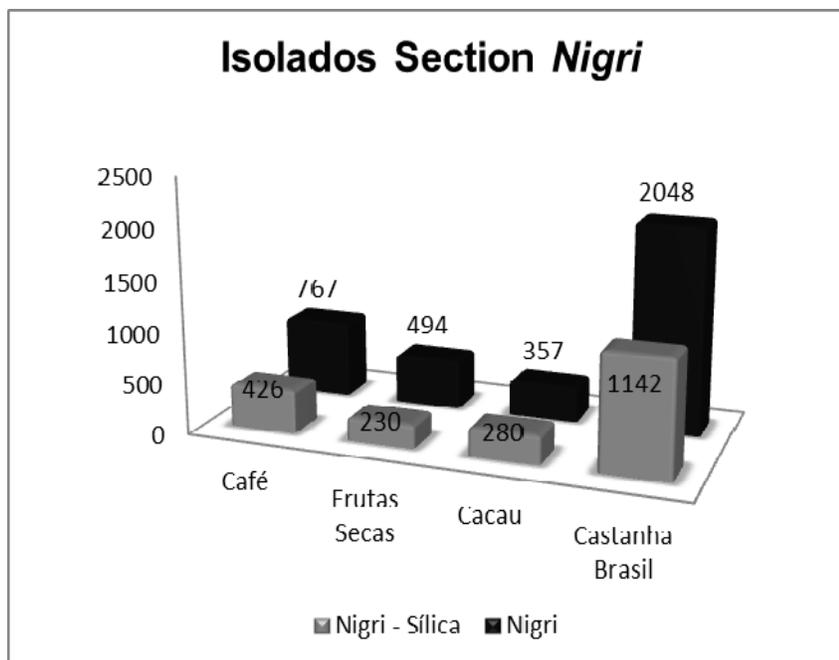


Figura 7. *Aspergillus* section *Nigri* por tipo de amostra.

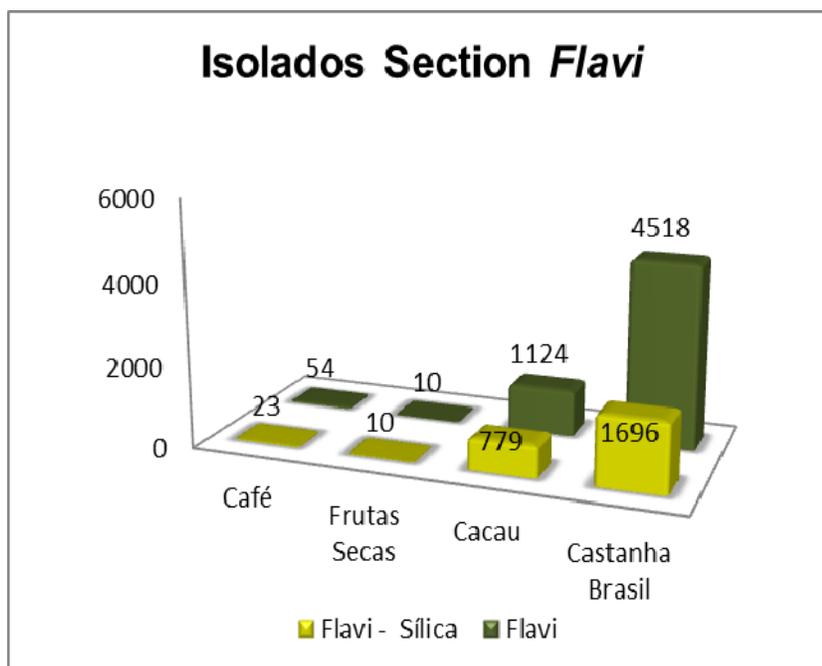


Figura 8. *Aspergillus* section *Flavi* por tipo de amostra.

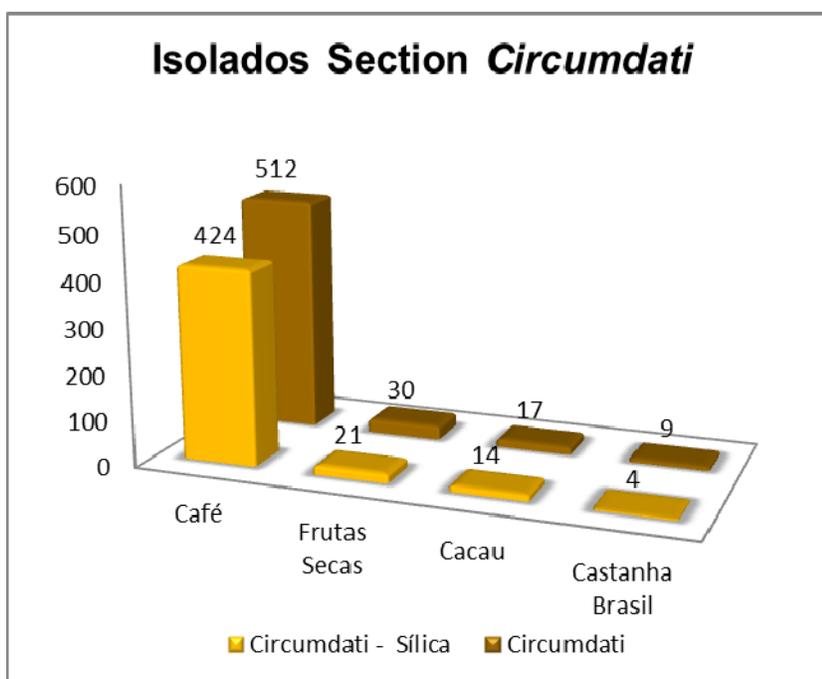


Figura 9. *Aspergillus* section *Circumdati* por tipo de amostra

A coleção é composta principalmente de fungos da section *Flavi* e *Nigri*. *Aspergillus* section *Flavi* apareceram com frequência em castanha do Brasil e cacau, mas a section *Nigri* merece destaque por aparecer em todos os substratos com um número relevante.

Os *Aspergillus section Nigri* aparecem com frequência como contaminantes de alimentos. São fungos capazes de crescer rapidamente, toleram a pH ácido (*A. carbonarius* cresceram em valores de pH 2,0 e *A. ochraceus* em pH 3,0), temperatura entre 8 °C a 45 °C e são resistentes a raios solares, por possuírem esporos com pigmentação escura. Características estas que favorecem não só sua permanência como também vantagens para competir pelo o ambiente em frente a seus competidores (NIELSEN *et al.*, 2009; PITT; HOCKING 2009; TANIWAKI *et al.*, 2006). Os fungos section *Circumdati* apareceram com um número relevante somente em amostras de café. A contaminação por fungos em café geralmente é resultado de um processamento inadequado de grãos, principalmente nas etapas de colheita, secagem, estocagem e transporte (LIMA *et al.*, 2011).

5.1.2. Fungos Produtores de Micotoxinas

Por ser uma coleção formada a partir de projetos relacionados com a garantia da segurança alimentar, visando encontrar fontes de contaminação, trabalhando com a prevenção e eliminação da contaminação, bem como o estudo das características comportamentais dos fungos, a obtenção de dados sobre a capacidade de produção de micotoxina é uma informação importante na rastreabilidade do problema.

As Figuras 10 e 11 demonstram o número de cepas de *Aspergillus* isoladas e preservadas que produzem toxinas, tais como aflatoxinas e ocratoxina A.



Figura 10. Porcentagem de *Aspergillus* produtores de micotoxina, relacionado ao total de isolados.

Cepas Preservadas

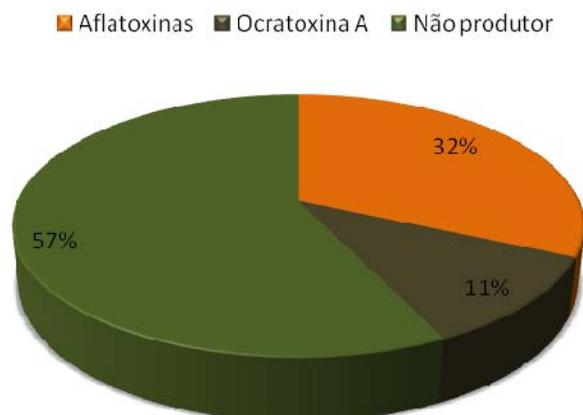


Figura 11. Porcentagem de *Aspergillus* depositados na coleção, produtores de micotoxinas.

Um total de 25% do total de isolados de *Aspergillus* section *Flavi* foram capazes de produzir aflatoxina e 7% dos *Aspergillus* section *Nigri* e section *Circumdati* foram produtores de ocratoxina A. Do total de toxigênicos, 44% foram preservados, sendo 32% das cepas isoladas foram capazes de produzir aflatoxina e 11% das cepas produtoras de ocratoxina A.

A porcentagem de fungos não produtores foi elevada, demonstrando a importância deste trabalho investigativo.

5.1.3. Identificação dos Fungos Isolados

A maioria das culturas isoladas foi identificada pelo método convencional (morfologia), no entanto a identificação polifásica vem ganhando espaço importante no campo da micologia, devido principalmente às constantes mudanças que vêm ocorrendo na taxonomia do gênero *Aspergillus*, e a limitação para identificação das espécies utilizando apenas um tipo de ferramenta. Sendo assim, algumas espécies importantes, que apresentaram características diferenciais, ou representantes de grupos, foram enviadas para outros laboratórios para a análise molecular e de metabólitos.

A Tabela 7 apresenta as principais espécies identificadas pela morfologia. As espécies da section *Nigri* apresentaram semelhanças quanto às características fenotípicas, sendo um dos grupos mais difíceis de determinar a espécie usando somente este tipo de ferramenta (PITT; HOCKING, 2009). O grupo 15 é um exemplo desta dificuldade. Alguns representantes foram enviados para serem identificados por outras metodologias, mas houve divergências e mais da metade destas cepas foram

preservadas para que mais representantes sejam identificados pela forma polifásica futuramente.

Tabela 7. Número de espécies identificadas por caracterização morfológica.

(Azul: espécies que não tem potencial de produção de toxinas).

Especies	Total	Preservadas	Especies	Total	Preservadas
<i>Aspergillus flavus</i>	1940	1022	<i>Aspergillus foetidus</i>	3	1
<i>Aspergillus parasiticus</i>	220	205	<i>Aspergillus japonicus</i>	20	15
<i>Aspergillus nomius</i>	1300	716	Grupo 15 (Section <i>Nigri</i>)	444	288
<i>Aspergillus carbonarius</i>	185	153	<i>Aspergillus caelatus</i>	744	224
<i>Aspergillus Níger</i>	2568	1406	<i>Aspergillus ibericus</i>	108	85
<i>Aspergillus ochraceus</i>	518	445	<i>Aspergillus tamarii</i>	857	184
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	29	13	<i>Aspergillus bertholletius</i>	60	46
<i>Aspergillus tubingensis</i>	48	39	<i>Aspergillus sojae</i>	264	29
<i>Aspergillus arachidicola</i>	5	2	<i>Aspergillus acidus</i>	5	1
<i>Aspergillus bombycis</i>	4	4	<i>Aspergillus aculeatinus</i>	3	1
<i>Aspergillus melleus</i>	12	9	<i>Aspergillus aculeatus</i>	11	10
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	10	4			

A seguir estão ilustrada duas tabelas de identificações, trata-se de culturas que necessitaram de ferramentas complementares para identificação até o nível de espécie (ou porque apresentaram algumas características diferenciadas da literatura ou eram espécies com classificação recente). A Tabela 8 contém as identificações através da Biologia Molecular, realizada pela Universidade Estadual de Londrina pela Dra. Maria Helena P. Fungaro e a Tabela 9 com as identificações realizadas na Universidade de Técnica da Dinamarca pelo Dr. Jens C. Frisvada.

Para o ITAL, a identificação polifásica é um desafio, pois atualmente o instituto depende de apoio de outras instituições, mas futuramente há projetos de implantação do laboratório de Biologia Molecular, que deverá enriquecer a coleção.

O catálogo apresenta uma numeração sequencial que corresponde à ordem de depósito, mais uma subnumeração que corresponde a ordem numérica de isolamento de cada projeto/ano. As culturas estão identificadas nas tabelas abaixo com a subnumeração.

Tabela 8. – Espécies de *Aspergillus* Isolados identificados pelo método molecular no laboratório da UEL pela Profa. Dra. Maria Helena P. Fungaro (MORELLO *et al.*, 2007; FERRACIN *et al.*, 2009; FIER, 2009; FERRACIN *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2012).

Nº ITAL	Identificação por molecular	Section	Localização	Substrato
7; 30; 103; 104; 105; 106;109; 113; 114; 119; 121; 123; 126; 185;186; 213; 215; 219; 642; 643; 704	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	São Paulo	Café
97; 108; 167; 200; 207; 217	<i>A. tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	São Paulo	Café
163; 234; 249	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>Circumdati</i>	São Paulo	Café
259	<i>A. ochraceus</i>	<i>Circumdati</i>	São Paulo	Café
148	<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	Minas Gerais	Café
128; 142	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>Circumdati</i>	Minas Gerais	Café
413; 418; 444; 446; 448; 477	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Paraná	Café
414; 415; 416; 419; 421; 442; 443; 445; 447; 449	<i>A. tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	Paraná	Café
777	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Rondônia	Café
176; 177; 178; 180; 424; 425; 426; 428; 429; 430; 431; 437; 438; 439	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Argentina	Frutas Secas
166; 460; 517	<i>A. tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	Argentina	Frutas Secas
461	<i>A.foetidus</i>	<i>Nigri</i>	Argentina	Frutas Secas
152	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Chile	Frutas Secas
318; 327; 331; 332	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Espanha	Frutas Secas
263; 277; 313; 319; 326; 503	<i>A. tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	Espanha	Frutas Secas
325	<i>A.foetidus</i>	<i>Nigri</i>	Espanha	Frutas Secas
402; 403; 404; 405; 406; 528	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	EUA	Frutas Secas
150	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Irã	Frutas Secas
499; 500; 501	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	México	Frutas Secas
490; 493; 494; 496; 498	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Tunísia	Frutas Secas
249; 250	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Turquia	Frutas Secas
353; 354; 356; 363	<i>A. tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	Turquia	Frutas Secas
135	<i>A.flavus</i>	<i>Flavi</i>	Bahia	Cacau
57; 79; 79B; 98; 136; 146; 147; 182; 183; 240; 250; 366; 375	<i>A.parasiticus</i>	<i>Flavi</i>	Bahia	Cacau
781	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>Flavi</i>	Bahia	Cacau
103; 681	<i>A.caelatus</i>	<i>Flavi</i>	Bahia	Cacau
62A; 100; 102; 126; 131A; 135B; 138; 140; 149; 170; 188; 194; 303; 306;378A; 706; 722; 809	<i>A.flavus</i>	<i>Flavi</i>	Bahia	Cacau
161; 181; 220; 226; 228; 700; 731	<i>A.nomius</i>	<i>Flavi</i>	Bahia	Cacau
137; 250B	<i>A.tamarii</i>	<i>Flavi</i>	Bahia	Cacau
1346; 1409; 1432	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>Flavi</i>	Bahia	Cacau
791; 792	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>Flavi</i>	Amazonas	Castanha do Brasil
189	<i>A.arachidicola</i>	<i>Flavi</i>	Amazonas	Castanha do Brasil

Nº ITAL	Identificação por molecular	Section	Localização	Substrato
116; 259; 262; 7155; 7179; 7180; 7189; 7191; 7192; 7193; 7195; 7196; 7197; 7224	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	Amazonas	Castanha do Brasil
89; 245; 246	<i>A.bombycis</i>	<i>Flavi</i>	Amazonas	Castanha do Brasil
79; 87; 91; 95; 96; 121; 140; 201; 212; 216; 225; 243	<i>A.caelatus</i>	<i>Flavi</i>	Amazonas	Castanha do Brasil
57; 58; 60; 62; 67; 70; 72; 74; 113; 205; 254; 261; 263	<i>A.flavus</i>	<i>Flavi</i>	Amazonas	Castanha do Brasil
103A; 153; 156; 157; 158*; 159*; 160; 161; 162*; 228*; 229*; 231*; 232*; 233*; 234*; 236; 240; 269; 276*; 277; 278; 279	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Amazonas	Castanha do Brasil
94; 98; 114; 120; 122; 139; 144; 148; 192; 193; 206; 213; 215; 217; 223; 244; 255; 256	<i>A.nomius</i>	<i>Flavi</i>	Amazonas	Castanha do Brasil
179	<i>A.pseudoflavus</i>	<i>Flavi</i>	Amazonas	Castanha do Brasil
76; 80; 81; 119; 123; 129; 142; 198; 207; 219; 226; 227; 248; 249; 250; 251; 252; 7630	<i>A.tamaritii</i>	<i>Flavi</i>	Amazonas	Castanha do Brasil
1233	<i>A.arachidicola</i>	<i>Flavi</i>	Para	Castanha do Brasil
50; 301; 330	<i>A.caelatus</i>	<i>Flavi</i>	Para	Castanha do Brasil
20; 24; 26; 31; 35; 40; 48; 49; 336; 371; 375	<i>A.flavus</i>	<i>Flavi</i>	Para	Castanha do Brasil
1277; 1279; 1281; 1282	<i>A.ibericus</i>	<i>Nigri</i>	Para	Castanha do Brasil
1182	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	Para	Castanha do Brasil
333 ^a	<i>A.nomius</i>	<i>Flavi</i>	Para	Castanha do Brasil

*Grupo 15 (Section *Nigri*).

Tabela 9. Espécies de *Aspergillus* Isolados e identificados pelo método de extração de metabólitos secundários - Laboratório DTU – Dr. Jens C. Frisvad. (COPETTI, 2009).

Nº ITAL	Section	Localização	Substrato	Identificação por Metabólitos	Resultado dos Principais Extrólitos Extraídos
466; 479	<i>Nigri</i>	São Paulo – BR	Café	<i>A. foetidus</i>	Positivo: Asparizina; Piranonigrina A; Nafto- γ - Pirononas e Antafumionisinas; Negativo: Ocratoxina A.
325	<i>Nigri</i>	Espanha	Frutas Secas		
461	<i>Nigri</i>	Argentina	Frutas Secas		
1248	<i>Nigri</i>	Bahia – BR	Cacau		
166; 457; 460; 517	<i>Nigri</i>	Argentina	Frutas Secas	<i>A. tubingensis</i>	Positivo: Funalenona; Piranonigrina A; CAR; Nafto- γ - Pirononas; Variável: Ocratoxina A; Asparazina Tensidol B; NOE; DERH; Malformina.
263; 277; 313; 319; 326; 503	<i>Nigri</i>	Espanha	Frutas Secas		
403	<i>Nigri</i>	EUA	Frutas Secas		
501	<i>Nigri</i>	México	Frutas Secas		
353; 354; 356; 363	<i>Nigri</i>	Turquia	Frutas Secas		
264; 1001; 1250; 1633	<i>Nigri</i>	Bahia – BR	Cacau		
594*; 596*; 671; 672; 687; 714	<i>Nigri</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil	<i>A. acidus</i>	Positivo: Tensidol B; Piranonigrina A; Nafto- γ - Pirononas; Funalenona; Variável: DERH; Negativo: Ocratoxina A.
160	<i>Nigri</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil		
877; 922; 1280; 1326	<i>Nigri</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		
1529	<i>Nigri</i>	Bahia – BR	Cacau	<i>A. aculeatinus</i>	Positivo: Neoxalina; Ácido Secalonico D e F e Aculeacinas; Negativo: Ocratoxina A.
1209; 1212	<i>Nigri</i>	Para – BR	Castanha do Brasil	<i>A. aculeatus</i>	Positivo: Glabrinol; Neoxalina; Ácido Secalônico D e F; Negativo: Ocratoxina A.
1509; 1531	<i>Nigri</i>	Bahia – BR	Cacau		
365	<i>Nigri</i>	Para – BR	Castanha do Brasil	<i>A. carbonarius</i>	Positivo: CAR; DERH; Xantomegnina; Piranonigrina A; Nafto- γ - Pirononas e Ocratoxina A; Variável: NOE.
392; 791; 1150; 1160; 1161; 1375; 2153	<i>Nigri</i>	Bahia – BR	Cacau		
526	<i>Nigri</i>	Argentina	Frutas Secas	<i>A. ibericus</i>	Positivo: Funalenona; Asparazina; Piranonigrina A e Nafto- γ - Pirononas; Negativo: Ocratoxina A.
1214; 1297; 1327; 1328; 1329; 1334; 1460; 1461	<i>Nigri</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		
1336	<i>Nigri</i>	Para – BR	Castanha do Brasil	<i>A. neoniger</i>	Positivo: Funalenona; Kotanina; Tensidol B; Piranonigrina A e Ocratoxina A.

Nº ITAL	Section	Localização	Substrato	Identificação por Metabólitos	Resultado dos Principais Extrólitos Extraídos
177; 180; 424; 425; 426; 429; 431; 437; 447	<i>Nigri</i>	Argentina	Frutas Secas	<i>A.niger</i>	Positivo: Tensidol B; Piranonigrina A; Nafto-γ- Pirononas; Funalenona e DEDO; Variável: NOE; Orlandina; Ocratoxina A; Kotanina; DERH e CAR.
152	<i>Nigri</i>	Chile	Frutas Secas		
318; 331	<i>Nigri</i>	Espanha	Frutas Secas		
402	<i>Nigri</i>	EUA	Frutas Secas		
500	<i>Nigri</i>	México	Frutas Secas		
490; 491; 498	<i>Nigri</i>	Tunísia	Frutas Secas		
246; 249; 250; 253	<i>Nigri</i>	Turquia	Frutas Secas		
632; 777; 1113; 1121; 1240; 1242; 1244; 1246; 1469	<i>Nigri</i>	Bahia – BR	Cacau		
157; 159*; 162*; 163*; 237; 238; 1001	<i>Nigri</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil		
911; 937A; 1206; 1276; 1278; 1330; 1331; 1332; 1333; 1335; 1337; 1338; 1339; 1340; 1341; 1342; 1344; 1345 até 1371; 1382; 1398; 1399; 1400; 1402; 1403; 1459; 1462	<i>Nigri</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		
118	<i>Circumdati</i>	São Paulo – BR	Café	<i>A.westerdijkiae</i>	Positivo: Ácido Penicílico; Xantomegninas; Viomelleína; Aspergamidas A e B; Vioxantinas; Melleína; Ocratoxina A e Circundatinas A e B; Variável: Aspirona.
130; 134	<i>Circumdati</i>	Minas Gerais – BR	Café		
93; 94; 1524	<i>Circumdati</i>	Bahia – BR	Cacau		
70; 72; 74	<i>Circumdati</i>	São Paulo – BR	Café	<i>A. melleus</i>	Positivo: Xantomegninas; Viomelleína; Aspergamida A ; Vioxantina, Ost e Melleína; Variável: Ocratoxina A; Ácido Aspergílico; Aspergamida B.
116; 124	<i>Circumdati</i>	Minas Gerais – BR	Café		
27B; 151; 201A; 547; 549; 1673	<i>Circumdati</i>	Bahia – BR	Cacau		
150; 201B	<i>Circumdati</i>	Bahia - BR	Cacau	<i>A. ochraceus</i>	Positivo: Xantomegninas; Viomelleína; Aspergamida A; Vioxantina; An-Aspergamidas e Melleína; Variável: Ocratoxina A; Aspergamida B e Aspirona.
262; 7155; 7157; 7179; 7180; 7189; 7191 até 7193; 7195; 7196; 7197	<i>Flavi</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil	<i>A.bertholletius</i>	Positivo: Ácido Kójico; Ácido Ciclopiazonico; Negativo: Aflatoxinas.
1784; 1875	<i>Flavi</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		
246	<i>Flavi</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil	<i>A.bombycis</i>	Positivo: Ácido Kójico; Aflatoxina B1 e G1; Acido Tenuazônico; Acido Aspergílico.

Nº ITAL	Section	Localização	Substrato	Identificação por Metabólitos	Resultado dos Principais Extrólitos Extraídos
97; 201; 225; 437; 444; 499; 562; 563	<i>Flavi</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil	<i>A.caelatus</i>	Positivo: Ácido Kójico; Alcaloides; Variável: Ácido Ciclopiazônico; Acido Tenuazônico; Negativo: Aflatoxinas.
1186; 1225; 1232; 1234; 1235; 1235B; 1258; 1265; 1266; 1271; 1288; 1290; 1310; 1445; 1451; 1574; 1579; 3553	<i>Flavi</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		
62A; 62B; 131A; 149; 378A; 520A; 520B; 520C; 654; 722; 731B; 809; 826; 914A; 914B; 1174; 1176; 1216; 1228	<i>Flavi</i>	Bahia – BR	Cacau	<i>A.flavus</i>	Positivo: Ácido Kójico; Aflavinas; Ditriptofenalina; Variável: Aflatoxina B1 e B2; Ácido Ciclopiazônico; Esterigmatocistina; Parasiticolida; Flaviminas I e II; Negativo: Aflatoxina G.
378B	<i>Flavi</i>	Bahia – BR	Cacau		
69; 86; 131; 167; 168; 169; 170; 191; 194	<i>Flavi</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil		
48; 1118; 1118B; 1127; 1250; 1257; 1261; 1264; 1268; 1271B; 1272; 1275; 1301; 1305; 1306; 1321; 1372; 1373; 1374; 1375; 1376; 1378; 1379; 1380; 1381; 1383; 1385; 1389; 1390; 1391; 1392; 1393; 1394; 1408; 1428; 1429; 1430; 1431; 1443; 1447; 1448; 1529; 1700; 1836	<i>Flavi</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		
161; 226; 700; 731; 931	<i>Flavi</i>	Bahia – BR	Cacau	<i>A.nomius</i>	Positivo: Ácido Kójico; NO2 Aflatoxina B1 e G1; Variável: Acido Tenuazônico; Aflavinas; Versicolorinas; CNO; NB2; Aflatoxina B2 e G2.
1438B	<i>Flavi</i>	São Paulo – BR	Castanha do Brasil		
94; 120; 189; 244; 438; 476; 486; 491; 496; 525; 532; 573; 585; 587; 589; 608; 617; 628; 650; 657; 658; 696; 699A; 723; 730; 743; 764; 995; 996; 998; 999; 1000; 6226; 6245	<i>Flavi</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil		
1095; 1228 até 1231; 1252; 1254; 1262; 1286; 1289; 1290B; 1298; 1299; 1303; 1310B; 1316; 1317; 1320; 1322; 1325; 1434; 1457; 1463; 1833; 3050; 3087; 3332; 4456; 4466; 4472	<i>Flavi</i>	Para - BR	Castanha do Brasil		
79; 183; 240; 366; 720	<i>Flavi</i>	Bahia – BR	Cacau	<i>A.parasiticus</i>	Positivo: Ácido Kójico; Aflatoxina B1B2 e G1G2; Parasiticolida.
1233	<i>Flavi</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		
1730	<i>Flavi</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		

Nº ITAL	Section	Localização	Substrato	Identificação por Metabólitos	Resultado dos Principais Extrólitos Extraídos
1300	<i>Flavi</i>	Para – BR	Castanha do Brasil	<i>A.pseudocaelatus</i>	Positivo: Ácido Kójico; NO2; Aflatoxina B1B2 e G1G2; Aflavinas; Parasiticolida; Esterigmatocistina.
179	<i>Flavi</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil	<i>A.pseudoflavus</i>	Positivo: Aflavinas; Ditriptofenalina; Negativo: Aflatoxinas.
791; 792	<i>Flavi</i>	Amazonas – BR	Castanha do Brasil	<i>A.pseudotamaris</i>	Positivo: Ácido Kójico; Aflatoxina B1; Alcaloides; SCYT. Variável: Aflavinas
1433	<i>Flavi</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		
781; 137; 346; 1409; 1432	<i>Flavi</i>	Bahia – BR	Cacau	<i>A.tamaris</i>	Positivo: Ácido Kójico; Ácido Ciclopiazônico; Variável: Ditriptofenalina.
1325B	<i>Flavi</i>	São Paulo – BR	Cacau		
119; 129; 137; 198; 219; 226; 227; 7630	<i>Flavi</i>	Amazonas – BR	Cacau		
1174; 1179; 1187; 1235B; 1248; 1270; 1295; 1307; 1313; 1314; 1407; 1411; 1412; 1417; 1418; 1419; 1420; 1421; 1423; 1426; 1427; 1432; 1435; 1436; 1437; 1438; 1439; 1440; 1441; 1442; 1444; 1446; 1449; 1450; 1454; 1455; 1456; 1464; 1465	<i>Flavi</i>	Para – BR	Castanha do Brasil		
842; 884; 1587B; 1589; 1590; 1591; 1604; 1607; 1623; 1635; 1645; 1433; 1652	<i>Flavi</i>	Bahia – BR	Cacau	<i>Aspergillus sp - grupo tamaris</i>	Positivo: Ácido Kójico; Ácido Ciclopiazônico; Variável: Ditriptofenalina.

Alguns metabólitos ainda não foram elucidados como: CAR; NOE; DERH; DEDO; NO2; CNO; NB2; SCYT e Ost, mas são elementos importantes na diferenciação das espécies etc (NIELSEN *et al.*, 2009; VARGA *et al.* 2011 a, b).*Grupo 15 (Section *Nigri*).

Na tabela 10 estão apresentados os resultados das espécies por identificação polifásica. A grande maioria dos fungos apresentou coerência, mas houve divergências para algumas culturas, as de número 403 e 501 isoladas de frutas secas, que pelo método identificações morlecular classificou como *A. niger* e pela metabólita como *A. tubingensis*. Neste caso, os aspectos morfológicos como coloração e diâmetro de colônia, tamanho e forma dos conídios, por exemplo, não foi conclusiva, pois são duas espécies semelhantes neste aspecto (FERRACIN *et al.*, 2009). A metodologia que indicou melhor resultado foi a molecular (maior semelhança na comparação), *A.niger*, mesmo sendo o fungo capaz de produzir um extrólito (asparazine) mais frequente em *A. tubingensis*.

Para os isolados 781,1409 e 1432 de cacau, os fatores determinantes para a identificação, além dos aspectos morfológicos, foi à presença ou ausência da produção de toxina pelo fungo. *A. caelatus* e *A. tamarii* são fungos não produtores (HORN, 1997; PITT; HOCKING, 2009) já que *A. arachidicola* e *A. pseudotamarii* produzem aflatoxinas (ITO *et al.*, 2001; PILDAIN *et al.*, 2008).

Nas espécies 160, 189 e 1233 isoladas de castanha do Brasil, a identificação morfológica distinguiu as espécies divergentes.

Todas as formas de identificar apresenta eficiência, mas existem variações devido a fatores como: nutrientes, temperatura e fonte de isolamento, que influenciam na cultura fazendo desenvolver características, mutações e metabólitos que não são comumente frequentes nas espécies padrões, como problemas relacionados a sequências depositadas em banco de dados on line, sem ratreabilidade (SAMSON *et al.*, 2011).

São microrganismos “selvagens” submetidos a diversas condições e por isso com reações diferentes.

Tabela 10. Espécies de *Aspergillus* Isolados através de identificação polifásica.

Nº ITAL	Identificação por morfologia	Identificação por molecular	Identificação por metabolitos	Section	Sílica	Substrato	Localização	Período do isolamento
152	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Ameixa seca	Chile	2002
166	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	não	Uva passa escura	Argentina	2002
177	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	sim	Uva passa escura	Argentina	2002
180	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Uva passa escura	Argentina	2002
249	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	sim	Figo seco	Turquia	2002
250	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Figo seco	Turquia	2002
263	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	sim	Tâmaras	Espanha	2002
277	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	sim	Tâmaras	Espanha	2002
313	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	não	Tâmaras	Espanha	2002
318	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Tâmaras	Espanha	2002
319	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	não	Tâmaras	Espanha	2002
325	<i>A.foetidus</i>	<i>A.foetidus</i>	<i>A.foetidus</i>	<i>Nigri</i>	não	Tâmaras	Espanha	2002
326	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	sim	Tâmaras	Espanha	2002
331	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Tâmaras	Espanha	2002
353	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	sim	Uva passa escura	Turquia	2002
354	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	não	Uva passa escura	Turquia	2002
356	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	sim	Uva passa escura	Turquia	2002
363	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	sim	Uva passa escura	Turquia	2002
402	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Uva passa escura	EUA	2002
403	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	não	Uva passa escura	EUA	2002
424	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	sim	Ameixa seca	Argentina	2002
425	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	sim	Ameixa seca	Argentina	2002
426	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Ameixa seca	Argentina	2002
429	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Ameixa seca	Argentina	2002
431	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Ameixa seca	Argentina	2002
437	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Ameixa seca	Argentina	2002
460	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	sim	Uva passa escura	Argentina	2002
461	<i>A.foetidus</i>	<i>A.foetidus</i>	<i>A.foetidus</i>	<i>Nigri</i>	não	Uva passa escura	Argentina	2002
490	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Tâmaras	Tunísia	2002
498	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	sim	Tâmaras	Tunísia	2002
500	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Tâmaras	México	2002
501	<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	não	Tâmaras	México	2002
503	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	sim	Tâmaras	Espanha	2002
517	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	sim	Uva passa escura	Argentina	2002

Nº ITAL	Identificação por morfologia	Identificação por molecular	Identificação por metabolitos	Section	Sílica	Substrato	Localização	Período do isolamento
62A	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2006
79	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2006
103	<i>A. caelatus</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>A. arachidicola</i>	<i>Flavi</i>	não	Cacau	Bahia	2006
131A	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2006
137	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	não	Cacau	Bahia	2006
149	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2006
161	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>Flavi</i>	não	Cacau	Bahia	2006
183	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2006
226	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2006
240	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2006
366	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2006
378A	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2006
700	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2007
722	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2007
731	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>Flavi</i>	não	Cacau	Bahia	2007
781	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2007
809	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Cacau	Bahia	2007
1409	<i>A. tamarii</i>	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	não	Cacau	Bahia	2007
1432	<i>A. tamarii</i>	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	não	Cacau	Bahia	2007
48	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Para	2009/2011
94	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
119	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
120	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
129	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
157	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
159*	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
160	<i>A. acidus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. acidus</i>	<i>Nigri</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
162*	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
179	<i>A. pseudoflavus</i>	<i>A. pseudoflavus</i>	<i>A. pseudoflavus</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
189	<i>A. arachidicola</i>	<i>A. arachidicola</i>	<i>A. nomius</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
198	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
201	<i>A. caelatus</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
219	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
225	<i>A. caelatus</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
226	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011

Nº ITAL	Identificação por morfologia	Identificação por molecular	Identificação por metabolitos	Section	Sílica	Substrato	Localização	Período do isolamento
227	<i>A.tamarit</i>	<i>A.tamarit</i>	<i>A.tamarit</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
244	<i>A.nomius</i>	<i>A.nomius</i>	<i>A.nomius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
246	<i>A.bombycis</i>	<i>A.bombycis</i>	<i>A.bombycis</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
262	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
791	<i>A. pseudotamarit</i>	<i>A. pseudotamarit</i>	<i>A. pseudotamarit</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
792	<i>A. pseudotamarit</i>	<i>A. pseudotamarit</i>	<i>A. pseudotamarit</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
1233	<i>A.arachidicola</i>	<i>A.arachidicola</i>	<i>A.parasiticus</i>	<i>Flavi</i>	não	Castanha do Brasil	Para	2009/2011
7155	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7157	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7179	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7180	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7189	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7191	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7192	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7193	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7195	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7196	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7197	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>A.bertholletius</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011
7630	<i>A.tamarit</i>	<i>A.tamarit</i>	<i>A.tamarit</i>	<i>Flavi</i>	sim	Castanha do Brasil	Amazonas	2009/2011

*Grupo 15 (Section *Nigri*)

5.1.4. Distribuição das Culturas

Outra informação importante para constar em um banco de dados é a origem do microrganismo. As Figuras 12 e 13 mostram a distribuição geográfica das culturas.

A maioria das cepas foi isolada de amostras do Brasil (Castanha do Brasil, café, frutas secas e cacau)

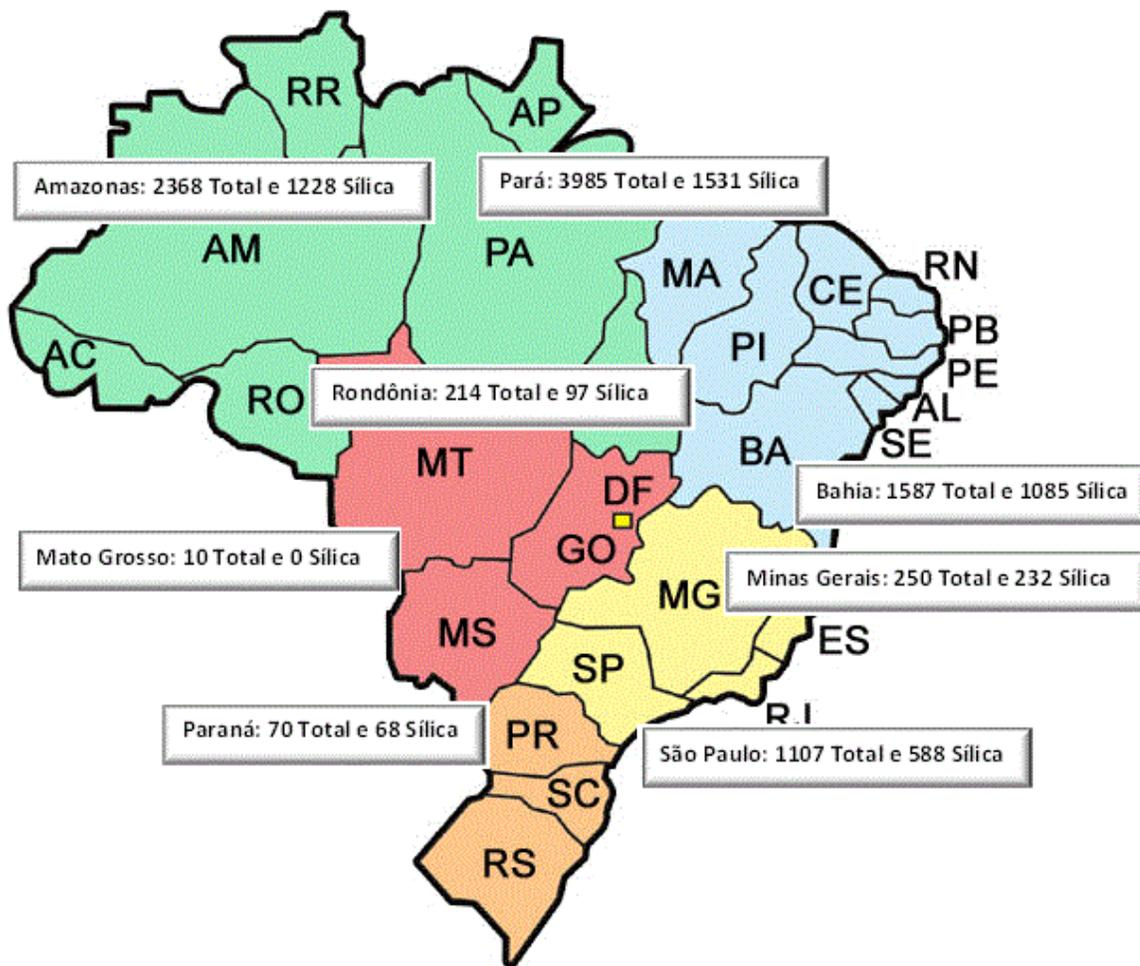


Figura 12. Distribuição dos *Aspergillus* Isolados em diferentes estados do Brasil que foram preservados. Fonte da imagem: www.google.com.br (imagens).

O projeto de frutas secas foi o responsável por aumentar esta distribuição para o aspecto mundial, pois uma parte das amostras provinha de outros países (Figura 13).

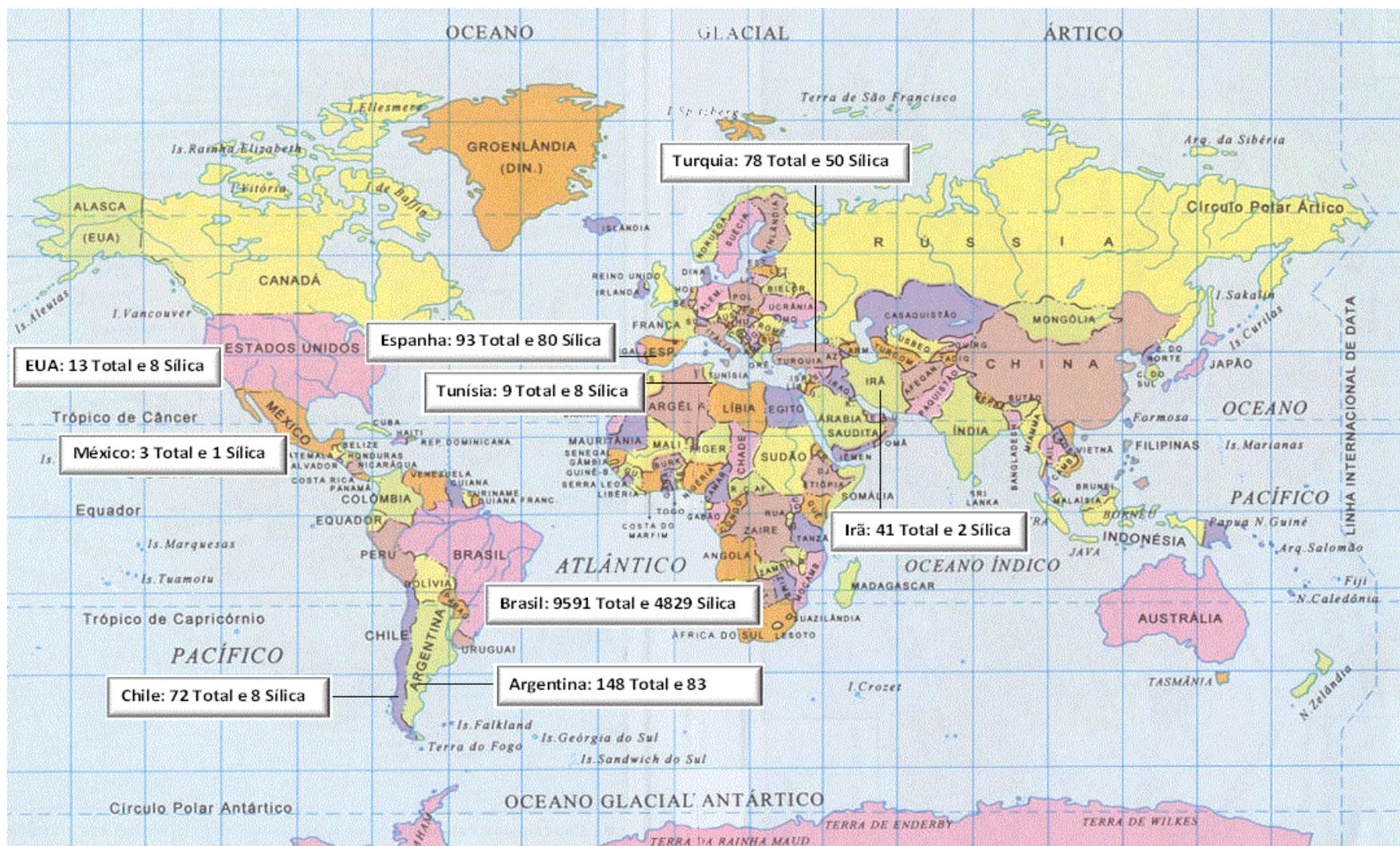


Figura 13. Distribuição mundial dos *Aspergillus* Isolados e preservados. Fonte imagem: www.google.com.br (imagens)

5.1.5. Biodiversidade

As Figuras 14 a 37 ilustram a biodiversidades das cepas que estão presentes na coleção ITAL de fungos, pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Os fungos ilustrados são as principais espécies submetidas por mais de um método de identificação. As fotos se referem a colônias isoladas em Agar Czapek Extrato de Levedura ou *Aspergillus Flavus* Parasiticus após 7 dias em diferentes temperaturas e características microscópicas - microscópico óptico, aumento de 400 vezes.

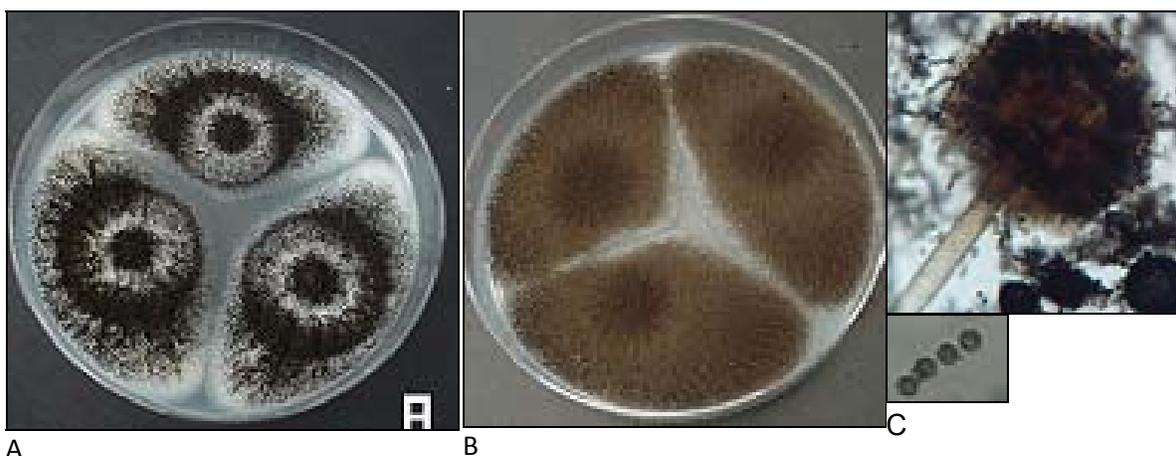


Figura 14. *Aspergillus acidus* número ITAL 160 cB (castanha do Brasil – Identificação por Metabólitos e Morfológica. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (60 mm); B – Colônia a 37 °C CYA (55 mm) C- Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 3 – 4 μ m, liso/levemenete áspero).

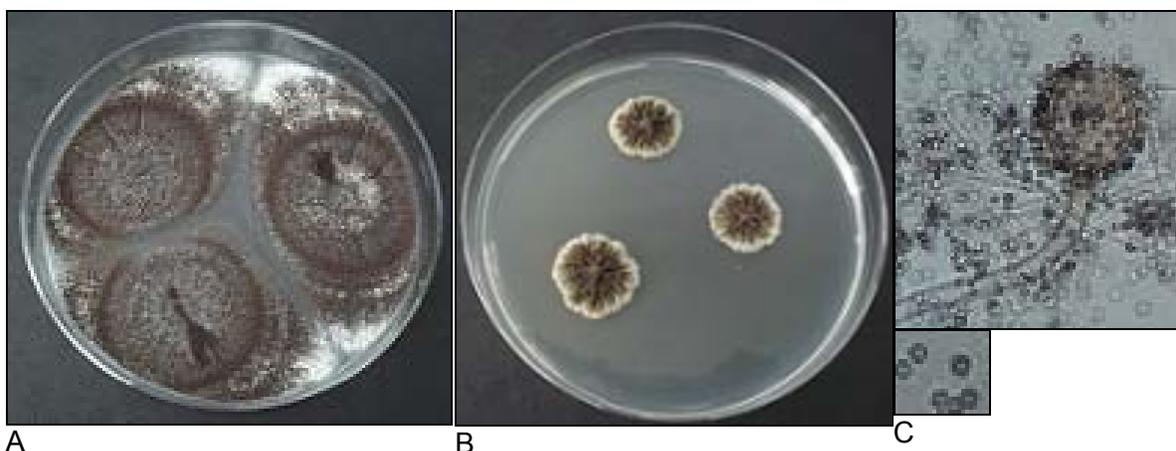


Figura 15. *Aspergillus aculeatus* número ITAL 1247cc (cacau) – Identificação Morfológica Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (60 mm); B – Colônia a 37 °C CYA (16 mm); C - Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/elipsoidal, 3 – 5 μ m, liso).

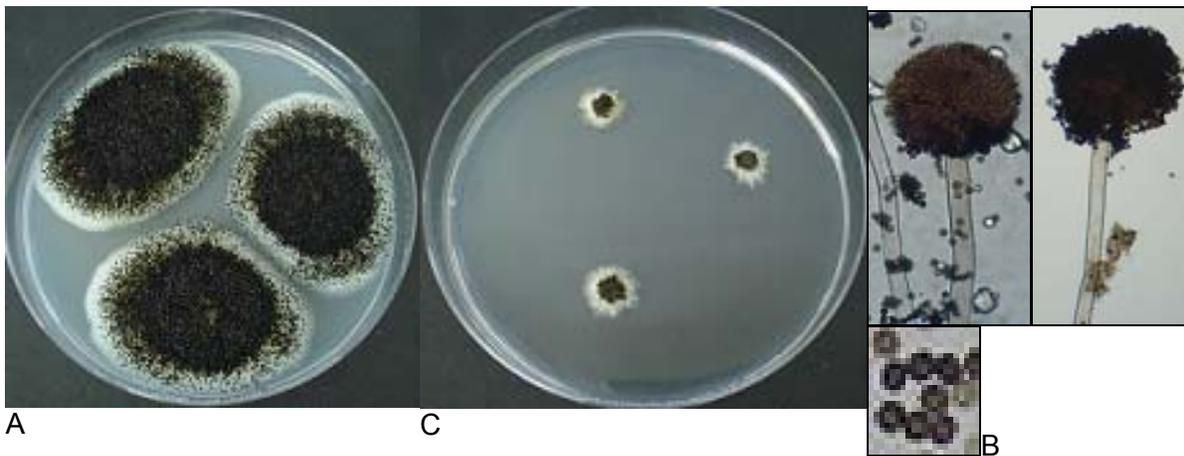


Figura 16. *Aspergillus carbonarius* número ITAL 1375 cB (castanha do Brasil) – Identificação por Metabólitos e Morfológica. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (50 mm); B - Colônia a 37 °C CYA (10 mm); C - Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 7 – 10 μ m, rugoso).

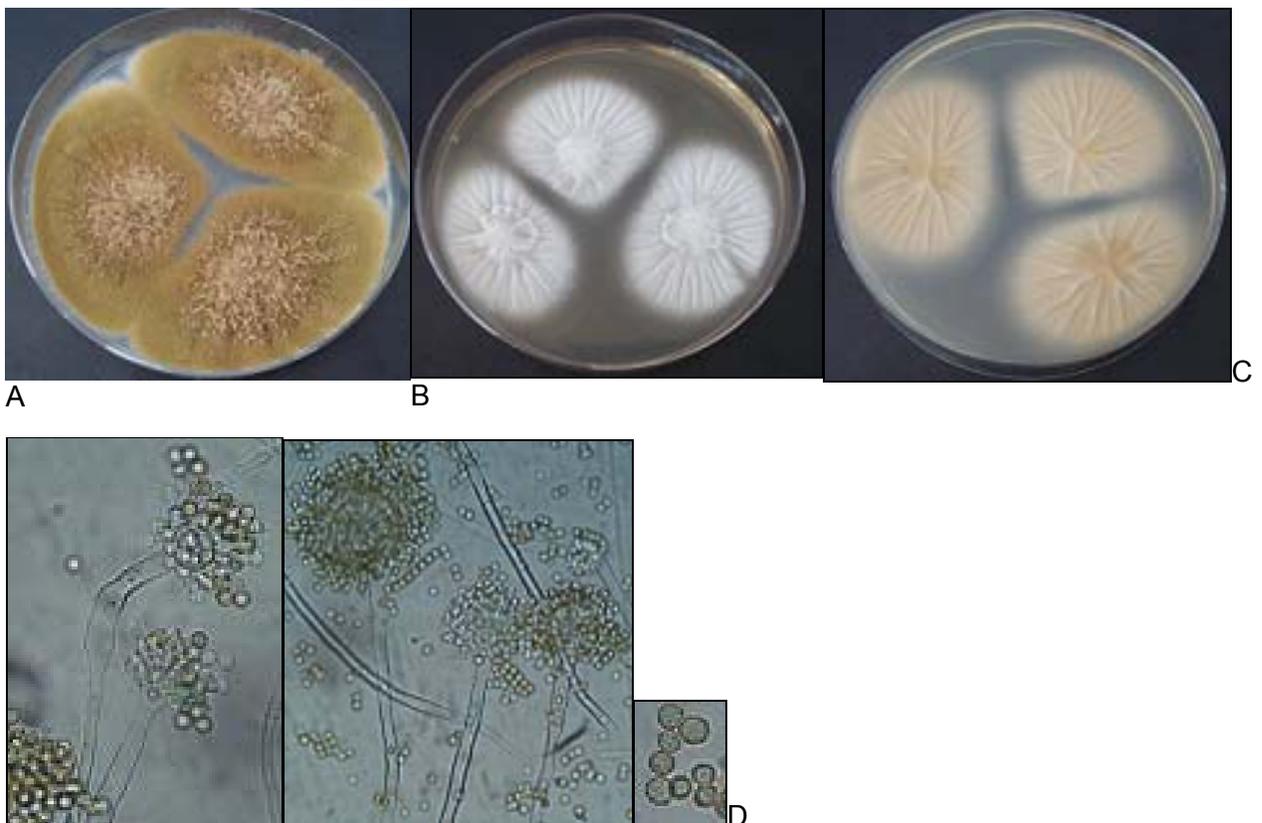
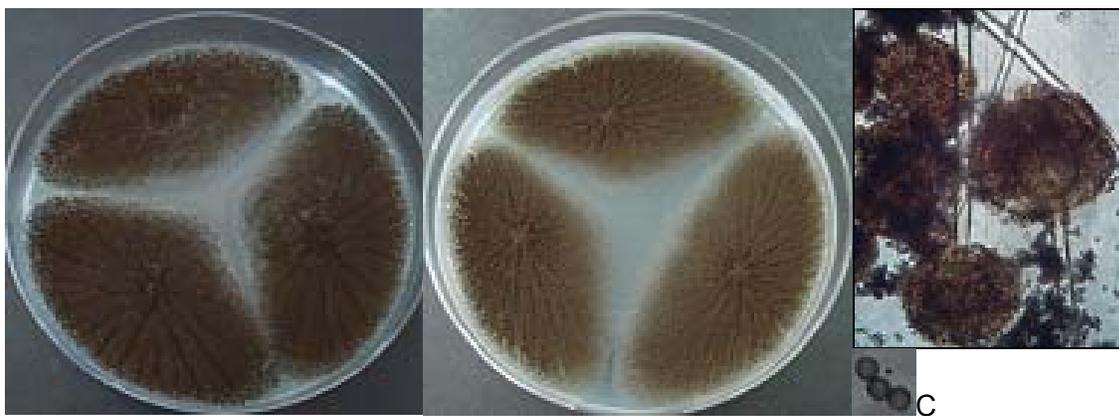


Figura 17. *Aspergillus bertholletius* número ITAL 7191 cB (castanha do Brasil) – Identificação Polifásica – Não cresce a 37 °C. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (65 mm); B – Colônia AFPA; C - Colônia AFPA Reverso; D - Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 5,5 – 6,5 μ m, rugoso/levemente espinhoso).



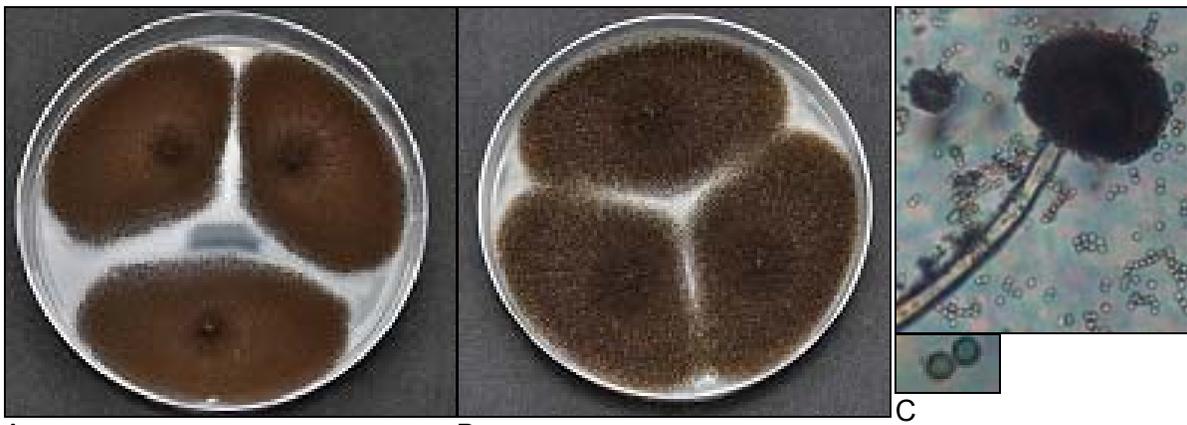
A B C
 Figura 18. *Aspergillus foetidus* número ITAL 325 fs (frutas secas) – Identificação Polifásica. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (60 mm); B - Colônia a 37 °C CYA (60 mm); C – Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 4 – 5 μ m, liso/levemente rugoso).



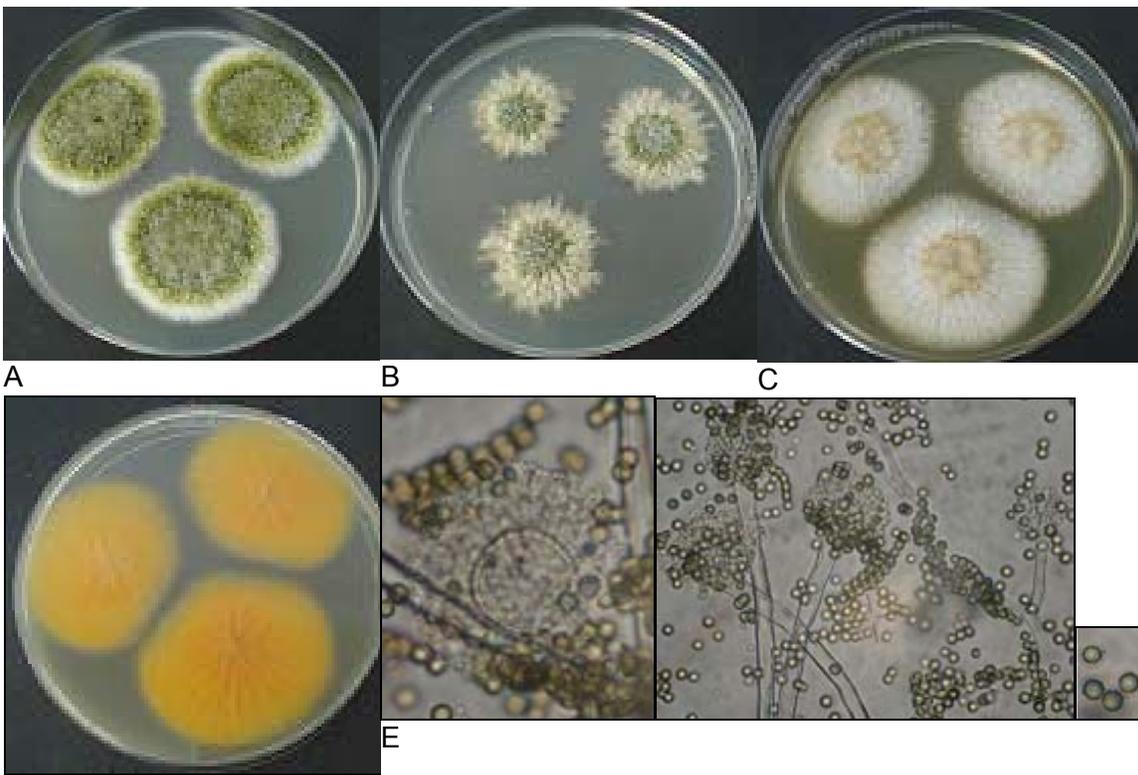
A B C



D
 Figura 19. *Aspergillus bombycis* número ITAL 246 cB (castanha do Brasil) – Identificação Polifásica – Não cresce a 37 °C. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (65 mm); B - Colônia AFPA; C - Colônia AFPA Reverso; D - Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 4 – 7 μ m, rugoso)



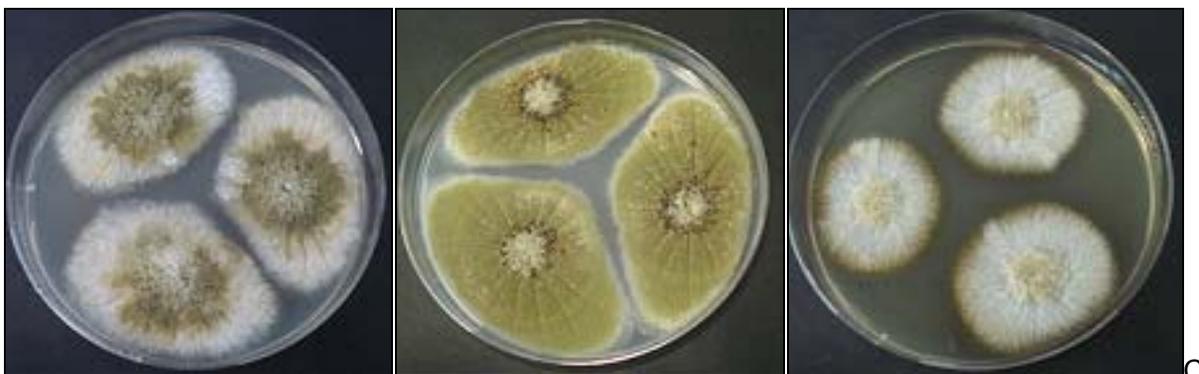
A B C
 Figura 20. *Aspergillus ibericus* número ITAL 526 fs (frutas secas) – Identificação por Metabólitos e Morfológica. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (45 mm); B – Colônia a 37 °C CYA (60 mm); C - Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/sub-globoso, 5 – 7 μ m, rugoso/espinhoso).



A B C
 D E
 Figura 21. *Aspergillus caelatus* número ITAL 95 cB (castanha do Brasil) – Identificação Morfológica, Molecular. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (40 mm); B – Colônia a 37 °C (30 mm); C - Colônia AFPA; D - Colônia AFPA Reverso; E - Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 5 – 6 μ m, rugoso/espinhoso).



A B C
 Figura 22. *Aspergillus melleus* número isolamento ITAL 151 cc (cacau) – Identificação por Metabólitos e Morfológica. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (40 mm); B – Colônia a 37 °C CYA (20 mm); C - Estruturas Microscópicas (Conídio: elipsoidal/cilíndrico, 3 – 3,5 µm, rugoso/espinhoso).



A B C



D E
 Figura 23. *Aspergillus flavus* número ITAL 62A cc (cacau) – Identificação Polifásica. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (60 mm); B – Colônia a 37 °C CYA (60 mm); C - Colônia AFPA; D – Colônia AFPA Reverso; E – Estruturas Microscópicas (Conídio: elipsoidal/esférico, 3 – 6 µm, levemente rugoso).

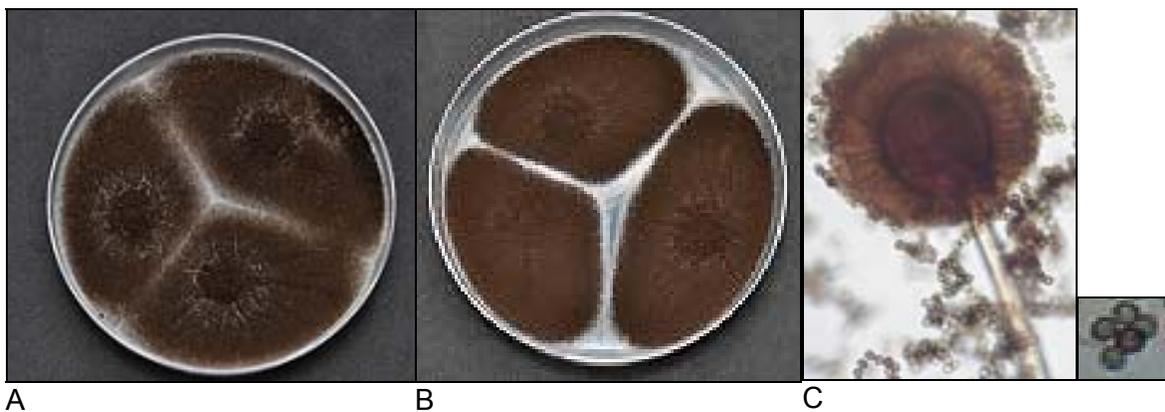


Figura 24. *Aspergillus niger* número ITAL 632 cc (cacau) – Identificação por Metabólitos e Morfológica. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (65 mm); B – Colônia a 37 °C CYA (60 mm); C - Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 3,5 – 4,5 μ m, levemente rugoso).

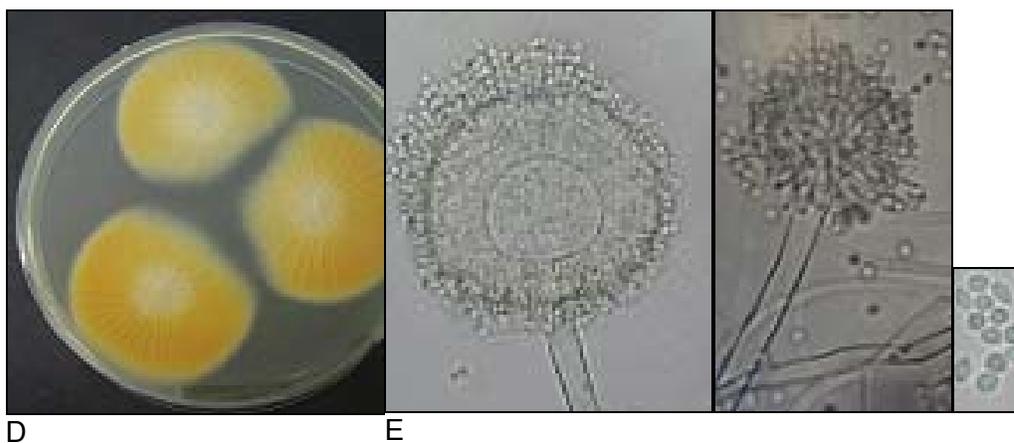


Figura 25. *Aspergillus nomius* número isolamento ITAL 193 cB (castanha do Brasil) – Identificação molecular e morfológica. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (61 mm); B – Colônia a 37 °C CYA (41 mm); C - Colônia AFPA; D – Colônia AFPA Reverso; E – Estruturas Microscópicas (Conídio: sub-globoso/esférico, 4 – 8 μ m, rugoso/espinhoso).

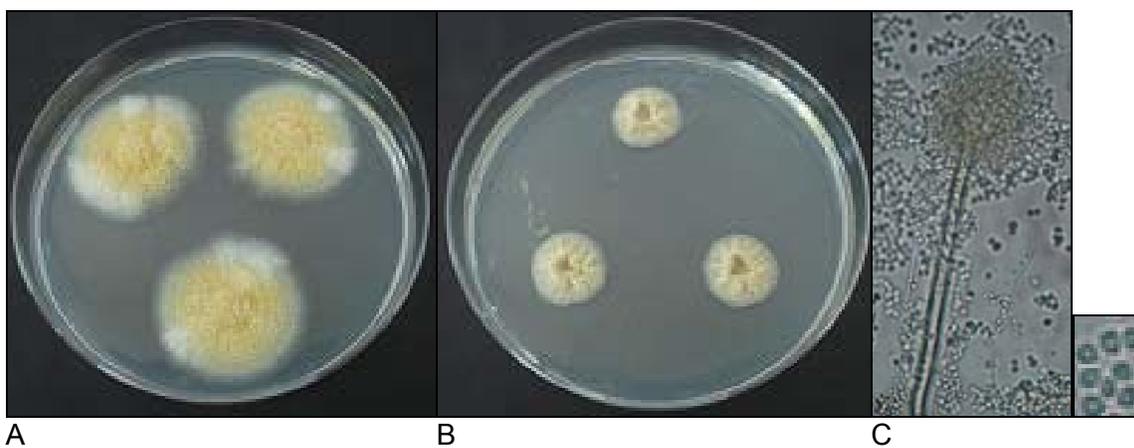


Figura 26. *Aspergillus ochraceus* número ITAL 150 cc (cacau) – Identificação por Metabólitos e Morfológica. Imagem A – Colônia a 25 °C CYA (39 mm); B – Colônia a 37 °C CYA (20 mm); C - Estruturas Microscópicas (Conídio: elipsoidal/globoso, 2,5 – 3,5 µm, levemente rugoso/ liso).

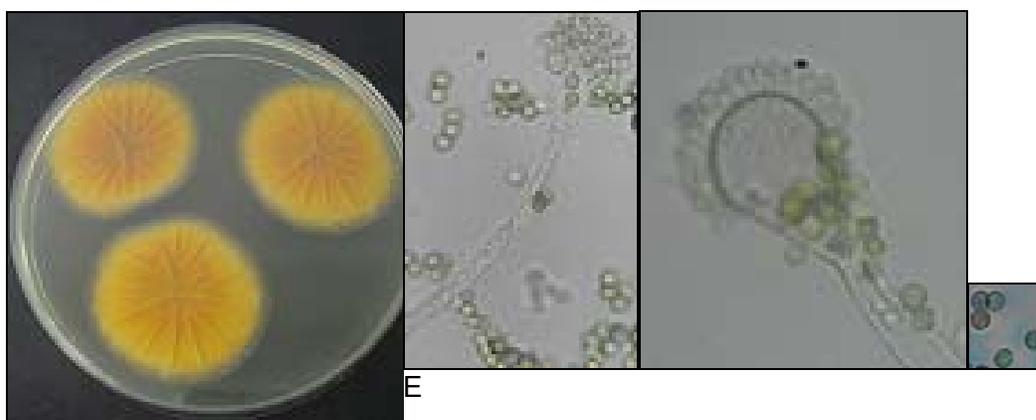
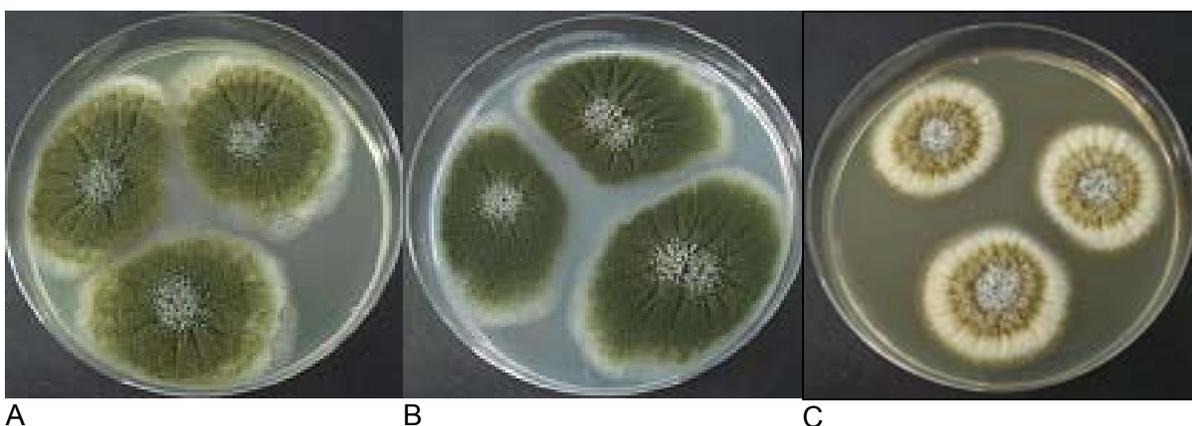
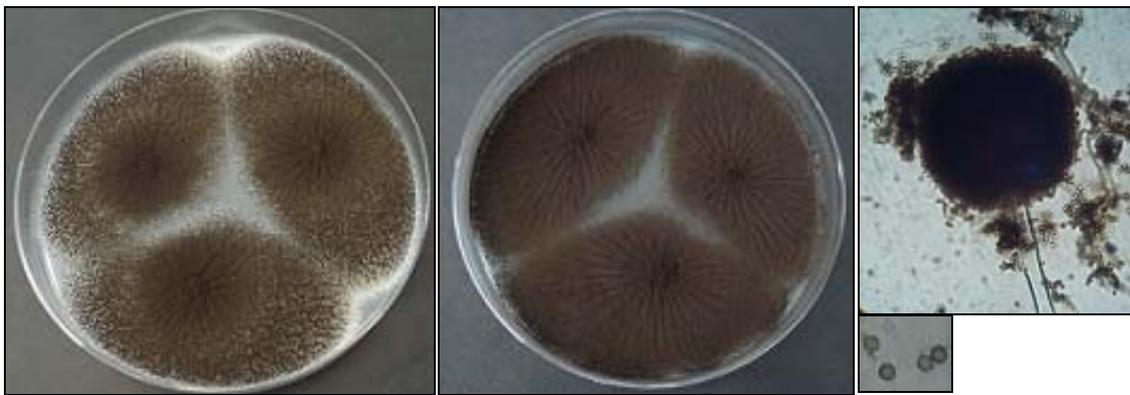
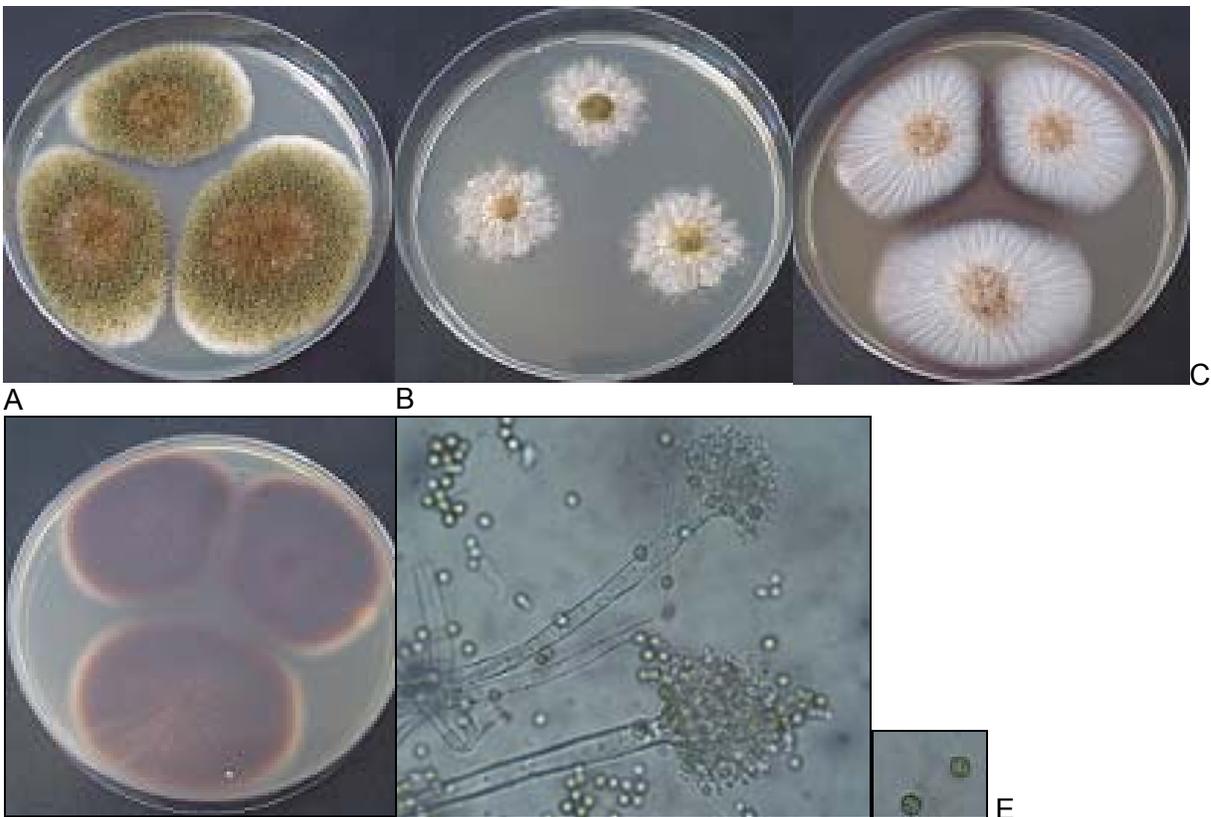


Figura 27 *Aspergillus parasiticus* número isolamento ITAL 720 cc (cacau) – Identificação por Metabólito e Morfológica. Imagem A – Colônia a 25°C CYA (59 mm); B - Colônia a 37°C CYA (57 mm); C – Colônia AFPA; D – Colônia AFPA Reverso; E – Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 3,5 – 6 µm, rugoso).



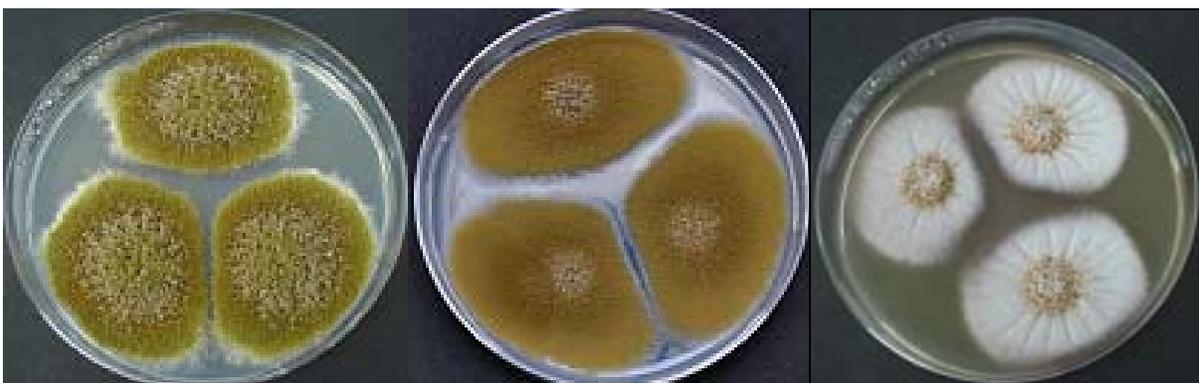
A B C
 Figura 28. *Aspergillus tubingensis* número ITAL 460 fs (frutas secas) – Identificação Polifásica. Imagem A – Colônia a 25°C CYA (55 mm); B – Colônia a 37°C CYA (65 mm); C - Estruturas Microscópicas (Conídio: elipsoidal/cilíndrico, 3 – 3,5 µm, levemente rugoso).



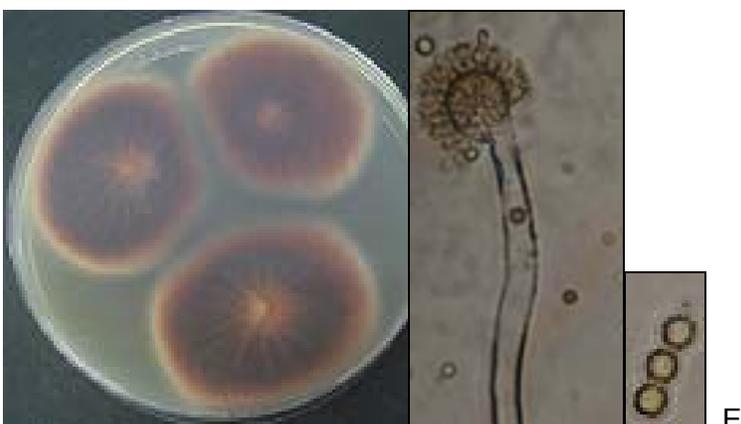
A B C D E
 Figura 29. *Aspergillus pseudotamarii* número isolamento ITAL 791 cB (castanha do Brasil) – Identificação Polifásica. Imagem A – Colônia a 25°C CYA (54 mm); B - Colônia a 37°C CYA (25 mm); C – Colônia AFPA; D – Colônia AFPA Reverso; E – Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 3,9 – 9,9 µm, espinhoso/rugoso).



A B
 Figura 30. *Aspergillus westerdijkiae* número ITAL 118 cf (café) – Identificação por Metabólito e Morfológica. Imagem A – Colônia a 25°C CYA (45 mm); B – Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 2,5 – 3,1 µm, levemente rugoso) – Não cresce a 37°C.



A B C



D E
 Figura 31. *Aspergillus tamaris* número ITAL 76 cB (castanha do Brasil) – Identificação molecular. Imagem A – Colônia a 25°C CYA (50 mm); B - Colônia a 37°C CYA (55 mm); C – Colônia AFPA; D – Colônia AFPA Reverso; E – Estruturas Microscópicas (Conídio: globoso/esférico, 5,5 – 8 µm, rugoso).

As Figuras de 32 a 37 apresentam as mesmas espécies isoladas de diferentes alimentos, mostrando a biodiversidade entre microrganismos de mesma espécie.

Essa biodiversidade se explica pelo fato de serem “selvagens”, cada cepa passou por uma particularidade e por um conjunto de adversidades que promoveram a ativação de algumas características e/ou inibição de outras.

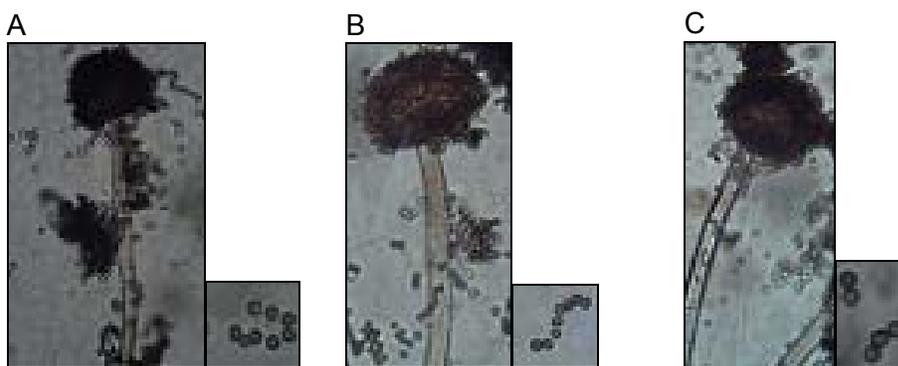
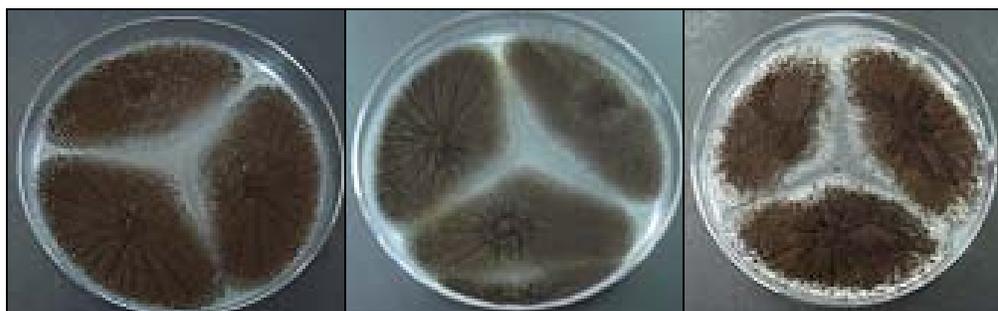


Figura 32. *Aspergillus foetidus* – Imagem A - número ITAL 325³ fs (frutas secas), Imagem B - número ITAL 466* cf (café), Imagem C - número ITAL 479* cf (café).

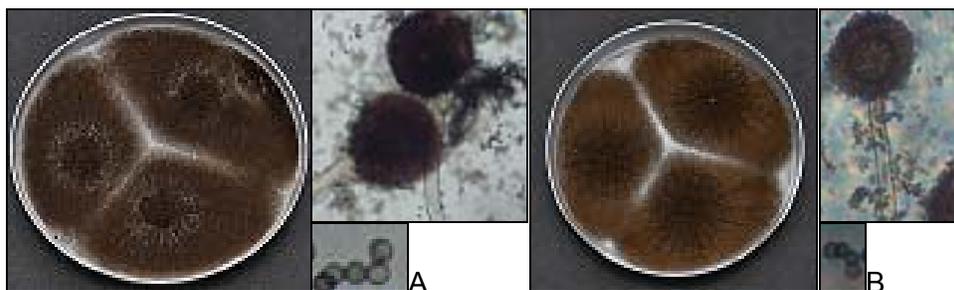


Figura 33. *Aspergillus niger* - Imagem A - número ITAL 632* cc (cacau), Imagem B número ITAL 268² cB (castanha do Brasil).

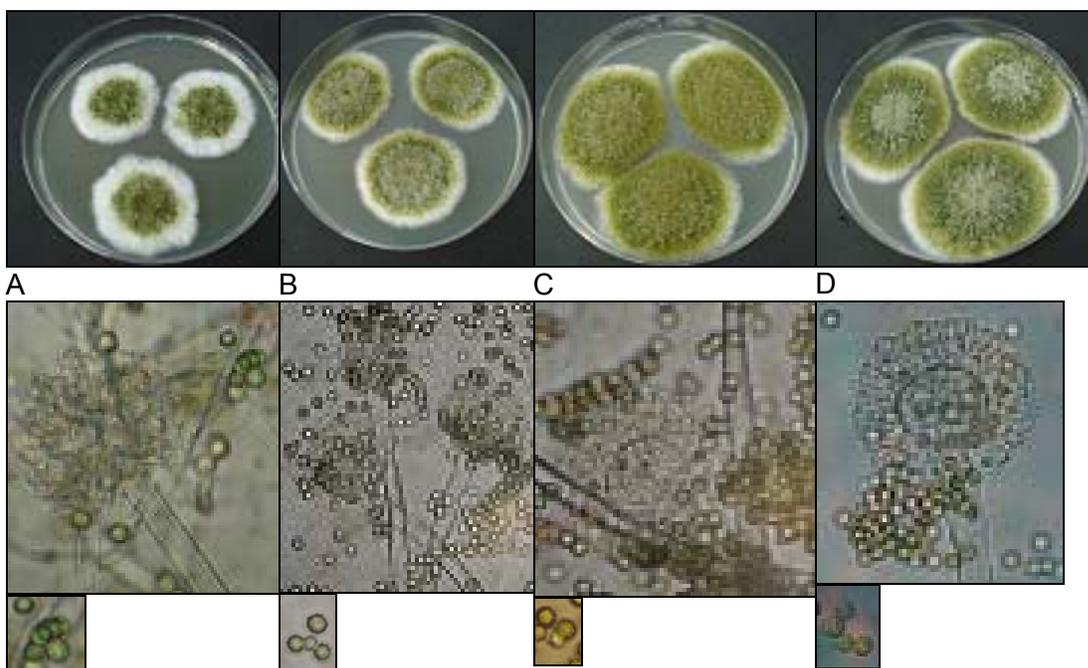


Figura 34. *Aspergillus caelatus* - Imagem A, B, C – números ITAL respectivamente 562* cB, 95² cB e 79¹ cB (castanha do Brasil) Imagem D – número ITAL 681¹ cc (cacau).

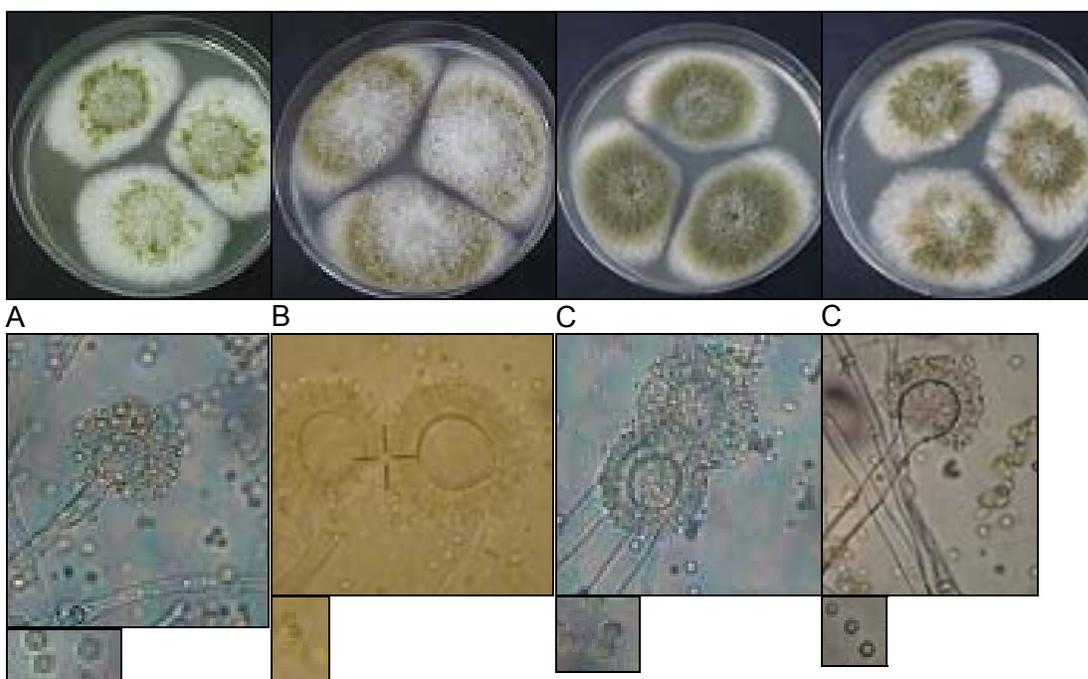


Figura 35. *Aspergillus flavus* - Imagem A e B - números ITAL respectivamente 58² cB e 31¹ cB (castanha do Brasil); Imagens C e D – números ITAL respectivamente 1216* cc e 62A³ cc (cacau).

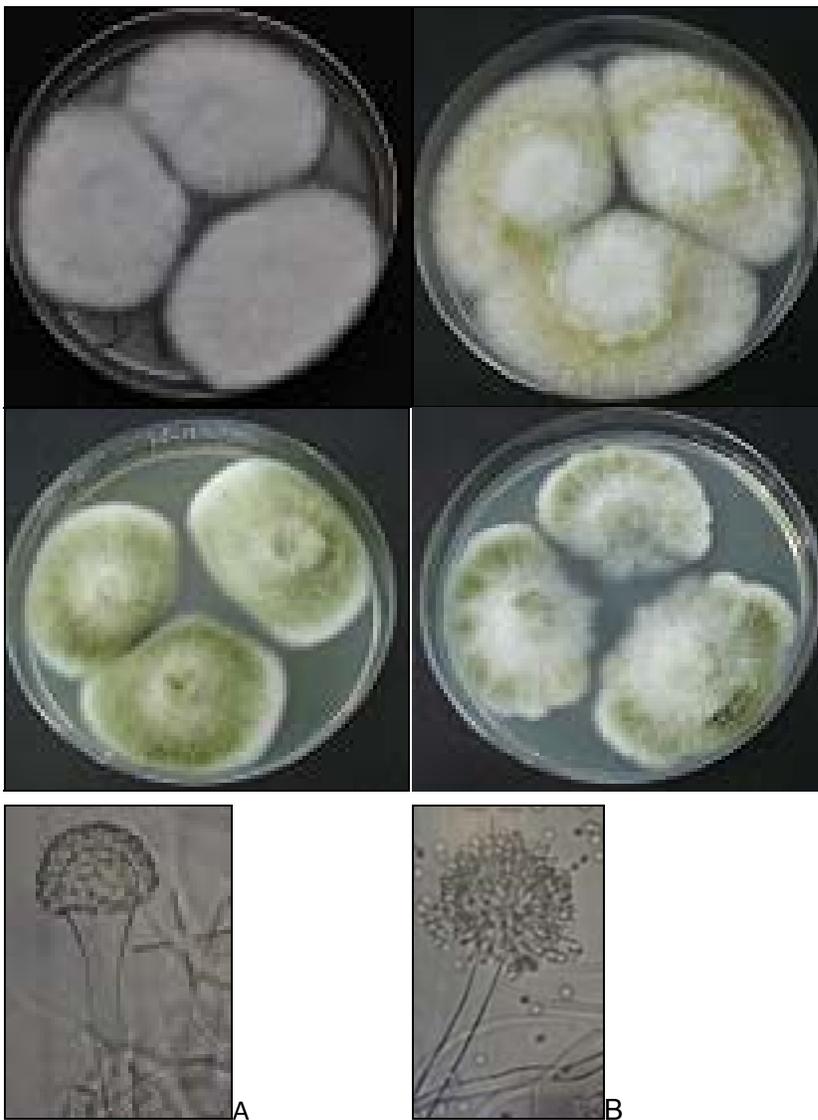


Figura 36. *Aspergillus nomius* - Imagem A e B– números ITAL respectivamente 1325* cB e 193¹ cB (castanha do Brasil).

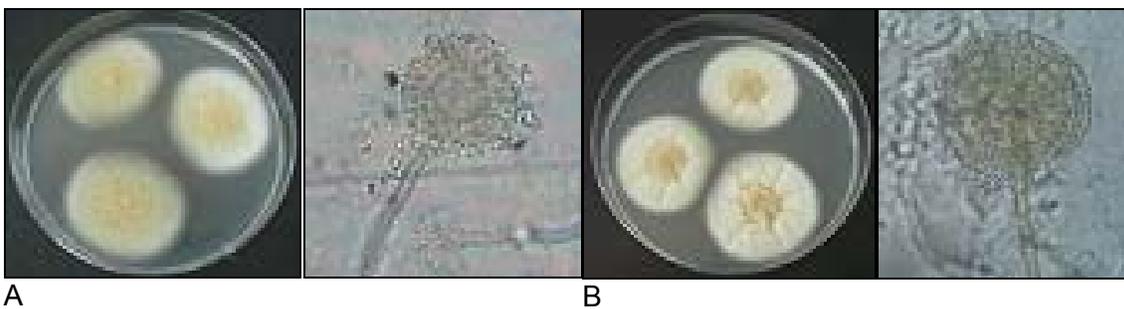


Figura 37. *Aspergillus westerdijkiae* – Imagem A - número ITAL 118* cf (café) ; Imagem B número ITAL 94* cc (cacau) .

Legenda: * Identificação por metabólito; ¹ Identificação molecular, ² Identificação por morfologia; ³ Identificação polifásica.

6. CONCLUSÃO

O gerenciamento de uma coleção exige pessoas treinadas, investimento financeiro, tempo e espaço de armazenamento. O levantamento de todos os dados disponíveis sobre os microrganismos é o início do processo de curadoria. Este trabalho atingiu o objetivo de demonstrar a importância, para comunidade científica, de que o mundo, e em especial o Brasil, não é somente rico em diversidade de amostras, como é mostrada nesta dissertação, mas também no que estes substratos podem conter em seus interiores, como biodiversidade de fungos do gênero *Aspergillus*.

A biodiversidade foi apresentada neste trabalho com as ilustrações e com a apresentação de diferentes tipos de métodos para se identificar um microrganismo (a dificuldade que algumas cepas proporcionam, tendo que utilizar mais de um recurso para se chegar até o nível de espécie), assim como o predomínio de uma espécie em relação à outra, que pode ser relacionada, ao substrato (alimentos e nutrientes), condições ambientais (floresta ou campo) e a genética do microrganismo, como o caso dos *Aspergillus* section *Nigri* que apareceram em todas as amostras, devido a características de resistência como a pigmentação dos conídios.

O trabalho de uma coleção nunca acaba, são novas pesquisas iniciando-se, o acervo acompanhando este crescimento e o ITAL contribuindo para a Ciência dos Alimentos com a manutenção do acervo e novas aquisições.

Com estes dados levantados, o número de culturas preservadas, pesquisas genéticas, comportamentais e taxonômicas podem ser iniciadas.

Algumas atividades encontram-se em andamento como a implantação de novas técnicas de identificação, assim como um segundo método de preservação, além do estoque de segurança.

Por fim conclui-se que alguns passos que a WFCC (World Federation Culture Collection) exige para uma coleção já foram atingidos como: definição do método de preservação, viabilidade do microrganismo, espaço para armazenamento e levantamento dos dados de cada cepa depositada.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F.J. Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 86: 33–49, 2004.

ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLA, G., CABANES, F.J. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, 66:504–506, 2003.

ABRUNHOSA, L.J. **Estratégia para o controle de ocratoxina A em alimentos**. (Tese), Engenharia Química e Biológica, Universidade do Minho - UNIMINHO, Braga, Portugal, 236 p., 2008.

AMEZQUATA, S.; GONZALEZ-PENHAS, E.; DACHOUPAKAN, C.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A.L.; GUIRAUD, J.P. OTA-producing fungi isolated from stored cocoa beans. **Letters in Applied Microbiology**, 47:197–200, 2008.

ANDERSEN, B.; DONGOB, A.; PRYORC, B.M. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani* and *A. tomatophila*. **Mycological Research**, 112(2): 241-250, 2008.

AQUINO, S. **Avaliação da microbiota fúngica e da presença de micotoxinas em amostras de plantas medicinais irradiadas adquiridas no comércio varejista e atacadista** (Tese), Tecnologia Nuclear, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo – SP, Brasil, 98 p., 2007.

AZEVEDO, A.C.S.; FURLANETO, M.C.; SOZA-GOMEZ, D.R.; FUNGARO, M.H.P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agricola**, 57:729–732, 2000.

ARRUSA, K.; BLANKA, G.; ABRAMSONB, D.; CLEARC,R.; HOLLEYA, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, 41: 513–527, 2005.

AZIZ, N.H.; MOUSSA, L.A.A. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxin in fruits. **Food control**, 13:281-288, 2002.

BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **Boletim Ceppa**, Curitiba, 22 (1):1-14, 2004.

BATISTA, L.R.; CHALFOUN, S.M. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, 31(3):804-813, 2007.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts. **Mycopathologia**, 155:161-169, 2002.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, 16 (3):497–516, 2003.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K.C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology**, 81:167-206, 2002.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, 50: 1058-73, 1987.

BINDER, E. M.; TAN, L.M.; CHIN, L.J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, 137:265-282, 2007.

BONVEHI, J.S. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(20): 6347-6352, 2004.

BOVO, F.; CORASSIN, C.H.; OLIVEIRA, C.A.F. descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, 12(2):15-21, 2010.

BOZZA, A. **Detecção e quantificação de ocratoxina a produzida por espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café**, (Dissertação), Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba - PR, Brasil, 144 p., 2010.

BRASIL, Ministério da Ciência e Tecnologia. **Sistema de Avaliação da Conformidade de Material Biológico**. Brasília: SENAI/DN, 2002, 102 p.

BRASIL, Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos – CNNPA, **Resolução - CNNPA nº 12, de 1978 de 24/07/1978**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 jul. 1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78.pdf> Acesso: 12/05/2012.

BUSBY JR., W.F.; WOGAN, G.N. Ochratoxins, In: SHANK, R. (Ed.). **Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks**. Boca Raton: CRC Press, 198, p.129 – 136.

BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, 47(8):637-646, 1984.

CALDASA, E.D.; SILVAB, S.C.; OLIVEIRA, J. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saude humana. **Revista de Saúde Pública**, 36 (3):319-323, 2002.

CALDERARI, T.O.; IAMANAKA, B.T.; FRISVAD, J.C.; SARTORI, D.; PEREIRA, J.L.; FUNGARO, M.H.P.;TANIWAKI, M.H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology** (in press), 2012.

CALDERARI, T.O. **Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em castanha do Brasil**, (dissertação) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brasil, 145 p., 2011.

CAMPBELL, I.M. Secondary metabolism and microbial physiology. In: ROSE, A.H.; TEMPEST, S.W. (Ed.), **Advances in Microbial Physiology**. London:Academic Press, 1991, p. 1-60.

CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P.E. Fungi in the production of foods and their ingredients. **Journal of Applied Bacteriology**, 67:117-131, 1989.

CAMPO/PAS, **Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da castanha do Brasil**. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos, Brasília – DF: Campo PAS, 2004, 48 p.

CASTRILLON, A.L.; PURCHIO, A. Ocorrência de aflatoxinas do Pára (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl., 1808) (Aflatoxin occurrence in Brazil nuts). **Acta Amazonica**, 18: 49–56, 1988.

CHALFON, S.M; BATISTA, L.R. **Fungos associados a frutos e grãos do café *Aspergillus & Penicillium***. Brasil: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003, 69p.

CHRISTENSEN, M. The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils and a synoptic key. **Mycologia**, 74 (2): 210–225, 1982.

CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. **Mutation Research**, 259:291-306, 1991.

CIEGLER, A. Fungi that produce mycotoxins: condition and occurrence. **Mycopathologia**, 65:5-11, 1978.

COLE, R.J.; SCHWEIKERT, M.A. **Handbook of secondary fungal metabolites**. Volume 1, San Diego, USA: Academic Press, 2003a, 1006 p.

COLE, R.J.; SCHWEIKERT, M.A. **Handbook of secondary fungal metabolites**. Volume 2, San Diego, USA: Academic Press, 2003b, 819 p

COLE, R.J.; SCHWEIKERT, M.A. **Handbook of secondary fungal metabolites**. Volume 3, San Diego, USA: Academic Press, 2003c, 2498 p.

COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, 104: 410-433, 1970.

COULOMBE, R.M.A.; CORRÊA, B.; XAVIER, J.G; MALLOZZI, M.A.B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Acute effect of aflatoxin B1 on different inbred mouse strains II. **Mycopathologia**, 133:23-29, 1991.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (safras), Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso: 18/06/2012.

COPETTI, M.V., PEREIRA, J.L.; IAMANAK, B.T.; PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, 143:67–70, 2010.

COPETTI, M. V. **Microbiota do cacau: fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate**. (Tese) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brasil, 155 p., 2009.

COULOMBE, R.M.A.; CORRÊA, B.; XAVIER, J.G; MALLOZZI, M.A.B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Acute effect of aflatoxin B1 on different inbred mouse strains II. **Mycopathologia**, 133:23-29, 1991.

DILKIN, P. Micotoxicose Suína: Aspectos Preventivos, Clínicos e Patológicos. **Departamento de Microbiologia USP**, 64(2):187-191, 2002.

DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives & Contaminants**, 13:45-48, 1996.

DIRHEIMER, G; CREPPY, E.E. Mechanism of action of ochratoxin A. **IARC Scientific Publications**, 115:171-86, 1991.

DOHLMAN, E. Mycotoxin hazards and regulations: Impacts on food and animal feed crop trade. In: BUZBY, J.C. (Ed.), **International trade and food safety: Economic theory and case studies**. Cap. 6, United States Department of Agriculture USA: Agricultural Economic Report, p. 97-108, 2003.

DRUSCH, S.; Ragab, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. **Journal of Food Protection**, 66:1514–1527, 2003.

EDWARDS, S.G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A.D.W. PCRbased detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, 106:1005–1025, 2002.

EHRlich, K.C.; LEE, L.S.; CIEGLER, A.; PALMGREN, M.S. Secalonic acid D: natural contaminant of corn dust. **Applied and Environmental Microbiology**, 44: 1007–1008, 1982.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1:47–50, 2005.

FANG, H.L.; LAI, J.J.; LIN, W.L.; LIN, W.C. A fermented substance from *Aspergillus phoenicis* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 71: 1154–1161, 2007.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/y5143e/y5143e0x.htm>> Acesso: 22/05/2012.

FERBERG, I.; CABRAL, L.C.; GONÇALVES, E.B.; DELIZA, R. Efeito das condições de extração no rendimento e qualidade do leite de castanha-do-brasil despelculada. **Boletim CEPPA**, 20(1):75-88, 2002.

FERREIRA, H.; ELAINE PITTNER, E.; SANCHES, H.F.; MONTEIRO, M.C. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, 2(1):113-127, 2006.

FERRACIN, L.M.; FIER, C.B.; VIEIRA, M.L.C.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; ALESSANDRO DE MELLO VARANI, A.M.; ROSSI, M.M.; MÜLLER-SANTOS, M.;

TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; FUNGARO, M.H.P. Strain-specific polyketide synthase genes of *Aspergillus niger*. **International Journal of Food Microbiology**, 155:137–145, 2012.

FERRACIN, L.M.; FRISVAD, J.C.; TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; SARTORI, D.; SCHAOAVALOFF, M.E.; FUNGARO, M.H.P. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52: 241–248, 2009.

FERREIRA, N.P. The effect of aminoacids on the production of Ochratoxin A in a chemically defined media. **Antonie van Leeuwenhoek**, 34:433-440, 1968.

FIER, C.B. **Discriminação molecular de linhagens de *Aspergillus niger* sensu stricto produtoras e não produtoras de Ocratoxina A**, (Dissertação) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - PR, Brasil, 64 p., 2009.

FIGUEIREDO, E.O.; SANTOS, J.C.; FIGUEIREDO, S.M.M. **Demandas tecnológicas para o manejo florestal da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. Rio Branco:Embrapa Acre., 2001, 15p.

FILTENBORG, O.; FRISVALD, J.C.; SVENDENSEN, J.A.; Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, 45: 81-585, 1983.

FORRESTER, L.M.; NEAL, G.E.; JUDAH, D.J.; GLANCEY, M.J.; WOLF, C.R. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 87: 8306-8310, 1990.

FREIRE, F.C.O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, 149:13-19, 2000.

FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological research**, 112(2):231-240, 2008.

FRISVAD, J.C.; LARSEN, T.O.; VRIES, R.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; CABAÑES, F.J.; EHRlich, K.; R.A. SAMSON, R.A. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, 59: 31–37, 2007.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; SAMSON, R.A. Mycotoxin producers. In: DIJKSTERHUIS, J.; SAMSON, R.A. (Ed.) **Food Mycology. A multifaceted approach to fungi and food.** Mycology series, Volume 25, Boca Raton - USA: CRC Press, 2007b., p. 135-159.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; SAMSON, R.A.; PITT, J.I. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; SAMSON, R.A.; THRANE, U. **Advances in food mycology.** New York – USA: Springer Science, 2006, p. 3-31.

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**, 28: 442–453, 2005.

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

FRISVAD, J.C.; LARSEN, T.O.; VRIES, R.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; CABAÑES, F.J.; EHRLICH, K.; SAMSON, R.A. The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 99: 81 - 95, 1989.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone indices and UV-VIS spectra (diode array detection). **Journal of Chromatography**, 404:195-214, 1987.

FUNGARO, M.H.P. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52: 241–248, 2009.

FUNGARO, M.H.P. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agrícola**, 62:45 -49, 2005.

FUNGARO, M. H. P.; VISSOTTO, P. C.; SARTORI, D.; VILASBOAS, L. A.; FURLANETO, M. C.; TANIWAKI, M. H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* on coffee beans. **Current Microbiology**, 49:123-127, 2004.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares. In: SERAFINI, I.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**, Brasil: Agropecuária, 2001, 463 p.

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

FUJII, S.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar. **Ciências Agrárias**, 23(2):273-292, 2002.

GALAGAN, J.E.; CALVO, S.E.; CUOMO, C.; *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, 438: 1105-1115, 2005.

GALVANO, F.; PIVA, A.; RITIENI, A; GALVANO, G. Dietary strategies to counteract effects of mycotoxins: A review. **Jornal of Food Protection**, 64(1):120-131, 2001.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008, 512 p.

GEISEN, R. Molecular detection and monitoring. In: DIJKSTERHUIS, J.; SAMSON, R. A. **Food Mycology. A multifaceted approach to fungi and food**, Mycology series, Volume 25, Boca Raton - USA: CRC Press, 2007, p. 255 – 278.

GEISER, D.M.; KLICH, M.A.; FRISVAD, J.C.; PETERSON, S.W.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, 59: 1–10, 2007.

GEISER, D.M. Practical molecular taxonomy of fungi. In: LANGE, L.; TKACZ, J. (Ed.), **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Medicine and Agriculture**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2004, p. 1-12.

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**, 61(4): 1323-1330, 1995.

GONÇALVES, J.S.; FERRACIN, L.M.; VIEIRA, M.L.C.; IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, M.H.; FUNGARO, M.H.P. Molecular analysis of *Aspergillus section Flavi* isolated from Brazil nuts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 28:1817–1825, 2012.

GONÇALVES, J.F.C.; FERNANDES, A.V.; OLIVEIRA, A.F.M.; RODRIGUES, L.F.; MARENCO, R.A. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 14 (2):139-142, 2002.

HAGGBLOM, P.E.; GHOSH, J. Postharvest production of Ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein level. **Applied Environmental Microbiology**, 49:787-790, 1985.

HASEGAWA, T. History and evolution of culture maintenance and preservation techniques. In: HUNTER-CEVERA, J.C; BELT, A. **Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry**. 2nd ed, San Diego: Academic Press., 1996, p. 15 – 23.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, 95(6):641-655, 1991.

HEBERT, P.D.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Biological Sciences**, 270 (1): 96-99, 2003.

HOCKING, D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: BLACKBURN, C. W. **Food Spoilage Microorganisms**. Woodhead – UK: CRC Press, 2006, p. 451-477.

HONG; S.B.; GO, S.J.; SHIN, H.D.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, 97: 1316-1329, 2005.

HOOSHMAND, S.; ARJMANDI, B.H. Viewpoint: Dried plum, an emerging functional food that may effectively improve bone health. **Ageing Research Reviews**, 8: 122-127, 2009.

HORN, B. *Aspergillus caelatus*, a new species in section *Flavi*. **Mycotaxon**, 56:185–191, 1997.

HUI, Y.H. **Handbook of fruits and fruit processing**. 1st ed., Oxford - UK: Blackwell Publishing, 2006, 697 p.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, 167:101-134, 2001.

IAMANAKA, B. T.; MENEZES, H. C.; VICENTE, E.; LEITE, R.S.F.; TANIWAKI, M.H. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. **Food Control**, 18: 454–457, 2007.

IAMANAKA, T.B., TANIWAKI, M.H., MENEZES, C.H., VICENTE, E., FUNGARO, M.H.P., Incidence of toxigenic fungi and Ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, 22: 1258–1263, 2005.

IAMANAKA, B. T; **Fungos toxigênicos e micotoxinas em frutas secas e produção de Ocratoxina A em uvas passas em condições de abuso.** (Dissertação) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brasil, 90p. 2004.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In: IARC, **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, Volume 82, France: International Agency for Research on Cancer, 2002, p.171–300.

IARC. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: IARC, **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, volume 56, France: International Agency for Research on Cancer, 1993, 571 p.

ITO, Y.; PETERSON, S.W.; WICKLOW, D.T.; GOTO, T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**, 105: 233–239, 2001.

JARVIS, B.B.; MILLER, J.D. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 66:367-372, 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6nd Ed., Porto Alegre: ARTMED, 2005, 711 p.

KABAKA, B.; DOBSON, A.D.W.; VARA, I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 46(8):593-619, 2006.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETTI, J.W. Fungal secondary metabolism - Biochemistry to genomics. Nature Publishing Group. **Nature Reviews**, 3: 937-947, 2005.

KING, A.D.; PITT, J.I.; BEUCHAT, L.R.; CORRY, J.E.L. Methods for the mycological examination of food. New York: Plenum Press, 1986, 328 p.

KIRSOP, B.E., DOYLE, A. **Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures - A Manual of Laboratory Methods**. 2nd ed., London:Academic Press, 1991, 308p.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, 48:71-80, 2007.

KLICH, M. A. Identification of clinically relevant aspergilli. **Medical Mycology**, 44: 127-131, 2006.

KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, 116p.

KLICH, M.A., PITT, J.I. **A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their telecomorphs**. Austrália: Division of Food Science and Technology, 1988, 134 p.

KUMEDA, Y.; ASAO, T. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. **Applied and Environmental Microbiology**, 62: 2947–2952, 1996.

LANDERS, K.E.; DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts. **Phytopathology**, 57: 1086 1090, 1967.

LARSEN, T.O.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, K.F.; HANSEN, M.E.; FRISVAD, J.C. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Product Reports**, 22: 672 – 693, 2005.

LEE, K.; JUN-HO, H. Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. **Food Chemistry**, 98:71-75, 2006.

LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995, 352 p.

LEVANON, Y.L.; ROSSETINI, S.M.O. Cacau. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. LIMA, U.A. **Biotecnologia Industrial Biotecnologia de Produção de Alimentos**. Cap. 12, Volume 4, 1nd Ed., São Paulo: Edgard Blucher, 2001, p.347-364.

LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the Occurrence of Ochratoxin A in Green Coffee Beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 57(4):866-870, 1974.

LIMA, M.S.; LOPES, A.S.; FERRANTI, L.S.; CALDERARI, T.O.; TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T. Caracterização micológica e micotoxicológica de frutos de cafeeiros da espécie *C. canephora* com vistas à garantia da segurança do produto, **5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**, 5:1-8, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Volume 1, 4nd Ed., São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 384p.

MAIA, G.A; SOUSA, P.H.M; LIMA, A.S; CARVALHO, J.M.; FIGUEIREDO, R.W, **Processamento de Frutas Tropicais: Nutrição, Produtos e Controle de Qualidade**. Fortaleza: UFC, 2009, 277 p.

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

MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; PRETE, C.S.E.C.; HOMECHIM, M.; ONO, E.Y.S.; VILAS-BOAS, L.A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M.C.; FUNGARO, M.H.P. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agrícola**, 62:45-49, 2005.

MAGNUSON, J.K.; LASURE, L.L. Organic acid production by filamentous fungi. In: TKACZ, J.S.; LANGE, L. (Ed.), **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine**. New York: Kluwer Academic, p. 307–340, 2004.

MALTA, M. R.; SANTOS, M. L.; SILVA, F. A. M. Qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum**, 24(5):1385-1390, 2002.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>> Acesso: 22/05/2012.

MAZIERO, M.T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 12(1):89-99, 2010.

MEDINA, A.; MATEO, R.; LÓPEZ-OCANÑA, L.; VALLE-ALGARRA, F.M.; MATEO, F.; JIMENEZ, M. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, 71:4696–4702, 2005.

MISLIVEC, P.B. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, 46(11):969-973, 1983.

MISKI, M.; DAVIS, P.J. Microbiologically catalyzed enantio- and diastereoselective oxidation of chrysanthemol stereoisomers to chrysanthemic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, 54: 2267–2272, 1988.

MIYAKE, Y.; ITO, C.; ITOIGAWA, M.; OSAWA, T. Isolation of the antioxidant pyranonigrin-a from rice mold starters used in the manufacturing process of fermented foods. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 71(10):2515-2521, 2007.

MOODLEY, R.; KINDNESS, A.; JONNALAGADDA S. B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. **Journal of Environmental Science and Health**, 42:585-591, 2007.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, Humb & Bonpl: Lecythidaceae). In: PRANCE, G. T.; BALICK, M. J. (Ed.). **New directions in the study of plants and people: research contributions from the Institute of Economic Botany**. Volume 8, New York: The New York Botanical Garden, 1990, p.130-150.

MOSS, M.O. General characteristics of moulds. In: BLACKBURN, C. W. (Ed.). **Food spoilage microorganisms**, Boca Raton: CRC Press, 2006, p. 402-414.

MOSS, M.O. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 50:37-142, 2002.

MOSS, M.O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J.F.; HENDERSON, R.S. (Ed.). **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Ratón: CRC Press, 1991, p. 37-56.

MORELLO, L.G.; SARTORI, D.; MARTINEZ, A.L.O.. VIEIRA, M.L.C.; TANIWAKI, M.H.; FUNGARO, M.H.P. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, 119:270–276, 2007.

MOUNJOUENPOU, P.; GUEULE, D.; FONTANA-TACHON, A.; GUYOT B.; TONDJE P.R.; GUIRAUD J.P. Filamentous fungi producing Ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, 128:234-241, 2008.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, 71(5):51-65, 2006.

MURO, M.A.; LUCHI, M.R. **Preservação de Microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1989, 65 p.

NAKAMURA, L.K. Preservation and Maintenance of Eubacterium. In: HUNTER-CEVERA, J.C; BELT, A. **Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry**, 2nd ed., San Diego: Academic Press, 1996, p. 65 – 84.

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

NIELSEN, K.F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, 1002:111-136, 2003.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C; SAMSON, R.A. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58:1727–1734, 2008.

NORTHOLT, M.D.; BULLERMAN, L.B. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. **Journal of Food Protection**, 45:519-526, 1982.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D.R. Ochratoxin A: the continuing enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, 35:33–60, 2005.

OETTERER, M. Tecnologia de obtenção do cacao, produtos do cacao e chocolate. In: Oetterer, M.; D'ARCE, M.A.B.R.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciencia E Tecnologia de Alimentos**. Brasil:Manole, 2006, p. 1 – 50.

OLIVEIRA, C.A.F.; ALBUQUERQUE, R.; CORREA, B.; KOBASHIGAWA, E.; REIS, T.A.; FAGUNDES, A.C.A.; LIMA, F.R. Produção e Qualidade dos ovos de poedeiras submetidas a intoxicação prolongada com aflatoxina B1. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, 68:1-4, 2001.

OLIVEIRA C.A.F.; GERMANO P.M.L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, 31(4):417-424, 1997.

OLSEN, M.; JOHNSOM, P.; MOLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD, M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts. **World Mycotoxin Journal**, 1(2):123-126, 2008.

OSTRY, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal**, 1(2): 175-188, 2008.

PACHECO, A.M; SCUSSEL, V.M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55:11087-11092, 2007.

PACHECO A.M; SCUSSEL V.M. **Castanha-do-Brasil – Da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 2006. 176p.

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; HASHIMOTO, J. M.; MENEZES, H. C. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36(1):24-28, 2005.

PARIZA, M.W.; JOHNSON, E.A. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. **Regulatory Toxicology & Pharmacology**, 33: 173–186, 2001.

PARK, K.J.; BIN, A.; BROD, F.P.R. Obtenção das isotermas de sorção e modelagem matemática para a pêra bartlett com ou sem desidratação osmótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 21(1):73-77, 2001.

PASTER, N. ;BULLERMAN, B.L. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means, **International Journal of Food Microbiology**, 7(3): 257–265, 1988.

PASTER, N.; LISKER, N.; CHET, I. Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* wilhelm grown under controlled atmospheres. **Applied and Environmental Microbiology**, 45:1136 1139, 1983.

PAYNE, G.A.; BROWN, M.P. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. **Annual Review of Phytopathology**, 36:329-362, 1998.

PEL, H.J.; WINDE, J.H.; ARCHER, D.B.; *et al.* Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, 25: 221-231, 2007.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of World Health Organization**, 77(9):754-766, 1999.

PEREIRA, M.L.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim Ceppa**, 20(1):141-156, 2002.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R.A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, 59: 53–66. 2007.

PERRONE, G.; VARGA, J.; SUSCA, A.; FRISVAD, J.C.; STEA, G.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z.; SAMSON, R.A. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58:1032–1039, 2008.

PETERSON, S.W.; ITO, Y.; HORN, B.W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, 93: 689–703, 2001.

PETSKA, J.J.; BONDY, G.S. Immunotoxic effects of mycotoxins. In: MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. **Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin**. St. Paul: Eagan Press, 1994, p 339-358.

PEZZINI, V.; VALDUGA, E.; CANSIANI, R. L. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho e armazenados sob diferentes condições. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 64(1):91-96, 2005.

PILDAIN, M.B.; FRISVAD, J.C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58: 725–735, 2008.

PINHEIRO R.R. **Estudo da variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento do PCR Multiplex para a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha do Brasil e castanha de caju**, (Dissertação), Genômica e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília- DF, Brasil, 149 p., 2004.

PITT, J.I., HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd ed., New York:Springer, 2009, 540 p.

- J.I. PITT, J.I.; R.A. SAMSON, R.A. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, 59: 67–70, 2007.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd ed., London: Blackie Academic & Professional, 1997, 593p.
- PITT, J.I. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Protection**, 56:265–269, 1993.
- PITT, J.I. Toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* species. In: SEMPLE, R.L.; FRIO, A.S.; HICKS, P.A.; LOZARE, J.V. **Mycotoxin prevention and control in food grains**. Department of Agriculture, Bangkok, Thailand: UNDP/FAO, 1989, Disponível <[http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E08.htm#Toxigenic aspergillus and penicillium species](http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E08.htm#Toxigenic%20aspergillus%20and%20penicillium%20species)>, Acesso: 20/05/2012.
- PLESTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. **Food Additives & Contaminants**, 13:49-50, 1996.
- PRADO, G.; SOUZA, R.A.; MORAIS, V.A.D.; MADEIRA, J.E.G.C.; *et al.* Influência de *Saccharomycopsis schoenii* e *Saccharomycopsis crataegensis* na produção de aflatoxinas B₁ e G₁ por *Aspergillus parasiticus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 67(3):177-182, 2008.
- PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T.; BARROSO, R.E.S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 20(2):192-196, 2000.
- RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. **The Genus *Aspergillus***. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1965, 686 p.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. Aflatoxin B₁-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. **Biological Chemistry**, 387(1):87-93, 2006.
- RIBEIRO, E.A.R. **Contaminação Toxicológica de Resíduos Vitivinícolas – Ocratoxina A**. (Dissertação), Engenharia do Ambiente, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto- UNIPORTO, Porto, Portugal, 125p., 2007.

RILEY, R.T; NORRED, W.P. Mycotoxin Prevention and decontamination: A case study on maize. **Food, Nutrition and Agriculture**, 23:25-32,1999.

RODRIGUES, A.P.D.; CARVALHO, A.S.C.; SANTOS, A.S.; ALVES, C.N.; NASCIMENTO, J.L.M.; SILVA, E.O. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp. **Cell Biology International**, 35:335–343 (2011).

RODRIGUES, P.; SOARES, C.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.R.M.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A., Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Microbiology book series - Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Badajoz: Formatex, 2007, 527 – 534 p.

ROKAS, A.; PAYNE, G.; FEDOROVA, N.D.; *et al.* What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? **Studies in Mycology**, 59: 11 -17, 2007.

ROHLFS, M.; OBMANN, B.; PETERSEN, R. Competition with filamentous fungi and its implication for a gregarious lifestyle in insects living on ephemeral resources. **Ecological Entomology**, 30:556 -563, 2005.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software**, New York: Setauket, 2000, 98p.

ROSMANINHO, J.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arquivos do Instituto de Biologia**, 68:107-114, 2001.

ROMERO, S.M.; COMERIO, R.M.; LARUMBE, G.; RITIENI, A.; VAAMONDE, G.; PINTO, V. F. Toxicogenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, 104:43–49, 2005.

SAMSON, R.A.; VARGA, J.; MEIJER, M.; FRISVAD, J.C. New taxa in *Aspergillus* section *Usti*. **Studies in Mycology**, 69: 81–97. 2011.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B., **Food and Indoor Fungi**. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010, 390p.

SAMSON, R.A; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, 1:1-8, 2009.

- SAMSON, R.A.; VARGA, J. ***Aspergillus systematics in the genomics era***. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2007, 206 p.
- SAMSON, R.A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. ***Studies in Mycology***, 59: 129–145. 2007b.
- SAMSON, R.A.; HONG, S.B.; FRISVAD, J.C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. ***Medical Mycology***, 44:133-148, 2006.
- SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; KUIJPERS, A.F.A.; FRANK, J.M.; FRISVAD, J.C. New Ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section *Nigri*. ***Studies in Mycology***, 50: 45–61, 2004.
- SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. ***Introduction to Food- and Airborne Fungi***. 6nd Ed., Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2002, 389 p.
- SAMSON, R.A.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; KING, A.D. ***Modern methods in food mycology***. Amsterdam: Elsevier, 1992, 388 p.
- SÁNCHEZ-HERVAS, M.; GIL, J.V.; BISBAL, F.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. ***International Journal of Food Microbiology***, 125(3):336–340, 2008.
- SANTOS, M.R.; SILVA, J.O. Impacto da presença de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal. ***Revista Multidisciplinar da Saúde***, 2(4):49-61, 2010.
- SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. ***Revista Brasileira de Ciência Avícola***,2(1):1-12, 2000.
- SCHAUER, F.; BORRISS, R. Biocatalysis and biotransformation. In: TKACZ, J.S.; LANGE, L. (Ed.). ***Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine***. New York: Kluwer Academic , 2004, p. 237–306.
- SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. ***Food Additives & Contaminants***, 25(2):146–151, 2008.
- SERRA, R.; CABANES, F.J.; PERRONE, G.; CASTELLA, G.; VENANCIO, A.; MULE, G.; KOZAKIEWIC, Z. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. ***Mycologia***, 98: 295–306, 2006.

SERRA, R.M.A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a Ocratoxina A.** (Tese), Engenharia Química e Biológica, Universidade do Minho - UNIMINHO, Lisboa, Portugal, 330 p., 2005.

SPILLER, G.A.; STORY, J.A.; FURUMOTO, E.J.; CHEZEM, J.C.; SPILLER, M. Effect of tartaric acid and dietary fiber from sun-dried raisins on colonic function and on bile acid and volatile fatty acid excretion in healthy adults. **British Journal of Nutrition**, 90:803-807, 2003.

SMEDSGAARD, J.; HANSEN, M.E.; FRISVAD, J.C. Classification of terverticillate *Penicillia* by electrospray mass spectrometric profiling. **Studies in Mycology**, 49: 243–251, 2004.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, 60:264–270, 1997.

SMITH, D. Maintenance of filamentous fungi. In: KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. **Maintenance of microorganisms and cell cultures – A manual of laboratory methods.** Cap. 5, 2nd ed., London: Academic Press, 1991, p.133 – 159.

SMITH, D.; ONIONS, A.H.S. **The preservation and maintenance of living fungi.** England: Commonwealth Mycological Institute, 1983, 132 p.

SNELL, J.J.S. General Introduction to maintenance methods. In: KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. **Maintenance of microorganisms and cell cultures – A manual of laboratory methods.** Cap. 3, 2nd ed., London: Academic Press, 1991, p. 21 - 30.

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**, 104(3):682-97, 2012.

SODRE, G.A. A espécie *Theobroma cacao*: novas perspectivas para a multiplicação de cacaueteiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 29(2):204-413, 2007.

SORENSEN, A.; LÜBECK, P.S.; LÜBECK, M.; NIELSEN, K.F.; AHRING, B.K.; TELLER, P.J.; FRISVAD, J.C. *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a new black *Aspergillus* species isolated in Denmark. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 61(12):3077-3083, 2011.

SOUZA, M.L.; MENEZES, H.C. Processamento de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24:120-128, 2004.

SOUZA, M. L. Processamento de cereais matinais extrusados de castanha-do-Brasil com mandioca. (Tese). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas/SP, Brasil, 191 p., 2003.

STEINER, W.E.; BRUNSCHWEILER, K.; LEIMBACHER, E.; SCHENEIDER, R. Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and pistachio nuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40:2453–2457, 1992.

STRANGE, R. Natural occurrence of mycotoxins in groundnuts, cottonseed, soya, and cassava. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Ed.). **Mycotoxins and animal foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 341-362.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, 24: 1596-1599, 2007.

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**, 7(8): 1 – 7, 2012.

TANIWAKI, M.H. An Update on Ochratoxigenic Fungi and Ochratoxin a in Coffee. In: HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; SAMSON, R.A; THRANE, U. **Advances in food mycology**. New York – USA: Springer Science, 2006, 189-202 p.

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

TAVARES F.F.; FISCHER T.B.; TONETTE R. **Agregação de valor na castanha do Brasil: o caso da Natura Ekos**. Núcleo de estudos do agronegócio, São Paulo: ESPM, 2010, 5-16p.

THOM, C.; CHURCH, M.B. **The Aspergilli**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1926, 268 p.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22: 4673-4680, 1994.

TONINI, H.; COSTA, P.; KAMINSKI, P.E. Estrutura e produção de duas populações nativas de castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* O. Berg) em Roraima. **Floresta**, 38(3):445-457, 2008.

TRAGER, J. **The food Chronology: a food lover's compendium of events and anecdotes, from prehistory to the present**. New York: Henry Holt and Company Inc, 1995, 800 p.

TRUCKSESS, M. W.; SCOTT, P. M. Mycotoxins in botanicals and dried fruits: A review. **Food Additives and Contaminants**, 25(2): 181–192, 2008.

TRUCKSESS, M.W.; STOLOFF, L.; MISLIVEC, P.B. Effect of temperature, water activity and other toxigenic mold species on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production on corn, pinto beans and soybeans. **Journal of Food Protection**, 51(5):361-363, 1988.

UMINO, C.Y. **Coleções de Culturas e Manutenção e Preservação de Microrganismo**. Apostila de Curso, Campinas, SP: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, 2000, 80 p.

URBANO, G.H; **Ocorrência e desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* em café e influência da torração e do preparo de infusão nos níveis de Ocratoxina A**, (Tese) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brasil, 86 p., 2002.

URBANO, G.R.; TANIWAKI, M.H.; LEITÃO, M.F.F.; VICENTINI, M.C. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian Coffee. **Journal of Food Protection**, 64: 1226-1230, 2001.

UTTPATEL, R. **Níveis baixos de aflatoxinas dietéticas e adsorventes no desempenho de matrizes de corte e de sua progênie**. (Dissertação), Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, Brasil, 66 p., 2007.

VALERO, A.; MARIN, S.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Ochratoxin A producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. **Letters in Applied Microbiology**, 41:196–201, 2005.

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

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

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J.C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R.A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57: 1925–1932, 2007.

VARGA, J.; KEVEI, É.; TÓTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z.; HOEKSTRA, R.F. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. **Canadian Journal of Microbiology**, 46: 593–599, 2000.

VECCHIA, A.D.; FORTES, R.C. Contaminação Fungica em Granola Comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(2):787-792, 2007.

VINSON, J.A.; ZUBIC, L.; BOSE, P.; SAMMAN, N.; PROCH, J. Dried fruits: excellent in vivo and in vitro antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, 24:44-50, 2005.

VRIES, R.P.; FRISVAD, J.C.; VONDERVOORT, P.J.I.; BURGERS, K.; KUIJPERS, A.F.A.; SAMSON, R.A.; VISSER, J. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, 87: 195–203, 2005.

ZOHRI, A.A.; ABDEL-GAWAD, K.M. Survey of mycoflora and mycotoxins of some dried fruits in Egypt. **Journal of Basic Microbiology**, 33:279–288, 1993.

ZOTTI, M.; CORTI, A.M. *Aspergillus persii*: A new species in section *Circumdati*. **Mycotaxon**, 83: 269–278, 2002.

WELKE, J.E.; HOELTZ, M.; NOLL, I.B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. **Ciência Rural**, 39(8):2567-2575, 2009.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, 18:7213-7218, 1990.

WFCC, World Federation of Culture Collection. **Estatísticas das coleções mundiais**, Disponível: <<http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics>> - Acesso: 23/07/2012.

WFCC, World Federation of Culture Collection. **Guidelines for the Establishment and Operation of Culture Collections of Microorganisms**, 2nd. ed., London:WFCC, 1999, 24p.

WHITE, T. J.; BURNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In. INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR - Protocols: A guide to methods and applications**, San Diego:Academic Press, 1990, p. 315-322.

WILLAMSON, G.; CARUGHI, A. Polyphenol content and health benefits of raisins. **Nutrition Research**, 30:511-519, 2010.

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

WOOD G.E. Mycotoxins in food and feeds in the United States. **Journal of Animal Science**. 70:3941-3944, 1992.

YANO, D. M. Y. **Técnicas para Cultivo, Identificação e Preservação de Bactérias**. Apostila de curso, Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1993, 83 p.

YU, J.; CHANG, P.K.; EHRLICH, K.C.; CARY, J.W.; *et al.* Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, 70(3):1253-1262, 2004.

8. ANEXOS

Tabela 11. Principais características morfológicas do gênero *Aspergillus* - baseada em autores: Horn, (1998); Ito *et al.* (2001); Peterson *et al.* (2001); Zotti; Corti (2002); Klich (2002); Vries *et al.* (2005); Serra *et al.* (2006); Frisvad *et al.* (2007); Noonim *et al.* (2008); Pildain *et al.* (2008); Pitt; Hocking (2009); Samson; Varga (2009); Samson *et al.* (2011); Sorensen *et al.* (2011); Varga, *et al.* (2011); Soares *et al.* (2012); Taniwaki *et al.* (2012).

Espécies	Colônia (mm)		Estirpe Textura	Vesícula Diâmetro (µm)	Forma	Forma	Conídio		Esclerócio	Séries
	CYA 25	CYA37					Diâmetro (µm)	Textura		
	<i>Aspergillus acidus</i>	37	30	Lisa	55	Globosa	Globosa	3	Lisa/Áspera	Não
	-	-	/ Áspera (leve)	-			-			
	80	67		80			4			
<i>Aspergillus aculeatinus</i>	> 85	22	Lisa	55	Globosa	Sub - Globosa/Elipsoidal	4	Espinho	V	U
	-	33		65			-			
<i>Aspergillus aculeatus</i>	65	5	Lisa	60	Sub-Globosa	Globosa/elipsoidal	3	Liso	Não	U
	-	-		-			-			
	70	30		80			5			
<i>Aspergillus arachidicola</i>	60	60	Áspera	28	Globosa	Globosa	4,5	Espinho	Não	V
	-	-		-			-			
	65	70		50			5			
<i>Aspergillus bombycis</i>	65	15	Lisa	30	Globosa	Globosa	4	Rugoso	Não	B
	-	-		-			-			
	-	-		50			7			
<i>Aspergillus caelatus</i>	30	35	Lisa/Áspera	15	Globosa	Globosa	5	Espinho	V	B
	-	-	(leve)	-			-			
	45	55		38			6			
<i>Aspergillus carbonarius</i>	65	10	Áspera (leve)	65	Globosa	Globosa	7	Rugoso	V	B
	-	-		-			-			
	70	30		90			10			
<i>Aspergillus flavus</i>	65	55	Áspera (leve)	20	Globosa/Elipsoidal	Globosa/Eli-psoidal	3	Rugoso (leve)	V	V
	-	-		-			-			
	70	65		45			6			
<i>Aspergillus foetidus</i>	45	48	Lisa	30	Sub-Globosa	Globosa	4	Rugoso (leve)/Liso	Não	B
	-	-		-			-			
	60	65		50			5			
<i>Aspergillus ibericus</i>	38	63	Lisa	50	Globosa	Globosa / Sub-Globosa	5	Espinho	Não	B
	-	-		-			-			
	43	70		60			7			
<i>Aspergillus japonicus</i>	60	20	Lisa	14	Elipsoidal/Globosa	Elipsoidal/globosa	4	Espinho	V	U
	-	-		-			-			
	70	50		30			5			
<i>Aspergillus melleus</i>	30	25	Rugosa	20	Globosa/Puntif.	Elipsoidal/Globosa/Cili	3	Espinho	V	B
	-	-		-			-			
	50	35		35			3,5			
<i>Aspergillus niger</i>	55	50	Lisa	30	Globosa	Globosa	3,5	Rugoso (leve)	V	B
	-	-		-			-			
	70	70		75			4,5			
<i>Aspergillus nomius</i>	40	40	Lisa/Áspera	25	Globosa	Globosa/Su	4	Espinho	V	V
	-	-	(leve)	-		b - Globosa	-			
	70	70		65			8			

<i>Aspergillus ochraceus</i>	39	35	Rugosa	25	Globosa/ Elipsoidal	Globosa/Eli psoidal	2,5	Rugoso (leve)/ Liso	V	V
	-			-			-			
	59			55			3,5			
<i>Aspergillus parasiticus</i>	60	60	Rugosa/ Rugosa (leve)	20	Globosa/ Elipsoidal	Globosa	3,5	Rugoso	Não	V
	-	-		-			-			
	70	70		35			6			
<i>Aspergillus pseudocaelatus</i>	60	60	Lisa	17	Globosa	Globosa	4,5	Espinho	Não	V
	-	-		-			-			
	65	70		22			5			
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	60	30	Áspera	26	Globosa	Globosa	3,9	Espinho	Não	V
	-	-		-			-			
	70	35		38			9,9			
<i>Aspergillus sojae</i>	60	45	Lisa/ Áspera (leve)	15	Globosa/ Clavata	Globosa	5,5	Rugoso	Não	V
	-	-		-			-			
	70	70		35			7			
<i>Aspergillus tamarii</i>	55	40	Rugoso	20	Globosa/ Puntif.	Globosa	5,5	Rugoso	V	V
	-	-		-			-			
	70	70		45			8			
<i>Aspergillus tubingensis</i>	40	40	Lisa	40	Elipsoidal/ Cilindrico	Globosa	3	Rugoso (leve)	V	B
	-	-		-			-			
	50	50		60			3,5			
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	49	0	Áspera	20	Globosa	Globosa	2,5	Rugoso (leve)	V	B
	-	-		-			-			
	57			35			3,1			
<i>Aspergillus bertholletius</i>	60	0	Lisa	10	Esférica	Esférica	5,5	Espinho (leve)	Não	-
	-	-		-			-			
	70	15		20			6,5			

Legenda: U – Unisseriado; B – Bisseriado e V – Variável.

Tabela 12. Extrólitos encontrados nas espécies de *Aspergillus*.

Fungo	Principais Extrólitos
<i>A.foetidus</i>	Asparizina; Piranonigrina A; Nafto- γ -pyrones Antafumionisinas (SAMSON <i>et al.</i> 2006)
<i>A. tubingensis</i>	Funalenona; Piranonigrina A; Nafto- γ - Pirononas; Asparazina Tensidol B; Malformina (SAMSON <i>et al.</i> 2006; VARGA <i>et al.</i> 2011b)
<i>A.acidus</i>	Piranonigrina A; Nafto- γ - Pirononas; Funalenona; Variável: Asparazina; Antafumionisinas (MOGENSEN <i>et al.</i> , 2009)
<i>A.aculeatinus</i>	Neoxalina; Ácido Secalonico D e F e Aculeacinas (NOONIM <i>et al.</i> , 2008)
<i>A.aculeatus</i>	Glabrinol; Neoxalina; Ácido Secalônico D e F (SAMSON <i>et al.</i> 2006; VARGA <i>et al.</i> 2011b)
<i>A.carbonarius</i>	Piranonigrina A; Nafto- γ - Pirononas e Ocratoxina A (SAMSON <i>et al.</i> 2006; VARGA <i>et al.</i> 2011b)
<i>A.neoniger</i>	Funalenona; naphtho- γ -pyrones; “MYC” (VARGA <i>et al.</i> 2011b)
<i>A.niger</i>	Piranonigrina A; Nafto- γ - Pirononas; variável: Orlandina; Kotanina (SAMSON <i>et al.</i> 2004; VARGA <i>et al.</i> 2011b)
<i>A.westerdijkiae</i>	Ácido Penicílico; Xantomegninas; Viomelleína; Aspergamidas A e B (<i>avraivilamides</i> = <i>stephancidins</i>) Vioxantinas; Melleína; Ocratoxina A e Circundatinas A e B; NB1 (FRISVAD <i>et al.</i> 2004)
<i>A. melleus</i>	Ácido Penicílico; Xantomegninas; Melleína (FRISVAD <i>et al.</i> 2004)
<i>A. ochraceus</i>	Ácido Penicílico; Xantomegninas; Viomelleína; Aspergamida A e B; Melleína (FRISVAD <i>et al.</i> 2004)
<i>A.arachidicola</i>	Ácido Kójico; Aflatoxina B1 B2 e G1 G2; Parasiticolida; Ácido Aspergílico; Crisogina (SAMSON <i>et al.</i> 2006)
<i>A.bombycis</i>	Positivo: Ácido Kójico; Aflatoxina B e G; Variável: Acido Aspergílico e Crisogina (SAMSON <i>et al.</i> 2006)
<i>A.caelatus</i>	Ácido Kójico; Ácido Ciclopiazônico (SAMSON <i>et al.</i> 2006)

Fungo	Principais Extrólitos
<i>A. flavus</i>	Ácido Kójico; Ácido Ciclopiazônico; Ácido Aspergílico. Variável: Aflatoxina B (SAMSON <i>et al.</i> 2006)
<i>A. nomius</i>	Ácido Kójico; Aflatoxina Be G; Ácido Aspergílico. Variável: Crisogina (SAMSON <i>et al.</i> 2006)
<i>A. parasiticus</i>	Ácido Kójico; Aflatoxina B e G; Ácido Aspergílico; Parasiticolida (SAMSON <i>et al.</i> 2006)
<i>A. pseudocaelatus</i>	Ácido Kójico; Aflatoxina B e G; Ácido Aspergílico; Parasiticolida (VARGA <i>et al.</i> 2011a)
<i>A. pseudotamarii</i>	Ácido Kójico; Aflatoxina B e G; Ácido Ciclopiazônico (SAMSON <i>et al.</i> 2006)
<i>A. tamarii</i>	Positivo: Ácido Kójico. Variável: Ácido Ciclopiazônico (SAMSON <i>et al.</i> 2006)

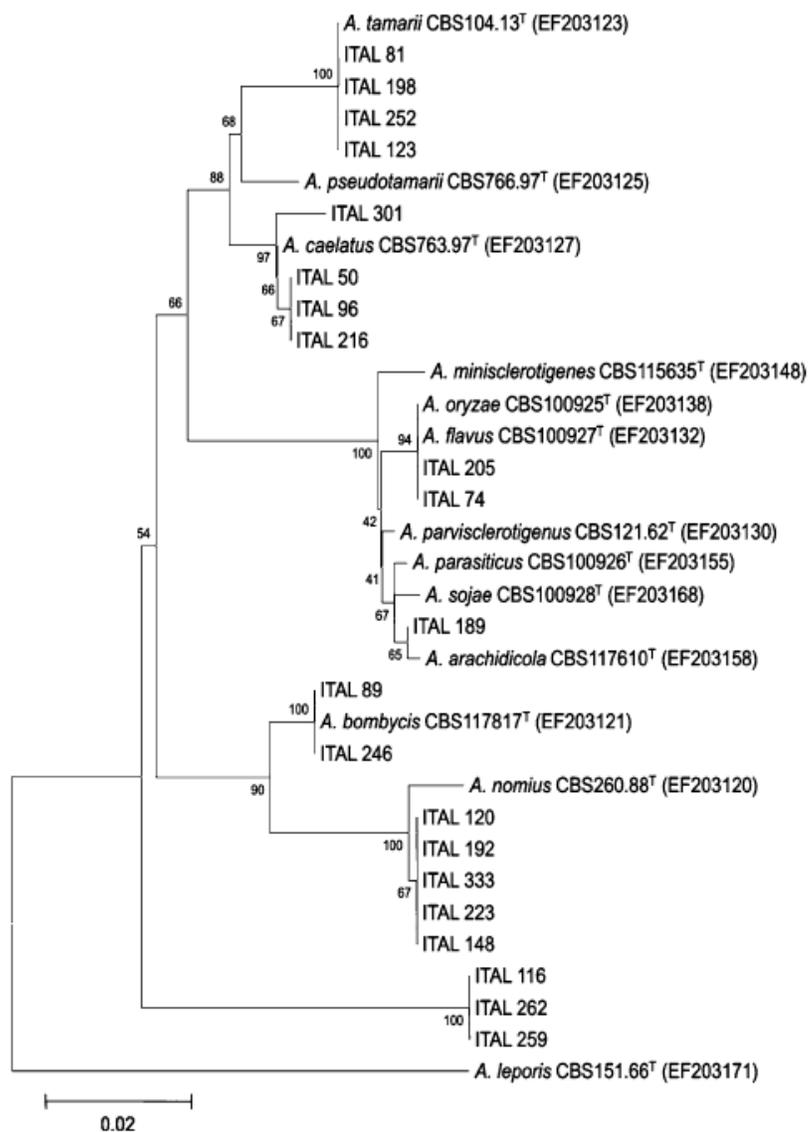


Figura 38. Árvore filogenética (castanha do Brasil), reconstruído a partir do gene β -tubulina, sequências correspondentes de *Aspergillus* section *Flavi* - bancos de dados públicos (GONÇALVES *et al.*, 2012).

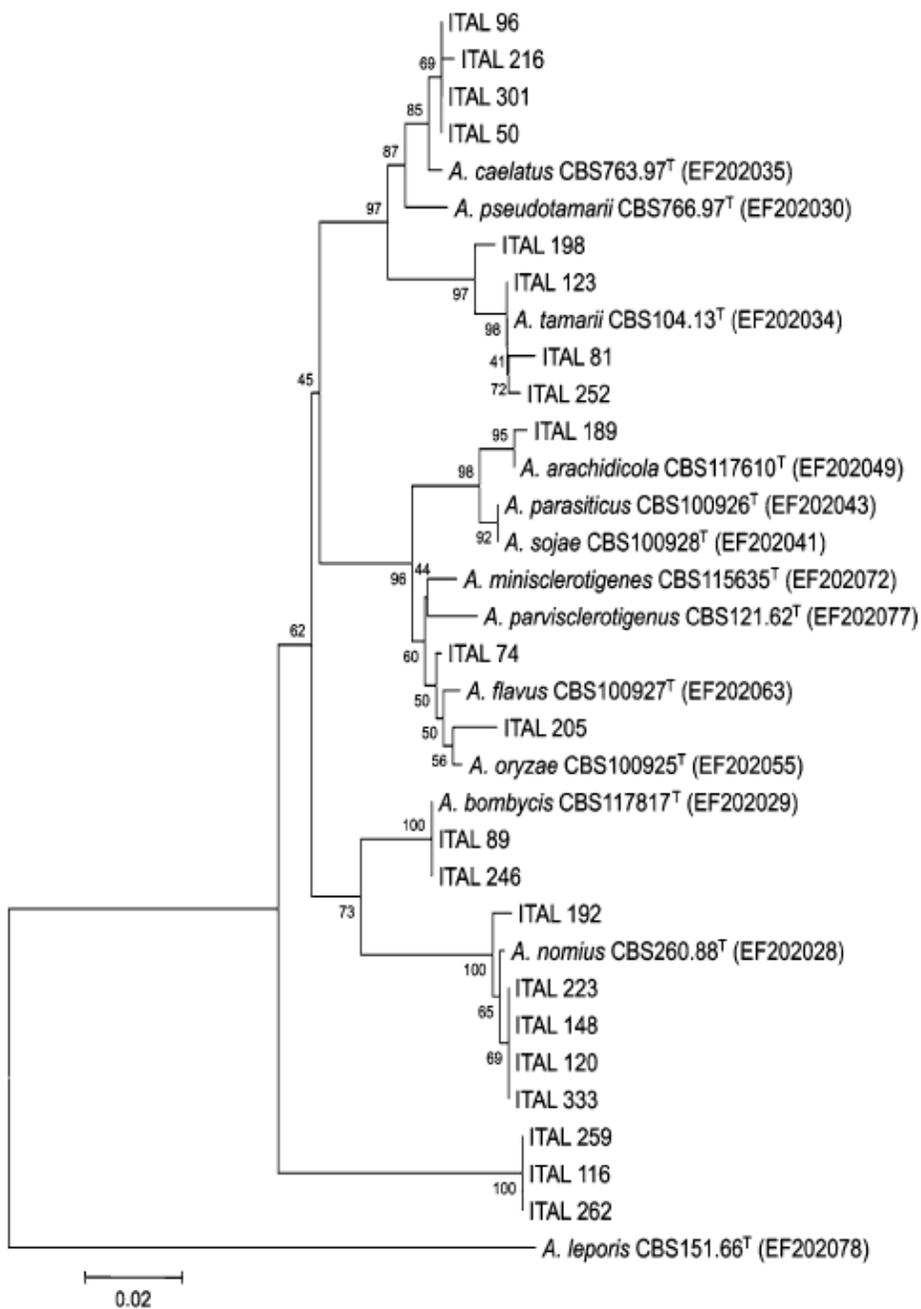


Figura 39. Árvore filogenética (castanha do Brasil), reconstruído a partir do gene calmodulina, sequências correspondentes de *Aspergillus* section *Flavi* - bancos de dados públicos (GONÇALVES *et al.*, 2012).

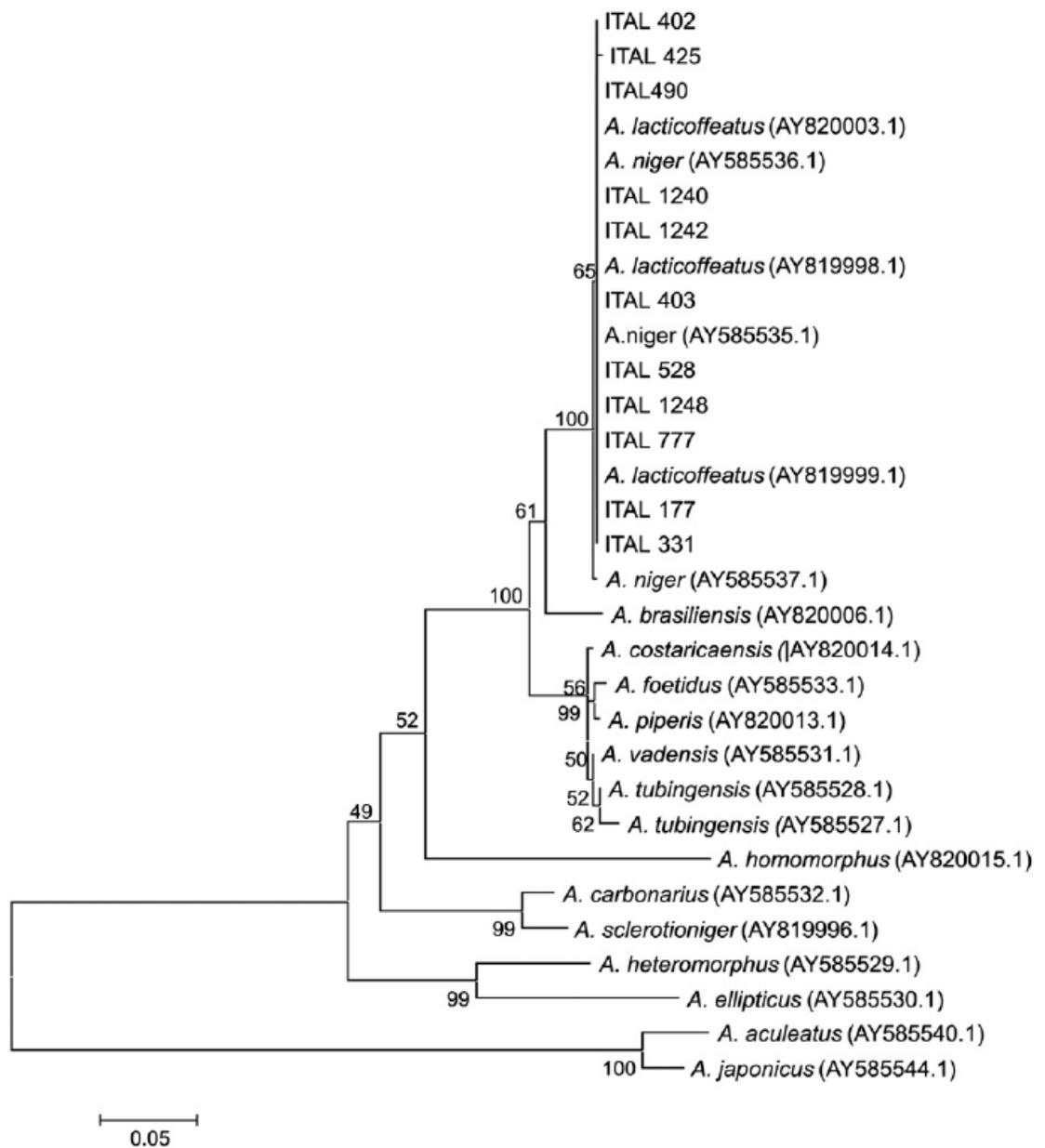


Figura 40. Árvore filogenética (futas secas), reconstruído a partir do gene β -tubulina, sequências correspondentes de *Aspergillus* section *Nigri* - bancos de dados públicos (FERRACIN *et al.*, 2012).