



ANIELLI SOUZA PEREIRA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE
ENZIMAS DE *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces* e
Paecilomyces ISOLADOS DE SOLO DE MATA ATLÂNTICA
DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

**LAVRAS - MG
2019**

ANIELLI SOUZA PEREIRA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE *Penicillium*,
Aspergillus, *Talaromyces* e *Paecilomyces* ISOLADOS DE SOLO DE MATA
ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Coorientador

**LAVRAS - MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Anielli Souza.

Diversidade e potencial para a produção de enzimas de
Penicillium, *Aspergillus*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* isolados de
solo de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero / Anielli Souza
Pereira. - 2019.

101 p. : il.

Orientador(a): Sara Maria Chalfoun de Souza.

Coorientador(a): Luís Roberto Batista.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Biodiversidade. 2. Potencial biotecnológico. 3. Pectinase. I.
de Souza, Sara Maria Chalfoun. II. Batista, Luís Roberto. III.
Título.

ANIELLI SOUZA PEREIRA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE *Penicillium*,
Aspergillus, *Talaromyces* e *Paecilomyces* ISOLADOS DE SOLO DE MATA
ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 03 de junho de 2019.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dra. Caroline Lima Angélico	EPAMIG
Dra. Fátima Maria de Souza Moreira	UFLA

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza
Orientadora

**LAVRAS - MG
2019**

À minha família, fonte inesgotável de amor e apoio, dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pelo amor incondicional, pelo direcionamento, pelo cuidado, por ter sido força e alento nessa caminhada, por me guiar e permitir conquistar mais essa vitória.

À minha família, minha base, meu alicerce, que estão sempre na plateia me aplaudindo ou enxugando minhas lágrimas. Sem vocês eu nada seria. Meu muito obrigada. Amo vocês.

À minha eterna orientadora Dra. Ana Flávia Santos Coelho (UFPB) que há tantos anos, através do PIBIC-UFT, plantou em mim a sementinha da microbiologia que hoje me rende um fruto muito especial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, professores e coordenadores pela oportunidade, ensinamentos e disponibilidade. À excepcional secretária Rose, por seu atendimento tão gentil e por nunca nos deixar perder os prazos.

À minha orientadora Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza, por tamanha sabedoria e paciência, por estar sempre disposta a ouvir e ajudar.

Ao meu co-orientador Dr. Luís Roberto Batista, por abrir as portas, pela oportunidade de participação no projeto e pela oportunidade de conhecer e me encantar pelo mundo dos fungos.

Aos colegas de turma, de disciplinas, das horas de desespero, principalmente à melhor equipe de estudos de Genética de Microrganismos: Joyce, Micha, Rafa e Su. Vocês foram demais.

Às amigas, confidentes, companheiras de laboratórios, de trabalho, de café, de noites e finais de semana no laboratório, de frustrações, mas, principalmente, de alegrias Loris, Michele, Nathasha, Sirlei, Fabi, Suzana, Thalissa. A jornada foi bem mais feliz com vocês.

Aos queridos Luiz Gustavo e Wesley pela companhia e toda ajuda com os experimentos e incansáveis traduções.

A todos que passaram pelo Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciências de Alimentos – UFLA durante essa jornada e contribuíram de alguma forma para a conquista deste trabalho.

E teve festa também, momentos de amizade, descontração, apoio. E em todos eles a companhia de vocês fez toda a diferença. Su e Kaka, sempre e sempre. A vocês toda minha amizade, gratidão e amor. Sabrina, Ju, Camis, Paula, Reps Desapego, Tindóida, Pinga Pura, tem um pedacinho de cada um em meu coração.

À minha psicóloga Rafaela Borges por me ajudar a enxergar o mundo de uma maneira mais leve e conseguir concluir essa etapa. “Não somos bons o tempo todo e está tudo bem”.

Ao meu namorado Evandro, pela companhia, paciência e amor, por estar perto quando tudo parecia que ia desabar. Mesmo chegando no final foi apoio e aconchego em uma das etapas mais difíceis. Obrigada amor.

A todos que passaram pela minha vida ao longo desses anos e que de alguma forma, direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar até aqui.

Muito obrigada!

Este trabalho faz parte do sub projeto intitulado “Biodiversidade e bioprospecção de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em solos de áreas de mineração” que compõe o projeto “Diversidade de plantas e de organismos dos solos com potencial biotecnológico e indicadores de impacto ambiental, no estado de Minas Gerais” (CRA-RDP-00136-10, FAPEMIG/FAPESP/FAPESPA/VALE S.A).

RESUMO

O Brasil é um país rico em biodiversidade com inúmeras espécies de plantas, animais e microrganismos, distribuídos em diferentes biomas, apresentando como importante fonte de produtos biológicos de interesse para as indústrias farmacêuticas, agrárias e alimentícias. O conhecimento sobre esses organismos e os compostos por eles produzidos ainda é pouco explorado no Brasil, tornando importante a realização do levantamento dessa diversidade e possibilitando a utilização desses compostos de maneira eficaz. O objetivo do presente trabalho foi realizar um levantamento da diversidade de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* em solo de Mata Atlântica da região do Quadrilátero Ferrífero e avaliar seu potencial para produção de enzimas. Os isolados foram avaliados e caracterizados morfológicamente de acordo com aspectos macro e microscópicos. Para auxiliar na identificação dos isolados, foi avaliada a produção de toxinas (citrinina, aflatoxinas e ocratoxina A) através do método de cromatografia em camada delgada e também foi avaliado o perfil proteico de alguns isolados por MALDI-TOF MS. Por meio de teste de produção de enzima *in vitro* foi realizado *screening* dos isolados para as enzimas lipase, celulase e pectinase, sendo calculado o índice enzimático para cada fungo. A partir do *screening* foi selecionado um morfotipo e uma enzima para testes em fermentação submersa. Foram obtidos 2035 isolados de fungos, sendo 37 do gênero *Aspergillus*, 34 do gênero *Paecilomyces*, 6 do gênero *Talaromyces* e 1958 isolados do gênero *Penicillium*. Com a caracterização morfológica foi possível identificar 34 isolados de *Aspergillus*, 50 de *Penicillium* e 6 de *Talaromyces*, agrupados em 3, 15 e 3 espécies, respectivamente. Os demais foram agrupados por suas semelhanças morfológicas, caracterizados e armazenados para posterior análise genética. O teste de aflatoxinas foi eficiente para auxiliar na identificação de *A. flavus* e *A. parasiticus*, indicando 19 isolados na primeira espécie e 2 da segunda. A utilização de MALDI-TOF se mostrou eficiente no auxílio à identificação de fungos filamentosos, resultando em um bom agrupamento e diminuição do número de morfotipos a serem levados para análises posteriores. Na avaliação da produção de enzimas a enzima pectinase foi a que apresentou maior número de isolados produtores e o morfotipo P51 o maior índice enzimático, sendo selecionados para o teste em fermentação submersa. O isolado se apresentou bom produtor da enzima exo-poligalacturonase e foram definidas faixas ótimas de tempo, temperatura e pH para sua produção. Os resultados mostraram uma diversidade de espécies no solo avaliado, podendo haver espécies novas ainda não descritas, além de um potencial biotecnológico não explorado que pode ser melhor estudado e utilizado em diversos processos de produção.

Palavras-chave: biodiversidade, potencial biotecnológico, índice enzimático, DCCR, pectinase

ABSTRACT

Brazil is a rich country in biodiversity, with numerous plants, animals and microorganisms species, distributed in different biomes, presented as an important source of biological products of interest to pharmaceutical, agricultural and food industries. The knowledge on these organisms and on the compounds produced by them still little explored, so it is important the development of biodiversity surveys, enabling the effective use of these compounds. The aim of the present study was to carry out a biodiversity survey on genera of filamentous fungi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, and *Paecilomyces* in Atlantic Forest soil located in the Quadrilátero Ferrífero, and evaluate their enzyme production potential. The isolates were morphologically characterized and evaluated according to macroscopic and microscopic aspects. The toxin production evaluation (citrinin, aflatoxins and ochratoxin A) was applied to aid in the identification of isolates by thin layer chromatography method, in addition, the protein profile of some isolates were evaluated by MALDI-TOF MS. In vitro enzyme production tests was performed screening the isolates for lipase, cellulase and pectinase enzymes, so the enzymatic index of each fungus was calculated. From the screening, one morphotype and one enzyme were selected and tested in submerged fermentation. In total, 2035 fungal isolates were obtained, among which 37 of the genus *Aspergillus*, 34 of *Paecilomyces*, 6 of *Talaromyces* and 1958 isolates of the genus *Penicillium*. Through morphological characterization was possible to identify 34 isolates of *Aspergillus*, 50 of *Penicillium* and 6 of *Talaromyces*, grouped into 3, 15 and 3 species, respectively. All further isolates were grouped by their morphological similarities, characterized and stored for later genetic analysis. The aflatoxin test was efficient to assist with the identification of *A. flavus* and *A. parasiticus*, thus it was able to indicate 19 isolates from the first specie and 2 from the second. The application of MALDI-TOF technique was efficient in the aid to identify the filamentous fungi, resulting in good clusters and decreasing the number of isolates to be subjected to further analysis. In the enzyme production tests, the pectinase enzyme showed the higher number of isolates producers, and the morphotype P51 showed the highest enzymatic index, so it was selected for the submerged fermentation. The isolated demonstrated to be a good exo-polygalacturonase producer and optimum time, temperature and pH ranges were defined for its production. The results showed wide diversity of species in the evaluated soil, with the possibility of new species that have not been described before, besides the untapped biotechnological potential that can be better studied and used in several production processes.

Keywords: biodiversity, biotechnological potential, enzymatic index, Central Composite Design, pectinase

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1- Estrutura microscópica de <i>Aspergillus</i>	24
Figura 1.2 – Estrutura microscópica de <i>Penicillium</i>	25
Figura 1.3 – Estrutura microscópica de <i>Paecilomyces</i>	26
Figura 1.4 – Estrutura microscópica de <i>Talaromyces</i>	28

CAPÍTULO 2

Figura 3.1 – Colônias obtidas a partir do plaqueamento em superfície em meios DG18 (A) e DRBC (B) da diluição (10^{-2}) do solo de uma das amostras analisadas.	44
Figura 3.2 – Macro e micromorfologia de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>A. parasiticus</i> (B) e <i>A. niger</i> (C).	48
Figura 3.3 – Macro e micromorfologia de <i>Penicillium aurantiogriseum</i> (A), <i>P. brevicompactum</i> (B), <i>P. solitum</i> (C) e <i>P. corylophilum</i> (D).	50
Figura 3.4 – Macro e micromorfologia de <i>Penicillium janthinellum</i> (A), <i>P. simplicissimum</i> (B), <i>P. waksmanii</i> (C) e <i>P. decumbens</i> (D).	50
Figura 3.5 – Macro e micromorfologia de <i>Penicillium spinulosum</i> (A), <i>P. glabrum</i> (B) e <i>P. sclerotiorum</i> (C).....	51
Figura 3.6 – Macro e micromorfologia de <i>Talaromyces funiculosus</i> (A), <i>T. purpurogenus</i> (B) e <i>T. variabilis</i> (C).....	52
Figura 3.7 – Macro e micromorfologia dos morfotipos A01 (A), A02 (B) e A03 (C).	53
Figura 3.8 – Macro e micromorfologia dos morfotipos Pae01 (A), Pae02 (B), Pae03 (C) e Pae04 (D).....	53
Figura 3.9 – Macro e micromorfologia dos morfotipos P01 (A), P02 (B), P03 (C), P04 (D), P06 (E), P07 (F), P08 (G), P09 (H), P10 (I), P11 (J).	54
Figura 3.10 – Macro e micromorfologia do morfotipo P12 (A), P16 (B), P17 (C), P18 (D), P20 (E), P21 (F), P22 (G), P23 (H), P24 (I) e P25 (J).	55
Figura 3.11 – Macro e micromorfologia do morfotipo P26 (A), P27 (B), P28 (C), P29 (D), P30 (E), P31 (F), P32 (G), P33 (H), P34 (I) e P35 (J).	56
Figura 3.12 – Macro e micromorfologia do morfotipo P36 (A), P37 (B), P38 (C), P39 (D), P40 (E), P41 (F), P42 (G), P43 (H), P44 (I) e P45 (J).	57
Figura 3.13 – Macro e micromorfologia do morfotipo P46 (A), P47 (B), P48 (C), P49 (D), P50 (E), P51 (F), P52 (G), P53 (H), P54 (I) e P55 (J).	58

Figura 3.14 – Macro e micromorfologia do morfotipo P61 (A), P62 (B), P63 (C), P64 (D), P65 (E), P66 (F), P67 (G), P68 (H), P69 (I) e P70 (J).	59
Figura 3.15 – Macro e micromorfologia do morfotipo P71 (A), P72 (B), P73 (C), P74 (D), P75 (E), P76 (F), P79 (G), P82 (H), P84 (I) e P85 (J).	60
Figura 3.16 – Macro e micromorfologia do morfotipo P86 (A), P87 (B), P89 (C), P90 (D), P91 (E), P92 (F), P93 (G), P94 (H), P95 (I) e P96 (J).	61
Figura 3.17 – Macro e micromorfologia do morfotipo P97(A), P98 (B), P101 (C), P103 (D), P104 (E), P105 (F), P107 (G), P108 (H), P109 (I) e P114 (J).....	62
Figura 3.18 – Macro e micromorfologia do morfotipo P115 (A), P116 (B), P117 (C), P118 (D), P122 (E), P123 (F), P124 (G), P125 (H), P126 (I) e P127 (J).	63
Figura 3.19 – Macro e micromorfologia do morfotipo P129 (A), P130 (B), P131 (C), P132 (D), P137 (E), P139 (F), P142 (G), P143 (H), P144 (I) e P145 (J).	64
Figura 3.20 – Macro e micromorfologia do morfotipo P146 (A), P148 (B), P150 (C), P151 (D), P152 (E), P154 (F), P155 (G), P156 (H), P157 (I) e P158 (J).	65
Figura 3.21 – Macro e micromorfologia do morfotipo P160 (A), P161 (B) e P162 (C).	66

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 – Testes positivos para produção de lipase. A – P40, B – P54, C – P126, D – P130.	91
Figura 3.2 – Testes positivos para produção de celulase. A – P22, B – P48, C – P71.....	92
Figura 3.3 – Morfotipos que apresentaram maior índice enzimático no teste para produção de pectinases. A – <i>A. parasiticus</i> , B – <i>A. flavus</i> , C – P51, D – P66, E – A01.	94
Figura 3.4 – Diagrama de Pareto com efeito do tempo (t), temperatura (T), pH e suas interações sobre a atividade enzimática de exo-PG.....	96
Figura 3.5 – Curvas de contorno em função da interação entre as variáveis tempo (h), temperatura (°C) e pH sobre a atividade da enzima exo-PG.....	97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 3.1 – Estimativa da população total de fungos filamentosos em amostras de solo de região de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero em dois meios de cultivo.	45
Tabela 3.2 – Espécies dos gêneros <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Talaromyces</i> isoladas de solo de região de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero.	47

CAPÍTULO 3

Tabela 2.1 – Variáveis do delineamento experimental com valores reais e codificados.....	87
Tabela 2.2 – Matriz do delineamento experimental.	88
Tabela 3.1 – Índice enzimático de isolados dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> e <i>Paecilomyces</i> avaliada para produção de lipase, celulase e pectinase. (continua)	90
Tabela 3.2 – Matriz do delineamento experimental e atividade enzimática para exopoligalacturonase.	95

LISTA DE APÊNDICES

CAPÍTULO 2

Apêndice A - Coordenadas geográficas dos pontos centrais das 9 amostras compostas de solo coletadas em região de Mata Atlântica no Quadrilátero Ferrífero.	71
Apêndice B - Principais características macro e micromorfológicas dos isolados de fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Paecilomyces</i> e <i>Penicillium</i> não identificados em nível de espécie. (continua)	72
Apêndice C - Placas de cromatografia de camada delgada para teste de micotoxinas.....	82

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1	19
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
1.1 Biodiversidade	19
1.2 Bioprospecção.....	20
1.3 Quadrilátero Ferrífero e o bioma Mata Atlântica como ambiente para bioprospecção 20	
1.4 Biodiversidade microbiana do solo.....	21
1.5 Fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> e <i>Paecilomyces</i>	22
1.5.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	23
1.5.2 Gênero <i>Penicillium</i>	25
1.5.3 Gênero <i>Paecilomyces</i>	26
1.5.4 Gênero <i>Talaromyces</i>	27
1.6 Utilização de fungos para produção de enzimas.....	28
1.6.1 Pectinases	30
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO 2	39
DIVERSIDADE DE FUNGOS DOS GÊNEROS <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> E <i>Paecilomyces</i> ISOLADOS DE SOLO DE MATA ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO.....	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1 Área de estudo	41
2.2 Coleta de amostras	41
2.3 Isolamento, contagem e identificação dos fungos	42
2.3.1 Caracterização e identificação morfológica das espécies	43
2.3.2 Agrupamento de isolados pela técnica de MALDI-TOF MS	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1 Estimativa da população total de fungos filamentosos nas amostras	44
3.2 Quantificação de isolados dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> e <i>Paecilomyces</i>	46

3.3	Isolados do gênero <i>Aspergillus</i> identificados em nível de espécie.....	48
3.4	Isolados dos gêneros <i>Penicillium</i> identificados em nível de espécie.....	48
3.5	Isolados dos gêneros <i>Talaromyces</i> identificados em nível de espécie.....	51
3.6	Isolados dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Paecilomyces</i> não identificados em nível de espécie	52
3.7	Avaliação da produção de ocratoxina A, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e citrinina .	66
3.8	Agrupamento de isolados pela técnica de MALDI-TOF MS.....	67
4	CONCLUSÃO.....	67
5	REFERÊNCIAS.....	68
6	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	71
CAPÍTULO 3.....		83
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS DOS GÊNEROS <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> E <i>Paecilomyces</i> ISOLADOS DE SOLO DE MATA ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO		83
1	INTRODUÇÃO.....	84
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1	Obtenção dos isolados.....	85
2.2	Screening dos isolados para produção de lipase, celulase e pectinase.....	85
2.2.1	Screening para produção de lipase (SIERRA, 1975).....	86
2.2.2	Screening para produção de celulase (KASANA et al., 2008)	86
2.2.3	Screening para produção de pectinase (MARCHI et al., 2009)	86
2.2.4	Determinação do índice enzimático (IE)	87
2.3	Otimização da produção de pectinase	87
2.3.1	Condições de cultivo e obtenção do extrato enzimático	88
2.3.2	Determinação da atividade enzimática de pectinase	89
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
3.1	Screening dos isolados para produção de lipase, celulase e pectinase.....	89
3.2	Otimização para produção de pectinase	94
4	CONCLUSÃO.....	99
5	REFERÊNCIAS.....	99

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país de destaque mundial quando se fala em biodiversidade. Detentor de uma das maiores biodiversidades do mundo abriga milhões de espécies de plantas, animais e microrganismos distribuídos em biomas distintos (Amazônia, Pantanal, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado e Pampa) (VALLI & BOLZANI, 2016). Porém, pouco ainda se conhece a respeito desse potencial biológico e sua possível utilização na biotecnologia, o que aumenta a importância da pesquisa na descoberta de novos processos e produtos microbianos, além da manutenção e caracterização desses microrganismos, afim de que a diversidade microbiana seja utilizada corretamente.

A necessidade por compostos bioativos de utilização nas áreas farmacêutica, agrária e alimentícia tem reforçado a importância da busca por novos recursos biológicos. Com isso, a bioprospecção, caracterizada como a busca por material biológico em ambientes extremos ou ricos em biodiversidade (SPROCATI et al., 2014), se mostra como uma ferramenta importante na descoberta de microrganismos com potencial para utilização em processos biotecnológicos.

O Quadrilátero Ferrífero é uma das principais regiões de produção de minério de ferro do Brasil e possui uma área de cerca de 7.000 km² localizada na porção centro-sudeste do estado de Minas Gerais. As suas características de hidrologia, pedologia, topografia e geologia são bastante diversas e resultam em uma rica biodiversidade, com presença de biomas distintos, destacando Cerrado e Mata Atlântica (RUCHKYS, 2009).

A Mata Atlântica, um complexo ecossistema de importância mundial, é conhecida por abrigar uma grande diversidade biológica graças à presença de condições adequadas para evolução de organismos de natureza animal, vegetal e microbiológica. Essa ampla biodiversidade lhe confere o patamar de um dos biomas mais ricos do mundo, e por possuir um solo raso, úmido e com alto teor de matéria orgânica, é grande a presença de vários microrganismos decompositores no seu solo, como fungos e bactérias.

Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* estão entre os principais gêneros presentes no solo e são apontados por possuírem grande potencial para utilização em processos biotecnológicos, uma vez que se destacam como produtores de enzimas como amilases, pectinases, celulasas, lipases, dentre outras, que podem ser utilizadas em vários segmentos.

As enzimas microbianas vêm sendo utilizadas na obtenção de vários produtos como detergentes, alimentos, papel, indústria têxtil, farmacêutica, produção de oleoquímicos, biocombustíveis, dentre outros. Os fungos filamentosos são os microrganismos mais promissores para essa utilização, principalmente devido a facilidade no seu cultivo e por apresentarem boa produção de enzimas extracelulares (GUIMARÃES et al., 2006; SHARMA et al., 2017a).

O levantamento da diversidade de microrganismos em uma região ainda pouco estudada, com uma vegetação preservada, pode resultar na descoberta de espécies ainda não descritas, importantes do ponto de vista ambiental e econômico, promissoras para serem utilizadas em processos biotecnológicos, como por exemplo na produção de enzimas.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar um levantamento da diversidade de espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* em solo de Mata Atlântica da região do Quadrilátero Ferrífero e avaliar o potencial dos isolados para produção das enzimas lipase, celulase e pectinase.

CAPÍTULO 1

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 *Biodiversidade*

De acordo com o decreto legislativo n° 2 de junho de 1992 que trata da Convenção sobre Diversidade Biológica, biodiversidade, ou diversidade biológica, pode ser definida como a diversidade de seres vivos que compreende a variabilidade de organismos vivos de todas as origens (incluindo ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos) e os processos ecológicos envolvidos nesse ecossistema, além da diversidade dentro de espécies, entre espécies e entre ecossistemas (BRASIL, 1992).

A biodiversidade possui importância econômica, ambiental e social. Provedora de uma infinidade de matéria-prima para produção de alimentos e medicamentos, além de cosméticos e outros produtos, também auxilia na manutenção de condições ambientais, como purificação do ar e moderação do clima.

O Brasil possui grande extensão territorial e diversos climas, o que propicia uma rica biodiversidade, conhecida internacionalmente, com uma grande variedade de fauna e flora e presença de diversas espécies endêmicas, incluída entre as maiores do mundo. Essa biodiversidade está distribuída em biomas distintos, dentre os mais importantes a Mata Atlântica, o Cerrado e a Floresta Amazônica (CORTE, 2010; VALLI & BOLZANI, 2016).

Um país que possui uma grande biodiversidade provavelmente será detentor de uma grande diversidade de moléculas biológicas, sendo muito grande a probabilidade de serem descobertas novas moléculas com valor comercial (MAGALHÃES, 2006).

Porém, o potencial biotecnológico do Brasil pode ser considerado ainda pouco explorado frente à quantidade de bioprodutos de grande impacto que podem ser encontrados e utilizados na indústria (BOLZANI, 2016). Daí vem a importância da pesquisa na descoberta de novos processos e produtos microbianos, além da manutenção e caracterização desses microrganismos, afim de que a diversidade microbiana seja utilizada corretamente.

A demanda por informações do estado de conservação da biodiversidade vem crescendo em todo o mundo e essas informações constituem uma ferramenta fundamental para ações de gestão e uso sustentável dos recursos naturais (MAGALHÃES, 2006; CONSTANTINO et al., 2016), sendo que essa conservação só pode ser assegurada a partir do conhecimento e registro das espécies existentes nos diferentes ambientes.

1.2 Bioprospecção

O termo bioprospecção é descrito por Artuso (2002) como “a avaliação proposital de material biológico selvagem em busca de novos produtos valiosos”, ou seja, envolve a aplicação tecnológica avançada para desenvolver novos produtos como fármacos, agroquímicos, enzimas industriais, entre outros.

Já Sprocati et al. (2014) definem bioprospecção como sendo a “busca por material biológico de ocorrência natural, em especial em ambientes extremos ou ricos em biodiversidade”. Como nesses ambientes os microrganismos se adaptam desenvolvendo estratégias em resposta às condições de vida adversas, eles se apresentam como candidatos em potencial para exploração biotecnológica.

A maioria das reações realizadas durante os processos industriais exigem enzimas que possuam uma elevada funcionalidade e especificidade, além de alta estabilidade quando submetidas a condições particulares. Assim, tolerância a alto teor de sal, temperaturas altas ou baixas e variação de pH são características desejáveis em uma enzima (ELLEUCHE et al., 2015; ROBL et al, 2013; SURYANARAYANAN et al, 2012).

A crescente necessidade de novos compostos bioativos na área farmacêutica (como por exemplo, antibióticos contra patógenos multi-resistentes) e na área agrária e alimentícia (como agroquímicos, produtos de controle biológico e aditivos alimentares) reforça a importância da prospecção de novos recursos biológicos (MÜLLER et al., 2016).

Embora a análise de genomas ambientais forneça uma grande quantidade de informações, é importante a obtenção de isolados cultiváveis para a realização de estudos fisiológicos, ecológicos e evolutivos e também para benefícios de longo alcance no que diz respeito a aplicações tecnológicas (SPROCATI, 2014).

1.3 Quadrilátero Ferrífero e o bioma Mata Atlântica como ambiente para bioprospecção

O Brasil é um país com grande produção de minérios de ferros e dentre as regiões produtoras as principais são o Quadrilátero Ferrífero, a Província Mineral de Carajás e a região Corumbá (CARVALHO et al., 2014).

O Quadrilátero Ferrífero é uma área onde estão concentradas as jazidas de ferro do centro de Minas Gerais e essa denominação se dá principalmente pelo arranjo geométrico da sua morfoestrutura. Conhecida internacionalmente como um importante terreno pré-cambriano com significativos recursos minerais, principalmente ferro e ouro, a área está

localizada na porção centro-sudeste do estado e possui cerca de 7.000 km², delimitada aproximadamente por linhas que ligam as cidades de Itabira, Mariana, Congonhas e Itaúna (RUCHKYS, 2007; RUCHKYS, 2009).

Características como hidrologia, formação de solo, localização, tipos de relevo, presença de minerais são bastante diversas, o que resulta em uma grande riqueza da biodiversidade da região, caracterizada por uma cobertura vegetal dividida entre os biomas de Cerrado e Mata Atlântica (RUCHKYS, 2009).

A Mata Atlântica é um complexo ecossistema de grande importância para o Brasil e para o mundo, pois é um bioma que abriga parcelas significativas de diversidades biológicas. O fato de possuir uma fitofisionomia bastante diversificada ofereceu condições adequadas para a evolução de um complexo biótico de natureza vegetal e animal altamente rico, colocando a Mata Atlântica no patamar de um dos biomas mais ricos em termos de diversidade biológica (SANTOS, 2010).

O bioma de Mata Atlântica abriga uma notável diversidade biológica com alto grau de endemismo, sendo um complexo biótico de natureza vegetal, animal e microbiológica altamente rico, considerada a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano e um dos biomas mais importantes do mundo (SIMÕES & LINO, 2002; TABARELLI et al., 2005 RODRIGUES et al., 2009; SANTOS, 2010). Por possuir um solo raso, sempre úmido e com grande quantidade de matéria orgânica, possibilita a presença de vários microrganismos decompositores, como fungos e bactérias.

1.4 Biodiversidade microbiana do solo

A maior parte das espécies desconhecidas de microrganismos está presente nas florestas tropicais, que são detentoras da maior diversidade do planeta, possuindo cerca de 50% das espécies totais. O solo é responsável por abrigar a maior quantidade e diversidade desses microrganismos, sendo que um grama de solo contém mais de 10.000 espécies diferentes (LOPES, 2016).

Essa grande diversidade de microrganismos no solo se dá principalmente devido a sua natureza dinâmica, heterogênea e complexa. Essas características permitem que organismos com reações metabólicas distintas possam estar presentes no mesmo ambiente, interagindo em estado de equilíbrio, podendo haver relações de dependência entre eles e estabelecendo condições ideais para uma grande biodiversidade (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os microrganismos possuem papel importante na manutenção da vida na Terra. A presença de microrganismos no solo influencia em diversos parâmetros, uma vez que estão envolvidos em várias ações como decomposição de matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e energia, produção de compostos complexos que auxiliam na agregação do solo, decomposição de compostos xenobióticos e controle biológico de pragas e doenças, dentre outras (LOPES, 2016; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006, OLIVEIRA et al., 2013; TANCIC ZIVANOV et al., 2017).

Estudos de diversidade de microrganismos tem ganhado atenção principalmente por serem grandes produtores de metabólitos de interesse para a indústria biotecnológica. Com isso tem sido cada vez mais crescente a atuação em pesquisas na busca por novos isolados com potencial enzimático para aplicação em diversos processos (GADD, 2010).

As condições do habitat no qual os microrganismos estão inseridos influenciam diretamente no seu metabolismo e na sua sobrevivência no ambiente. Sendo assim, o tipo de solo e os fatores ambientais exercem impacto direto na estrutura das comunidades microbianas presentes. Parâmetros como tamanho de partículas, pH, capacidade de intercâmbio de íons, conteúdo de matéria orgânica, concentração de oxigênio e temperatura estão entre os fatores de interferência o que faz com que a composição das comunidades microbianas do solo flutue bastante (GARBEVA et al., 2004; DANIEL, 2006).

Muitos fungos que habitam o solo são decompositores de matéria orgânica e contribuem para a ciclagem dos nutrientes, podendo estar presentes também os formadores de micorrizas com diversas espécies de plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; PFENNING & ABREU, 2006). Dentre os gêneros de fungos filamentosos encontrados em solo, os principais são *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* (GAMS, 2007). Esses microrganismos possuem a capacidade de secretar enzimas no meio ambiente e que auxiliam na degradação de produtos e compostos, disponibilizando nutrientes necessários a sua manutenção e sobrevivência.

1.5 Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces*

Inicialmente os fungos filamentosos eram conhecidos como prejudiciais, sendo apontados como patógenos de humanos, causadores de contaminação e deterioração em alimentos, produtores de toxinas. No entanto, com a evolução das pesquisas, os fungos tem se destacado em suas ações benéficas.

Os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* são bem conhecidos e têm sido estudados ao longo dos séculos, principalmente porque muitas dessas espécies possuem implicações com importância social e econômica em diversas áreas (ICPA, 2016).

Esses fungos podem ser utilizados na produção de alimentos como queijos, salsichas, molho de soja e também são importantes biotecnologicamente, sendo muito utilizados para produção de enzimas, além de apresentarem uma produção diversificada de metabólitos secundários, os quais podem ser utilizados medicinalmente como antibióticos ou produtos farmacêuticos com atividade biológica e também como controle biológico em cultivos agrícolas. Porém, algumas espécies também são apontadas como deterioradoras de alimentos, produtoras de toxinas e agentes de algumas doenças humanas e animais (TSANG et al., 2018).

Anteriormente pertencentes a família *Trichocomaceae*, a qual foi subdividida em 3 novas famílias, esses gêneros são agora classificados como pertencentes às famílias *Aspergillaceae* (*Aspergillus* e *Penicillium*), *Thermoascaceae* (*Paecilomyces*) e *Trichocomaceae* (*Talaromyces*) e são conhecidos por possuírem impactos positivos e negativos sobre as atividades humanas (HOUBRAKEN & SAMSON, 2011; VISAGIE et al., 2014; HOUBRAKEN et al., 2014).

Algumas espécies pertencentes a esses grupos também são conhecidas por sua capacidade de crescimento em ambientes extremos com altas/baixas temperaturas, altas concentrações de sal/açúcar, baixa acidez ou baixos níveis de oxigênio (TSANG et al., 2018).

1.5.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é um gênero diverso que apresenta alto impacto econômico e social. Ocorre em todo o mundo, em diversos habitats e são conhecidos pela deterioração de alimentos, produção de toxinas e por serem patógenos de animais e humanos. Porém muitas espécies também são conhecidas por sua utilização na biotecnologia, na produção de vários metabólitos como antibióticos, ácidos orgânicos, enzimas e agentes de fermentação (SAMSON, 2014).

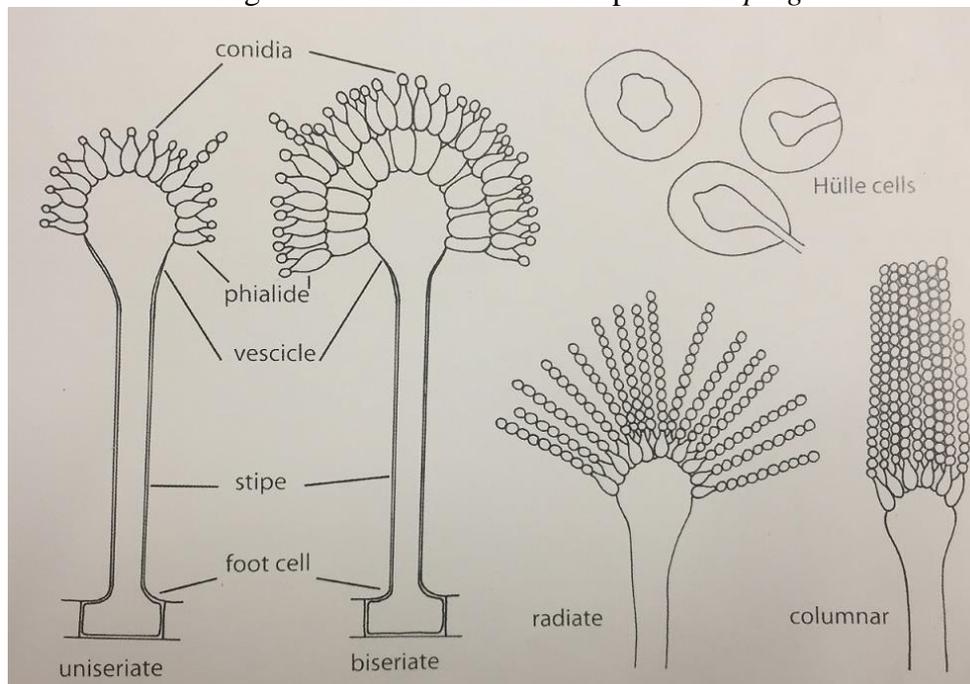
O nome *Aspergillus* foi introduzido inicialmente por Micheli em 1729 para descrever fungos assexuados que possuíam conidióforos semelhantes ao utensílio utilizado para aspergir água benta. Em 1768 von Haller validou o gênero e em 1832 Fries sancionou o nome (TSANG et al., 2018).

Sua identificação e classificação são baseadas principalmente em características morfológicas de conidióforos e esporos assexuais e características bioquímicas, mas a caracterização molecular e quimiotaxonômica tem ganhado cada vez mais espaço (SAMSON, 2014).

Por apresentar morfologia bastante variada, principalmente em relação à coloração das colônias, esta é a principal característica macroscópica utilizada na classificação, sendo que a coloração pode variar em tons de verde, azul, amarelo, cinza, marrom, preto e branco. Além disso, as espécies podem ser também divididas em seções como *Flavi*, *Circumdati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulants* dentre outras (KLICH, 2002; VARGA et al., 2004).

As espécies possuem conidióforo asseptado com base em forma de T ou L (célula pé) ligada a uma hifa vegetativa, na qual se inicia e pode se estender por alguns milímetros de comprimento até chegar a vesícula onde são formadas as células conidogênicas, métulas e fiáides como representado na figura 2.1 (RAPER & FENNEL, 1965; KOZAKIEWICZ, 1989; KLICH, 2002; SAMSON et al, 2010).

Figura 1.1- Estrutura microscópica de *Aspergillus*.



Fonte: SAMSON et al, 2010.

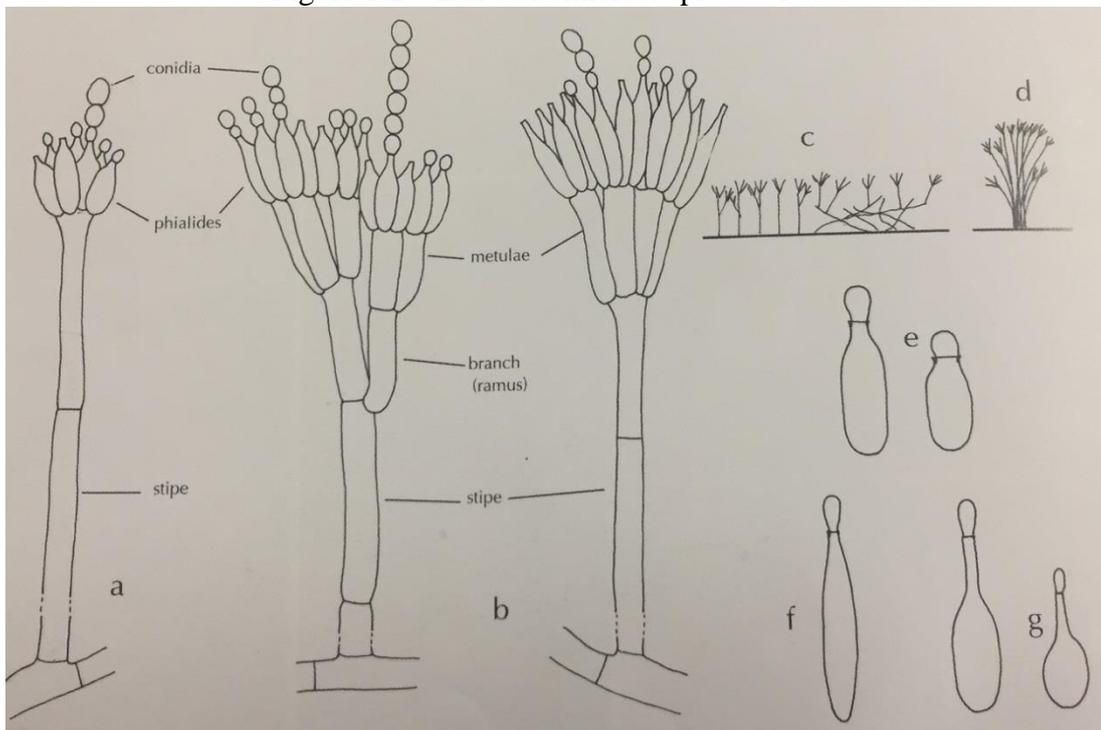
Dentre os metabólitos secundário produzidos estão as toxinas, enzimas, ácidos orgânicos e medicamentos.

1.5.2 Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* pode ser encontrado distribuído no mundo todo, presente em diversos substratos como solos, ar, alimentos e em vegetação deterioração (PITT e HOCKING, 2009).

Inicialmente foi descrito por Link em 1809 para classificar fungos assexuados que possuíam estrutura reprodutiva semelhante a um pequeno pincel (Figura 2.2). Em 1901 o gênero foi dividido em subgêneros *Aspergilloides*, *Biverticillium* e *Eupenicillium* por Dierckx. Em 1930 Thom escreveu uma das maiores contribuições sobre o gênero *Penicillium*, a monografia “The Penicillia”, e em 1979 Pitt realizou uma nova divisão em relação aos tipos de ramificações dos conidióforos e coloração de colônias.

Figura 1.2 – Estrutura microscópica de *Penicillium*.



Fonte: SAMSON et al, 2010.

Muitas espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* têm servido de modelo para estudos básicos, porém o investimento em pesquisas aplicadas tem apontado o enorme potencial biotecnológico desses microrganismos. Dentre esses potenciais podemos destacar a utilização no biocontrole, o micoparasitismo, a utilização de seus metabólitos secundários para diversas indústrias, como enzimas para indústrias de alimentos e novas substâncias para a indústria farmacêutica (PALLU, 2010), além de alguns processos que já são bem estabelecidos como a produção de queijos do tipo roquefort e camembert, produção do

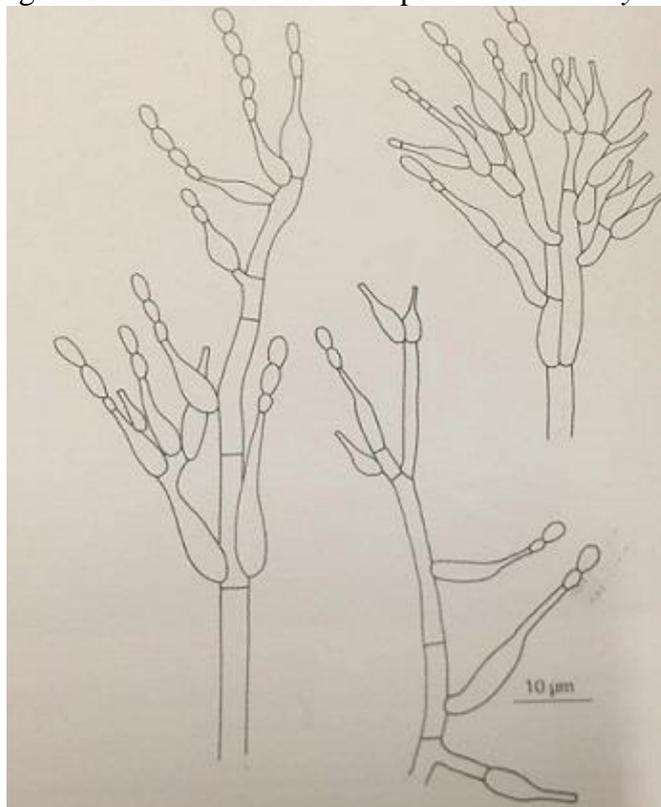
antibiótico penicilina, além de enzimas como lipases, xilanases e endoglucanases. Porém, algumas espécies são apontadas também como produtoras de toxinas, não sendo indicada sua utilização em processos biotecnológicos (PITT, 2000).

De acordo com suas características culturais e morfológicas (principalmente arranjo de conidióforos e conídios) o gênero *Penicillium* foi subdividido em quatro subgêneros: *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Furcatum* e *Biverticillium*, sendo que as espécies pertencentes a este último foram realocadas no gênero *Talaromyces* (DENG et al., 2012; PITT & HOCKING, 1997).

1.5.3 Gênero *Paecilomyces*

O gênero *Paecilomyces* está classificado na, classe dos *Ascomycetes*, ordem *Eurotiales* e família *Thermoascaceae*. Possui como característica morfológica a presença de conidióforos ramificados em grupos de bifurcações irregulares, com fiálides longas no topo (Figura 2.3) e conídios marrom-oliva, o que difere do gênero *Penicillium* que possui fiálides curtas cilíndricas ou em forma de garrafa e conídios verdes (HOUBRAKEN & SAMSON, 2011; FAIA, 2011).

Figura 1.3 – Estrutura microscópica de *Paecilomyces*.



Fonte: SAMSON et al, 2010.

A proposta desse gênero por Bainier (1907) foi realizada para classificar uma única espécie, *P. varioti*, sendo posteriormente revisada por Brown & Smith (1957) e modificada por Samson (1974) que apontou 31 espécies, sendo reconhecidas mais de 100 espécies até 2016 (NGUYEN et al., 2016).

Espécies de *Paecilomyces* podem ser encontradas em solos, animais, ambientes internos e produtos alimentícios, além de serem isolados de insetos e alguns podem causar infecções em humanos. A maioria tem seu crescimento ótimo entre 30 e 37° C e diversos estudos mostram suas aplicações biotecnológicas (SAMSON, 1974; BROWN & SMITH, 1957; PASTOR & GUARRO, 2006; HOUBRAKEN et al., 2008; ZHOU et al., 2015;

Fungos do gênero *Paecilomyces* encontrados em resíduos lignocelulolítico, como cana-de-açúcar e madeira em decomposição, tem levantado interesse devido a sua capacidade de transformar produtos complexos e produtos de maior valor agregado, como celulose em biocombustível. Além disso, está entre os principais gêneros de fungos nematófagos, que infectam e se alimentam de nematoides, podendo ser utilizados no controle biológico (SANTIAGO et al., 2006; BASSO et al, 2010).

1.5.4 Gênero *Talaromyces*

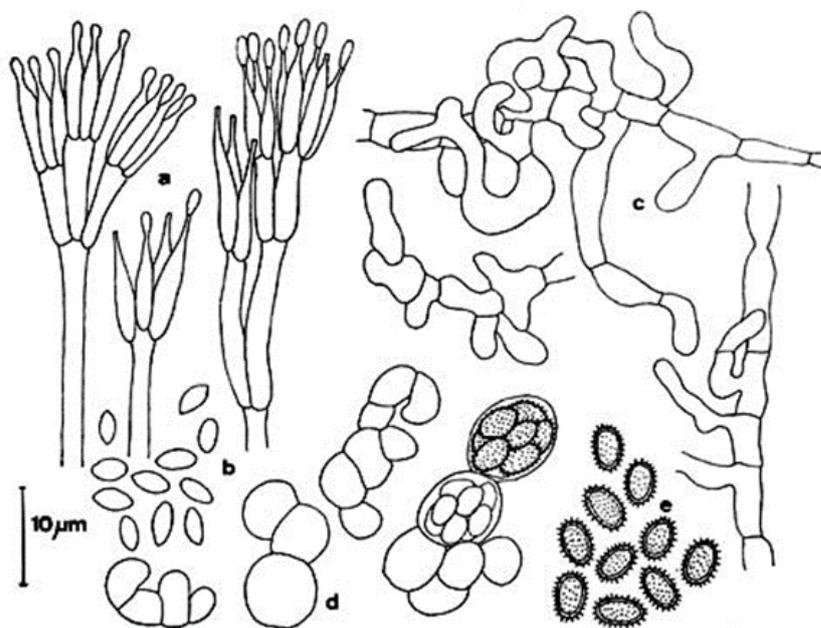
O gênero *Talaromyces* foi inicialmente descrito por Benjamim (1955) utilizando *T. vermivulatus* como espécie tipo. Este gênero apresenta como característica principal a presença de ascomata cleistotecial com parede de hifas entrelaçadas e foi sempre relacionado com o gênero *Penicillium*, indicado como sua forma teleomorfa. Porém, esse conceito não é mais aplicado devido às mudanças no Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas que preconiza que espécies filogeneticamente relacionadas devem ser tratadas sob o mesmo nome independentemente de suas formas sexuadas ou assexuadas (McNEILL et al., 2012).

Samson et al. (2011) mostraram estreita relação filogenética entre fungos do gênero *Talaromyces* e fungos do gênero *Penicillium* subgênero *Biverticillium*, passando então a classifica-los como *Talaromyces*.

A diferença fenotípica entre *Talaromyces* e relação a *Penicillium* se dá principalmente pela formação de seus conidióforos simetricamente ramificados (Figura 2.4), com fiáldes lanceoladas e presença de ascomata macio sem parede persistente e bem definida. Além disso, crescem mais lentamente e apresentam diferenças nos padrões de seus metabólitos.

Algumas espécies do gênero *Talaromyces* são apontadas como patogênicas oportunistas, podendo causar doenças pulmonares. A espécie *T. marneffei*, por exemplo, é a mais conhecida como causadora de uma micose fatal, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Além dessa espécie, *T. purpurogenus* e *T. amestolkiae* também já foram indicados como causadores de doenças pulmonares (USTIANOWSKI et al., 2008; ATALAY et al., 2016; VILLANUEVA-LOZANO, 2017; MOHSIN et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Figura 1.4 – Estrutura microscópica de *Talaromyces*.



Fonte: STOLK & SAMSON (1972), adaptado.

Apesar disso, várias outras espécies são indicadas pela capacidade de produzir metabólitos secundários com diversas ações benéficas, como anti-inflamatórios, ácidos, óleos, antibióticos, pigmentos, dentre outros (CHEN et al., 2017; ZHANG et al., 2017; REN et al., 2017; DE GOES et al., 2017; NOINART et al., 2017; FRISVAD et al., 2013).

1.6 Utilização de fungos para produção de enzimas

Enzimas são substâncias produzidas por todo e qualquer organismo vivo e que fazem parte de reações químicas essenciais para manutenção da vida. Porém, com o aumento do conhecimento sobre essas substâncias, as enzimas passaram a ser utilizadas em diversos processos industriais nas mais diferentes áreas (MUSSATO et al., 2007).

A utilização de enzimas como ferramenta para obtenção de diversos produtos industriais vem crescendo cada vez mais. Essa utilização, na maioria das vezes, reduz o uso de altas temperaturas, solventes orgânicos e valores de pH extremos, oferecendo maior especificidade de reação, pureza do produto final e redução de impactos ambientais (BHAT, 2000; CHERRY & FIDANTSEF, 2003).

As enzimas microbianas vêm sendo utilizadas na obtenção de vários produtos como detergentes, alimentos, papel, indústria têxtil, farmacêutica, produção de oleoquímicos, biocombustíveis, dentre outros, sendo que os fungos filamentosos são os microrganismos mais promissores para essa utilização, principalmente devido a facilidade no seu cultivo e por apresentarem boa produção de enzimas extracelulares (GUIMARÃES et al., 2006; SHARMA et al., 2017a).

Essas substâncias agem de maneira específica em condições controladas, sendo ideais para utilização na tecnologia de alimentos, resultando em modificação da matéria-prima sem perda de nutrientes. Na indústria de alimentos as transformações químicas de moléculas orgânicas realizadas por microrganismos vivos ou por seus metabólitos são alternativas de grande potencial tecnológico, porém, uma pequena parcela de microrganismos no mundo tem sido testada como produtores de enzimas (HASAN et al., 2006).

Em comparação com enzimas vegetais e animais, as enzimas microbianas possuem maior eficiência, pois os microrganismos apresentam variedade na atividade catalítica, maior rendimento, manipulação genética mais simples, produção não dependente de flutuações sazonais, rápido crescimento em meio de cultura, além de suas enzimas serem mais estáveis, mais fáceis de manipular e mais seguras (COELHO & NASCIMENTO, 2008; SHARMA et al., 2017b).

Dentre as enzimas produzidas por microrganismos as podemos destacar as enzimas celulasas, lipases, hemicelulasas, proteases, amilases e pectinases como as mais utilizadas nos processos biotecnológicos e algumas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium* são geralmente consideradas como seguras (GRAS) e produzem enzimas extracelulares de fácil recuperação (BHAT, 2000; MRUDULA & ANITHARAJ, 2011).

As pectinases são amplamente utilizadas na produção de sucos de frutas, vinhos, extração de óleo vegetal, dentre outros processos. No caso de sucos, por exemplo, sua turbidez, consistência e aparência são resultantes da presença de substâncias pécnicas que levam a um aumento da viscosidade e dificuldades em processos industriais de filtração e concentração. A utilização de enzimas pode auxiliar nas características sensoriais do produto,

umentando estabilidade no armazenamento e proporcionando melhora na qualidade e redução nos custos (RAMADAN & MOERSEL, 2007; KHAIRNAR et al., 2009; PEDROLI & CARMONA, 2010; BARMAN et al., 2015).

1.6.1 Pectinases

As pectinases, também chamadas de enzimas pécticas, são enzimas que degradam a pectina em moléculas menores de ácido galacturônico. A pectina é um polissacarídeo que compõe a parede celular de vegetais, constituindo de uma fina camada extracelular adesiva responsável pela integridade estrutural das plantas. A ação das pectinases desempenha papel importante no amadurecimento de frutos e também na patogênese de plantas, sendo produzidas por microrganismos para facilitar o ataque e colonização do tecido vegetal. Mas também possuem grande importância do ponto de vista industrial (PEDROLI et al., 2008; OKONJI et al, 2019).

Inicialmente as pectinases eram conhecidas apenas como decompositoras de parede celular vegetal e mais tarde passaram a ser utilizadas em nível doméstico. Atualmente essas enzimas têm recebido atenção mundial como biocatalisador biológico e são responsáveis por cerca de 25% do mercado global de enzimas de alimentos e bebidas. Com um crescimento anual de 2,86% na sua produção, o rendimento de 27,6 milhões de dólares em 2013 subiu para 30 milhões em 2016, com previsão de 35,5 milhões de dólares em 2021 (Global Pectinase Market Research Report, 2017; AMIN et al, 2019).

As enzimas pectinolíticas são divididas de acordo com suas ações na degradação da pectina. As esterases agem liberando metanol, as liases agem na reação de β -eliminação e as hidrolases agem na quebra das ligações α -1,4 glicosídicas do ácido poligalacturônico, como é o caso das poligalacturonases (STOCK, 2013; HUANG et al, 2019).

As poligalacturonases (PGs) são utilizadas em ampla escala industrial, principalmente no processamento de alimentos, especialmente na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas. Essas enzimas realizam a quebra da pectina de maneira hidrolítica, ou seja, degrada a cadeia de pectina pela introdução de uma molécula de água através de pontes de hidrogênio (PEDROLI, 2010).

Sendo as mais estudadas dentre as enzimas pectinolíticas, elas podem ser divididas em exopoligalacturonases, que removem as unidades D-galacturônicas das extremidades não redutoras da molécula de pectina, e em endopoligalacturonases, que agem aleatoriamente em

ligações internas α -1,4-D-galactosidurônicas (KASHYAP et al., 2001; KIRK et al., 2002; JAYANI et al., 2005).

Em termos industriais, as pectinases são utilizadas no processamento de frutos e vegetais, desempenhando importante papel na produção de sucos de frutas, tratamento enzimático de frutos, melhoria de rendimento e cor do suco de uva para produção de vinhos, melhoria no rendimento da extração de óleos e gorduras de tecidos vegetais, dentre outras (SITTIDILOKRATNA et al, 2007). No caso de sucos de frutas, por exemplo, a maceração enzimática pode resultar em aumento de até 90% no rendimento quando comparada com maceração mecânica, além de conferir melhora nas propriedades sensoriais (cor e sabor), nutricionais (vitaminas) e tecnológicas (facilidade na filtragem) (PEDROLI et al., 2008).

A hidrólise da pectina resulta principalmente em ácido D-galacturônico, que pode ser utilizado também na produção de ácido múcico e ácido L-galactônico. Apesar de seu alto custo, o ácido L-galactônico apresenta propriedades semelhantes ao D-glucônico, utilizado como aditivo em cosméticos, acidulante em alimentos e agente quelante em produtos de limpeza, o que torna importante a busca por fontes novas e de menor custo para obtenção dessas moléculas (STOCK, 2013).

A maior parte das pectinases é produzida a partir do metabolismo microbiano de fungos, bactérias e leveduras e essas enzimas estão naturalmente relacionadas aos processos fitopatológicos, à simbiose planta-microrganismo e à decomposição de material vegetal morto, considerado o substrato mais rico em microrganismos produtores de pectinases (PEDROLI & CARMONA, 2010).

Os fungos filamentosos possuem grande capacidade de produção e excreção de diversas enzimas o que faz com que esse grupo de microrganismos seja amplamente utilizado na indústria (PEDROLI et al., 2008). O gênero *Aspergillus* possui cepas geralmente consideradas como seguras (GRAS) e é um dos mais utilizados para produção dessas enzimas, podendo ter seus metabólitos utilizados diretamente em alimentos, bebidas, papéis, produtos farmacêuticos, etc (HUANG et al., 2019). Porém, é importante a pesquisa de outros gêneros de fungos que possam apresentar melhor produção e maior rentabilidade no processo.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTUSO, A. Bioprospecting, benefit sharing, and biotechnological capacity building. **World Development**, v. 30, n. 8, p. 1355-1368, 2002.

ATALAY, A. et al. Pulmonary infection caused by *Talaromyces purpurogenus* in a patient with multiple myeloma. **Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive**, Salerno, v. 24, n. 2, p. 153–157, 2016.

BAINIER, G. Mycothèque de l'école de Pharmacie XL *Paecilomyces*, genre nouveau de Mucédinées. **Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France**, v. 23, p. 26-27, 1907.

BARMAN, S. et al. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. **J. Food Sci. Technol.**, v. 52, n. 6, p. 3579–3589, 2015.

BASSO, T. P., GALLO, C. R. & BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1282-1289, 2010.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Cienc. Cult.** [online], v. 68, n.1 [cited 2016-05-06], p. 04-05, 2016. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252016000100002&lng=en&nrm=iso. Acesso em 25/04/2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Decreto Legislativo n. 2 de 5 de junho de 1992 - Convenção Sobre Diversidade Biológica**. Brasília, DF, 1992. 19 p.

BROWN, A. H., SMITH, G. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 40, p.17-89, 1957.

CARVALHO, P. S. L. et al. Minério de ferro. **BNDES Setorial**, v. 39, p. 197-234, 2014.

CHEN, A. J. et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Cervini*. **Studies in Mycology, Utrecht**, v. 85, p. 65–89, 2017.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Curr. Opin. Biol.**, v. 14, p. 438-443, 2003.

COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 71-94.

CONSTANTINO, et al. Monitoramento Participativo da Biodiversidade e dos recursos Naturais: **Seminário Internacional e Formação da Rede Internacional de Monitoramento e Manejo Participativo. Biodiversidade Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 18-33, 2016.

CORTE, R. D. Espécies endêmicas nos biomas brasileiros. **Biogeografia-UFSM**, 2010. Disponível em: http://biogeografia-ufsm.blogspot.com.br/2010/06/especies-endemicas-nos-biomas_3710.html. Acesso em: 18/07/2018.

DE GOES, K. C. G. P. et al. *Talaromyces sayulitensis*, *Acidiella bohemica* and *Penicillium citrinum* in Brazilian oil shale by-products. Antonie van Leeuwenhoek, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 110, n. 12, p. 1637–1646, 2017.

DENG, X. et al. Bioleaching of heavy metals from a contaminated soil using indigenous *Penicillium chrysogenum* strain F1. **Journal of Hazardous Materials**, 233 – 234, p. 25– 32, 2012.

DIERCKX, R. P. Un essai de révision du genre *Penicillium*. **Annales de la Société scientifique de Bruxelles**, Bruxelles, v. 25, p. 83–89, 1901.

ELLEUCHE, S. et al. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. **Current Opinion In Microbiology**, v. 25, p. 113-119, 2015.

FAIA, A. M. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água**. 2011. 52p. Dissertação (mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências – Universidade de Lisboa, 2011.

FARIA, L. S. **Determinação da radioatividade natural de águas subterrânea e superficial de Brumadinho e Nova Lima, Brasil**. 2013. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2013.

FRISVAD, J. C. et al. *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. 1–15, 2013.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 69-72, 2007.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-270, 2004.

Global Pectinase Market Research Report 2017. Disponível em: <https://www.marketresearchstore.com/report/global-pectinase-market-research-report-2017-190713>. Acesso em: 12/07/2019.

GOPINATH, S. C. B. et al. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **Bio Med Res. Int.**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

GUIMARÃES, L. H. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 37, n. 4, p.474-480, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 235-251.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Glycerol Medium for Enumeration of Xerophilic Fungi from Low-Moisture Foods. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 488-492, 1980.

HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; RICO-MUNOZ, E.; JOHNSON, S.; SAMSON, R. A. Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssochlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*). **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, n. 5, p. 1613-1619, 2008.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 117-133, 2010.

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

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R.P.; SAMSON, R.A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Adv Appl Microbiol.**, v. 86, p. 199-249, 2014.

HUANG, D.; SONG, Y.; LIU, Y.; QIN, Y. A new strain of *Aspergillus tubingensis* for high-activity pectinase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 01, p. 53-65, 2019.

ICPA – International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus*. Introduction. Disponível em: <http://www.aspergilluspenicillium.org/>. Acesso em: 25/04/2016.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KIRK, O.; BORCHERT, V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.

KHAIRNAR, Y. et al. Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 2, p. 13-17, 2009.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centralbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

LINK, H. F. Observaciones in ordines plantarum naturales. **Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde**, v. 3, n. 1, 1809.

LOPES, E. M. **Identificação e caracterização de metagenomas e isolados bacterianos visando a biorremediação de solos de áreas de mineração**. 2015. 115 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

MAGALHÃES, V. G. Convenção sobre a diversidade biológica (cdb): a necessidade da revisão do seu texto substituindo o termo “recursos genéticos” por “recursos biológicos” nos arts 1, 9, 15, 16 e 19. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 1, n. 1, p. 16-32, 2006.

MCNEILL, J. et al. **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)**. Koeltz Scientific Books, Königstein. Regnum vegetabile no. 154, 2012.

MOHSIN, J. et al. Imported Talaromycosis in Oman in Advanced HIV: A Diagnostic Challenge Outside the Endemic Areas. **Mycopathologia**, v. 182, n. 7–8, p. 739–745, 2017.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2º Ed. Editora UFLA, Lavras, 2006, 729p.

MRUDULA. S., ANITHARAJ, R. Pectinase production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. **Glob. J. Biotechnol. Biochem.**, v. 6, p. 64–71, 2011.

MUSSATAO, S. I.; FERNNDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa Ferramenta na Indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

MÜLLER, C. A.; OBERMEIER, M. M.; BERG, G. Bioprospecting plant-associated microbiomes. **Journal of Biotechnology**, v. 235, p. 171-180, 2016.

NGUYEN, T. T. T.; PAUL, N. C.; LEE, H. B. Characterization of *Paecilomyces variotii* and *Talaromyces amestolkiae* in Korea Based on the Morphological Characteristics and Multigene Phylogenetic Analyses. **Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 248-259, 2016.

NOINART, J. et al. A new ergosterol analog, a new bis-anthraquinone and anti-obesity activity of anthraquinones from the marine sponge-associated fungus *Talaromyces stipitatus* KUFA 0207. **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, 2017.

OKONJI, R. E., ITAKORODE, B. O.; OVUMEDIA, J. O.; ADEDEJI, O. S. Purification and biochemical characterization of pectinase produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from soil of decomposing plant materials. **Jour. App. Bio. & Biotechnology**, v. 7, n. 03, p. 1-8, 2019.

OLIVEIRA, L. G. et al. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 96, p. 49-54, 2013.

PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010. 129 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PASTOR, F. J.; GUARRO, J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, p. 948-60, 2006.

PAUL, E. A. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 4. ed. ed. London: Elsevier Academic Press, 2015.

PEDROLI, D. B. et al. Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 144, p. 191-200, 2008.

PEDROLI, D. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, p. 567-573, 2010.

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. **Diversity of microfungi in tropical soils. In: Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems.** MOREIRA, F. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. (Ed.). Wallingford: CABI, p. 184-205, 2006.

PITT, J. I. **The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.** London: Academic Press, 1979.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species.** Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, 2000. 197 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage.** 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage.** 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2009.

RAMADAN, M. F.; MOERSEL, J. T. Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice. **J. Sci. Food Agric.**, v. 87, p. 452–460, 2007.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus*.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 686 p.

REN, J. et al. Bioactive Azaphilone Derivatives from the Fungus *Talaromyces aculeatus*. **Journal of Natural Products**, New York, v. 80, n. 8, p. 2199–2203, 2017.

ROBL, D. et al. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 94, 2013.

RODRIGUES, P et al. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 187-193, 2009.

RUCHKYS, U. A. **Patrimônio geológico e geoconservação no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: potencial para a criação de um geoparque da UNESCO.** 2007. 211p. Tese (Doutorado em Geociências) – Instituto de Geociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

RUCHKYS, U. A. et al. **Quadrilátero Ferrífero, MG: da lenda do Sabarabuçu ao patrimônio histórico, geológico, paisagístico e religioso,** In: SCHOBENHAUS, Carlos; CAMPOS, Diógenes de Almeida; QUEIROZ, Emanuel Teixeira de; WINGE, Manfredo; BERBERT-BORN, Mylène (Ed.). **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil.** Brasília:

DNPM; CPRM; Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos - SIGEP, 2009. v. 2, p. 203-212.

SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes*. **Studies in Mycology**, v. 6, p. 1-119, 1974.

SAMSON, R. A. et al. **Food and Indoor Fungi**. Utrecht (The Netherlands): CBS, 2010.

SAMSON, R. A., et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, n. 1, p. 159–83, 2011.

SAMSON, R.A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**. v. 78, p. 141–173, 2014.

SANTIAGO, D. C. et al. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1055-1064, 2006.

SANTOS, R. C. M. **Mata Atlântica: características, biodiversidade e a história de um dos biomas de maior prioridade para conservação e preservação de seus ecossistemas**. 2010. (TCC em Ciências Biológicas). Centro Universitário Metodista, Belo Horizonte, 2010. 31p.

SHARMA, A. K.; SHARMA, V.; SAXENA, J. Isolation and screening of extracellular lipase producing fungi from soil. **Am. J. Pharma. Health Res.**, v. 4, p. 38-50, 2016.

SHARMA, A. K.; KUMARI, S.; SHARMA, V. Effect of nitrous acid treatment on lipase production by local soil fungal isolate. **Plantica**, v. 1, n. 2, p. 61-69, 2017a.

SHARMA, A. K., SRIVASTAVA, V.; SHARMA, V. A review on screening of extracellular hydrolytic enzyme producing microorganisms. **Plantica**, v. 1, n. 2, p. 37-48, 2017b.

SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Ed. SENAC. 215 p. 2002.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 66, p. 486-520, 2012.

SPROCATI, A. R. et al. Bioprospecting at former mining sites across Europe: microbial and functional diversity in soils. **Environmental Science Pollution Research**, v. 21, p. 6824–6835, 2014.

SITTIDILOKRATNA, C. et al. Screening of pectinase producing bacteria and their efficiency in biopulping of paper mulberry bark. **Sci Asia**, v. 33, p. 1513–1874, 2007.

STOCK, D. **Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido**. 2013. 113 P. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná.

- STOLK, A. C.; SAMSON, R. A. The genus *Talaromyces*: studies on *Talaromyces* and related genera II. 2. ed. ed. Baarn: **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, 1972.
- SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. **Fungal Diversity**, v. 54, p. 19-30, 2012.
- TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1., n. 1, jul. 2005.
- THOM, C. et al. **The penicillia**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1930.
- TSANG, C.-C. et al. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 197-210, 2108.
- USTIANOWSKI, A. P.; SIEU, T. P.; DAY, J. N. *Penicillium marneffeii* infection in HIV. **Current Opinion In Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 31–36, 2008.
- VALLI, M.; YOUNG, M. C.; BOLZANI, V. S. A Beleza Invisível da Biodiversidade: O Táxon Rubiaceae. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, 2016.
- VARGA, J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 627-640, 2004.
- VILLANUEVA-LOZANO, H. et al. Successful treatment of *Talaromyces amestolkiae* pulmonary infection with voriconazole in an acute lymphoblastic leukemia patient. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 23, n. 6, p. 400–402, 2017.
- VISAGIE, C.M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. v. 78, p. 343–371, 2014.
- XING-HUA, L. et al. The most stirring technology in future: cellulase enzyme and biomass utilization. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 8, p. 2418-2422, 2009.
- ZHANG, J. et al. Coinfection of disseminated *Talaromyces marneffeii* and *Mycobacteria kansasii* in a patient with papillary thyroid cancer. **Medicine**, v. 96, n. 52, p. 7–9, 2017.
- ZHOU, K.; ZHAO, X. L.; HAN, L. P.; CAO, M. M.; CHEN, C.; SHI, B. Z.; LUO, D. Q. Paecilomycines A and B, novel diterpenoids, isolated from insect-pathogenic fungi *Paecilomyces* sp. ACCC 37762. **Helv Chim Acta**, v. 98, p. 642-9, 2015.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE DE FUNGOS DOS GÊNEROS *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* E *Paecilomyces* ISOLADOS DE SOLO DE MATA ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO

RESUMO: O Brasil é um país rico em biodiversidade com inúmeras espécies de plantas, animais e microrganismos, porém o conhecimento sobre os microrganismos ainda é pouco explorado no país. Isso torna importante a realização do levantamento dessa diversidade, através da sua descrição e armazenamento, para que esses recursos biológicos sejam melhor disponibilizados e utilizados em processos biotecnológicos, por exemplo como fonte de produtos de interesse para as indústrias farmacêuticas, agrárias e alimentícias. Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar um levantamento da diversidade de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* em solo sob vegetação de Mata Atlântica da região do Quadrilátero Ferrífero. Foram obtidos 2035 isolados, sendo 37 do gênero *Aspergillus*, 34 do gênero *Paecilomyces*, 6 do gênero *Talaromyces* e 1958 isolados do gênero *Penicillium*. Com a caracterização morfológica foi possível identificar 34 isolados de *Aspergillus*, 50 de *Penicillium* e 6 de *Talaromyces*, agrupados em 3, 11 e 3 espécies, respectivamente. Os demais isolados foram agrupados em 123 morfotipos diferentes por suas semelhanças morfológicas, produção de toxinas e perfil de proteínas, caracterizados e armazenados para posterior análise genética. Os resultados mostraram uma elevada diversidade de espécies no solo avaliado, tendo a possibilidade de haver espécies novas ainda não descritas que podem apresentar um potencial biotecnológico ainda não explorado, podendo ser mais bem estudado e utilizado em diversos processos de produção.

Palavras-chave: biodiversidade; fungos filamentosos; caracterização morfológica

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de destaque mundial quando se fala em biodiversidade. Como detentor de uma das maiores biodiversidades do mundo, abriga milhões de espécies de plantas, animais e microrganismos distribuídos em biomas distintos (Amazônia, Pantanal, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado e Pampa), o que pode levar a presença de uma grande diversidade de moléculas biológicas e a probabilidade da descoberta de novas moléculas com valor comercial (MAGALHÃES, 2006; VALLI & BOLZANI, 2016). Porém, pouco ainda se conhece a respeito desse potencial biológico e sua possível utilização na biotecnologia (BOLZANI, 2016), o que aumenta a importância da pesquisa na descoberta de novos processos e produtos microbianos, além da manutenção e caracterização desses microrganismos, afim de que a diversidade microbiana seja utilizada corretamente.

O Quadrilátero Ferrífero é uma das principais regiões de produção de minério de ferro do Brasil e possui uma área de cerca de 7.000 km² localizada na porção centro-sudeste do estado de Minas Gerais. As suas características de hidrologia, pedologia, topografia e geologia são bastante diversas e resultam em uma rica biodiversidade, com presença de biomas distintos, destacando Cerrado e Mata Atlântica (RUCHKYS, 2009).

A Mata Atlântica é conhecida por abrigar uma grande diversidade biológica e isso se deve a presença de condições adequadas para evolução de organismos de natureza animal,

vegetal e microbiológica. Essa ampla biodiversidade faz da Mata Atlântica um dos biomas mais ricos do mundo, possuindo vários microrganismos decompositores no seu solo, como fungos e bactérias (SIMÕES & LINO, 2002; TABARELLI et al., 2005 RODRIGUES et al., 2009; SANTOS, 2010).

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* estão entre os principais gêneros presentes no solo e são apontados por possuírem grande potencial para utilização em processos biotecnológicos. Esses gêneros se destacam como potenciais produtores de enzimas como amilases, pectinases, celulases, lipases, dentre outras, que podem ser utilizadas em vários segmentos como indústria alimentícia, farmacêutica, agroindústria e produção de biodiesel (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; ICPA, 2016; TSANG et al., 2018).

O levantamento da diversidade de microrganismos em uma região ainda pouco estudada com características que resultam em diferentes biomas pode levar a descoberta de espécies ainda não descritas, importantes do ponto de vista ambiental e econômico, promissoras para serem utilizadas em processos biotecnológicos, como, por exemplo, na produção de enzimas.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar um levantamento da diversidade de espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* em solo sob vegetação de Mata Atlântica da região do Quadrilátero Ferrífero.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

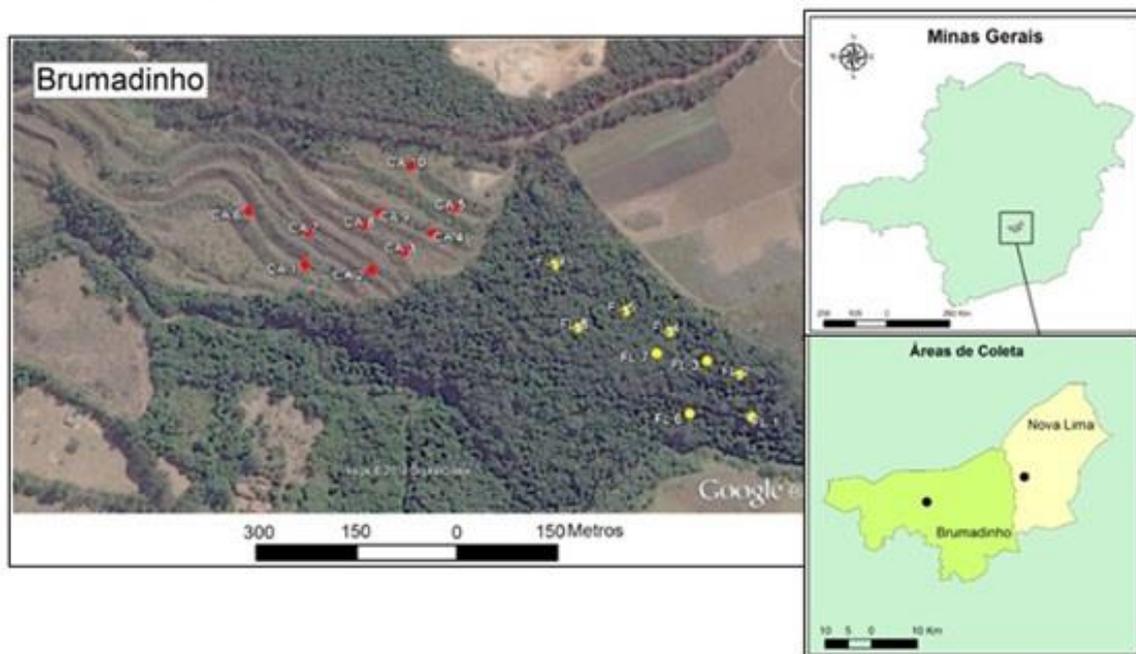
O estudo foi realizado na Mina do Córrego do Feijão, uma área pertencente a empresa Vale S.A. localizada na cidade de Brumadinho, região metropolitana de Belo Horizonte-MG, pertencente à região do Quadrilátero Ferrífero (Figura 2.1). A vegetação do local de estudo foi identificada como Mata Atlântica e não sofreu nenhum impacto do processo de mineração (CASTRO et al, 2017).

2.2 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas entre os dias 10 a 15 de agosto de 2015. Foram coletadas 9 amostras compostas de solo, em uma profundidade de zero a vinte centímetros, em dois transectos, com auxílio de um trado estéril. Cada amostra foi composta de cinco amostras simples com distância de 5 metros entre si, sendo o ponto central previamente

georreferenciado (Apêndice A). A distância entre os pontos centrais de cada amostra composta foi de 50 a 70 metros dentro do mesmo transecto e entre os dois transectos. As amostras foram homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos, colocadas em isopor, transportadas e armazenadas a 4°C no Departamento de Ciência do Solo da UFLA até o início das análises.

Figura 2 - Área onde foram realizadas as coletas de amostras de solo.



Pontos amarelos correspondem aos pontos de amostragem. Fonte: CASTRO et al, 2017 (adaptado)

2.3 Isolamento, contagem e identificação dos fungos

Para o isolamento dos fungos presentes nas amostras foram pesados 10,0 g do solo, adicionados a 90,0 mL de solução salina (0,85%) esterilizada e a mistura foi colocada em shaker a 120 rpm por 30 minutos para homogeneização. Foi realizada a técnica de diluição seriada de 10^{-1} até 10^{-4} e uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi depositada em placas de Petri, em triplicata, contendo meios de cultivo DG18 (1,0 mL de Dicloran; 5,0 de Peptona Bacteriológica; 1,0 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 220 g de Glicerol; 15,0 g de Ágar; 1 mg de cloranfenicol; 1000 mL de Água destilada) e DRBC (10,0 g de Glicose; 5,0 de Peptona Bacteriológica; 1,0 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mL de solução 5% de Rosa Bengala; 1,0 mL de Dicloran; 15,0 g de Ágar; 1 mg de cloranfenicol; 1000 mL de Água Destilada). As placas de DG18 foram incubadas a 25°C por 7 dias e as placas de DRBC foram incubadas a 25° C por 4 a 5 dias.

Para estimar a população total de fungos filamentosos por grama de amostra de solo, as colônias foram contadas e foi calculada a média das três placas da diluição que apresentou entre 15 e 150 colônias, sendo o resultado apresentado em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g).

As colônias com morfologia similar a de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* foram repicadas em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Malte 2% (20,0 g de Extrato de Malte; 15,0 g de Ágar e 1000 mL de Água Destilada) e incubadas a 25°C para purificação. Após sete dias as colônias foram inoculadas em meios de cultivo e temperaturas padronizadas e avaliadas de acordo com manuais de identificação.

2.3.1 Caracterização e identificação morfológica das espécies

Os isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* foram repicados em placas de Petri contendo meios de cultura CYA (1,0 g de K₂HPO₄; 10,0 mL de Concentrado de Czapek; 1 mL de Solução Metálica; 5,0 g de Extrato de Levedura; 15,0 g de Ágar; 30,0 g de Sacarose e 1000 mL Água Destilada) a 25°C e 37°C e MEA (20,0 g de Extrato de Malte; 1,0 g de Peptona Bacteriológica; 20,0 g de Glicose; 15,0 g de Ágar e 1000 mL de Água Destilada) a 25°C, por sete dias.

A caracterização e identificação morfológica dos isolados foram realizadas de acordo com as características macroscópicas (cor da colônia, cor do micélio, presença e ausência de exsudato, cor do reverso, diâmetro da colônia, presença ou ausência de pigmentação solúvel e cleistotécio/escleródios) e microscópicas (comprimento e largura dos conidióforos e diâmetro da vesícula para *Aspergillus*; ramificação, comprimento, largura e textura de conidióforos para *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces*; diâmetro, forma e textura dos conídios, forma e cor do cleistotécio/escleródios), de acordo com Klich (2002) para *Aspergillus*; Pitt (2000) e Pitt e Hocking (1997) para *Penicillium* e *Talaromyces*; e Samson et al. (2010) para os isolados de *Paecilomyces*.

Para auxiliar na caracterização e identificação dos isolados foi realizada avaliação de produção de toxinas (aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina), quando necessário, através do teste de Cromatografia de Camada Delgada.

2.3.2 Agrupamento de isolados pela técnica de MALDI-TOF MS

Para auxiliar no agrupamento de isolados com características morfológicas muito semelhantes, foi realizada a avaliação do perfil proteico utilizando espectrometria de massa por MALDI-TOF.

Os isolados foram repicados em meio Agar Malte 2%, incubados a 25° C e após 3 dias foram avaliados, sendo transferida uma pequena porção de esporos e micélio do fungo, com auxílio de palito estéril, por contato direto na placa de cultura para a placa de aço inoxidável de MALDI-TOF MS. Foi utilizado como matriz uma solução de etanol (33,33 ml), acetonitrila (33,33 ml), TFA 10% (33,33 ml) e ácido α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic– HCCA (0,01 g), sendo adicionado 1,0 μ l sobre cada isolado. As amostras na placa foram secas ao ar livre e as análises foram realizadas em triplicata, sendo a *E. coli* K12 utilizada como padrão para calibração externa do equipamento (VILLANI et al, 2016).

As análises foram realizadas em um equipamento ultrafleXtreme MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Após obtenção dos picos, estes foram exportados e analisados no programa FLEX ANALYSES para seleção dos melhores resultados. Com os dados obtidos foi gerado um dendograma, utilizando o software MALDI BIOTYPER 3, para agrupamento entre os isolados de acordo com seu perfil proteico, sendo utilizado o nível de distância e as características morfológicas para determinar os isolados iguais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estimativa da população total de fungos filamentosos nas amostras

A partir das placas selecionadas de DRBC e DG18, as colônias semelhantes a fungos filamentosos foram quantificadas e foi estimada a população total de fungos filamentosos nas amostras (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Colônias obtidas a partir do plaqueamento em superfície em meios DG18 (A) e DRBC (B) da diluição (10^{-2}) do solo de uma das amostras analisadas.



Fonte: Do autor (2017)

A estimativa da população total de fungos filamentosos nas amostras analisadas está apresentada na tabela 3.1, sendo que o meio DRBC apresentou em média maior população de fungos totais.

Tabela 3.1 – Estimativa da população total de fungos filamentosos em amostras de solo de região de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero em dois meios de cultivo.

Amostra	DRBC (UFC/g)	DG18 (UFC/g)
F1	2,46.10 ⁵	0,24.10 ⁵
F2	3,76.10 ⁵	0,51.10 ⁵
F3	2,8.10 ⁵	2,8.10 ⁵
F4	6,8.10 ⁵	1,04.10 ⁶
F5	1,23.10 ⁶	8,0.10 ⁵
F6	7,4.10 ⁵	0,60.10 ⁵
F7	1,4.10 ⁶	1,10.10 ⁶
F8	1,53.10 ⁶	1,17.10 ⁶
F9	1,46.10 ⁶	0,9.10 ⁵
Médias	8,94.10⁵	5,79.10⁵

O tipo de meio de cultura utilizado influencia diretamente no crescimento dos microrganismos, sendo indicado o uso de meios específicos para obtenção de espécies de interesse. O meio DRBC contém em sua composição o rosa bengala e o fungicida Dicloran que atuam como inibidores de fungos que possuem crescimento rápido, favorecendo o desenvolvimento de colônias de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, e propiciando o crescimento de uma maior diversidade de fungos desses gêneros. O meio DG18 se caracteriza por possuir menor atividade de água devido a presença de glicerol, o que o torna um meio seletivo, favorecendo o crescimento de fungos xerofílicos (DOUGLAS-KING et al, 1979; HOCKING & PITT, 1980; HENSON, 1981; SAMSON et al, 2010; SHREYA et al., 2018).

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* se caracterizam por tolerar baixos teores de atividade de água, porém o gênero *Aspergillus* é mais sensível a essa condição (LEITE JUNIOR, 2012), o que pode explicar o isolamento da maioria dos isolados dessa espécie a partir do meio DRBC.

3.2 Quantificação de isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces*

O objetivo inicial do trabalho era isolamento e identificação de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Porém, durante a caracterização morfológica, foram encontrados isolados pertencentes ao gênero *Paecilomyces*, que possui características muito semelhantes ao gênero *Penicillium*. Assim, eles também foram incluídos nos resultados.

Além disso, as espécies de *Penicillium* anteriormente descritas e classificadas no subgênero *Biverticillium* foram reclassificadas e passaram a pertencer ao gênero *Talaromyces* (SAMSON et al., 2011; YILMAZ et al., 2014; TSANG et al., 2018), motivo pelo qual esse gênero também entrou no levantamento realizado.

Das 9 amostras analisadas, foi obtido um total de 2035 isolados, sendo 37 do gênero *Aspergillus*, 34 do gênero *Paecilomyces*, 6 do gênero *Talaromyces* e a maioria, 1958 isolados, do gênero *Penicillium*.

Espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* são encontrados em uma grande variedade de ambientes. Isso se deve, principalmente, ao fato de que esses microrganismos crescem rapidamente e produzem grande quantidade de conídios, que são facilmente dispersos no ambiente. Apesar disso, a vegetação, a exploração e as condições ambientais são fatores que influenciam a composição da comunidade microbiana do solo, sendo que a vegetação pode ser considerada um fator que está diretamente ligado ao microbioma encontrado (FRAGA & PEREIRA, 2012; VIEIRA et al., 2018; TSANG et al., 2018).

O gênero *Penicillium* geralmente se encontra em maior abundância na maioria dos ambientes analisados. Estudos apontam este gênero como um dos maiores representantes da biodiversidade de solos, principalmente em ambientes de florestas. De acordo com Christensen et al. (2000), o gênero *Penicillium* pode representar em média 35% das espécies prevalentes em qualquer comunidade de fungo em solo sob vegetação nativa. Fraga e Pereira (2012), analisando solo de serapilheira e floresta atlântica, encontraram 16 espécies de *Penicillium* de um total de 22 espécies isoladas. Puangsombat et al. (2010), ao analisarem solos de áreas com 5 tipos diferentes de uso na Tailândia, encontraram 27 espécies de *Penicillium* e 9 de *Aspergillus*. Oliveira et al. (2013) observaram resultados semelhantes analisando solos de região semi árida, nos quais encontraram 71 espécies, sendo 28 de *Penicillium*, 18 de *Aspergillus* e o restante distribuído em outros gêneros. Além disso, citaram

vários outros trabalhos com predominância desses dois gêneros em estudos de diversidade de solo.

Em contrapartida, o gênero *Aspergillus* é mais característico em ambientes agrícolas com cultura de ciclo curto (KLICH, 2002; HORN, 2007). Em levantamento bibliográfico realizado por Borges et al. (2011), comparando solos de cultivo agrícola e cultivo florestal, foi observado que não houve isolamento de *Aspergillus* em solo de cultivo de pinus, sendo encontrado em culturas como algodão, girassol, soja e goiaba. Em seu estudo, avaliando diversidade de solo de monocultivo de erva-mate, também foi encontrada maior porcentagem de *Aspergillus* em relação a *Penicillium*, podendo justificar o grande número de isolados do gênero *Penicillium* no presente trabalho, que avaliou solo de cultivo de floresta.

Com a utilização da caracterização morfológica foi possível a identificação em nível de espécie de 34 isolados de *Aspergillus*, 50 de *Penicillium* e 6 de *Talaromyces*, agrupados em 3, 11 e 3 espécies, respectivamente (Tabela 3.2). As espécies inicialmente identificadas como *P. funiculosum*, *P. purpurogenum* e *P. variabile* passam a serem chamadas de *Talaromyces funiculosus*, *T. purpurogenus* e *T. variabilis*, respectivamente.

Os demais isolados foram armazenados para posterior análise genética e foram agrupados por suas semelhanças morfológicas em diferentes morfotipos.

Tabela 3.2 – Espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Talaromyces* isoladas de solo de região de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero.

Espécie	Total de isolados	Espécie	Total de isolados
Terverticilados			
<i>P. aurantiogriseum</i>	1	<i>P. solitum</i>	1
<i>P. brevicompactum</i>	9		
Biverticilados			
<i>P. corylophilum</i>	1	<i>P. simplicissimum</i>	1
<i>P. janthinellum</i>	8	<i>P. waksmanii</i>	22
Monoverticilados			
<i>P. decumbens</i>	1	<i>P. glabrum</i>	1
<i>P. spinulosum</i>	4	<i>P. sclerotiorum</i>	1
<i>A. flavus</i>	19	<i>A. niger</i>	13
<i>A. parasiticus</i>	2		
<i>T. funiculosus</i>	4	<i>T. variabilis</i>	1
<i>T. purpurogenus</i>	1		

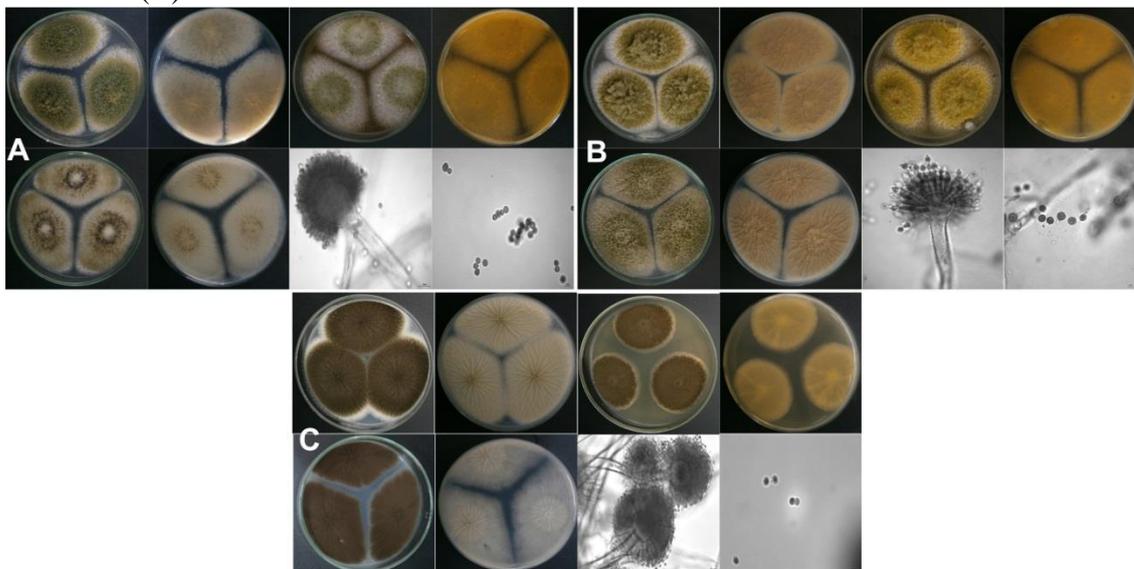
3.3 Isolados do gênero *Aspergillus* identificados em nível de espécie

Do gênero *Aspergillus* foram encontradas espécies pertencentes a 2 seções: *Nigri*, caracterizada por conídios com coloração escura e *Flavi*, caracterizada por conídios com coloração esverdeada.

Da seção *Flavi* foram encontradas duas as espécies. *A. flavus* se caracterizou por apresentar colônias em torno de 70 mm em CYA e MEA a 25 °C e em torno de 60 mm em CYA a 37°C. A coloração das colônias em CYA se apresentou verde oliva médio a 25 °C e marrom esverdeado a 37 °C, e verde claro em MEA, com textura flocosa. Os conidióforos finamente rugosos com vesículas predominantemente bisseriadas e conídios entre 3 a 4 µm com parede finamente rugosa (Figura 3.2-A). *A. parasiticus* apresentou características bem semelhantes a *A. flavus*, porém apresentou coloração mais amarelada em MEA 25 °C e mais esverdeada em CYA 37 °C, conídios com parede rugosa, além de ter diferenciado quanto a produção de toxinas (Figura 3.2-B).

Da seção *Nigri* foi identificada a espécie *Aspergillus niger*, que apresentou coloração de conídios marrom escuro a preto, reverso levemente amarelado em CYA, estruturas bisseriadas e conídios rugosos (Figura 3.2-C).

Figura 3.2 – Macro e micromorfologia de *Aspergillus flavus* (A), *A. parasiticus* (B) e *A. niger* (C).



Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

3.4 Isolados dos gêneros *Penicillium* identificados em nível de espécie

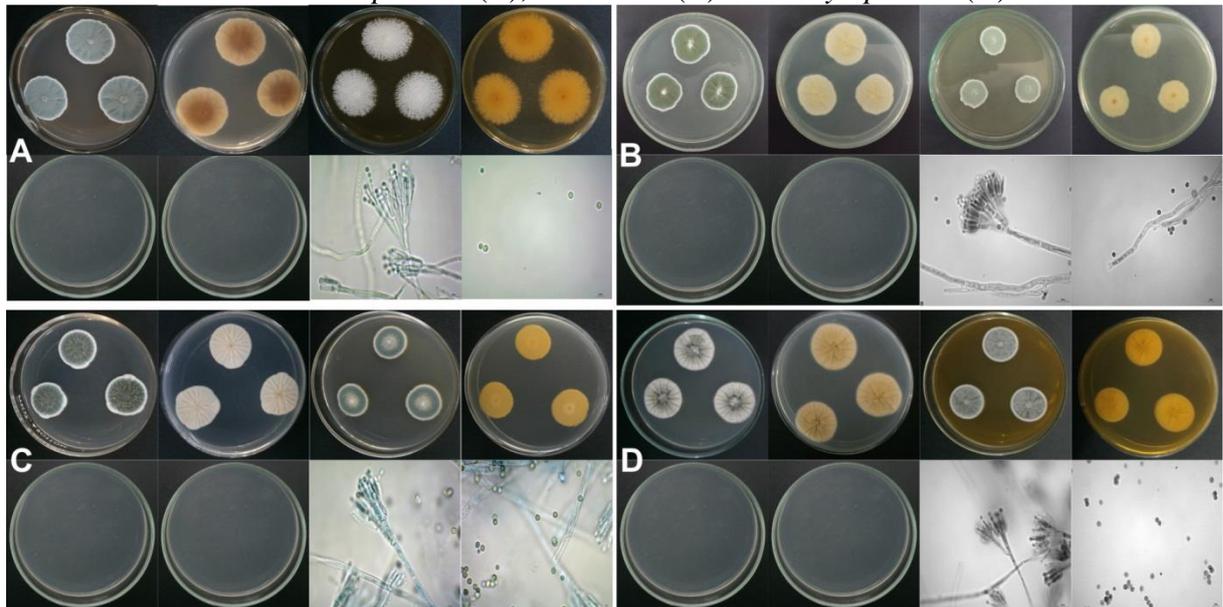
As espécies *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum* e *P. solitum* apresentaram conidióforos com ramificações terverticiladas. *P. aurantiogriseum* apresentou colônias com

coloração cinza azulada em CYA 25 °C com reverso e pigmentação solúvel marrom, colônia com textura granular em MEA 25 °C e reverso marrom, crescimento relativamente pequeno (menor que 37 mm) e com conidióforos lisos (Figura 3.3-A). *P. brevicompactum* é predominantemente terverticilado, mas pode apresentar algumas ramificações bi ou poliverticiladas. Seus *penicilli* se apresentaram compactos, com métulas curtas e infladas no topo e colônias de coloração verde escuro (Figura 3.3-B). *P. solitum* apresentou colônias com coloração cinza escuro a verde escuro e reverso amarelado claro, e conídios relativamente grandes (em torno de 3 a 4 µm) (Figura 3.3-C).

Foram encontradas 4 espécies com ramificação biverticilada. *P. corylophilum* apresentou métulas longas de tamanho desigual e esporulação moderada de coloração cinza escuro (Figura 3.3-D). *P. janthinellum* e *P. simplicissimum* apresentaram crescimento rápido com colônias em torno de 50 mm em MEA e crescimento moderado em CYA 37 °C, geralmente com coloração branca nas colônias em CYA a 25 °C. *P. janthinellum* apresentou formação moderada de conídios de coloração acinzentada em CYA a 25 °C, *penicilli* geralmente biverticilado com algumas estruturas irregulares monoverticiladas (Figura 3.4-A) enquanto *P. simplicissimum* apresentou formação moderada de conídios de coloração amarelo claro e reverso marrom amarelado, além de conidióforos e conídios rugosos (Figura 3.4-B). *P. waksmanii* se caracterizou por apresentar *penicilli* irregular, longos e curtos conidióforos, mono e biverticilados, métulas intercaladas e colônias com coloração acinzentada e reverso marrom amarelado (Figura 3.4-C).

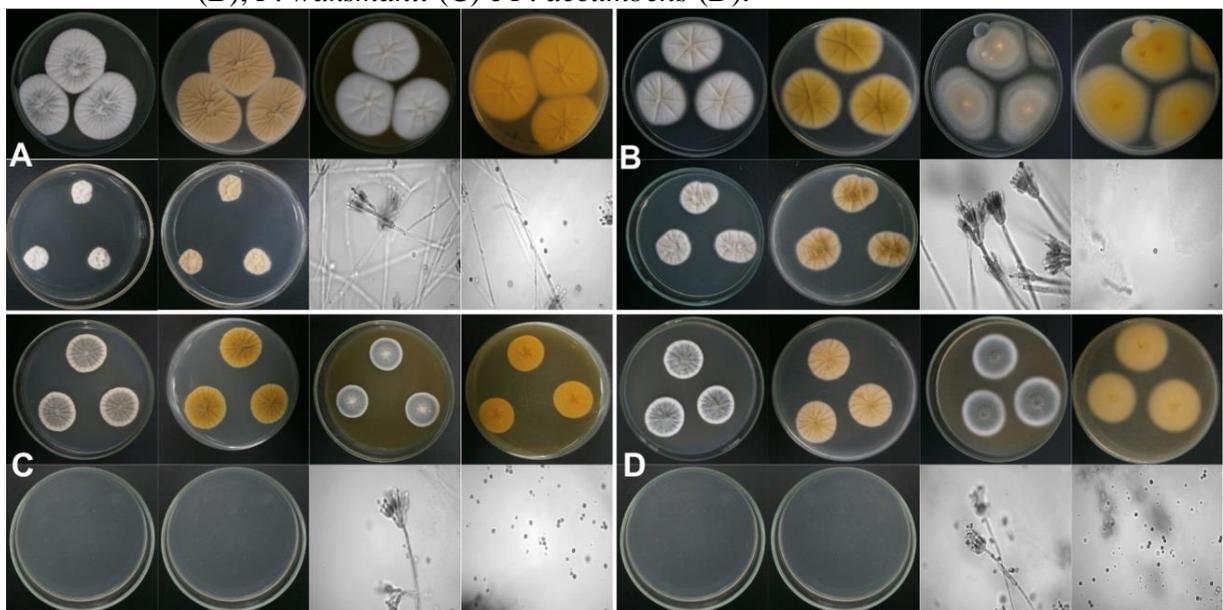
As 4 espécies restantes apresentaram ramificação monoverticilada. *P. decumbens* apresentou colônias em torno de 28 mm em CYA 25 °C, com coloração acinzentada e reverso amarelado. Em MEA a 25 °C apresentou colônias em torno de 35 mm, verde acinzentado, com textura flocosa no centro (Figura 3.4-D). *P. spinulosum* se caracterizou por apresentar crescimento rápido em CYA e MEA a 25 °C (em torno de 40 mm), com colônias com textura flocosa, reverso amarelado em MEA 25 °C e conídios espinhosos (Figura 3.5-A). *P. glabrum* se assemelhou ao *P. spinulosum* quanto ao crescimento rápido e coloração verde escuro das colônias, porém se caracterizou por reverso oliva em MEA 25 °C e conídios lisos a finamente rugosos nascidos em longas cadeias (Figura 3.5-B). *P. sclerotiorum* foi característico por apresentar colônias alaranjadas com reverso laranja avermelhado, conídios nascidos em longas cadeias e presença de escleródios amarelados (Figura 3.5-C).

Figura 3.3 – Macro e micromorfologia de *Penicillium aurantiigriseum* (A), *P. brevicompactum* (B), *P. solitum* (C) e *P. corylophilum* (D).



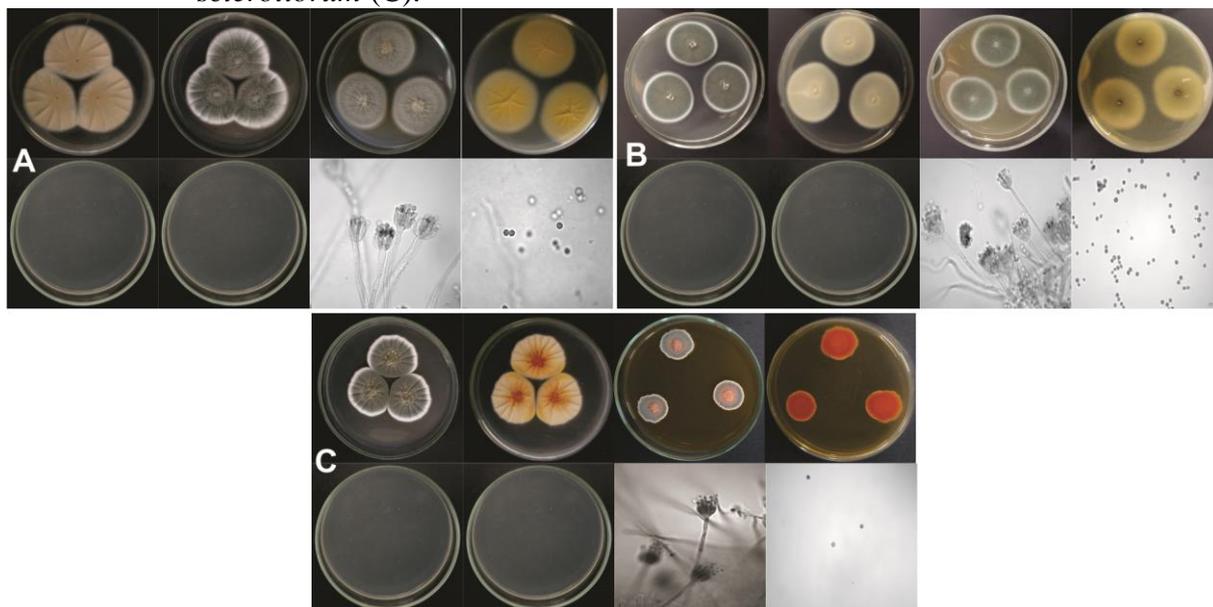
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.4 – Macro e micromorfologia de *Penicillium janthinellum* (A), *P. simplicissimum* (B), *P. waksmanii* (C) e *P. decumbens* (D).



Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.5 – Macro e micromorfologia de *Penicillium spinulosum* (A), *P. glabrum* (B) e *P. sclerotiorum* (C).



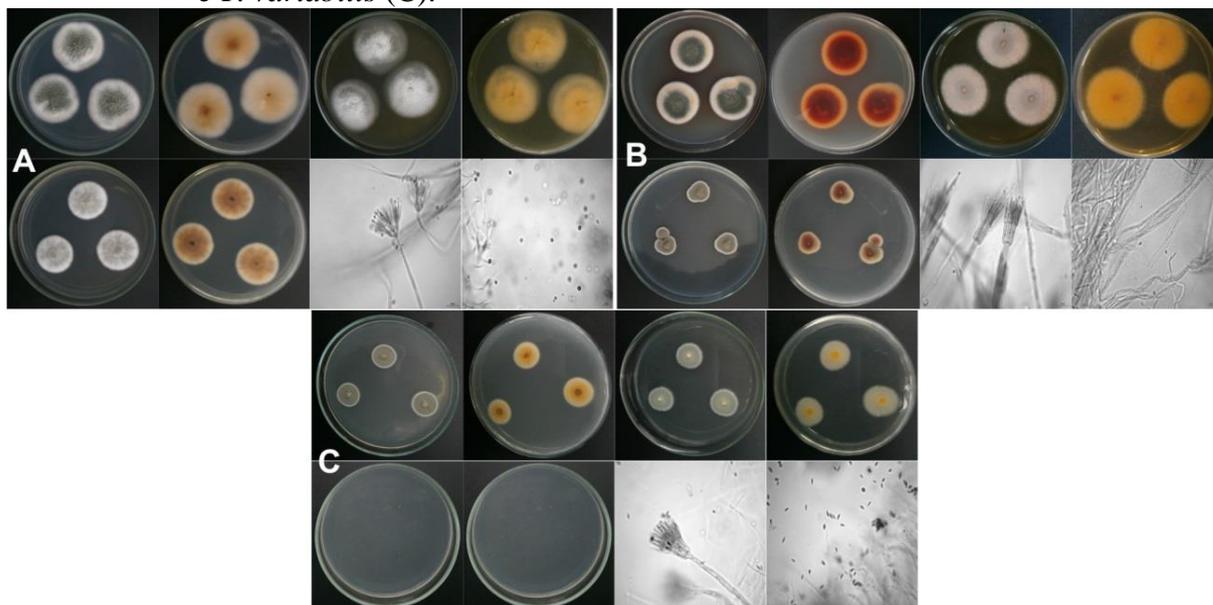
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

3.5 Isolados dos gêneros *Talaromyces* identificados em nível de espécie

Para o gênero *Talaromyces* são avaliadas as mesmas características morfológicas utilizadas para *Penicillium*, uma vez que esses gêneros possuem semelhanças morfológicas e várias espécies de *Talaromyces* foram anteriormente classificadas como *Penicillium* (TSANG et al., 2018).

T. funiculosus apresentou colônias com textura irregular (funiculosa) com coloração verde acinzentada, reverso marrom avermelhado claro, crescimento em CYA 37 °C similar a 25 °C, com relação estreita entre o tamanho de métulas e fiálides (Figura 3.6-A); *T. purpurogenus* apresentou pigmentação solúvel avermelhada em CYA 25 °C, crescimento moderado a 37 °C, micélio avermelhado com conídios verde escuro e *penicilli* estreitos e compridos (Figura 3.6-B). *T. variabilis* apresentou colônias pequenas em CYA e MEA 25 °C (em torno de 20 mm), com conidogênese densa e coloração verde escuro, com fiálides longas e conídios elipsoidais e reverso marrom alaranjado em CYA 25 °C (Figura 3.6-C).

Figura 3.6 – Macro e micromorfologia de *Talaromyces funiculosus* (A), *T. purpurogenus* (B) e *T. variabilis* (C).



Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

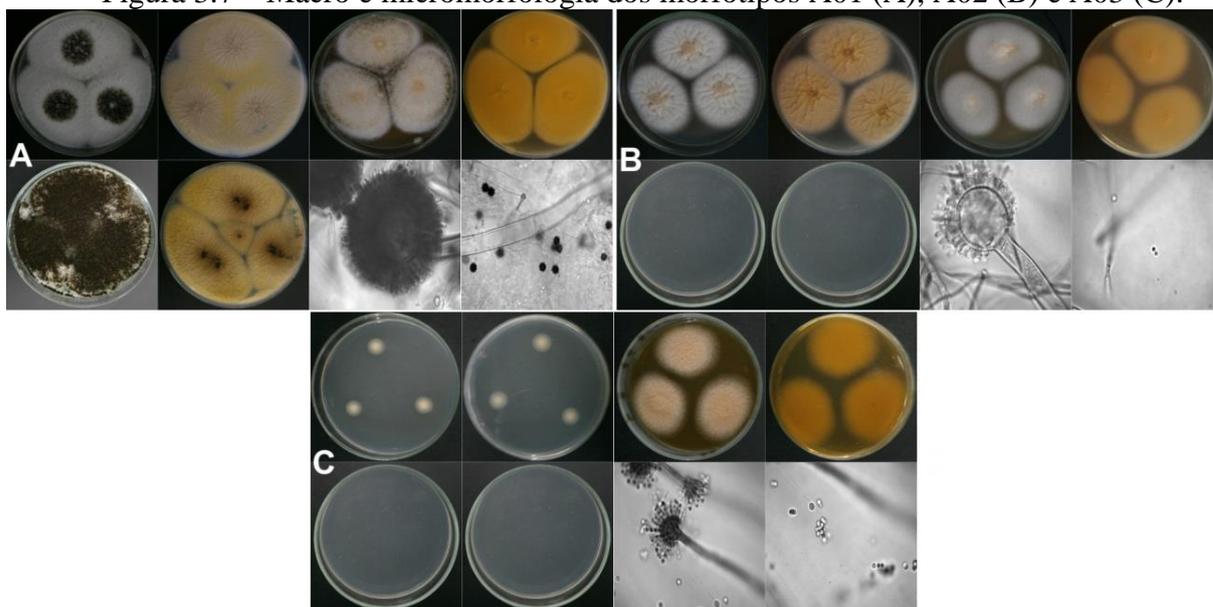
3.6 Isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces* não identificados em nível de espécie

Do total de isolados obtidos, 1945 não puderam ser identificados em nível de espécie, pois suas características morfológicas foram muito distantes das encontradas nas chaves de identificação e artigos pesquisados. Desses, 3 pertencem ao gênero *Aspergillus*, 34 ao gênero *Paecilomyces* e 1908 ao gênero *Penicillium*.

Os isolados não identificados foram agrupados em morfotipos de acordo com suas semelhanças nas características morfológicas (macro e microscópicas), resultando em 3 morfotipos de *Aspergillus* (A), 4 de *Paecilomyces* (Pae) e 123 de *Penicillium* (P).

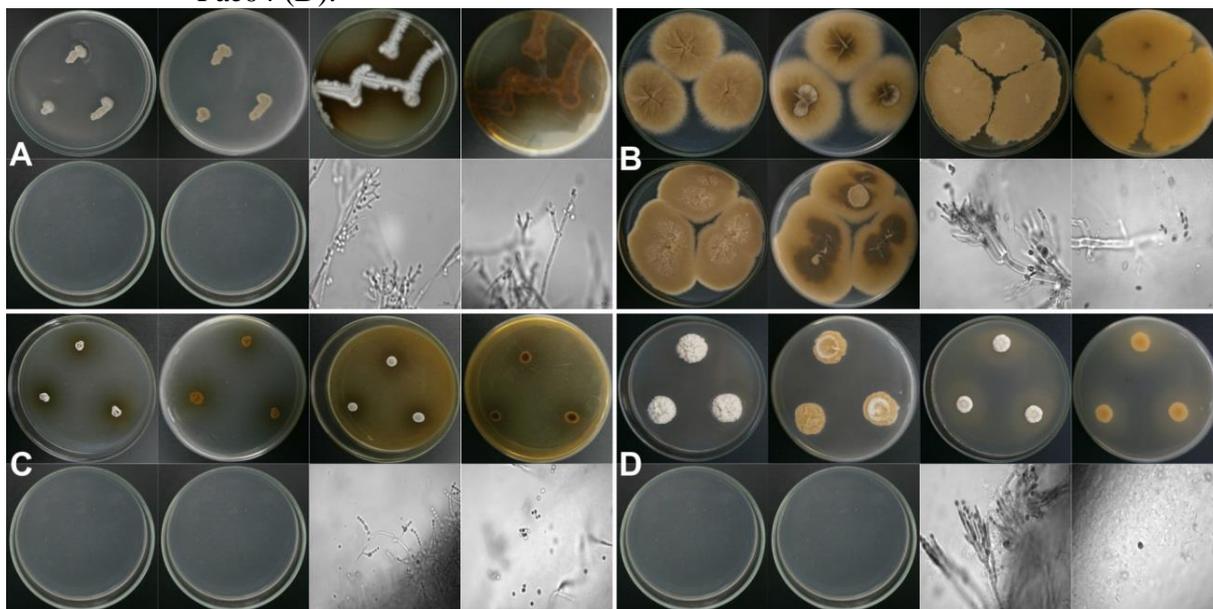
Os morfotipos foram caracterizados de acordo com metodologia descrita por Houbraken e Samson (2011). As principais características macro e micromorfológicas e o número de isolados de cada morfotipo estão descritas no Apêndice B e suas ilustrações estão dispostas nas figuras 3.7 a 3.21.

Figura 3.7 – Macro e micromorfologia dos morfotipos A01 (A), A02 (B) e A03 (C).



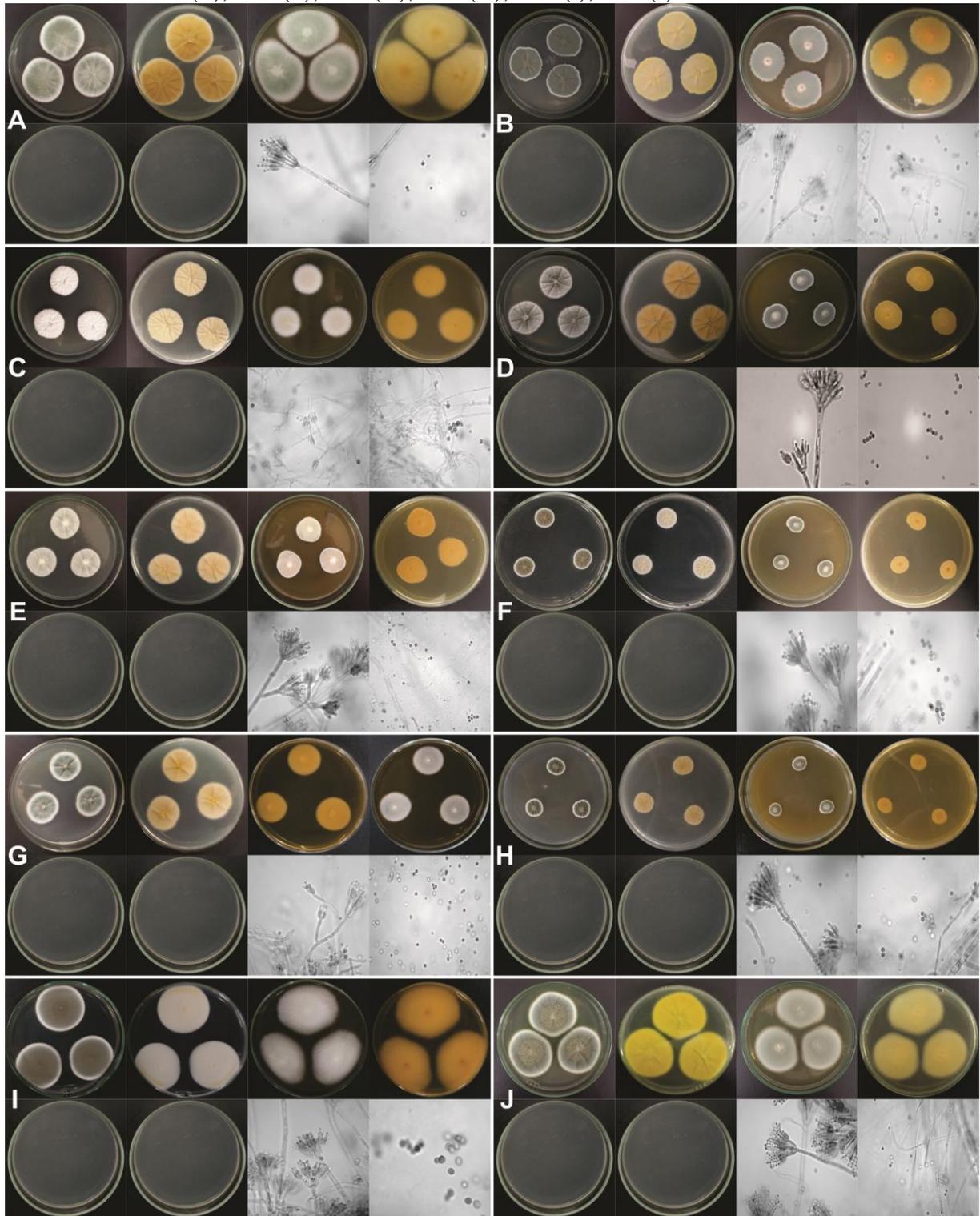
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.8 – Macro e micromorfologia dos morfotipos Pae01 (A), Pae02 (B), Pae03 (C) e Pae04 (D).



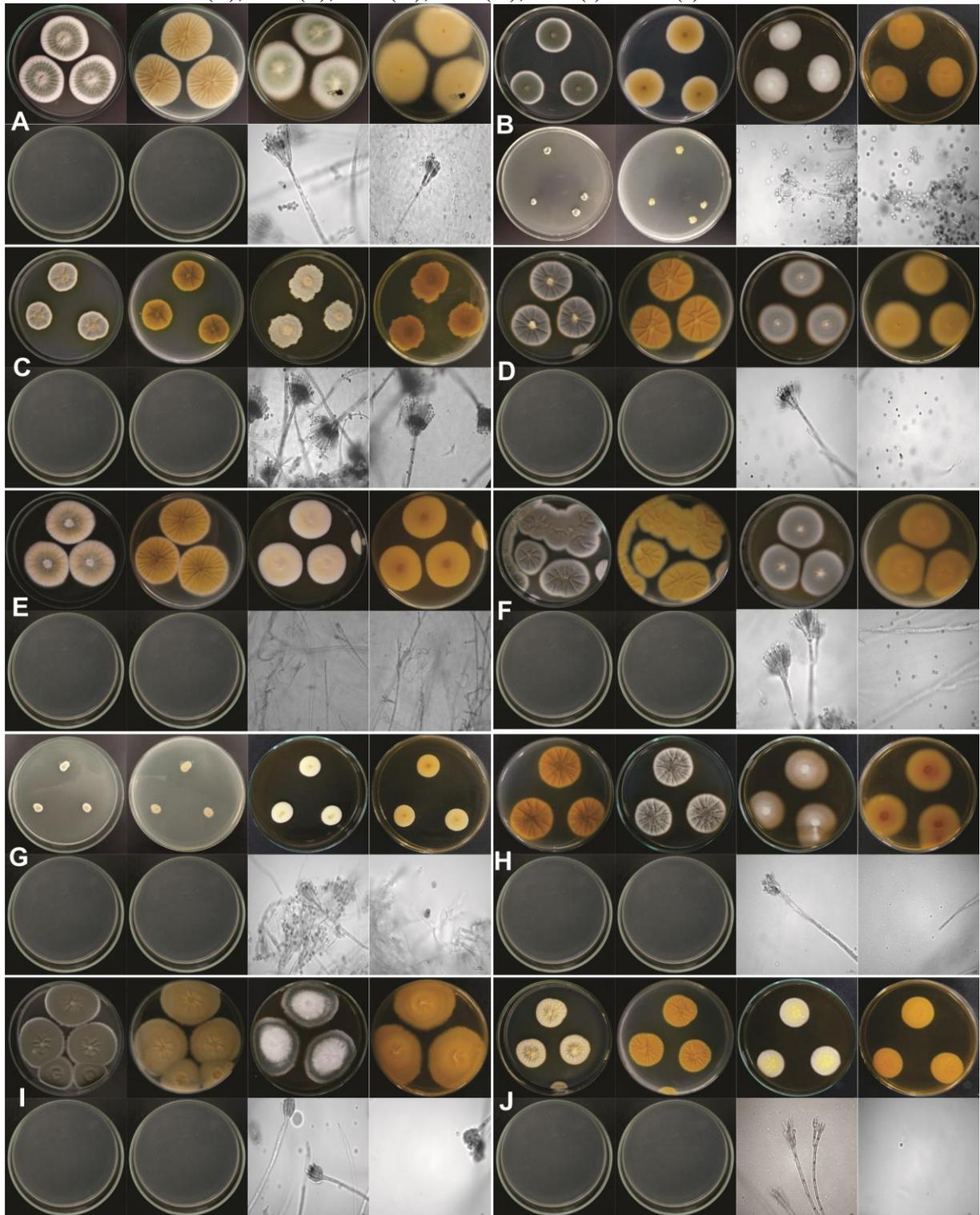
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.9 – Macro e micromorfologia dos morfotipos P01 (A), P02 (B), P03 (C), P04 (D), P06 (E), P07 (F), P08 (G), P09 (H), P10 (I), P11 (J).



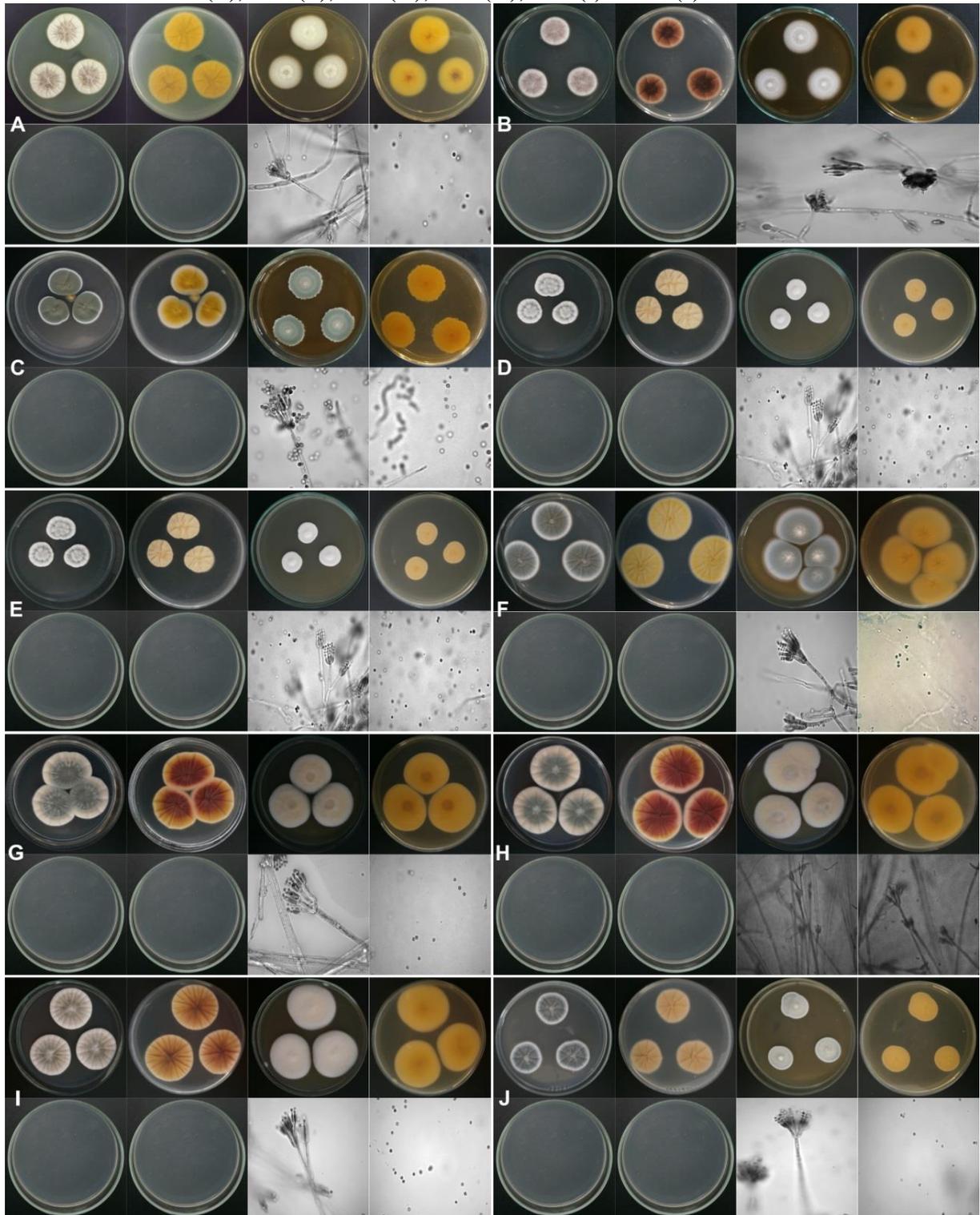
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.10 – Macro e micromorfologia do morfotipo P12 (A), P16 (B), P17 (C), P18 (D), P20 (E), P21 (F), P22 (G), P23 (H), P24 (I) e P25 (J).



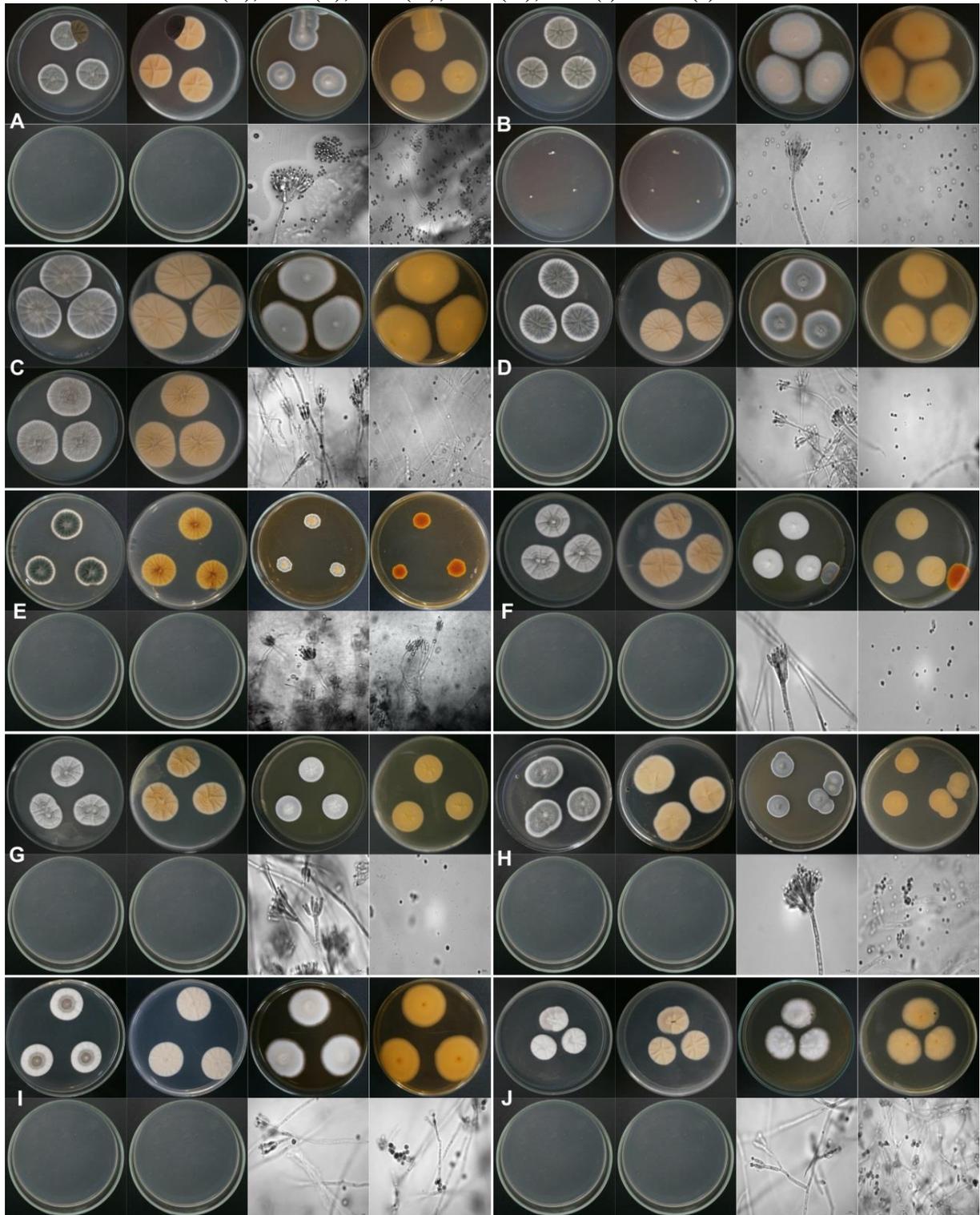
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.11 – Macro e micromorfologia do morfotipo P26 (A), P27 (B), P28 (C), P29 (D), P30 (E), P31 (F), P32 (G), P33 (H), P34 (I) e P35 (J).



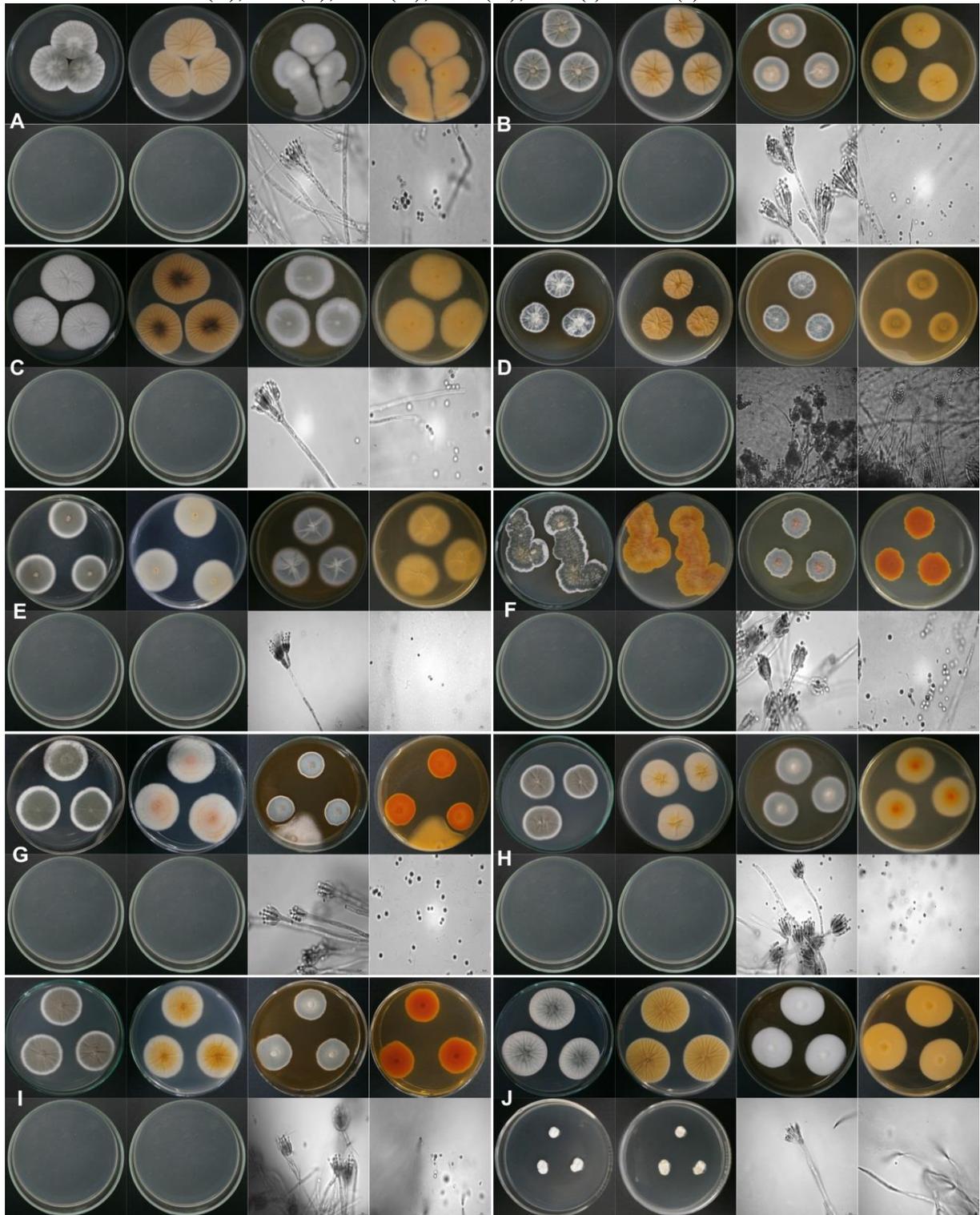
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.12 – Macro e micromorfologia do morfotipo P36 (A), P37 (B), P38 (C), P39 (D), P40 (E), P41 (F), P42 (G), P43 (H), P44 (I) e P45 (J).



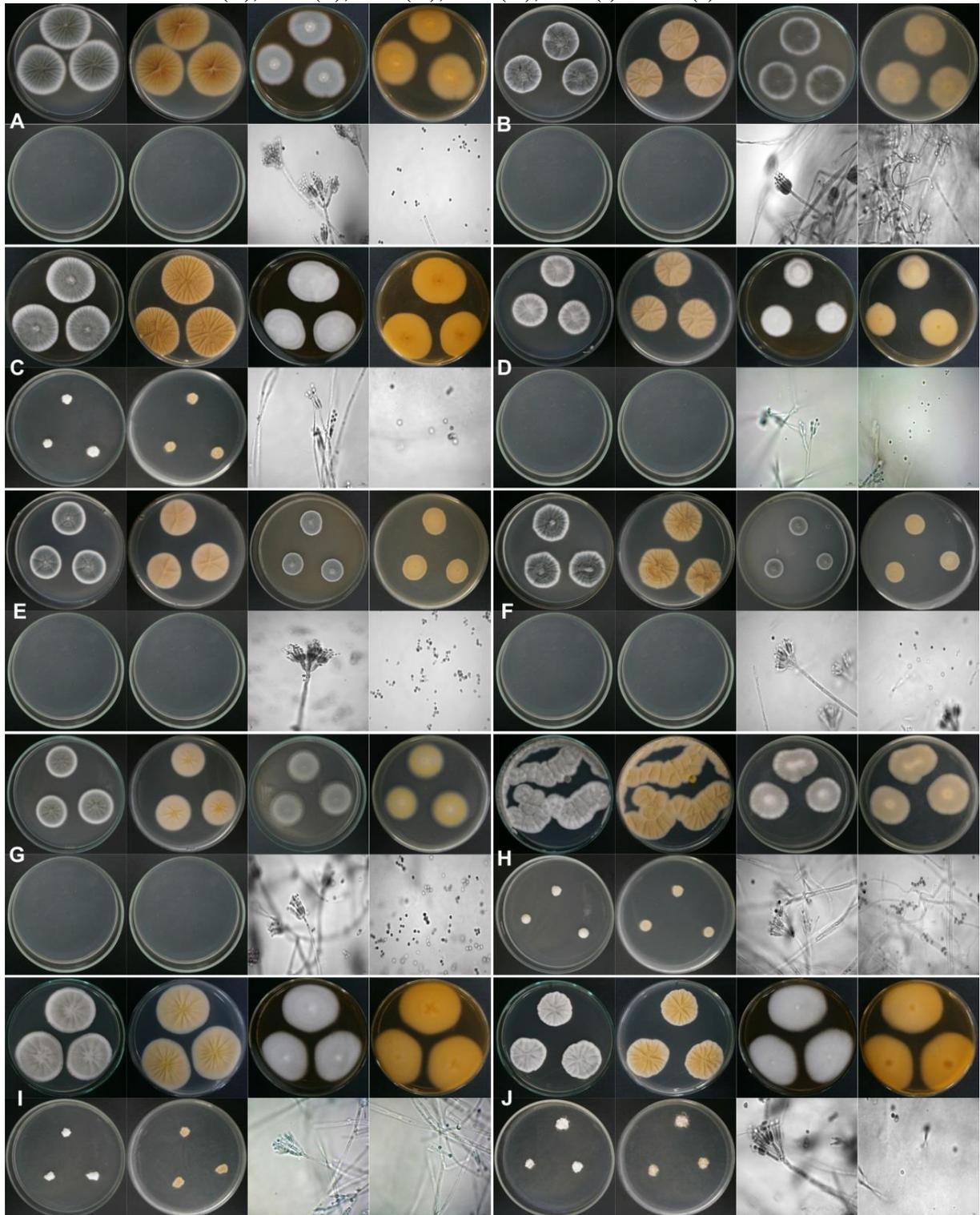
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.13 – Macro e micromorfologia do morfotipo P46 (A), P47 (B), P48 (C), P49 (D), P50 (E), P51 (F), P52 (G), P53 (H), P54 (I) e P55 (J).



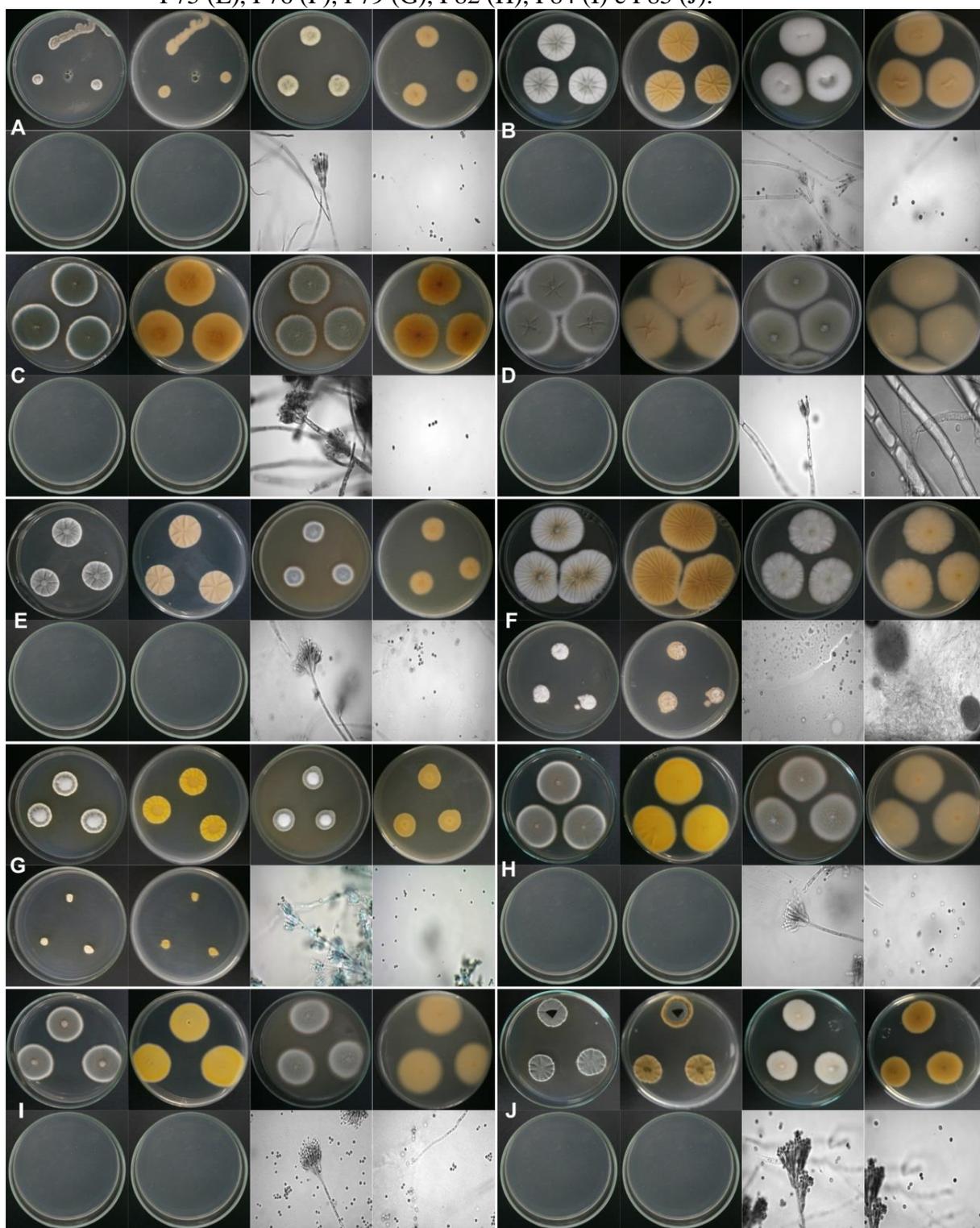
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.14 – Macro e micromorfologia do morfotipo P61 (A), P62 (B), P63 (C), P64 (D), P65 (E), P66 (F), P67 (G), P68 (H), P69 (I) e P70 (J).



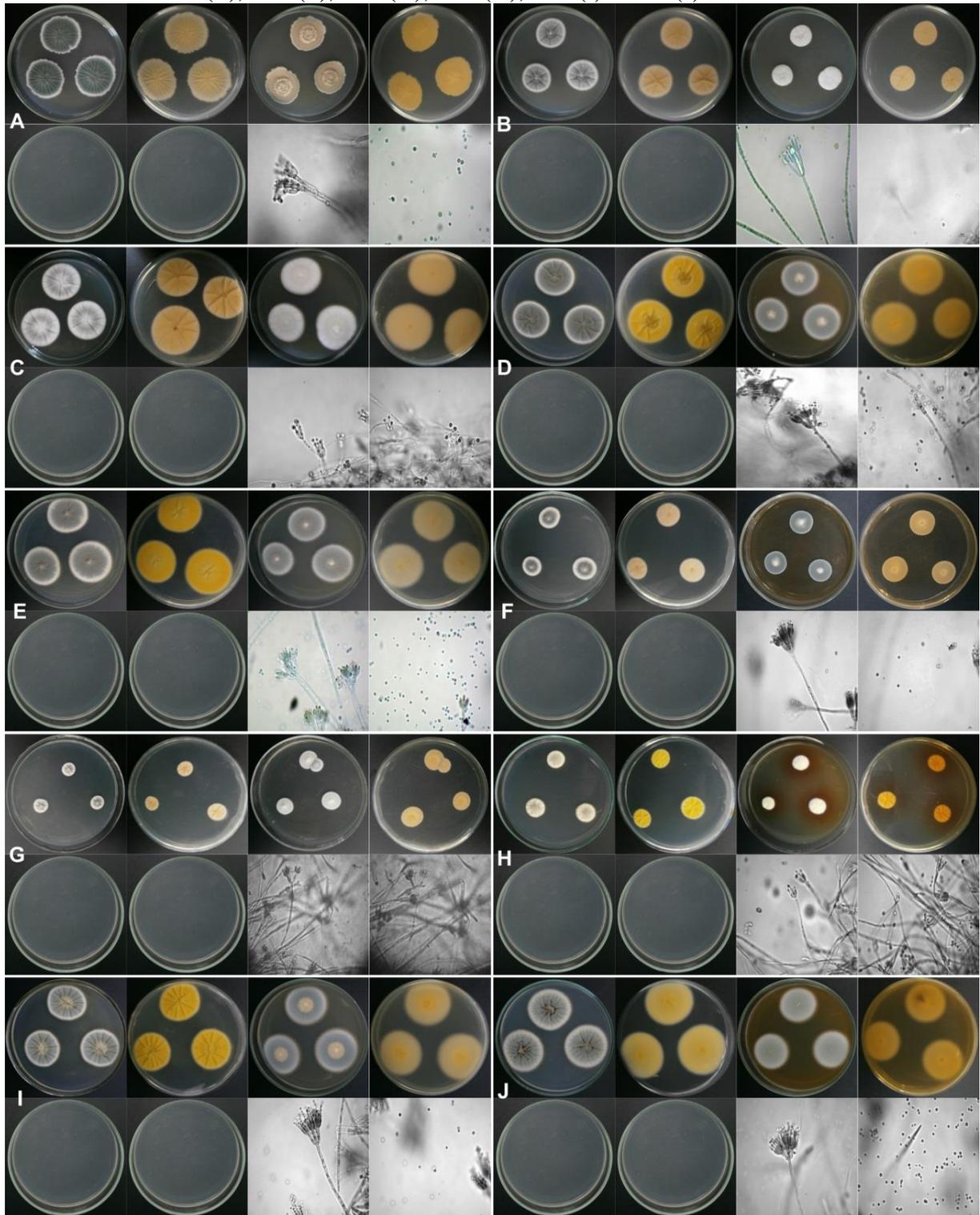
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.15 – Macro e micromorfologia do morfotipo P71 (A), P72 (B), P73 (C), P74 (D), P75 (E), P76 (F), P79 (G), P82 (H), P84 (I) e P85 (J).



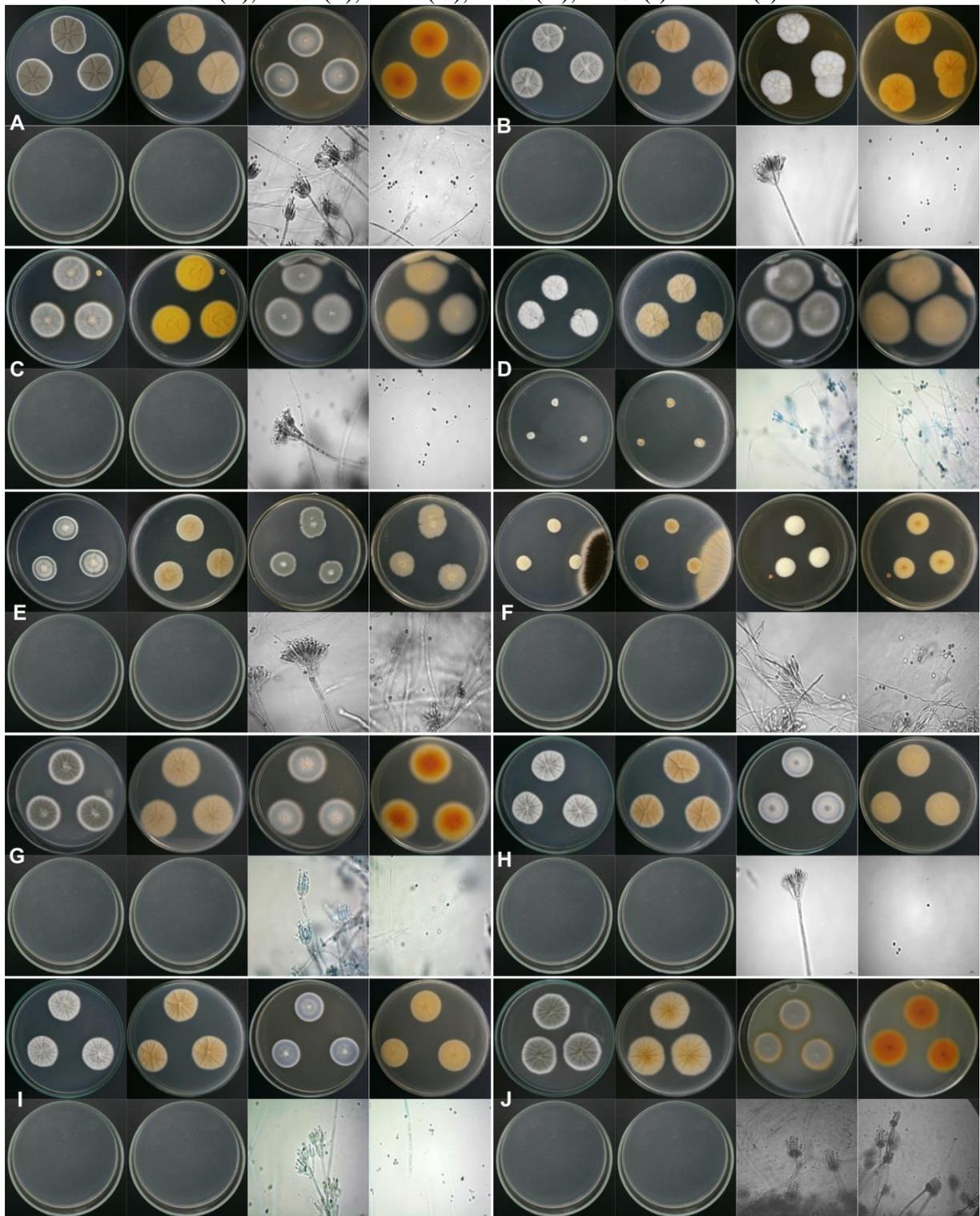
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios (com exceção da figura F – conídios e escleródios).

Figura 3.16 – Macro e micromorfologia do morfotipo P86 (A), P87 (B), P89 (C), P90 (D), P91 (E), P92 (F), P93 (G), P94 (H), P95 (I) e P96 (J).



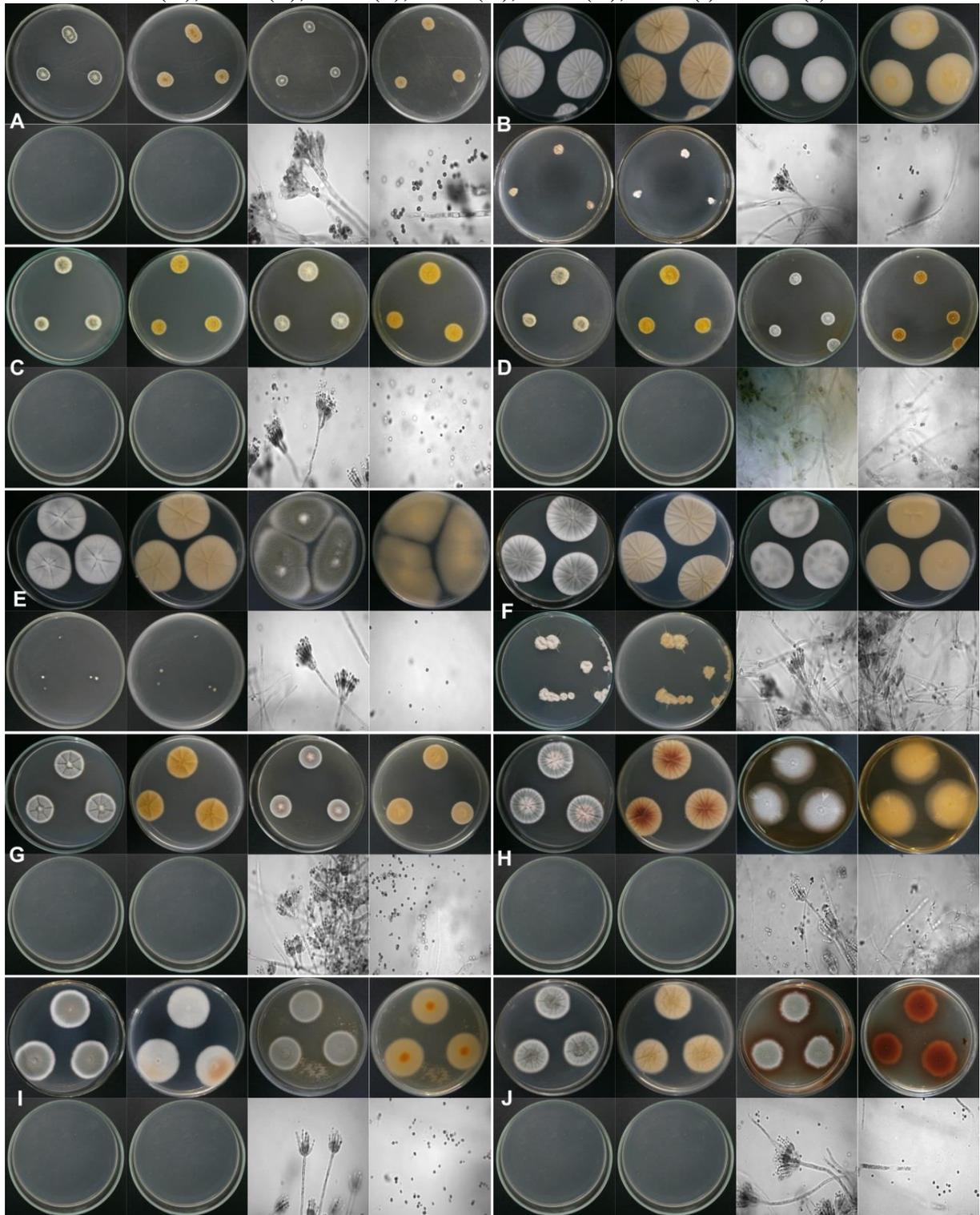
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.17 – Macro e micromorfologia do morfotipo P97(A), P98 (B), P101 (C), P103 (D), P104 (E), P105 (F), P107 (G), P108 (H), P109 (I) e P114 (J).



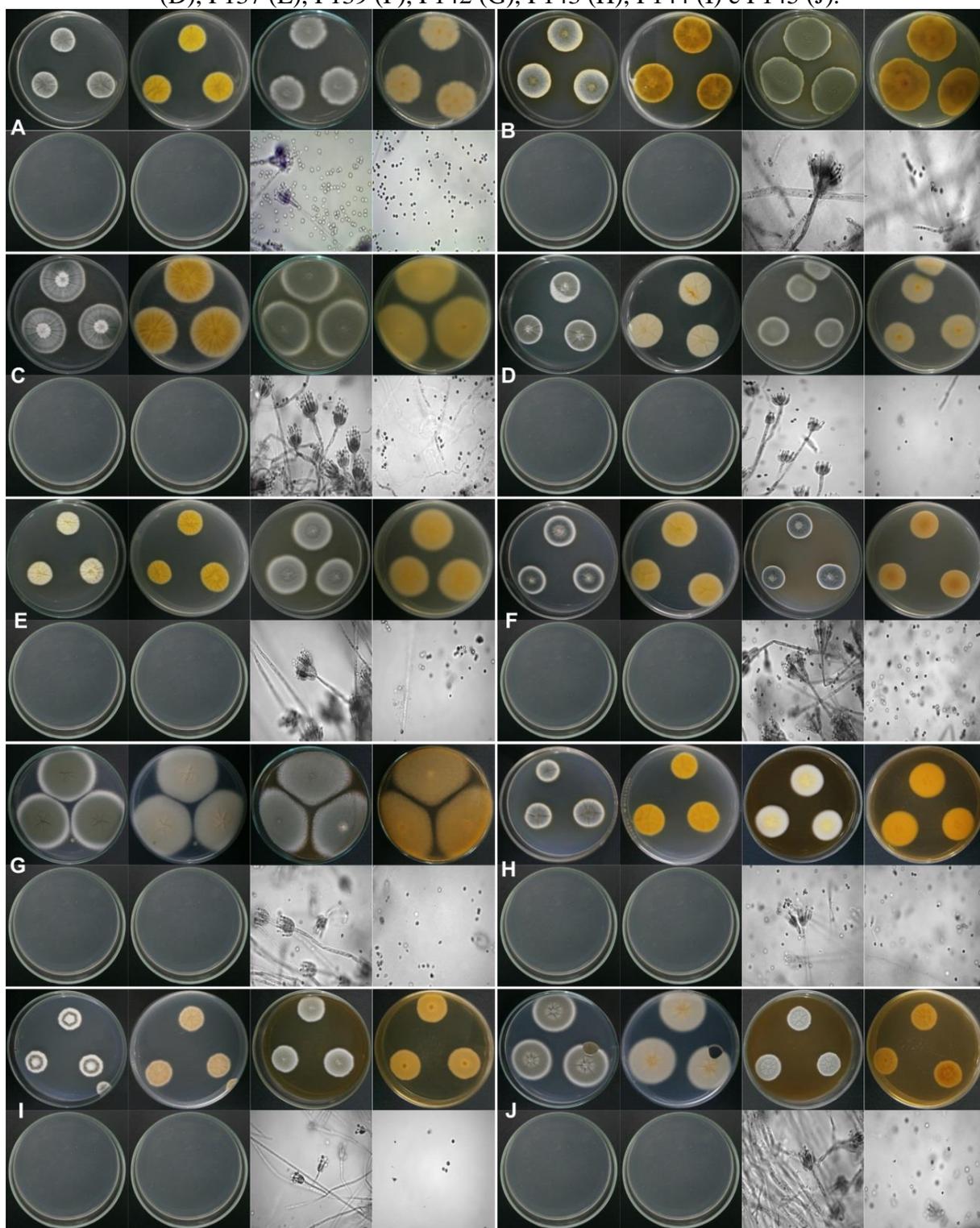
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.18 – Macro e micromorfologia do morfotipo P115 (A), P116 (B), P117 (C), P118 (D), P122 (E), P123 (F), P124 (G), P125 (H), P126 (I) e P127 (J).



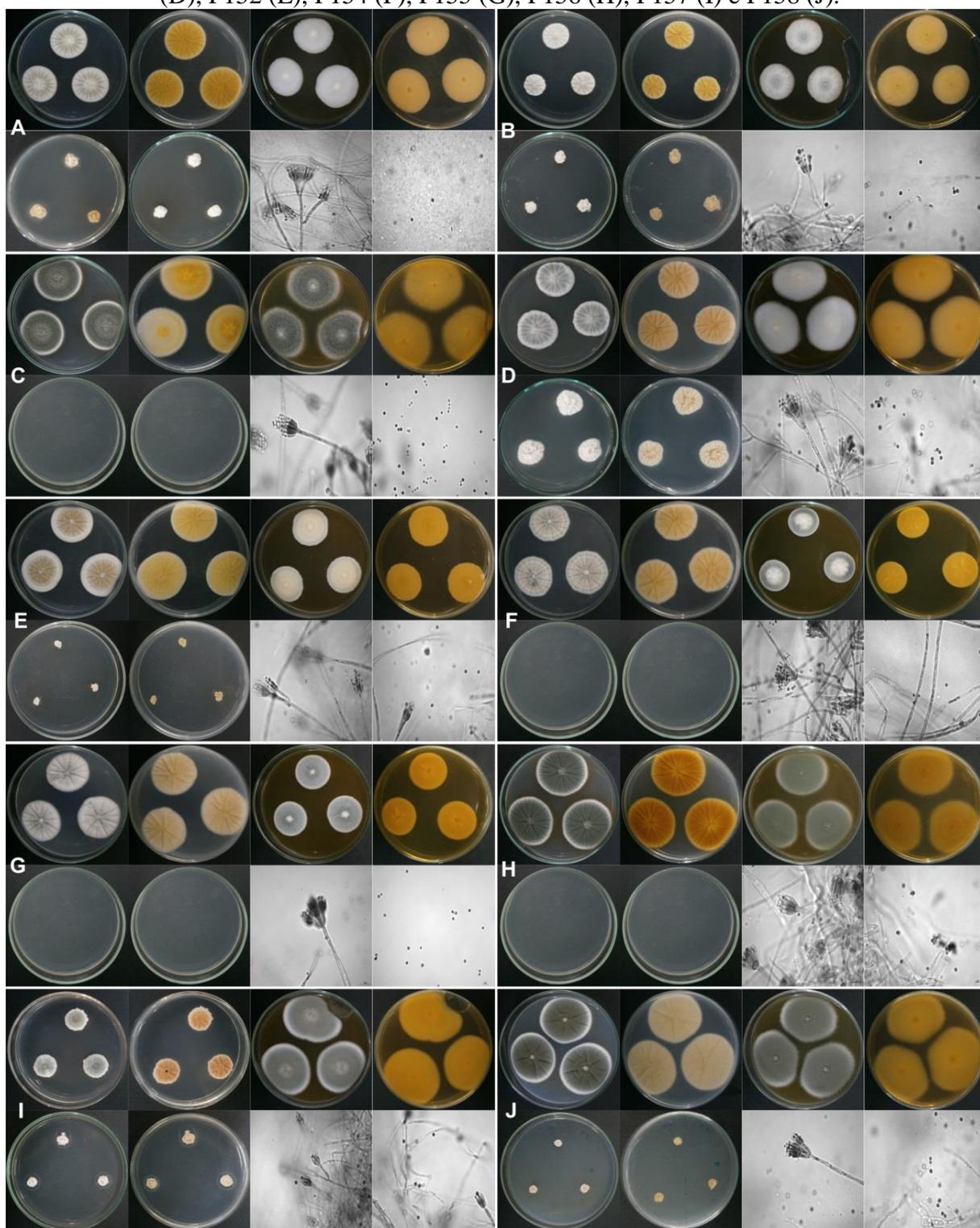
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.19 – Macro e micromorfologia do morfotipo P129 (A), P130 (B), P131 (C), P132 (D), P137 (E), P139 (F), P142 (G), P143 (H), P144 (I) e P145 (J).



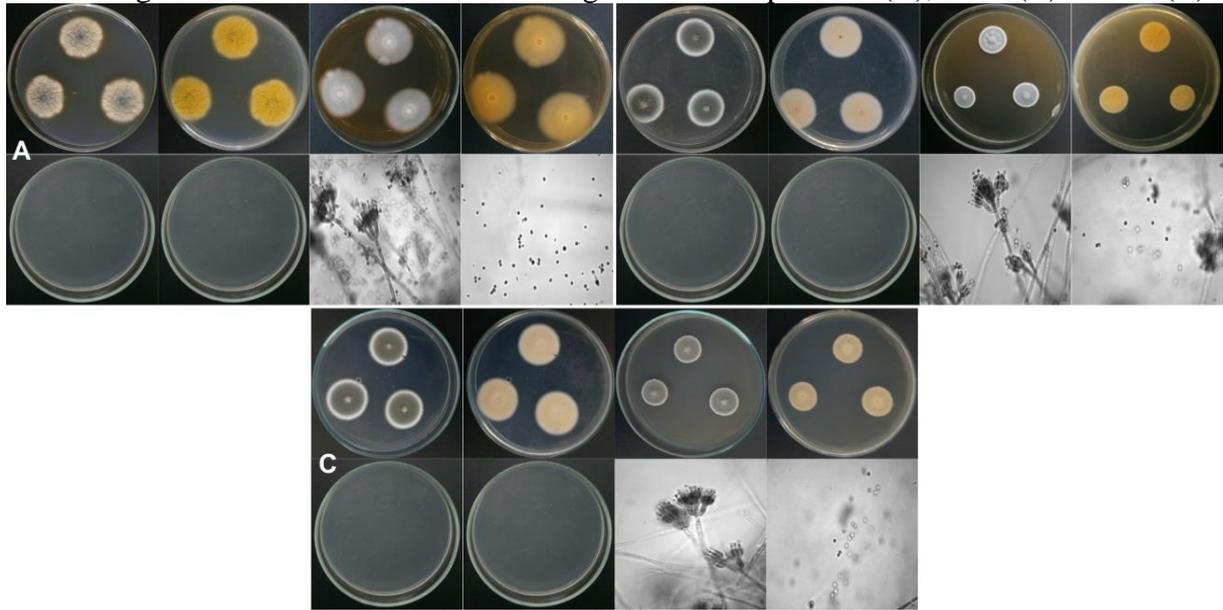
Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.20 – Macro e micromorfologia do morfotipo P146 (A), P148 (B), P150 (C), P151 (D), P152 (E), P154 (F), P155 (G), P156 (H), P157 (I) e P158 (J).



Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

Figura 3.21 – Macro e micromorfologia do morfotipo P160 (A), P161 (B) e P162 (C).



Da esquerda para a direita: CYA 25 °C (frente e verso); MEA 25 °C (frente e verso); CYA 37 °C (frente e verso); conidióforo, conídios.

3.7 Avaliação da produção de ocratoxina A, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e citrinina

Trinta e cinco morfotipos de *Penicillium* (P11, P12, P13, P14, P15, P18, P19, P20, P21, P31, P47, P56, P59, P60, P80, P82, P83, P84, P88, P100, P101, P102, P113, P120, P128, P129, P133, P134, P136, P137, P139, P140, P141, P153, P159) com características semelhantes ao *P. citrinum* (colônias em CYA 25°C com micélio branco aveludado; conídios com coloração verde escuro; exsudato, pigmentação solúvel e reverso amarelados) e agrupados como seção Citrina foram testados quanto a produção de citrinina.

A citrinina é um composto nefrotóxico produzido por *P. citrinum* e algumas outras espécies relacionadas. Muitas espécies pertencentes a seção Citrina são apontadas como produtoras das micotoxinas citrinina e citreoviridina, além de muitos outros extrólitos (HOUBRAKEN et al., 2010).

Dos morfotipos testados nenhum se apresentou como produtor da toxina, porém todos apresentaram um padrão no perfil de bandas na cromatografia delgada, com a produção de dois metabólitos em comum (Apêndice C-A), sendo indicada a pesquisa quanto a produção de outros metabólitos tóxicos, além dos analisados, para que possam ser utilizados para fins biotecnológicos.

Foi realizado o teste de aflatoxinas para diferenciar 21 isolados entre as espécies *A. flavus* (produtores de B1 e B2) e *A. parasiticus* (produtores de B1, B2, G1 e G2),

possibilitando a identificação de 19 isolados de *A. flavus* (Apêndice C-B) e 2 de *A. parasiticus*. Essas espécies possuem características muito semelhantes, o que dificulta a identificação correta apenas por análise morfológica. Por isso, a avaliação da produção de toxinas é uma metodologia que auxilia na diferenciação dessas espécies (RODRIGUES et al., 2009; KLICH, 2002; NIKOLIC et al., 2018).

Foi realizado também o teste de ocratoxina A, aflatoxinas e citrinina para os morfotipos de *Aspergillus* A01, A02 e A03. Nenhum dos isolados se apresentou como toxigênico, porém, o isolado do morfotipo A02 apresentou um perfil diferente de metabólitos, podendo ser estudado posteriormente quanto a produção destes (Apêndice C-C).

3.8 Agrupamento de isolados pela técnica de MALDI-TOF MS

Foi realizada a análise do perfil protéico pela técnica de MALDI-TOF para os isolados de *Penicillium* agrupados na seção citrina, para isolados com características semelhantes aos morfotipos classificados inicialmente como P01, P04, P34, P44 e P72, e também para isolados agrupados como *A. niger* agregado.

Dos 35 morfotipos classificados na seção citrina, 25 foram pertencentes ao mesmo grupo quando analisado o dendograma gerado pela análise de MALDI-TOF, sendo realocados para o morfotipo P11.

Os 5 morfotipos inicialmente chamados de *Aspergillus niger* agregado 1, 2, 3, 4 e 5, e um isolado de *A. niger* identificado morfológicamente foram agrupados e identificados como *A. niger* pela técnica utilizada, com níveis de *score* acima de 2,0. O mesmo não ocorreu para o morfotipo A01, que possui características parecidas ao *A. niger*, mostrando ser uma outra espécie.

Os morfotipos inicialmente chamados de P04-1, P44, P44-2 e P44-3 foram agrupados com o morfotipo P04, sendo realocados para esse morfotipo.

Os demais morfotipos analisados não apresentaram bom agrupamento, sendo reclassificados em diferentes morfotipos, resultando na caracterização descrita no item 3.7.

4 CONCLUSÃO

Foram obtidos 2035 isolados de fungos filamentosos, divididos em 17 espécies e 130 morfotipos, sendo a grande maioria do gênero *Penicillium*. A caracterização morfológica, com auxílio da avaliação de produção de toxinas e do perfil de proteínas (quando necessário),

possibilitou a identificação de 3 espécies de *Aspergillus*, 11 espécies de *Penicillium* e 3 espécies de *Talaromyces*.

Os resultados mostraram uma diversidade grande de espécies em solo de área de Mata Atlântica retirado da região do Quadrilátero Ferrífero. Apesar de um grande número de isolados sem identificação em nível de espécie, esses isolados podem ser espécies novas, ainda não descritas, podendo apresentar um grande potencial para uso biotecnológico.

Além disso, todos os morfotipos e espécies passam a compor a Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciências de Alimentos da UFLA (CCDCA).

5 REFERÊNCIAS

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Cienc. Cult.** [online], v. 68, n.1 [cited 2016-05-06], p. 04-05, 2016. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252016000100002&lng=en&nrm=iso. Acesso em 25/04/2016.

BORGES L. R. et al. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, v. 9, n. 2, p. 185-194, 2011.

CASTRO, J. L. et al. Diversity and Efficiency of Rhizobia Communities from Iron Mining Areas Using Cowpea as a Trap Plant. **Rev. Bras. de Ciência do Solo**, 41: e0160525, 2017.

CHRISTENSEN, M.; FRISVAD, J. C.; TUTHILL, D. E. *Penicillium* species diversity in soil and some taxonomic and ecological notes. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. **Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification**. London: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 309-321.

DOUGLAS-KING, J. A.; HOCKING, A. D.; PIT., J. I. Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 959-964, 1979.

FARIA, L. S. **Determinação da radioatividade natural de águas subterrânea e superficial de Brumadinho e Nova Lima, Brasil**. 2013. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2013.

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G. Diversidade de *Trichocomaceae* isolada de solo e serrapilheira de Floresta Atlântica. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 4, p. 405-413, 2012.

HENSON, O. E. Dichloran as an Inhibitor of Mold Spreading in Fungal Plating Media: Effects on Colony Diameter and Enumeration. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 656-660, 1981.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Glycerol Medium for Enumeration of Xerophilic Fungi from Low-Moisture Foods. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 488-492, 1980.

HORN, B. W. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: A review. **Food Additive Contaminant**, London, v. 24, n. 10, p. 1088-1101, Oct. 2007.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 117-133, 2010.

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

ICPA – International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus*. **Introduction**. Disponível em: <http://www.aspergilluspenicillium.org/>. Acesso em: 25/04/2016.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centralbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

LEITE JÚNIOR, D. P. et al. Trichocomaceae: biodiversity of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp residing in libraries. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 6, n. 10, p. 734-743, 2012.

MAGALHÃES, V. G. Convenção sobre a diversidade biológica (cdb): a necessidade da revisão do seu texto substituindo o termo “recursos genéticos” por “recursos biológicos” nos arts 1, 9, 15, 16 e 19. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 1, n. 1, p. 16-32, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2º Ed. Editora UFLA, Lavras, 2006, 729p.

NIKOLIC, M. et al. Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates originated from wheat. **Genetika**, v. 50, n. 1, p. 143-152, 2018. <https://doi.org/10.2298/GENSR1801143N>

OLIVEIRA, L. G. et al. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 96, p. 49-54, 2013.

PAUL, E. A. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 4. ed. ed. London: Elsevier Academic Press, 2015.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, 2000. 197 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

PUANGSOMBAT, T. K.; SANGWANIT, U.; MAROD, D. Diversity of soil fungi in different land use types in Tha Kum-Huai Raeng forest reserve, Trat Province. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 44, p. 1162-1175, 2010.

RODRIGUES, P et al. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 187-193, 2009.

RUCHKYS, U. A. et al. Quadrilátero Ferrífero, MG: da lenda do Sabarabuçu ao patrimônio histórico, geológico, paisagístico e religioso, In: SCHOBENHAUS, Carlos; CAMPOS, Diógenes de Almeida; QUEIROZ, Emanuel Teixeira de; WINGE, Manfredo; BERBERT-BORN, Mylène (Ed.). **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**. Brasília: DNPM; CPRM; Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos - SIGEP, 2009. v. 2, p. 203-212.

SAMSON, R. A. et al. **Food and Indoor Fungi**. Utrecht (The Netherlands): CBS, 2010.

SAMSON, R. A., et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Stud Mycol**, v. 70, n. 1, p. 159–83, 2011.

SHREYA et al. Optimization of culture conditions for extracellular fungal lipase production by submerged fermentation process. **Plant Science Today**, v. 5, n. 3, p. 135-141, 2018.

TSANG, C.-C. et al. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 197-210, 2108.

VALLI. M.; YOUNG. M. C.; BOLZANI. V. S. A Beleza Invisível da Biodiversidade: O Táxon Rubiaceae. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, 2016.

VIEIRA, C. K. et al. Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. **Applied Soil Ecology** (2018), <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.07.011> .

VILLANI, A. et al. A polyphasic approach for characterization of a collection of cereal isolates of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **Int. Jour. of Food Microbiology**, v. 234, p. 24-35, 2016.

YILMAZ, N. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Stud Mycol**, v. 78, p. 175–341, 2014.

6 MATERIAL SUPLEMENTAR

Apêndice A - Coordenadas geográficas dos pontos centrais das 9 amostras compostas de solo coletadas em região de Mata Atlântica no Quadrilátero Ferrífero.

Ponto	Coordenadas		Ponto	Coordenadas	
FL 1	20°9'38.923" S	44°8'47.012" O	FL 6	20°9'39.000" S	44°8'49.630" O
FL 2	20°9'37.430" S	44°8'47.709" O	FL 7	20°09'36.6" S	44°08'51.3" O
FL 3	20°9'36.426" S	44°8'48.748" O	FL 8	20°9'34.576" S	44°8'54.402" O
FL 4	20°9'34.948" S	44°8'50.680" O	FL 9	20°9'33.467" S	44°8'54.515" O
FL 5	20°9'34.013" S	44°8'52.441" O			

Apêndice B - Principais características macro e micromorfológicas dos isolados de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Penicillium* não identificados em nível de espécie. (continua)

Morfotipo	Diâmetro das colônias (mm)			Formato, textura e diâmetro de conídios	Características típicas	N° de isolados
	CYA (25 °C)	MEA (25 °C)	CYA (37 °C)			
A01	72-75	59-65	80-81	Globoso, espinhoso 3,0-5,0 µm	Bisseriado; CYA 25 °C branco com centro preto e reverso amarelado; MEA 25 °C branco com centro amarelado, CYA 37 °C preto	01
A02	52-58	53-55	0	Globoso, liso 2,0-2,5 µm	Bisseriado, vesícula piriforme; CYA 25 °C branco com centro bege e reverso caramelo; MEA 25 °C	01
A03	12-13	47-51	0	Globoso, liso a finamente rugoso 2,0-3,0 µm	Unisseriado; CYA 25 °C inconspicuo e flocoso no centro; MEA 25 °C rosado e flocoso	01
Pae01	10-11	10-12	0	Elipsoidal, liso	CYA 25 °C cinza esverdeado; MEA 25 °C cinza com reverso e pigmentação intensa marrom escuro	01
Pae02	56-59	60-70	55-67	Elipsoidal, liso 3,0-5,0 µm	Colônias bege dourado com reverso palha e centro marrom escuro	01
Pae03	10-11	11-13	0	Globoso, liso a finamente rugoso 2,0 µm	CYA 25 °C branco acinzentado enrugado; MEA 25 °C cinza claro, ambos com reverso e pigmentação solúvel marrom escuro	01
Pae04	21-22	12-13	0	Globoso, liso 3,0-4,0 µm	Colônias palha rosado com reverso bege alaranjado; CYA 25 °C enrugado, pigmentação rosa alaranjada opaca, aroma frutado em MEA 25 °C	31
P01	44-45	52-55	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado, conidióforo rugoso; CYA 25 °C cinza esverdeado médio com reverso caramelo; MEA 25 °C verde claro	30
P02	33-34	30-33	0	Elipsoidal, liso 3,0-4,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde escuro com borda turquesa e reverso palha com manchas amarelas; MEA 25 °C verde azulado com bordas irregulares e centro nude, com aroma forte	24
P03	27-30	40-41	0	Globoso, rugoso 2,5-3,5 µm	Monoverticilado, conidióforos curtos; CYA 25 °C branco; MEA 25 °C azul claro com centro creme	09
P04	30-33	22-24	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado claro a escuro e reverso rosado claro; MEA 25 °C cinza azulado médio com centro flocoso bege	799
P05	35-36	29-35	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado, CYA e MEA 25 °C cinza esverdeado escuro com reverso rosa alaranjado	01
P06	29-30	25-26	0	Globoso, liso 2,0-2,5 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado claro com reverso rosado claro; MEA 25 °C cinza azulado claro com centro nude e miolo branco flocoso	04
P07	20-21	11-12	0	Globoso, finamente rugoso 3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde escuro com borda azulada fina; MEA 25 °C verde escuro com borda azulada fina e centro flocoso palha	02
P08	30-31	19-27	0	Globoso, finamente rugoso	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado com centro verde escuro e reverso	01

				2,0 µm	amarelado; MEA 25 °C cinza azulado escuro com centro cinza claro	
P09	19-20	14-16	0	Oval, rugoso 3,0 µm	Terverticilado; CYA 25 °C e MEA 25 °C verde escuro com centro flocoso mais claro; CYA 25 °C sulcado	01
P10	30-38	45-48	0	Oval, rugoso	Biverticilado; CYA 25 °C branco sulcado com reverso rosa alaranjado claro; MEA 25°C branco com borda acinzentada	01
P11	41-42	40-43	0	Globoso, liso 1,5-2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado, mais escuro no centro, reverso amarelo e exsudato transparente; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso palha	447
P12	44-45	52-55	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado, conidióforo rugoso; CYA 25 °C branco com centro cinza esverdeado escuro e reverso caramelo; MEA 25 °C verde com centro creme	02
P13	42-44	40-42	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado, conidióforo rugoso; CYA 25 °C branco com centro verde acinzentado; MEA 25 °C verde com centro creme	01
P14	38-39	53-55	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado, conidióforo rugoso; CYA 25 °C verde acinzentado médio; MEA 25 °C branco com centro rajado creme amarelado	01
P15	41-46	55-57	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado, conidióforo rugoso; CYA 25 °C cinza claro com reverso caramelo; MEA 25 °C branco com centro mais denso, aroma forte	01
P16	30-31	26-28	5-7	Globoso, liso 2,5 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde azulado escuro com reverso caramelo e centro mais escuro; MEA 25 °C com borda azulada e centro palha amarelado	01
P17	26-27	26-30	0	Subgloboso, liso 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado com centro amarelado, reverso marrom e pigmentação amarela; MEA 25 °C cinza azulado claro com centro flocoso amarelado e reverso marrom alaranjado	01
P18	38-39	50-51	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado escuro com centro e reverso amarelos; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso mais claro e reverso amarelado	01
P19	37-39	41-45	0	Globoso, liso a finamente rugoso 2,0 µm	Biverticilado, conidióforos com septos bem definidos; CYA 25 °C amarelo rosado com reverso marrom avermelhado claro; MEA 25 °C bege com reverso caramelo e centro mais escuro	01
P20	45-47	35-39	0	Globoso, liso a finamente rugoso 2,0 µm	Biverticilado, conidióforos com septos bem definidos; CYA 25 °C bege com centro cinza e miolo branco, reverso caramelo; MEA 25 °C bege com reverso caramelo e centro mais escuro	02
P21	41-42	42-45	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado escuro com reverso e pigmentação amarelos; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso palha	05
P22	11-12	16-18	0	Globoso, liso 2,0-2,5 µm	Biverticilado; CYA 25 °C palha com centro esverdeado; MEA 25 °C amarelo com centro verde e reverso caramelo claro	61
P23	31-33	34-35	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado, fiálides bem menores que métulas; CYA 25 °C cinza claro com centro mais escuro, exsudato rosado, reverso e pigmentação marrom avermelhado; MEA 25 °C branco, amarelado no centro, reverso caramelo com	01

					centro mais escuro	
P24	43-48	69-72	0	Subgloboso, liso 2,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C verde escuro com centro cinza; MEA 25 °C verde azulado escuro na borda com centro branco e reverso caramelo	01
P25	26-27	27-31	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C amarelo claro com centro cinza e reverso amarelo; MEA 25 °C amarelo rajado de branco com reverso alaranjado e presença de escleródios	03
P26	26-27	29-30	0	Globoso a elipsoidal, liso 2,0 µm	Biverticilado, fiálides curtas; CYA 25 °C cinza claro com centro rosado, reverso e pigmentação amarelos, exsudato transparente, presença de escleródios; MEA 25 °C amarelo claro, com reverso e pigmentação amarelos	125
P27	20-21	29-30	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado, fiálides curtas; CYA 25° C branco com centro rosa avermelhado, reverso marrom avermelhado; MEA 25° C branco, funiculoso, com reverso creme com centro bege alaranjado	01
P28	30-32	30-31	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde escuro com reverso amarelo; MEA 25 °C verde acinzentado com reverso amarelo	01
P29	23-27	19-20	0	Globoso, liso 1,5-2,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C branco e cinza com reverso palha; MEA 25 °C azul claro e nude	01
P30	27-28	44-45	0	Globoso, rugoso 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C branco com reverso bege claro; MEA 25 °C cinza esverdeado claro com centro nude e reverso bege	05
P31	41-42	40-43	0	Globoso, liso 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde escuro, reverso amarelo e exsudato transparente; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso palha	01
P32	41-43	37-39	0	Globoso, finamente rugoso 3,0-4,0 µm	Biverticilado, conidióforo rugoso; CYA 25 °C verde acinzentado escuro com borda bege claro e reverso marrom avermelhado; MEA 25 °C bege com reverso caramelo e centro mais escuro	01
P33	40-41	40-44	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde acinzentado escuro com borda bege claro e reverso marrom avermelhado; MEA 25 °C bege com reverso caramelo e centro mais escuro	02
P34	38-40	43-44	0	Globoso, liso a finamente rugoso 2,0 µm	Biverticilado, conidióforos com septos bem definidos; CYA 25 °C cinza rosado com centro cinza mais escuro e reverso marrom avermelhado; MEA 25 °C bege com reverso caramelo e centro mais escuro	09
P35	29-30	27-28	0	Globoso, liso 1,0-2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde acinzentado escuro, reverso palha rosado, exsudato transparente; MEA 25 °C nude com borda azul claro	14
P36	29-3	27-30	2-3	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza escuro, reverso nude, exsudato transparente; MEA 25 °C cinza azulado com centro nude e reverso palha	01
P37	28-29	48-49	2-3	Globoso a oval, liso 3,0-4,0 µm	Biverticilado, conidióforo rugoso; CYA 25 °C cinza com borda branca, reverso palha com miolo amarelo; MEA 25 °C nude com bora cinza azulado claro, borda irregular e reverso creme	01
P38	46-48	48-50	39-40	Globoso a oval, liso	Monoverticilado; CYA 25 e 37 °C cinza escuro com reverso palha; MEA 25	01

				2,0-3,0 µm	°C bege claro com bora cinza	
P39	33-35	36-40	0	Globoso a subgloboso, liso 2,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C cinza escuro com exsudato transparente; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso	01
P40	24-26	15-16	0	Globoso, rugoso 2,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C verde escuro com centro cinza, borda branca e reverso laranja escuro; MEA 25 °C verde escuro com centro cinza, miolo, reverso e pigmentação laranja	01
P41	32-35	22-23	0	Globoso, liso 2,0-3,0 µm	Biverticilado com alguns <i>penicilli</i> terverticilados, fiálides bem menores que métulas; CYA 25 °C cinza azulado claro com centro mais escuro, reverso bege rosado e exsudato transparente; MEA 25 °C palha com borda cinza azulado claro	04
P42	28-30	21-22	0	Globoso a subgloboso, liso 2,0 µm	Biverticilado com <i>penicillis</i> irregulares; CYA 25 °C cinza com borda cinza mais escura e reverso bege rosado; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso palha	25
P43	30-32	19-21	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde escuro com borda cinza, reverso bege, exsudato transparente; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso nude	01
P44	30-32	30-33	0	Globoso, rugoso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza claro, centro bege, reverso bege rosado; MEA 25 °C cinza com borda mais clara e reverso bege	01
P45	24-25	30-32	0	Globoso, rugoso 3,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C branco acinzentado com reverso palha; MEA 25 °C branco com centro bege amarelado	01
P46	40-41	39-41	0	Globoso, liso 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado com reverso bege claro; MEA 25 °C cinza esverdeado claro com centro palha e reverso alaranjado claro	01
P47	34-35	30-32	0	Subgloboso, liso 1,0-2,0 µm	Biverticilado; CUA 25 °C verde azulado escuro, reverso com centro amarelo, exsudato amarelado; MEA 25 °C verde azulado com centro bege amarelado, reverso amarelo claro	01
P48	42-45	44-46	0	Globoso, liso a finamente rugoso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C branco com reverso marrom e centro marrom mais escuro; MEA 25 °C verde acinzentado com centro mais escuro	01
P49	26-27	26-27	0	Globoso, liso 2,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C rajado de cinza claro e escuro, exsudato amarelado, reverso caramelo e pigmentação marrom; MEA 25 °C rajado de verde azulado claro e escuro, exsudato transparente e reverso escuro	01
P50	38-40	38-39	0	Subgloboso, liso, cadeias longas 1,0-2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado com centro branco, reverso e pigmentação amarelos, exsudato vermelho; MEA 25 °C cinza azulado com rajado palha	01
P51	29-30	22-26	0	Globoso, liso 2,0 µm	Monoverticilado, vesícula pequena; CYA 25 °C verde escuro com centro mais claro, reverso alaranjado e exsudato amarelo; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso alaranjado e reverso laranja escuro	01
P52	29-31	25-26	0	Globoso, liso 2,0-3,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C branco com centro esverdeado, exsudato amarelo, reverso com centro laranja; MEA 25 °C cinza azulado com	01

						centro e borda laranja
P53	29-31	34-35	0	Subgloboso a elipsoidal, liso 2,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °c verde azulado escuro com borda turquesa, reverso branco com centro amarelo; MEA 25 °C verde azulado com centro flocoso nude, reverso palha com centro laranja	12
P54	30-32	32-34	0	Globoso a elipsoidal, liso 2,0-2,5 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C verde acinzentado médio, reverso amarelado, exsudato transparente; MEA 25 °C verde acinzentado médio com reverso laranja escuro	01
P55	38-39	31-35	9-13	Globoso, liso 2,0-2,5 µm	Biverticilado; CYA 25 °C amarelo claro, reverso caramelo; MEA 25 °C branco esverdeado; CYA 37 °C branco, enrugado	01
P61	43-42	35-38	0	Subgloboso a apiculado, liso, em cadeias 1,5-2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado escuro com reverso caramelo; MEA 25 °C cinza esverdeado com centro funiculoso	01
P62	33-34	36-37	0	Globoso, liso 2,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C cinza esverdeado escuro, reverso palha, exsudato transparente; MEA 25 °C verde escuro	01
P63	41-42	34-36	9-11	Globoso, liso 2,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C verde claro com borda branca, reverso marrom claro; MEA 25 °C verde claro com centro bege claro; CYA 37 °C branco	01
P64	32-33	29-31	0	Globoso, liso 2,0-3,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C cinza claro com reverso palha; MEA 25 °C cinza esverdeado	02
P65	30-33	22-24	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA e MEA 25 °C cinza azulado escuro com centro flocoso acinzentado e reverso palha rosado	06
P66	32-33	15-17	0	Subgloboso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde acinzentado escuro com borda azulada e reverso palha amarelado; MEA 25 °C verde acinzentado escuro com centro flocoso	96
P67	28-31	30-32	0	Elipsoidal, liso 1,5-2,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C verde escuro com borda mais clara, reverso branco com centro amarelo e exsudato transparente; MEA 25 °C verde acinzentado com bordas irregulares, reverso com bordas amarelas	02
P68	32-33	39-40	9-10	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza claro com reverso bege rosado, exsudato transparente; MEA 25 °C cinza médio com borda branca; CYA 37 °C palha	02
P69	37-38	45-50	8-10	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza com centro branco, reverso amarelado, exsudato transparente; MEA 25 °C cinza claro com centro branco	01
P70	30-31	38-40	10-11	Globoso a apiculado, liso 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza claro, borda esverdeada e centro branco, reverso caramelo claro, exsudato transparente; MEA 25 °C branco	01
P71	9-10	19-20	0	Globoso, liso 3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde oliva com reverso palha; MEA 25 °C verde oliva claro com reverso bege	15
P72	32-33	35-38	0	Globoso, rugoso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza médio com borda branca e reverso caramelo; MEA 25 °C cinza esverdeado	05
P73	30-33	35-39	0	Elipsoidal, finamente rugoso	Biverticilado; CYA 25 °C verde azulado com borda branca, exsudato caramelo e reverso caramelo escuro; MEA 25 °C funiculoso, verde escuro	01

				2,5-3,0 µm	com borda mais clara e reverso caramelo	
P74	55-56	50-55	0	Globoso, liso 3,0 µm	Monovorticilado, vesiculado; CYA 25 °C cinza esverdeado escuro, reverso palha; MEA 25 °C verde com centro flocoso	02
P75	22-24	20-21	0	Subgloboso, liso a finamente rugoso 1,5-2,0 µm	Bivorticilado; CYA 25 °C cinza claro, reverso bege alaranjado; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso, reverso bege com centro amarelado	01
P76	44-47	40-43	14-17	Globoso, liso a finamente rugoso 2,0-3,0 µm	Bivorticilado; CYA 25 °C branco com centro amarelo, miolo cinza e reverso caramelo; CYA 25 °C branco com miolo amarelo, reverso palha com centro amarelo, presença de escleródios marrons	02
P79	21-23	15-16	4-5	Globoso, liso 1,0-2,0 µm	Bivorticilado com <i>penicillis</i> irregulares; CYA 25 °C cinza azulado com reverso, pigmentação e exsudato amarelos; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso; CYA 37 °C amarelado	01
P82	40-41	43-44	0	Globoso, liso 1,5-2,0 µm	Bivorticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado com reverso, pigmentação e exsudato amarelos; MEA 25 °C flocoso cinza esverdeado	07
P84	36-39	39-40	0	Globoso, liso 2,0 µm	Bivorticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado com borda azulada, reverso e pigmentação amarelada; MEA 25 °C cinza esverdeado	01
P85	23-26	30-31	0	Globoso a elipsoidal, liso 3,0-4,0 µm	Tervorticilado; CYA 25 °C verde escuro com borda azulada, reverso bege escuro; MEA 25 °C nude claro, com reverso caramelo; presença de aroma	02
P86	37-38	31-34	0	Globoso, finamente rugoso 2,0-3,0 µm	Tervorticilado; CYA 25 °C verde escuro, reverso palha com centro amarelado, exsudato transparente; MEA 25 °C bege com borda verde azulada e centro flocoso	02
P87	26-30	19-20	0	Globoso, liso	Bivorticilado; CYA 25 °C cinza com reverso bege; MEA 25 °C branco com reverso palha	01
P89	36-38	40-42	0	Globoso, rugoso 3,0 µm	Mono/Bivorticilado; CYA 25 °C cinza com centro e borda brancos, reverso bege; MEA 25 °C branco com centro nude claro	04
P90	41-42	40-43	0	Globoso, liso 1,5-2,0 µm	Bivorticilado; CYA 25 °C cinza azulado escuro com reverso amarelado; MEA 25 °C cinza azulado com centro nude, reverso palha com centro amarelado	04
P91	41-42	40-43	0	Globoso, finamente rugoso 1,5-3,0 µm	Bivorticilado; CYA 25 °C cinza azulado, centro flocoso, reverso amarelo; MEA 25 °C cinza azulado com centro palha flocoso	01
P92	18-19	15-16	0	Globoso, liso 1,5-2,0 µm	Bivorticilado; CYA 25 °C verde musgo com borda branca acinzentada, exsudato transparente; MEA 25 °C cinza azulado claro, amarelado no centro	01
P93	13-14	16-17	0	Globoso, liso 2,0 µm	Bivorticilado; CYA 25 °C cinza com centro flocoso e reverso bege; MEA 25 °C cinza azulado claro	01
P94	16-18	9-15	0	Elipsoidal a apiculado, liso 3,0-4,0 µm	Monovorticilado; CYA 25 °C cinza amarelado com centro cinza mais escuro, reverso amarelo; MEA 25 °C amarelo claro com reverso e pigmentação alaranjados	01

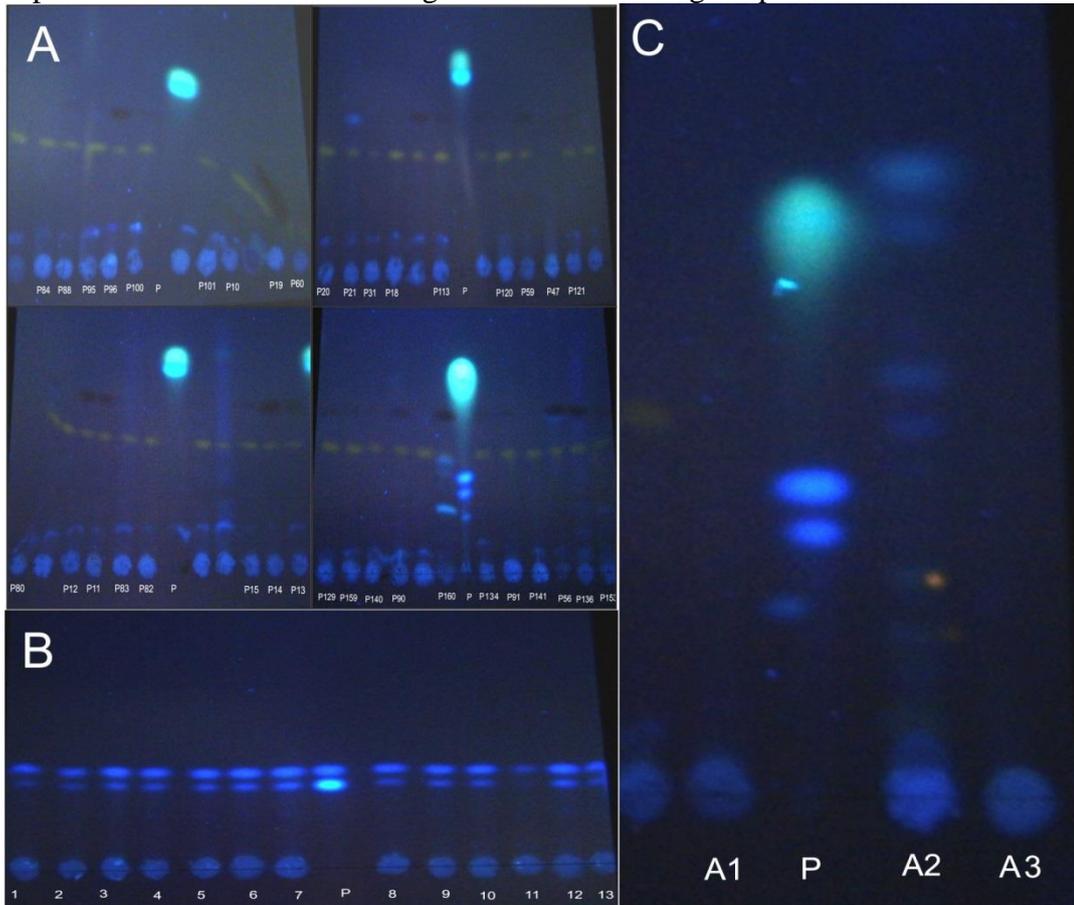
P95	36-38	32-33	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado, exsudato transparente, micélio, reverso e pigmentação amarelados; MEA 25 °C cinza azulado com centro palha	08
P96	40-41	32-35	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado, reverso amarelo e exsudato vermelho; MEA 25 °C cinza esverdeado e reverso amarelado	02
P97	31-34	33-34	0	Globoso a oval, finamente rugoso 2,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C verde musgo escuro, reverso palha e exsudato transparente; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso nude	01
P98	27-30	28-29	0	Globoso, liso	Monoverticilado; CYA 25 °C cinza claro, reverso bege rosado, exsudato transparente; MEA 25 °C branco com reverso amarelo	01
P101	32-33	39-40	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza com centro e reverso amarelados; MEA 25 °C cinza esverdeado com centro flocoso	05
P103	21-24	44-47	7-8	Globoso, rugoso 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C branco com reverso bege claro e exsudato transparente; MEA 25 °C verde acinzentado com borda branca; CYA 37 °C branco acinzentado com reverso amarelado	02
P104	22-25	22-23	0	Globoso, liso 2,0-3,0 µm	Terverticilado; CYA 25 °C verde escuro com centro mais claro e miolo amarelado, reverso palha com centro amarelado, exsudato transparente; MEA 25 °C verde escuro com centro mais claro	01
P105	9-10	20-21	0	Globoso, finamente rugoso 2,0-3,0 µm	CYA e MEA 25 °C amarelo claro, reverso com centro mostarda	03
P107	32-34	33-34	0	Subgloboso a apiculado, finamente rugoso 2,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C cinza esverdeado escuro com centro flocoso mais claro, reverso palha, exsudato transparente; MEA 25 °C cinza azulado com centro salmon e reverso laranja escuro	01
P108	30-31	27-28	0	Globoso, liso 1,0-2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza claro com reverso bege rosado; MEA 25 °C palha com borda e centro cinza azulados	01
P109	29-30	25-26	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado claro com reverso bege rosado; MEA 25 °C cinza azulado com centro flocoso nude	02
P114	31-34	31-34	0	Globoso, liso 2,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado com borda mais clara, reverso com centro laranja; MEA 25 °C cinza esverdeado, micélio e reverso laranja	17
P115	15-16	12-14	0	Globoso a subgloboso, rugoso 2,0-3,0 µm	Bi/Terverticilado; CYA 25 °C verde escuro com centro flocoso mais claro; MEA 25 °C verde escuro com borda turquesa e centro palha, reverso com centro alaranjado claro	02
P116	44-46	38-41	18-19	Globoso, finamente rugoso 2,0-3,0 µm	Biverticilado, conidióforo rugoso; CYA 25 °C branco com centro amarelado, reverso palha com pontos marrons no centro; MEA 25 °C branco com centro alaranjado claro, reverso palha com centro amarelado	09
P117	13-15	15-18	0	Globoso, liso a finamente rugoso 2,0-2,5 µm	Biverticilado; CYA 25 °C branco com centro esverdeado e reverso amarelo; MEA 25 °C verde amarelado, reverso e pigmentação amarelados e exsudato transparente	01

P118	12-15	11-12	0	Elipsoidal, liso 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza com micélio e reverso amarelados; MEA 25 °C cinza azulado, reverso mostarda, pigmentação marrom claro, presença de escleródios	01
P121	37-41	42-43	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado claro, reverso amarelo, exsudato transparente; MEA 25°C verde azulado com centro amarelo claro e reverso alaranjado	03
P122	46-47	56-57	2-3	Globoso a elipsoidal, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C branco com centro acinzentado claro; MEA verde acinzentado escuro, flocoso; CYA 37 °C branco	01
P123	43-44	41-42	10-12	Globoso a apiculado, liso 2,0-2,5 µm	Biverticilado; CYA 25 °C branco com centro cinza e reverso palha; MEA 25 °C cinza com rajado de branco; CYA 37 °C branco com reverso bege	02
P124	22-23	19-20	0	Subgloboso, funamente rugoso 1,5-2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza claro com borda mais escuro e reverso bege; MEA 25 °C cinza azulado com centro rosado e miolo palha, reverso amarelado	01
P125	32-33	38-39	0	Subgloboso, liso 1,5-2,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C verde com centro rosa, reverso com centro marrom avermelhado e exsudato avermelhado; MEA 25 °C cinza, com centro funiculoso	01
P126	30-31	30-31	0	Subgloboso a elipsoidal, liso 2,0-4,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA e MEA 25 °C verde escuro, reverso branco com centro laranja, exsudato transparente no CYA	02
P127	27-30	30-32	0	Globoso a subgloboso, liso 1,5-2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado claro com centro mais escuro, reverso bege e exsudato transparente; MEA 25 °C cinza esverdeado com reverso marrom avermelhado e pigmentação avermelhada	03
P129	22-24	33-34	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza esverdeado com reverso amarelo; MEA 25 °C cinza esverdeado, bordas irregulares, reverso palha com manchas amarelas	01
P130	36-37	40-42	0	Elipsoidal, finamente rugoso 3,0-4,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado com borda e centro amarelados, reverso mostarda, exsudato e pigmentação amarelos; MEA 25 °C verde escuro com reverso bege escuro	01
P131	40-42	50-52	0	Globoso, liso a finamente rugoso 2,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C cinza com centro branco, reverso amarelo; MEA 25 °C verde escuro com centro flocoso, reverso palha amarelado	03
P132	26-27	31-33	0	Globoso, liso 2,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C verde escuro com borda turquesa e centro flocoso branco; MEA 25 °C verde acinzentado, reverso palha com centro laranja	06
P135	29-30	30-34	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza com centro mais escuro, reverso amarelo e exsudato transparente; MEA 25 °C cinza azulado e reverso marrom claro	02
P137	19-21	32-34	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C branco amarelado com reverso amarelo; MEA 25 °C cinza esverdeado com centro flocoso e reverso amarelado	01
P138	19-20	27-29	0	Globoso, liso	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado com centro amarelo e miolo rosado,	01

				2,0 µm	reverso amarelo; MEA 25 °C cinza esverdeado com borda irregular e reverso bege	
P139	27-29	22-24	0	Globoso, finamente rugoso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C azul esverdeado escuro com borda mais clara e centro cinza, reverso amarelado e exsudato transparente; MEA 25 °C verde azulado com borda turquesa e centro flocoso, reverso bege alaranjado	05
P142	54-55	51-52	0	Elipsoidal, liso 3,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C verde escuro com borda mais clara e reverso branco; MEA 25 °C verde escuro com reverso bege	01
P143	22-26	21-22	0	Elipsoidal, liso 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado com reverso, pigmentação e exsudato amarelos; MEA 25 °C cinza azulado com reverso alaranjado	01
P144	22-23	34-35	0	Globoso, rugoso 2,0-3,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C branco com centro cinza escuro e miolo branco, reverso bege; MEA 25 °C verde acinzentado com borda mais clara	02
P145	39-40	22-23	0	Subgloboso, liso 2,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C cinza escuro com centro mais claro, reverso branco com centro amarelado; MEA 25 °C cinza esverdeado com reverso palha com manchas alaranjadas	01
P146	32-34	27-32	12-13	Subgloboso a apiculado, liso 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C amarelo esverdeado claro com centro e borda brancos, reverso bege; MEA 25 °C branco amarelado, reverso palha com centro alaranjado; CYA 37 °C branco com reverso palha	01
P147	19-20	14-15	0	Globoso, rugoso 2,5-3,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C verde escuro, reverso palha com centro alaranjado; MEA 25 °C verde escuro com centro e reverso laranja	01
P148	21-24	31-32	11-12	Subgloboso a apiculado, finamente rugoso 2,5-3,0 µm	Mono/Biverticilado; CYA 25 °C cinza claro, reverso amarelado e exsudato transparente; MEA 25 °C branco com centro cinza azulado claro	01
P149	45-47	40-45	5-6	Globoso, liso 2,0-2,5 µm	Biverticilado; CYA 25 °C branco com centro amarelo acinzentado, reverso bege, exsudato transparente; MEA 25 °C amarelo claro com branco, reverso amarelado	02
P150	40-41	48-50	0	Globoso, rugoso, em cadeias 1,5-3,0 µm	Monoverticilado, vesiculado; CYA 25 °C verde escuro com centro flocoso acinzentado, reverso amarelado; MEA 25 °C cinza escuro com centro funiculoso mais claro	01
P151	22-23	38-42	18-21	Subgloboso a apiculado, finamente rugoso 2,0-2,5 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza claro com borda azulada, reverso palha amarelado; MEA 25 °C cinza esverdeado	01
P152	36-38	31-32	7-8	Subgloboso a apiculado, liso 2,0-3,0 µm	Mono/Biverticilado; CYA 25 °C bege com borda verde claro e branca, reverso amarelado; MEA 25 °C bege claro com borda azulada	01
P154	33-35	25-26	0	Subgloboso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C com centro nude e borda branca e azulada, reverso nude alaranjado claro; MEA 25 °C cinza azulado com centro palha	01

P155	35-36	29-30	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C branco com centro acinzentado, reverso bege rosado; MEA 25 °C cinza	01
P156	38-43	45-50	0	Globoso, liso 2,0-4,0 µm	Monoverticilado, vesícula com septo na base e mais larga no ápice; CYA 25 °C verde escuro com centro flocoso, reverso amarelado; MEA 25 °C cinza esverdeado escuro com centro funiculoso mais claro	04
P157	25-27	40-47	14-17	Subgloboso a apiculado, finamente rugoso 2,0-3,0 µm	Monoverticilado; CYA 25 °C cinza com reverso bege; MEA 25 °C cinza esverdeado com centro flocoso; CYA 37 °C branco com reverso nude rosado	01
P158	46-47	50-52	7-8	Subgloboso a elipsoidal, 2,0-3,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde escuro, reverso palha e exsudato transparente; MEA 25 °C verde acinzentado; CYA 37 °C rosa com borda branca	01
P160	32-33	36-37	0	Globoso, liso 2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza azulado com borda branca, reverso e pigmentação amarelos; MEA 25 °C verde acinzenado com reverso marrom avermelhado	01
P161	20-21	12-18	0	Globoso, finamente rugoso 1,5-2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C cinza claro com centro cinza mais escuro, reverso palha; MEA 25 °C cinza azulado	01
P162	27-28	18-19	0	Globoso, liso 1,5-2,0 µm	Biverticilado; CYA 25 °C verde escuro com borda azulada e branca, reverso palha; MEA 25 °C verde escuro com centro flocoso	27

Apêndice C - Placas de cromatografia de camada delgada para teste de micotoxinas.



(A) Teste de citrinina nos isolados de *Penicillium* agrupados como seção Citrina; (B) teste de aflatoxinas nos isolados de *Aspergillus flavus*; (C) teste de ocratoxina A, aflatoxinas e citrinina nos morfotipos não identificados de *Aspergillus* (A01, A02 e A03). P – ponto central onde foi colocado o padrão da toxina. Fonte: do autor (2018).

CAPÍTULO 3

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS DOS GÊNEROS
Aspergillus, *Penicillium*, *Talaromyces* E *Paecilomyces* ISOLADOS DE SOLO DE MATA
ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

RESUMO: O presente trabalho avaliou a capacidade de fungos filamentosos isolados de solo de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero para produzir enzimas e testou as condições ótimas para produção em fermentação submersa da enzima que apresentou maiores índices enzimáticos. Foi avaliado o índice enzimático para produção de lipase, celulase e pectinase de 142 isolados de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* armazenados na coleção de cultura do Departamento de Ciências de Alimentos - UFLA, sendo considerados bons produtores de enzimas os isolados com índice enzimático maior que 2,0. A enzima pectinase apresentou maior número de isolados produtores e também maiores valores de índice enzimático, sendo escolhida para fermentação submersa junto com o morfotipo P51. A atividade enzimática de pectinase foi avaliada pela produção de exopoligalacturonase. Na otimização para produção da enzima exo-PG, tempo de fermentação foi apontado com maior influência no processo, sendo o pH a variável que menos influenciou. Maiores produções podem ser obtidas em ampla faixa de pH (3,0 a 11,0), desde que tempo e temperatura sejam utilizados em menores valores, menor que 40 dias e 18°C.

Palavras-chave: metabólitos microbianos, pectinase, celulase, lipase, DCCR

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores potenciais para diversas reações e a busca por essas substâncias para uso industrial tem crescido muito nos últimos tempos, sendo que a maioria das enzimas comerciais vem sendo obtidas através do metabolismo microbiano (ALBERTO et al., 2016).

Embora as enzimas possam ser obtidas de diferentes fontes de plantas e animais, as enzimas de fontes microbianas tem ganhado o mercado industrial. Microrganismos apresentam vantagens atrativas e ideais processo devido a sua grande diversidade, crescimento em menor tempo e maior suscetibilidade a manipulações genéticas (SILVA et al., 2005; GONÇALVES et al., 2012).

Enzimas microbianas são utilizadas em diversos tipos de processos industriais como produção de detergentes, alimentos, papel, indústria têxtil, farmacêutica, produção de oleoquímicos, biocombustíveis, e os fungos filamentosos são os microrganismos mais utilizados para essa finalidade (GUIMARÃES et al., 2006; SHARMA et al., 2017).

Vários tipos de enzimas produzidos por culturas microbianas são produzidas em escala comercial. Existem inúmeros fatores envolvidos na triagem e seleção de cepas microbianas para a produção de enzimas, como o tipo de técnica de fermentação, fermentação sólida e fermentação submersa, número e tipo de enzimas produzidas, Ph e características de estabilidade térmica das enzimas e composição genética dos isolados (AMIN et al., 2019).

Dentre as enzimas produzidas por microrganismos podemos destacar as celulases, lipases, pectinases, hemicelulases, proteases e amilases como as mais utilizadas nos processos

biotecnológicos e os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium* são geralmente considerados como seguros (GRAS) e produzem enzimas extracelulares de fácil recuperação (BHAT, 2000; MRUDULA & ANITHARAJ, 2011).

A procura por novos microrganismos que apresentem potencial de produção de metabólitos secundários de interesse industrial e biotecnológico que possam ser utilizados nos mais diversos processos tecnológicos se torna muito interessante do ponto de vista científico, econômico e tecnológico.

Com isso o objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes isolados de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* quanto a produção das enzimas lipase, celulase e pectinase e otimizar a produção da enzima com maiores índices enzimáticos em fermentação submersa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Os fungos utilizados para análise de produção de enzimas foram previamente isolados de amostras de solo sob vegetação de Mata Atlântica coletadas na Mina do Córrego do Feijão na cidade de Brumadinho-MG, uma área pertencente a VALE S/A, situada dentro do Quadrilátero Ferrífero, e estão armazenados na coleção de cultura do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência de Alimentos da UFLA.

Os isolados foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar malte 2% (20,0 g de Extrato de Malte; 15,0 g de Ágar e 1000 mL de Água Destilada), incubados a 25° C por 7 dias.

2.2 Screening dos isolados para produção de lipase, celulase e pectinase

Foi avaliado o potencial de 142 isolados de fungos filamentosos para produção de lipase, celulase e pectinase, sendo 131 de *Penicillium*, 6 de *Aspergillus*, 2 de *Talaromyces* e 3 de *Paecilomyces*. O *screening* foi realizado por meio de ensaio de difusão em meio sólido, que consiste em cultivar os isolados em meios específicos para produção de cada enzima e avaliar a presença de halos de degradação nos meios utilizados.

Os isolados foram repicados com auxílio de um palito estéril no centro de placas de Petri contendo os meios específicos, conforme descrito abaixo.

2.2.1 *Screening para produção de lipase (SIERRA, 1975)*

O meio de cultura utilizado para o teste de lipase foi composto de 10,0g de peptona, 5,0g de NaCl, 0,1g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 20,0g de ágar, 10,0ml de Tween 80 e 1000ml de água destilada. O Tween e foi esterilizado separadamente e adicionado no meio já estéril e resfriado, sendo ambos esterilizados a 121°C por 15 minutos. As placas com os isolados foram incubadas a 25°C por 7 dias e a atividade enzimática foi considerada positiva para lipase nas placas que apresentaram um halo opaco ao redor da colônia.

2.2.2 *Screening para produção de celulase (KASANA et al., 2008)*

O meio de cultura utilizado para o teste de celulase foi composto de 2,0g de carboximetilcelulase (CMC), 2,0g de NaNO_3 , 1,0g de K_2HPO_4 , 0,5g de KCl, 0,5g de MgSO_4 , 0,2g de peptona, 18g de ágar, 1000ml de água destilada. A CMC foi previamente diluída em água destilada para hidratação e melhor homogeneização no meio. O restante dos reagentes foi adicionado e o meio de cultura foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Após o repique dos isolados as placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. Para avaliação da produção de celulase, cerca de 10ml de solução de lugol foram vertidos nas placas e descartados após 20 minutos. Foram considerados produtores de celulase os isolados que apresentaram uma zona clara ao redor da colônia em contraste com a coloração escura do lugol.

2.2.3 *Screening para produção de pectinase (MARCHI et al., 2009)*

A avaliação da produção de pectinase foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foi utilizado um meio de cultura contendo 2,0g de KH_2PO_4 , 7,0g de K_2HPO_4 , 1,0g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6g de extrato de levedura, 3,0g de pectina cítrica, 18,0g de ágar e 1000ml de água destilada (pH 7,2). As placas com os isolados foram incubadas a 25°C por 5 dias. Após esse período foi retirado um *plug* de aproximadamente 6,0mm do centro da colônia e transferido para o centro de placas de Petri com meio de cultura contendo 7,74g de ácido cítrico, 17,93g de Na_2HPO_4 , 2,5g de pectina cítrica, 18,0g de ágar e 1000 ml de água destilada (pH 6,0). As placas foram incubadas a 40°C por 48 horas. Para avaliação da produção de pectinase, cerca de 10ml de solução de lugol foram vertidos nas placas e descartados após 20 minutos. Foram considerados produtores de pectinase os isolados que apresentaram uma zona clara ao redor da colônia em contraste com a coloração escura do lugol.

2.2.4 Determinação do índice enzimático (IE)

Após avaliação da produção de enzimas, foi realizada a medição dos halos de degradação e das colônias dos isolados. O índice enzimático foi calculado pela relação entre o diâmetro do halo de degradação enzimática e o diâmetro da colônia, medidos com régua (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Após a análise semi-quantitativa da atividade enzimática foi selecionada a enzima que apresentou maior produção, sendo essa utilizada no ensaio fermentativo.

2.3 Otimização da produção de pectinase

O isolado que apresentou melhor IE para pectinase foi submetido a fermentação submersa para avaliação da atividade enzimática e otimização das condições de produção da enzima.

Para isso foi utilizado um delineamento central composto rotacional (DCCR) utilizando software Chemoface (versão 1.61) e os resultados foram avaliados através de superfície de resposta. Foram avaliadas 3 variáveis independentes (tempo, temperatura e pH) em 5 níveis diferentes, e como variável resposta (dependente) foi avaliada atividade de exo-PG. Foram utilizados erlenmeyers de 250 ml com 100ml de solução Manachini (descrita no item 2.1.1) em diferentes valores de pH e incubados em diferentes temperaturas e tempos de fermentação, conforme descrito na tabela 2.1.

O planejamento experimental foi composto de 17 ensaios com 3 repetições no ponto central (Tabela 2.2) e os resultados foram analisados estatisticamente através do software Chemoface (versão 1.61).

Tabela 2.1 – Variáveis do delineamento experimental com valores reais e codificados.

Variável		-1,68	-1,0	0	+1,0	+1,68
Tempo (h)	X ₁	24	53,14	96	138,86	168
Temperatura (° C)	X ₂	10	18,09	30	41,90	50
pH	X ₃	2,5	4,22	6,75	9,28	11

Tabela 2.2 – Matriz do delineamento experimental.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (° C)	pH
1	53	18	4,22
2	53	18	9,28
3	53	42	4,22
4	53	42	9,28
5	139	18	4,22
6	139	18	9,28
7	139	42	4,22
8	139	42	9,28
9	24	30	6,75
10	168	30	6,75
11	96	10	6,75
12	96	50	6,75
13	96	30	2,5
14	96	30	11
15	96	30	6,75
16	96	30	6,75
17	96	30	6,75

2.3.1 Condições de cultivo e obtenção do extrato enzimático

O isolado foi repicado em placas de Petri contendo meio ágar malte 2% incubadas a 25° C por 7 dias. Foi preparada uma solução de esporos do isolado utilizando uma solução de Tween 80 a 0,1%. A solução foi adicionada nas placas e as colônias foram raspadas com auxílio de uma alça de Drigalsky. Em seguida a mistura foi filtrada em gaze estéril e a concentração da solução de esporos foi avaliada em microscópio utilizando câmara de Neubauer.

A fermentação submersa foi realizada em erlenmeyers de 250ml contendo 100ml solução Manachini (10,0g de pectina cítrica, 2,0g de KH_2PO_4 , 1,0g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,9g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0g de extrato de levedura, 1000ml de água destilada, MANACHINI et al., 1987), sendo os valores de pH definidos pelo delineamento experimental (Tabela 2.1). Foi inoculado 1,0ml de solução de esporos a 10^7 esporos/ml, resultando na concentração final de 10^5 esporos/ml, e os frascos foram incubados em shaker a 120rpm nas condições de tempo e temperatura anteriormente estabelecidas.

Em cada tempo de coleta as amostras foram filtradas, centrifugadas e o extrato enzimático obtido foi congelado para posterior análise.

2.3.2 Determinação da atividade enzimática de pectinase

Para determinar a atividade enzimática foi avaliada a atividade da enzima exopoligalacturonase. A análise da atividade de exo-PG foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Schwan e Rose (1994) em triplicata e o método de Miller (1959) foi utilizado para construção da curva de calibração do ácido galacturônico. A reação foi realizada em tubos de ensaio contendo 1,0ml de solução de ácido poligalacturônico 0,01% (em tampão citrato 0,1M pH 5,0) e 1,5ml do extrato enzimático, incubados em banho-maria a 40° C por 1 hora. Após esse período foi adicionado 1,5ml de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e os tubos foram colocados em banho em água em ebulição por 5 minutos. Os tubos foram resfriados em banho de gelo e foi realizada medição da absorbância, em temperatura ambiente, a 575nm.

Para controle, o extrato enzimático foi substituído por 1,5ml de solução Manachini nos diferentes valores de pH e para o branco foi substituído por água destilada.

A atividade de exo-PG (U) foi expressa como μmol de equivalentes de ácido galacturônico liberados por minuto de reação, nas condições de ensaio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Screening dos isolados para produção de lipase, celulase e pectinase

Os ensaios em placas são semi-quantitativos e dão uma ideia aproximada da produção de enzimas pelos fungos. Foi avaliado o potencial de 131 isolados de *Penicillium*, 6 de *Aspergillus*, 2 de *Talaromyces* e 3 de *Paecilomyces*. Como são considerados bons produtores os isolados que apresentam índice enzimático (IE) acima de 2,0, a tabela 3.1 mostra os resultados obtidos para os morfotipos que se destacaram na produção de pelo menos uma das enzimas avaliadas.

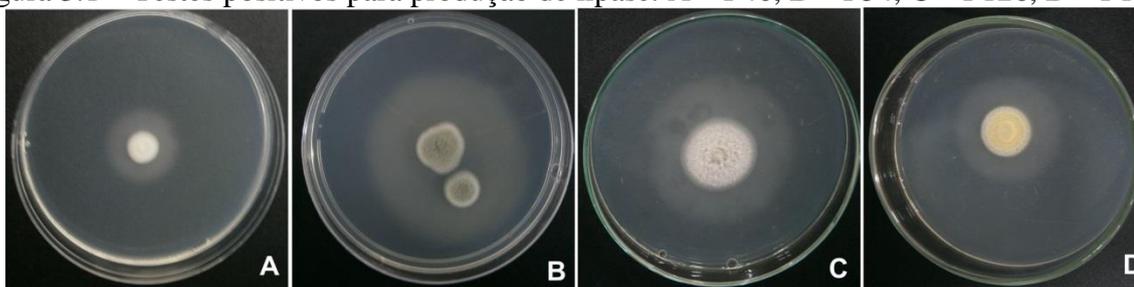
Tabela 3.1 – Índice enzimático de isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* avaliada para produção de lipase, celulase e pectinase. (continua)

Morfortipo/Espécie	Índice Enzimático		
	Lipase	Celulase	Pectinase
P11	0,00	0,00	3,00
P22	0,00	2,33	1,71
P23	0,00	1,27	3,25
P26	0,00	1,36	3,38
P28	1,52	1,52	3,00
P31	0,00	1,13	3,22
P36	0,00	0,00	3,25
P40	2,27	0,00	1,63
P48	0,00	2,38	2,44
P50	0,00	1,65	3,33
P51	1,73	1,63	3,67
P53	0,00	1,23	3,00
P54	2,94	1,38	2,50
P66	0,00	1,35	3,67
P71	0,00	2,33	2,63
P82	0,00	0,00	3,00
P91	0,00	NA	3,11
P94	0,00	NA	3,13
P95	0,00	0,00	3,00
P101	0,00	0,00	3,00
P114	NA	1,32	3,22
P126	2,0	1,42	2,56
P130	2,16	1,17	2,50
P131	1,68	1,23	3,00
P144	NA	1,31	3,00
A01	1,13	1,06	3,50
<i>P. aurantiogriseum</i>	NA	1,24	3,00
<i>P. sclerotiorum</i>	NA	NA	3,11
<i>A. flavus</i>	1,11	1,06	3,67
<i>A. parasiticus</i>	1,12	NA	4,22
<i>A. niger</i>	1,36	1,09	3,00

Índice enzimático = relação entre diâmetro do halo e diâmetro da colônia. NA – não avaliado. Fonte: Do autor, 2018.

Na avaliação de produção de lipase, apenas 28 dos isolados analisados foram capazes de crescer no meio específico e também apresentaram atividade enzimática, observada através da formação de um halo opaco ao redor da colônia (Figura 3.1), sendo que os morfortipos P40, P54, P126 e P130 apresentaram IE maior que 2,0.

Figura 3.1 – Testes positivos para produção de lipase. A – P40, B – P54, C – P126, D – P130.



Fonte: Do autor (2018).

Lipases são consideradas triacilglicerolester hidrolases que atuam na clivagem do triacilglicerol, resultando em moléculas de glicerol e ácidos graxos, apresentando um papel importante em aplicações industriais como laticínios, indústrias de detergentes, óleos, solventes orgânicos e biocombustíveis, sendo dada uma atenção maior às lipases microbianas devido as suas propriedades e estabilidade (SHARMA et al., 2017b; SHREYA et al., 2018).

Colen et al. (2006) cita uma dificuldade na avaliação da atividade lipolítica pelo método de difusão em placas para isolados que produzem pigmentos, pois como a atividade lipolítica é avaliada pela presença de um halo opaco ao redor da colônia, sua avaliação pode ser comprometida por pigmentos produzidos pelos fungos. Porém, não foi encontrada essa dificuldade no presente trabalho, uma vez que os isolados avaliados não apresentaram pigmentação no meio utilizado, mesmo os que apresentaram coloração intensa no reverso da colônia nos meios de cultura CYA e MEA, como P28, P51, P54 e P40.

Melo et al. (2018) avaliaram a produção de lipase e celulase por fungos isolados de três amostras de solo e três amostras de folhas em região do Cerrado brasileiro. Foram obtidos 28 isolados de fungos filamentosos no total, sendo a maioria pertencente ao filo *Ascomycota*. Os isolados identificados como *Trichoderma* sp. e *Colletotrichum boninense* apresentaram as maiores atividades celulolíticas, porém apenas *C. noninense* apresentou índice enzimático maior que 2,0. Para a atividade lipolítica, foram realizados dois testes em temperaturas diferentes. Todos os isolados apresentaram atividade em pelo menos um teste e 11 apresentaram atividade em apenas um teste, mostrando que a temperatura influencia na produção de lipase pelos fungos testados.

Não só a temperatura, mas diversos fatores ligados às condições de cultivo podem influenciar no crescimento do fungo e na produção de lipase, assim como de outras enzimas e metabólitos. A cepa utilizada, composição do meio, fontes de carbono, fontes de nitrogênio e pH são alguns dos fatores que afetam os resultados obtidos. Por isso, a pesquisa para identificar as melhores condições de crescimento de um fungo e produção de um metabólito

específico pode auxiliar no estabelecimento de parâmetros para obtenção de máximo rendimento em uma aplicação biotecnológica (COLEN et al., 2006; SHREYA et al., 2018).

Sharma et al. (2017a) utilizaram uma técnica de mutagênese induzida no gênero *Cunningamella* através da exposição do fungo a um agente mutagênico químico (ácido nítrico) por um tempo prolongado e observaram um aumento de 11% na atividade lipolítica em comparação com isolado selvagem. Isso mostra a importância do isolamento, identificação e armazenamento de microrganismos, a partir dos quais podem ser realizados testes biotecnológicos bem como a busca pela melhoria e aumento da produção de substâncias de interesse.

Na avaliação de produção de celulase 66 isolados de *Penicillium* (50,38%) apresentaram atividade enzimática, observada pela presença de um halo mais claro ao redor da colônia quando em contato com o lugol (Figura 3.2) e os morfotipos P22, P48 e P71 se destacaram por apresentar bom índice enzimático. Os morfotipos A01, A02, A03, Pae3, Pae4 e as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* também apresentaram atividade enzimática, porém seus índices enzimáticos foram todos abaixo de 2,0. Dos demais isolados testados 8 cresceram mas não apresentaram halo de degradação, indicando uma baixa atividade enzimática e os demais não foram capazes de crescer no meio específico de celulose.

Figura 3.2 – Testes positivos para produção de celulase. A – P22, B – P48, C – P71.



Fonte: Do autor (2018).

Em um levantamento da atividade celulolítica de fungos isolados de diferentes materiais realizado por Damaso et al. (2012), a maioria dos fungos que apresentaram atividade enzimática foram isolados de amostras de solo, apontando o solo como uma importante fonte de fungos para estudos biotecnológicos. Do total de 215 isolados avaliados apenas 14 apresentaram atividade celulolítica e os isolados com maiores atividades enzimáticas pertencem aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Em trabalho realizado por Imran et al. (2018), no qual foi avaliada a produção de celulase por fungos filamentosos isolados de diferentes substratos, foram testados 23 isolados pertencentes a quatro gêneros diferentes (*Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus* e *Penicillium*). Dos isolados testados 19 apresentaram atividade celulolítica, porém os índices enzimáticos apresentaram valores próximos de 1,0, o que indica que alguns isolados testados no presente trabalho podem ser muito mais promissores para produção de celulase.

Khokhar et al. (2012) também avaliaram produção de celulase por difusão em meio sólido e, dos 17 isolados avaliados, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*, apenas 8 apresentaram atividade celulolítica, com índices de atividade enzimática também em torno de 1,0, sendo que *P. citrinum* e *P. simplicissimum* não apresentaram nenhuma atividade.

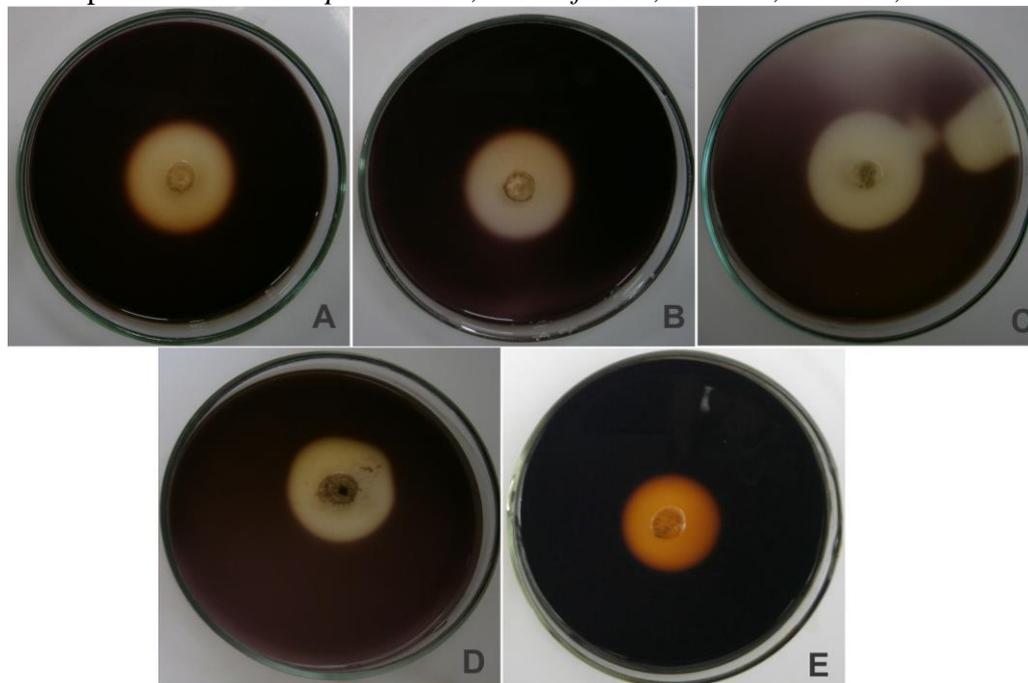
A pectinase foi a enzima que apresentou maior número de isolados com potencial para sua produção. Dos 134 isolados que apresentaram atividade positiva, 6 são do gênero *Aspergillus* (A01, A02, A03 *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. niger*), 3 do gênero *Paecilomyces* (Pae02, Pae03 e Pae04) e os demais do gênero *Penicillium*. Foi observado índice enzimático acima de 2,0 para 119 isolados, sendo que 15 apresentaram IE maior que 3,0. Dentre esses podemos destacar *A. parasiticus*, *A. flavus*, P51, P66, A01 com os maiores índices (Figura 3.3), porém *A. parasiticus* e *A. flavus* são produtores de aflatoxinas, não sendo indicados para produção de enzimas de uso alimentício. Os morfotipos P03, P76, P93 e P98 não foram capazes de crescer no meio com pectina e o morfotipo P104 cresceu, mas não apresentou halo de degradação.

Em trabalho realizado por Loperena et al. (2012) foi avaliado o potencial enzimático de microrganismos isolados de substratos marinhos da antártica. Foram testados 10 isolados de fungos filamentosos, os quais apresentaram atividade enzimática para lipase e celulase, mas não apresentaram produção de pectinase, o que mostra a importância de se pesquisar e definir qual tipo de microrganismo é mais indicado para produção de uma substância específica.

Observando diversos estudos realizados para avaliar atividade enzimática de fungos filamentosos, podemos confirmar o acerto na escolha do substrato e dos gêneros utilizados no presente trabalho, uma vez que *Aspergillus* e *Penicillium* se destacam na maioria das vezes como bons produtores de enzimas, tendo o solo como principal substrato de isolamento. Vale destacar que, no presente trabalho, vários isolados apresentaram índices enzimáticos acima de

2,0, com alguns apresentando índices até acima de 3,0, estando muito além de testes apresentados na literatura.

Figura 3.3 – Morfotipos que apresentaram maior índice enzimático no teste para produção de pectinases. A – *A. parasiticus*, B – *A. flavus*, C – P51, D – P66, E – A01.



Fonte: Do autor (2018)

A busca por enzimas altamente ativas e mais termoestáveis tem aumentado cada vez mais, o que reforça a importância de pesquisas com potencial enzimático de microrganismos. Os morfotipos que apresentaram atividade enzimática positiva podem produzir enzimas com parâmetros cinéticos importantes para aplicações biotecnológicas específicas, sendo indicada a realização de estudos de otimização e caracterização dessas enzimas (KHOKHAR et al., 2012; DUARTE et al., 2018).

3.2 Otimização para produção de pectinase

Os isolados de *A. parasiticus*, *A. flavus*, P51 e P66 apresentaram os maiores índices enzimáticos para pectinase (Tabela 3.1). *A. parasiticus* e *A. flavus* são fungos micotoxigênicos produtores de aflatoxinas, o que impossibilita de serem utilizados para produção de enzimas para utilização em alimentos. O morfotipo P66 não pode ser recuperado do armazenamento, então o morfotipo P51 foi selecionado para o teste avaliação e otimização da produção de pectinase em fermentação submersa.

A tabela 3.2 apresenta a matriz do delineamento experimental com os valores reais e as respostas para atividade de exo-PG para cada condição.

Tabela 3.2 – Matriz do delineamento experimental e atividade enzimática para exopoligalacturonase.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (° C)	pH	Atividade de Exo-PG (U/ml)		
				1	2	3
1	53	18	4,22	0,32	0,29	0,30
2	53	18	9,28	0,31	0,31	0,31
3	53	42	4,22	0,17	0,19	0,18
4	53	42	9,28	0,19	0,18	0,19
5	139	18	4,22	0,03	0,03	0,03
6	139	18	9,28	0,14	0,13	0,13
7	139	42	4,22	0,24	0,22	0,23
8	139	42	9,28	0,22	0,25	0,23
9	24	30	6,75	0,38	0,34	0,34
10	168	30	6,75	0,05	0,05	0,05
11	96	10	6,75	0,31	0,28	0,30
12	96	50	6,75	0,13	0,15	0,15
13	96	30	2,5	0,03	0,03	0,03
14	96	30	11	0,05	0,05	0,05
15	96	30	6,75	0,09	0,12	0,09
16	96	30	6,75	0,10	0,09	0,09
17	96	30	6,75	0,10	0,10	0,08

Com os resultados obtidos foram determinados os coeficientes de regressão para os dados experimentais, sendo que todos os parâmetros do modelo foram significativos. A relação entre as condições de cultivo e a atividade enzimática foi ajustada e o modelo quadrático conseguiu descrever bem essa relação.

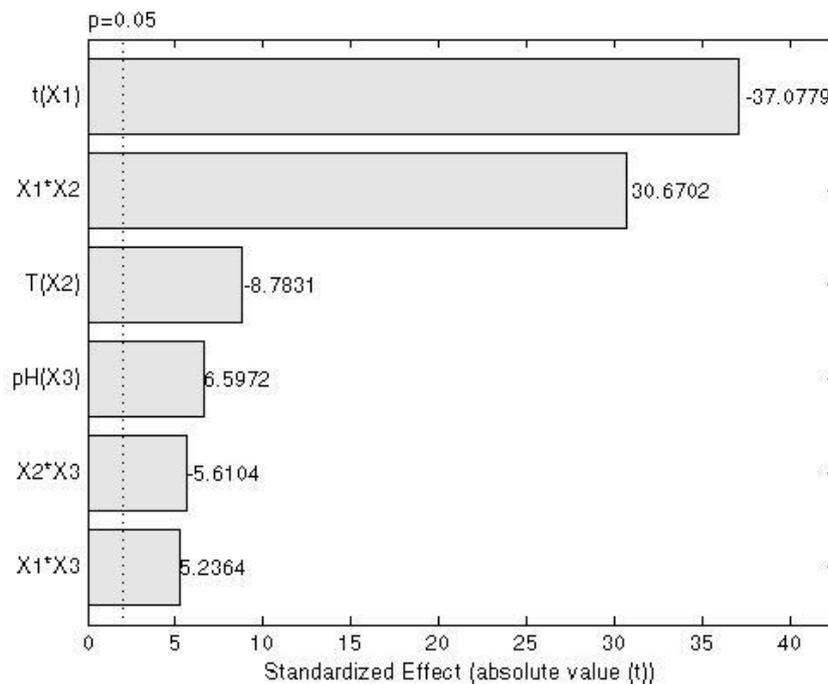
A equação a seguir apresenta o modelo obtido para a atividade de exo-PG:

$$ExoPG = 1,1192 - 0,0111t + 2,5668 \cdot 10^{-5}t^2 - 0,0340T + 3,7843 \cdot 10^{-4}T^2 + 0,0277pH - 0,0016pH^2 + 1,3392 \cdot 10^{-4}t \cdot T + 1,0759 \cdot 10^{-4}t \cdot pH - 4,1501 \cdot 10^{-4}T \cdot pH$$

sendo t – tempo de fermentação, T – temperatura de fermentação, pH – pH do meio de fermentação, em valores codificados, e o valor de variação explicada (R^2) igual a 0,86, mostrando boa concordância entre valores de atividade enzimática experimentais e preditos pelo modelo.

Com o diagrama de Pareto (Figura 3.4) pode ser avaliado a significância e o tipo de efeito de cada parâmetro de cultivo sobre a atividade enzimática. Todas as variáveis analisadas e também suas interações apresentaram efeito significativo sobre a produção de exo-PG pelo isolado de P51 ($p > 0,05$).

Figura 3.4 – Diagrama de Pareto com efeito do tempo (t), temperatura (T), pH e suas interações sobre a atividade enzimática de exo-PG.

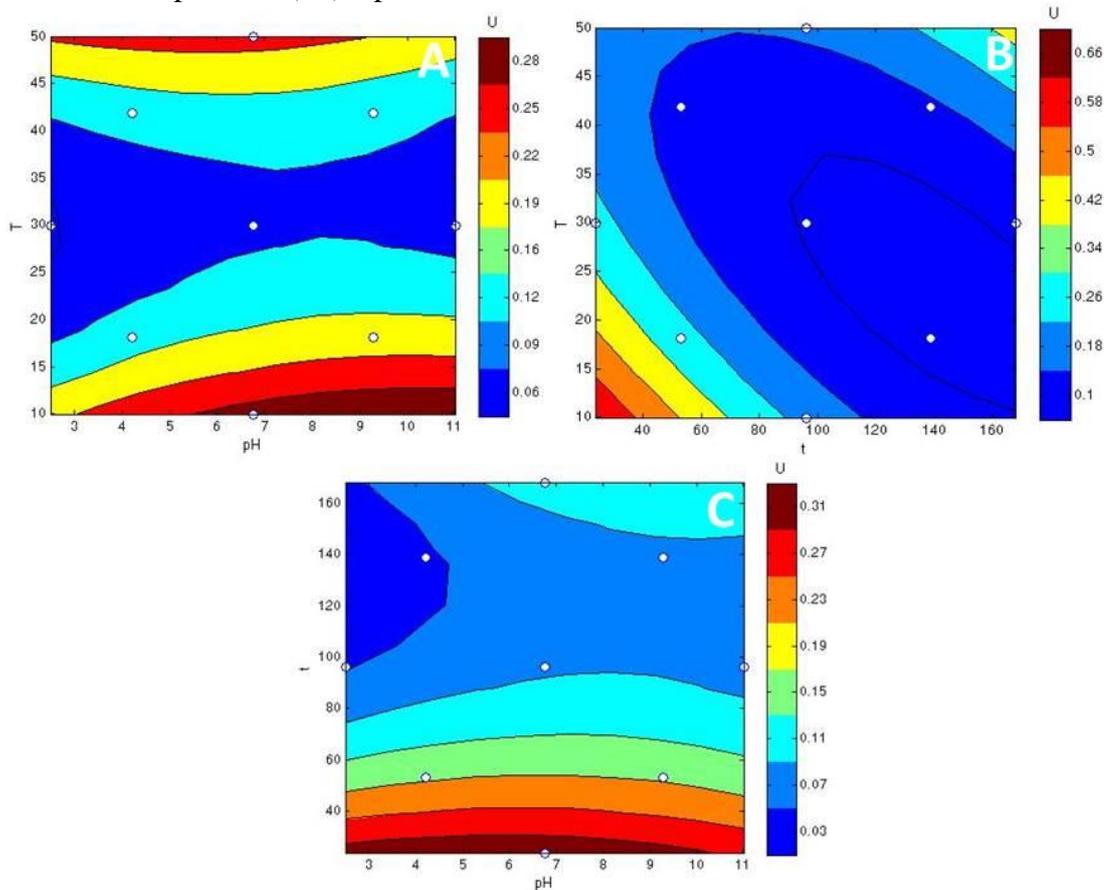


Fonte: Autor, 2019.

Dentre as variáveis analisadas, o tempo de cultivo foi a que mais influenciou na atividade enzimática. Como o efeito dessa variável foi negativo, quanto menor o tempo de cultivo maior a atividade enzimática. As variáveis tempo de cultivo e temperatura apresentaram efeito isolado negativo e interação positiva, o que leva a maior produção da enzima em níveis menores de temperatura e tempo. A variável pH também apresentou influência sobre a atividade enzimática, sendo que a atividade aumenta de acordo com o aumento do pH.

As curvas de contorno apresentadas na figura 3.5 mostram melhor as condições ótimas de cultivo considerando as três variáveis analisadas.

Figura 3.5 – Curvas de contorno em função da interação entre as variáveis tempo (h), temperatura (°C) e pH sobre a atividade da enzima exo-PG.



Fonte: Autor, 2019.

Com as curvas de contorno podemos observar a máxima produção de exo-PG (0,66 U/ml) pelo morfotipo P51 em condições inferiores de tempo e temperatura (abaixo de 40 dias e 15 °C). Nessas condições, melhores valores de pH para maiores atividades enzimáticas estão em torno de 6,0 a 9,0. Ao contrário, em faixas de temperatura em torno de 20 a 40° C, tempo acima de 90 horas e obtém-se baixa produção da enzima em pH menor que 6,0.

Okafor et al. (2010), avaliando isolados de *A. niger* e *P. chrysogenum* encontraram maiores valores de atividade pectinolítica com 48 horas de fermentação. Menores tempos de fermentação são ideais do ponto de vista industrial, uma vez que refletem diretamente na produtividade e valor econômico.

A diminuição da produção da enzima com o aumento do tempo pode ser explicada pelo esgotamento de nutrientes, uma vez que Bastos et al. (2013) conseguiram aumentar essa produção com suplementação de meio de cultivo. O mesmo comportamento pode ser observado por Fernandes (2014) que, avaliando espécies de diferentes gêneros também obteve redução na produção de exo-PG com o passar do tempo. Além dessa hipótese, Barman et al.

(2015) também defendem a hipótese da inativação da enzima com o avanço do tempo, já que sua atividade pode ser perdida devido a desnaturação da estrutura 3D das proteínas ao longo do tempo. Valendo ressaltar que o tempo de fermentação depende da característica do substrato e também das condições de cultivo exigidas por cada microrganismo utilizado.

A temperatura se relaciona diretamente com atividades metabólicas do microrganismo, influenciando assim no seu crescimento e produção de enzimas (MANKARIOS & FRIEND, 1980). Os fungos do gênero *Penicillium* possuem um crescimento ótimo em torno de 25° C, porém, os resultados obtidos apontaram uma melhor produção enzimática em temperaturas abaixo de 18° C. Isso pode ser devido a alguma condição de cultivo exigida pelo isolado em estudo que foge do padrão para o gênero, sendo indicado o cultivo em diferentes temperaturas para avaliar o seu crescimento.

O pH do meio de cultivo exerce influência no tipo e conteúdo das enzimas produzidas pelo fungo. Banu et al. (2010)

A composição do meio, principalmente as fontes de carbono e nitrogênio, influencia diretamente na produção de enzimas. Os valores encontrados para máxima produção de exo-PG pelo morfotipo P51 se apresentaram superiores quando comparados a *P. roqueforti* e enzima comercial testados por Fernandes (2014) em fermentação em estado sólido. Por outro lado, vários autores obtiveram valores de atividade enzimática bem maiores do que os encontrados no presente trabalho. Muito deles avaliaram a atividade enzimática específica, que leva em consideração o teor de proteínas, sendo indicada a realização desse cálculo para melhor comparação.

Pedrolli et al. (2008), avaliando a produção de poligalacturonase por *Aspergillus giganteus* em fermentação submersa em meio Vogel, encontraram uma atividade enzimática de 3,09 U/ml e 4,03 U/ml, com 6 e 4,5 dias de fermentação, respectivamente. Patil et al. (2010) isolaram *Penicillium* sp. de solo e encontraram uma atividade máxima de 8,39 U/ml. Munir et al. (2019), avaliando fungos isolados de diferentes frutos, obtiveram máxima produção de exo-PG, 24,57 U/ml, a partir de *A. tamarii* isolado de sapoti e utilizando polpa de sapoti em pó como substrato.

A produção de enzimas por microrganismos é um processo sensível a pequenas mudanças nos parâmetros do processo, o que torna importante o conhecimento do microrganismo utilizado, bem como das suas condições ótimas de produção, afim de que se obtenha o máximo rendimento de produção em processos em maior escala.

4 CONCLUSÃO

Os isolados avaliados apresentaram valores expressivos de índice enzimático para produção de pectinase, sendo escolhido o morfotipo P51 para avaliação da produção da enzima exo-poligalacturonase.

O tempo foi o fator que mais influenciou na atividade de exo-PG pelo isolado do morfotipo P51. As condições ótimas para produção de exo-PG foram tempo abaixo de 40 horas, temperatura abaixo de 15°C e pH na faixa de 6,0 e 9,0.

5 REFERÊNCIAS

ALBERTO, R. N., et al. Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. **Gen. and Mol. Research**, v. 14, n. 4, 2016.

AMIN, F. BHATTI, H. N., BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases— A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1017-1026, 2019.

BARMAN, S. et al. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. **J Food Sci Technol**, v. 52, n. 6, p.3579-3589, 2015.

BASTOS, S. C., et al. Pectinases from a new strain of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries isolated from coffee bean. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 2, 2013.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, V. 22, P. 881-885, 2006.

DAMASO, M. C. T. et al. Selection of cellulolytic fungi isolated from diverse substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 513-520, jul-aug 2012.

DIÁZ, A. B. et al. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 72-78, 2012

DOCO, T.; WILLIAMS, P.; CHEYNIER, V. Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. **J. Agriv. Food Chem.**, v. 55, p. 6643-6649, 2007.

DUARTE, A. W. et al. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s0030-0-018-2387-1>

FERNANDES, A. P. 2014. Aproveitamento de resíduos de processamento via seca e via úmida do café para obtenção de pectinases. Tese (Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, 136f. Universidade federal de Lavras, 2014.

GONÇALVES, D. B., et al. Use of response surface methodology to optimize production of pectinases by recombinant *Penicillium griseoroseum* T20, **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v. 1, n. 2, p. 140-146, 2012.

GUIMARÃES, L. H. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 37, n. 4, p.474-480, 2006.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

IMRAN, M. et al. Production and characterization of commercial cellulase produced through *Aspergillus niger* immis1 after screening fungal species. **Pak. J. Bot.**, v. 50, n. 4, p. 1563-1570, 2018.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Curr. Microbiol.**, v. 57, p. 503-507, 2008.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 3, p. 219-224, 1987.

KHOKHAR, I. et al. Isolation and screening of highly cellulolytic filamentous fungi. **J. Appl. Sci. Environ. Manage**, v. 16, n. 3, p. 223-226, 2012.

LOPERENA, L. et al. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 2249-2256, 2012).

MANKARIOS, A. T.; FRIEND, J. Polysaccharide degrading enzymes of *Botrytis allii* and *Sclerotium cepivorum*: enzyme production in culture and the effect of the enzymes on isolated onion cell walls. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 17, p. 92-104, 1980.

MARCHI, C. E. et al. Atividade pectinolítica de *Colletotrichum gloeosporioides* e a relação com a agressividade ao *Stylosanthes* spp. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 423-433, 2009.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MELO, M. et al. Cellulolytic and lipolytic fungi isolated from soil and leaf litter samples from the Cerrado (Brazilian Savanna). **Rev. Biol. Trop.**, v. 66, n. 1, p. 237-245, 2018.

MRUDULA. S., ANITHARAJ, R. Pectinase production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. **Glob. J. Biotechnol. Biochem.**, v. 6, p. 64-71, 2011.

MUNIR, M. et al. Isolation and identification of multi stress tolerant polygalacturonase producing fungi from various fruits. **The J. Anim. Plant Sci.**, v. 29, n. 4, 2019.

PATIL, N. P.; CHAUDHARI, B. L. Production and purification of pectinase by soil isolate *Penicillium* sp and search for better agro-residue for its SSF. **Recent Research in Science and Technology**, V. 2, N. 7, P. 36-42, 2010.

PEDROLI, D. B. et al. Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 144, p. 191-200, 2008.

POVEDA, G. et al. Cold-active pectinolytic activity produced by filamentous fungi associated with Antarctic marine sponges. **Biological Research**, v. 51, n. 28, 2018.

REYNOLDS, A. G.; KNOX, A.; DI PROFIO, F. Evaluation of macerating pectinase enzyme activity under various temperature, pH and ethanol regimes. **Beverages**, v. 4, n. 10, 2018.

SCHWAN, R. F.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. **Journal of App. Bacteriology**, v. 76, p. 62-67, 1994.

SHARMA, A. K.; KUMARI, S.; SHARMA, V. Effect of nitrous acid treatment on lipase production by local soil fungal isolate. **Plantica**, v. 1, n. 2, p. 61-69, 2017a.

SHARMA, A. K., SRIVASTAVA, V.; SHARMA, V. A review on screening of extracellular hydrolytic enzyme producing microorganisms. **Plantica**, v. 1, n. 2, p. 37-48, 2017b.

SHREYA et al. Optimization of culture conditions for extracellular fungal lipase production by submerged fermentation process. **Plant Science Today**, v. 5, n. 3, p. 135-141, 2018.

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

SILVA, E. G. et al. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Res.**, v. 5, n. 9, p. 859-865, 2005.