

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

FLÁVIA CRISTINA J. P. F. LUIZ

IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DE TALCOS COMERCIAIS COSMÉTICOS

CURITIBA
2010

FLÁVIA CRISTINA J. P. F. LUIZ

IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DE TALCOS COMERCIAIS COSMÉTICOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal
do Paraná, como pré-requisito à obtenção de grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Tania Maria Bordin Bonfim
Co-orientadoras: Prof^a Dr^a. Cyntia M. Telles F. Picheth
Prof^a Dr^a Débora Brand

CURITIBA
2010

A Deus, minha família e meus amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade.

Ao curso de especialização em Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Paraná pelo financiamento, o qual foi essencial para a realização deste trabalho.

À orientadora Prof^a. Dr^a. Tânia Maria Bordin Bonfim e co-orientadoras Prof^a. Dr^a. Débora Brand e Prof^a. Dr^a. Cyntia Telles Fadel-Picheth, pela oportunidade, orientação, ensinamentos e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Márcio Chimelli pela orientação nas fotos

A Cibelle Borba Dellagassa pela ajuda nas análises de biologia molecular.

Aos colegas de laboratório Fernanda Gaensly, Gisele Peixer Leitão, Bruna Augustini e Daniel Braga pelo grande apoio, paciência, compreensão e companheirismo.

Aos meus pais, Lidia e Osni, pela vida, amor incondicional e por todos os valores que me ensinaram e cultivam em mim.

Aos meus irmãos Vitor e Lucas pela companhia e apoio.

Ao meu marido Cristiano pelo amor e paciência.

Aos meus tios Eni e Jesualdo, pelo amor e carinho.

A minha avó Ludovica, pelas preces e amor.

A Suzana Rauen Davet pela compreensão e amizade.

A minha antiga colega de faculdade Odivânia Kruger e a Gisela Bontorim, amigas do peito, agradeço pelo apoio, confiança, paciência, grande afinidade, companheirismo, pelos conselhos, críticas, compreensão, por terem me segurado no momento de cair e, sobretudo pela amizade.

Às minhas grandes amigas e madrinhas, Juliana Tanaka e Gisah Kuster.

Aos colegas de trabalho, Marina, Nanda, Carol, Andrezza, Ivanna, Greicy, Klézia e Juliana, mais especialmente a Richard A. S. Schwarzer e a Tiago Martinello pela confiança, pela compreensão nas minhas ausências e por sempre me incentivarem.

A Deus, que sempre esteve ao meu lado, dando-me oportunidades incríveis na vida, proteção, força, determinação e fé para alcançar meus objetivos.

Só um lembrete do Quintana...

'A vida é o dever que nós trouxemos para fazer em casa.

Quando se vê, já são seis horas!

Quando se vê, já é sexta-feira...

Quando se vê, já terminou o ano...

Quando se vê, perdemos o amor da nossa vida.

Quando se vê, já se passaram 50 anos!

Agora é tarde demais para ser reprovado.

Se me fosse dado, um dia, outra oportunidade, eu nem olhava o relógio.

Seguiria sempre em frente e iria jogando, pelo caminho, a casca dourada e inútil das horas.

Desta forma, eu digo: ***Não deixe de fazer algo que gosta devido à falta de tempo, a única falta que terá será desse tempo que infelizmente não voltará mais.*** '

Mário Quintana

RESUMO

O mercado cosmético investe continuamente em novas formulações adequando a velocidade dos lançamentos às exigências de qualidade e segurança. Neste sentido nota-se o interesse em formulações que utilizem uma quantidade menor de conservantes dada à relação destes com a ocorrência de reações adversas. A diminuição da atividade de água pode vir a contribuir para a segurança microbiológica de um produto que utilize menos conservantes. No entanto, fungos filamentosos apresentam resistência em ambientes com pouca água disponível, como por exemplo, talcos cosméticos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos filamentosos de diferentes talcos comerciais e realizar a identificação morfológica e molecular destes micro-organismos. Foram isolados sete fungos filamentosos, obtidos a partir de cinquenta amostras de talcos cosméticos oriundas de três marcas diferentes, apresentando atividade de água variando entre 0,458 – 0,491. Em relação às características macroscópicas, a determinação da velocidade de crescimento radial foi semelhante em cinco fungos dos sete isolados. Ainda na identificação morfológica macroscópica foram observados cor, aspecto e formação de exsudato das colônias. Dentre os fungos isolados, cinco apresentaram características de cor e aspecto semelhantes entre si, um fungo filamentoso apresentou aspecto diferente e outro se diferenciou pela coloração da colônia. Na análise microscópica observando-se as estruturas reprodutivas foi possível diferenciar os micro-organismos em três gêneros, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. A identificação molecular foi realizada pelo sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal. Os resultados permitiram classificar um dos fungos filamentosos isolados como *Aspergillus fumigatus*, outro como pertencente ao gênero *Cladosporium sp.* e os demais como pertencentes ao gênero *Penicillium sp.*

palavras-chave: Fungos filamentosos. Talcos cosméticos. Identificação morfológica. Região ITS.

ABSTRACT

The cosmetic market continually invests in new formulations combining product launch to quality and security requirements. In this sense, there is interest in formulations with less preservative content due to its potential to cause adverse reactions. The reduction of water activity can contribute to microbiology security of products with less preservative. On the other hand, filamentous fungi present high resistance to environments with small amount of available water, for example, in cosmetics powders. Therefore, this study aimed to isolate filamentous fungi of different commercial cosmetic powders and perform morphological and molecular identification. Seven fungi were isolated from fifty samples of cosmetic powders of three different brands, with water activity ranging from 0.458 to 0.491. According to macroscopic evaluation, radial velocity determination was similar in five out of the seven fungi analyzed. Aspect, color and exudates formation were also included regarding morphological macroscopic analysis. Among the isolated fungi, five presented similar color and aspect, one presented different aspect and the other had a different colony coloration. In microscopic analysis, the observation of the reproductive structures made feasible the differentiation of the microorganisms in three genera, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Molecular identification was performed through sequence analysis of ribosomal DNA ITS region. The results allowed the classification of one of the isolated filamentous fungi as *Aspergillus fumigatus*, another one belonging to genus *Cladosporium* sp., and the remaining belonging to genus *Penicillium* sp.

key words: Filamentous fungi. Macroscopic and microscopic identification. ITS region.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UMA COLÔNIA DE FUNGO FILAMENTOSO EM SEUS DIFERENTES ESTÁGIOS DE DIFERENCIAÇÃO DURANTE O CRESCIMENTO RADIAL.....	28
FIGURA 2 -	MAPA DAS REGIÕES DE rDNA DE FUNGOS.....	32
FIGURA 3 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 4 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK.....	48
FIGURA 4 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 4 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE.....	48
FIGURA 5 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 5 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK.....	49
FIGURA 6 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 5 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE.....	49
FIGURA 7 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 9 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK.....	49
FIGURA 8 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 9 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE.....	49
FIGURA 9 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 10 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK.....	50
FIGURA 10 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 10 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE.....	50
FIGURA 11 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 11 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK.....	50
FIGURA 12 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 11 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE.....	50
FIGURA 13 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 12 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK.....	51
FIGURA 14 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 12 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE.....	51
FIGURA 15 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 13 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK.....	51

FIGURA 16 -	CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 13 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE.....	51
FIGURA 17 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 4 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 36 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO DE 400X.....	53
FIGURA 18 -	FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DO MICÉLIO VEGETATIVO E AÉREO DO FUNGO FILAMENTOSO 4 COM 24 HORAS DE CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE, AUMENTO DE 100X.....	53
FIGURA 19-	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 5 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 96 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO DE 400X.....	54
FIGURA 20 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 9 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO DE 400X.....	54
FIGURA 21 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 11 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO 400X.....	54
FIGURA 22 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 12 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO DE 400X.....	54
FIGURA 23 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 10 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO DE 400X.....	55
FIGURA 24 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 13 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO.....	55
FIGURA 25 -	ELETOFORESE DE DNA EXTRAÍDO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....	57
FIGURA 26 -	ELETOFORESE DOS PRODUTOS DE PCR.....	58

FIGURA 27 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 4 COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK.....	60
FIGURA 28 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 5 COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK.....	61
FIGURA 29 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 9 COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK.....	63
FIGURA 30 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 10 COM UMA DAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADA NO GENBANK.....	64
FIGURA 31 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 11 COM AS TRÊS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK.....	65
FIGURA 32 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 12 COM AS TRÊS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK.....	67
FIGURA 33 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 13 COM AS TRÊS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	LIMITES INFERIORES DE ATIVIDADE DE ÁGUA PARA O CRESCIMENTO MICROBIANO.....	27
TABELA 2 -	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS	43
TABELA 3 -	VALORES DE ATIVIDADE DE ÁGUA DOS TALCOS COSMÉTICOS A 27°C.....	45
TABELA 4 -	NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR GRAMA E RELAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE DIFERENTES TALCOS COMERCIAIS COSMÉTICOS.....	47
TABELA 5 -	VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL (mm.h^{-1}) DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS CULTIVADOS NOS MEIOS SÓLIDOS EXTRATO DE MALTE E CZAPECK.....	52
TABELA 6 -	SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 4.....	60
TABELA 7 -	SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 5.....	61
TABELA 8 -	SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 9.....	62
TABELA 9 -	SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 10.....	64
TABELA 10 -	SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 11.....	65
TABELA 11 -	SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 12.....	66
TABELA 12 -	SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 13.....	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 SETOR DE COSMÉTICOS NO BRASIL.....	17
3.2 DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	23
3.3 ATIVIDADE DE ÁGUA	25
3.4 RECONHECIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAIS	34
4.2 MÉTODOS GERAIS.....	34
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA DE TALCOS COMERCIAIS COSMÉTICOS	36
4.4 MEIOS DE CULTURA	36
4.4.1 Caldo nutriente	36
4.4.2. Meio Sabouraud Dextrose 4%.....	37
4.4.3 Meio Extrato de Malte.....	37
4.4.4 Meio Czapeck.....	37
4.5 DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....	38
4.6 CONSERVAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS	38
4.7 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS ASSEXUADOS (CONÍDIOS)	38
4.8 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL DOS FUNGOS FILAMENTOSOS	39
4.8.1 Características macroscópicas e determinação do crescimento radial	39
4.8.2 Características microscópicas	40
4.9 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS	40
4.9.1 Extração de DNA dos fungos filamentosos isolados	40
4.9.1.1 Cultivo dos fungos filamentosos isolados.....	40
4.9.1.2 Extração do DNA.....	41
4.9.1.3 Extração do DNA com o emprego de kit comercial	42
4.9.2 Análise do DNA purificado.....	42
4.9.3 Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	42
4.10. Sequenciamento dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 ATIVIDADE DE ÁGUA	45
5.2 DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....	46
5.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL DOS FUNGOS FILAMENTOSOS	47
5.3.1 Características macroscópicas.....	47
5.3.2 Determinação do crescimento radial	51
5.3.3 Características microscópicas.....	52
5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS	56
5.4.1 Extração de DNA dos fungos filamentosos isolados	56
5.4.2 Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	58
5.4.3 Sequenciamento dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase	59

5.4.3.1 Fungo filamentosos 4.....	59
5.4.3.2. Fungo filamentosos 5.....	61
5.4.3.3. Fungo filamentosos 9.....	62
5.4.3.4. Fungo filamentosos 10.....	63
5.4.3.5. Fungo filamentosos 11.....	65
5.4.3.6. Fungo filamentosos 12.....	66
5.4.3.7. Fungo filamentosos 13.....	68
6. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A indústria de cosméticos exige frequentes lançamentos para garantir a competitividade da empresa. Acompanhar tendências e necessidades dos consumidores implica em agilidade no desenvolvimento de novos produtos com qualidade (BONTORIM, 2009). É grande o investimento em novas formulações que possuam menor quantidade de conservantes, dada a frequência com que estes são relacionados à ocorrência de reações adversas (LUNDOV, MICHALE DYRGAARD *et al.*, 2009). Um dos meios de reduzir o uso destas matérias-primas, e ainda assim manter o produto pouco suscetível a contaminações microbianas implica na diminuição da atividade de água da formulação. Entretanto, fungos filamentosos possuem grande resistência a ambientes com pouca atividade de água (DITCHFIELD, 2000). Nas áreas de cosméticos e alimentos, por exemplo, a contaminação por fungos filamentosos e valores de atividade de água é relacionada havendo, ainda hoje, a busca de alternativas para evitar a contaminação dos produtos.

O uso pelo consumidor de produtos cosméticos sem considerar as orientações do fabricante pode causar contaminações e danos à própria saúde, mesmo se o produto sair da fábrica dentro dos limites de aceitação microbiológica preconizados pelo órgão regulador (BRANNAN; DILLE, 1990). Os danos que um produto contaminado pode causar, tanto em pessoas saudáveis, quanto em pessoas debilitadas, podem ser sérios. Em 2005, foi relatado um incidente com o bacilo *Burkholderia cenocepacia*, proveniente de um enxaguatório bucal contaminado que foi aplicado a 116 pacientes com doenças no trato respiratório, causando duas mortes. Foi relatado que tal produto não possuía a concentração do conservante declarado (KUTTY *et al.*, 2007). Percebe-se, desta forma, que é importante a qualidade dos produtos e a identificação dos micro-organismos nos casos de contaminações por patogênicos ou não, a fim de certificar-se dos riscos e precauções necessários para evitar outras contaminações.

A identificação de fungos filamentosos por características morfológicas macroscópicas ou microscópicas é muito utilizada, requer experiência por parte do pesquisador, principalmente devido ao fato de que as características dos fungos em desenvolvimento podem mudar consideravelmente dependendo do meio e das

condições a que estão expostos. As características macroscópicas e microscópicas podem ser muito semelhantes entre as espécies, podendo levar a resultados errôneos de identificação. (FISHER; DOTT, 2002).

A aplicação de técnicas moleculares na identificação de fungos filamentosos é cada vez mais acessível e visa, principalmente, a análise do gene que codifica para o DNA ribossomal. Nesta região, a sequência de interesse correspondente aos Espaçadores Internos Transcritos (ITS), devido ao seu alto grau de variabilidade entre espécies e, em alguns casos, entre cepas de mesma espécie (ANDERSON; PARKIN, 2007).

O fato de produtos cosméticos contaminados estarem em circulação no mercado, e que produtos com pouca atividade de água, entre eles os talcos comerciais cosméticos, serem produtos de uso pela população de todas as faixas etárias, o presente trabalho visa a identificação morfológica e molecular de fungos filamentosos isolados de talcos cosméticos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar fungos filamentosos isolados de talcos comerciais cosméticos por características morfológicas e sequenciamento da região ITS, que flanqueia o rDNA 5.8S e se encontra entre os rDNA 18S e 28S.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar fungos filamentosos de talcos comerciais cosméticos selecionados no mercado;

Determinar as características morfológicas macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos isolados;

Determinar o crescimento radial dos fungos filamentosos isolados;

Realizar a identificação molecular dos fungos filamentosos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SETOR DE COSMÉTICOS NO BRASIL

Segundo Minamoto, (2010) cosméticos são produtos com ação leve no corpo, aplicado por esfregaço ou aspensão do produto, com o objetivo de limpar, embelezar, alterar a aparência ou manter a pele e o cabelo em boas condições.

A Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) exibiu um crescimento médio de 10,6% em 13 anos, de 1996 a 2008. Apresentou um faturamento *ex-factory* (preço do produto na saída da fábrica, sem impostos) de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 21,7 bilhões em 2008. Os fatores que contribuíram para este aumento são a participação crescente da mulher no mercado de trabalho, a utilização de novas tecnologias com o aumento da produtividade, lançamentos constantes de novos e atrativos produtos e o aumento da expectativa de vida, o que traz a necessidade de “conservar a juventude”. Em 2008 produtos de banho, onde estão incluídos os talcos cosméticos, representaram 9,7% do faturamento dos produtos cosméticos vendidos no Brasil, só sendo menores do que produtos descartáveis (11,8%), fragrâncias (14,8%) e cabelos (24,9%) (ABIHPEC, 2009).

Em 2009, o faturamento de higiene e beleza no Brasil cresceu 14,75% com relação a 2008, chegando a R\$ 24,970 bilhões *ex-factory*, confirmando que a crise econômica mundial de 2008, não atingiu este setor no Brasil (ABIHPEC, 2009).

Os talcos são produtos cosméticos que contêm no mínimo 80% da matéria-prima silicato (talco), podendo ser colorido ou perfumado. Para crianças, os talcos são destinados a proteger a pele, especialmente contra irritações e assaduras, podem ser levemente perfumados, mas não podem conter corantes ou partículas palpáveis, matérias estranhas ou sujidades (BRASIL, Brasília, 1977).

A resolução 481 de 23 de setembro de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, é a legislação vigente para o controle microbiológico de cosméticos no Brasil. Esta resolução estabelece que os produtos cosméticos sejam classificados em duas classes: Classe I que engloba produtos infantis, produtos para a área dos olhos e para mucosas; e Classe II, que engloba os demais produtos

cosméticos. Esta legislação estabelece para os produtos da classe I, um máximo de 100 UFC.mL⁻¹ ou g de produto, de micro-organismos mesófilos aeróbios totais, que engloba bactérias, fungos filamentosos e leveduras. A classe II exige o máximo de 1.000 UFC.mL⁻¹ ou g de produto. Para ambas as classes de produtos é obrigatória a ausência das bactérias patogênicas *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e de coliformes fecais e totais em 1 g ou ml de produto. Também são realizadas, exclusivamente para talcos, as análises do micro-organismo *Clostridium sulfito* redutores, onde também é obrigatória a ausência em 1 g ou ml de produto (BRASIL, 1999).

Poucas matérias-primas utilizadas na fabricação de produtos farmacêuticos são estéreis quando fornecidas, e um tratamento especial pode ser necessário antes do uso. Fatores como controle do meio ambiente e sanitização, limpeza de equipamentos e boas práticas pessoais de higiene são vitais na manufatura farmacêutica para minimizar as contaminações microbiológicas. A natureza e a frequência de testes microbiológicos variam conforme o produto (USP, 2002).

Por mais de 20 anos os microbiologistas focaram seus estudos na microbiologia bacteriana de alimentos e não deram importância necessária ao crescimento de fungos filamentosos. Há vários modelos que permitem o estudo de crescimentos microbianos, como o modelo cardinal descrito por Rosso *et al.* (1993 e 1995 apud NEVAREZ *et al.*, 2009), utilizado no estudo de Nevarez, *et al.*, 2009 do fungo filamentoso *Penicillium glabrum*, comum em contaminações de alimentos.

Nos anos 60 e 70 houve uma preocupação com a contaminação de cosméticos que continham grande quantidade de água na formulação. Regulamentações e legislações começaram a serem criadas nos Estados Unidos e na Europa para a aplicação de conservantes em cosméticos. Além disso, a implementação das boas práticas de fabricação, já utilizada anteriormente pela indústria farmacêutica, começou a ser aplicada na indústria cosmética (LUNDOV, MICHAEL DYRGAARD *et al.*, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, divulga periodicamente a lista de conservantes permitidos e os limites de utilização de cada um deles. No entanto, ainda não caracterizou legalmente a necessidade da realização do *challenge test* durante o desenvolvimento do produto e nem mesmo o controle lote a lote do teor de conservantes dos produtos. Durante o desenvolvimento de uma nova formulação utiliza-se o *challenge test* para assegurar que o sistema conservante

utilizado é eficiente para garantir a qualidade microbiológica do produto. O principal fundamento do *challenge test* é baseado no conceito de medir a habilidade de sobrevivência de determinados micro-organismos que são propositalmente introduzidos em um sistema de conservantes. A duração dos testes varia entre 28 dias para cosméticos a 12 semanas para produtos farmacêuticos (YABLONSKI; MANCUSO, 2007).

Teores de conservantes acima dos valores permitidos podem aumentar o número de reações adversas como alergias, irritações dérmicas, entre outras que o produto pode causar durante o uso pelos consumidores. Enquanto baixos teores podem permitir a contaminação microbiológica do produto podendo vir a ocasionar doenças. A correta utilização de conservantes pode evitar a contaminação dos cosméticos durante todo o processo de fabricação, armazenamento, distribuição e uso durante seu prazo de validade. Mesmo durante sua vida de prateleira (*shelf life*) a contaminação do produto cosmético pode danificá-lo e ainda representar um risco iminente ao usuário devido ao contato direto do produto com a pele (LUNDOV, MICHALE DYRGAARD *et al.*, 2009). Pack *et al.*, (2008) verificaram a contaminação de máscara para cílios por micro-organismos presentes no próprio cílio das mulheres. Foi detectada a presença de bactérias e fungos em 36,4% dos cosméticos analisados. Este estudo confirma a necessidade de realização de testes antes e após o lançamento do produto, a fim de assegurar a concentração mínima de conservantes necessários para a integridade do produto durante o uso pelo consumidor.

As reações adversas causadas pelos produtos cosméticos são um problema conhecido. É relatado que aproximadamente 6% da população possui reações adversas a cosméticos, principalmente produzidas por conservantes ou fragrâncias e é dependente da concentração dos mesmos. No entanto, as alergias causadas por produtos cosméticos, não são exclusivamente produzidas pelos conservantes, ou pela falta de qualidade do produto, e sim pela predisposição do usuário em desenvolver tal quadro clínico, como tipo de pele, sensibilidade, doenças, entre outros (LUNDOV, MICHALE DYRGAARD *et al.*, 2009).

Outra preocupação do consumidor e da indústria cosmética é a contaminação microbiológica dos produtos disponíveis para serem testados pelo consumidor nas lojas, os *testers*. O fato de várias pessoas utilizarem esses produtos propicia a contaminação dos mesmos e o uso, após a contaminação, pode causar problemas

com outros consumidores. Mislivec *et al.* estudaram 3027 produtos cosméticos recolhidos de 171 estabelecimentos de vendas nos Estados Unidos, quanto à sua contaminação por fungos. Foi detectado que cerca de 14% dos produtos estavam contaminados com fungos e cerca de 32% dos isolados eram fungos patogênicos. Tran e Hitchins (1994), realizaram o mesmo estudo, mas pesquisando bactérias. Foi detectado que 50% dos produtos de teste analisados apresentavam contaminação com estes micro-organismos, sendo 60% dos isolados bactérias da flora da pele. No entanto houve a detecção de *Pseudomonas aeruginosa* em 0,07% dos isolados.

O conservante ideal para produtos cosméticos é solúvel em água, atóxico, inodoro, incolor, não irritante, efetivo em uma ampla faixa de pH e capaz de inibir o crescimento e o desenvolvimento de grande número de bactérias e fungos. No entanto, não há preservante que cumpra com todos estes requisitos. Parabenos (metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno e etilparabeno), derivados de formaldeído e metilcloroisotiazolinona/metilisotiazolinona foram os conservantes mais utilizados nos últimos 20 anos (LUNDOV, MICHAEL DYRGAARD *et al.*, 2009). Atualmente muitos destes conservantes estão proibidos ou somente é permitido o uso em mínimas quantidades. A resolução 162 de 11 de setembro de 2001 estabelece a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Sessenta substâncias são listadas como permitidas, assim como a concentração máxima autorizada, limitações e condições de uso e advertências. O álcool benzílico (1%), 2-fenoxietanol (1%), parabenos (0,4% expresso como éster para 1 éster ou 0,8% para misturas dos sais e ésteres), triclosana (0,3%), imidozolidiluréia (0,6%), metilcloroisotiazolinona/metilisotiazolinona (0,0015%) são alguns conservantes e limites descritos na resolução (BRASIL, 2001).

A criação de cosméticos que não possuem conservantes em sua formulação (*preservative free*) ou produtos que possuem matérias-primas com habilidades antimicrobianas, porém não são declaradas como conservantes (*self-preservatives*), são, sem dúvida, de interesse para muitas indústrias cosméticas. Estes produtos possuem um forte apelo de marketing por reduzirem a incidência de reações adversas aos consumidores devido à ausência dos conservantes (VARVARESOU *et al.*, 2009). A habilidade de um produto cosmético ser mais susceptível ou não à contaminação depende de alguns fatores como: a embalagem (quanto menor o contato do produto com o ar e com o consumidor, menor é a chance de contaminação); o pH da formulação (um produto com valores de pH maior ou menor

dificulta a possibilidade de contaminação microbiana, porém é inviável a utilização de produtos cosméticos com valores extremos de pH); a implementação das boas práticas de fabricação; a forma da emulsão (teoricamente uma emulsão óleo/água é mais susceptível à contaminação do que uma formulação água/óleo); presença de ingredientes anti-microbianos multifuncionais (óleos essenciais, extratos, álcool, surfactantes e quelantes, que podem possuir atividades anti-microbianas, porém não são considerados conservantes) e a atividade de água do produto (MISLIVEC; BANDLER; ALLEN, 1993; VARVARESOU *et al.*, 2009).

Produtos com pouca atividade de água têm sido formulados e estudados pelas indústrias cosméticas (LINTNER; GENET, 1999) e alimentícia (LAROCHE; FINE; GERVAIS, 2005) para minimizar a utilização de conservantes e a possibilidade de contaminação microbiológica. A existência de contaminação microbiológica em produtos com pouca atividade de água, como talcos, pós faciais, blushs, sombras, entre outros foi relatada por Mislivec *et al* (1993).

As bactérias requerem maior quantidade de água disponível para seu desenvolvimento, seguido das leveduras e depois dos fungos filamentosos. A atividade de água de um produto pode ser reduzida com a adição de algumas substâncias com capacidade de se ligar à água, como polióis, amino-ácidos, hidrolisados de proteínas e hidrocolóides (VARVARESOU *et al.*, 2009). Foi relatado por Fine e Gervais (2003) a detecção de esporos e células vegetativas em produtos alimentícios em pó, com pouca atividade água. Desta forma pode-se verificar que produtos com pouca atividade água podem possuir esporos e células vegetativas, e que quando em ambiente propício para seu desenvolvimento podem causar danos aos produtos.

Relatos de recalls de produtos cosméticos e alimentos contaminados no mercado são frequentes. Anelich e Korsten (1996), estudaram cremes para as mãos e corpo e creme facial contaminados na África do Sul. Os gêneros mais frequentes encontrados foram *Pseudomonas* (30%), seguido de *Enterobacter* (17%), *Aspegillus* (13%) e *Staphylococcus* (9%). Alvarez-Lerma, *et al.*, (2008), relataram a contaminação de pessoas debilitadas pelo uso de um hidratante corporal que estava contaminado por *Burkholderia cepacia*, bacilo Gram negativo, resistente a vários medicamentos e de grande incidência em ambientes hospitalares. Este estudo demonstra a importância da ausência de micro-organismos em produtos quando

utilizados por pessoas debilitadas, pois o hidratante corporal estava de acordo com os limites para contaminação microbiológica estabelecidos pela legislação europeia.

Na Europa, a RAPEX, Rapid alert system for non-food consumer, contabilizou 173 recalls de diferentes produtos cosméticos durante três anos, dentre estes 24 produtos foram constatados como contaminados por micro-organismos. Dentre os produtos contaminados, dois eram estojos de maquiagem, contendo produtos em pó, porém os micro-organismos isolados destes pós não foram identificados. O micro-organismo de maior incidência dentre as contaminações foi *Pseudomonas aeruginosa* e os demais micro-organismos identificados foram *Candida albicans*, *Burkholderia cepacea*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella oxytoca*, entre outros (LUNDOV, M. D.; ZACHARIAE, 2008).

No Brasil, em 1993, foi publicado um projeto para a criação de um talco cosmético grau farmacêutico para uso infantil com qualidade microbiológica (SAMPAIO; OLIVEIRA, 1993).

A contaminação dos produtos cosméticos é evidenciada pelo descuido do consumidor com o produto. Desta forma as indústrias investem em embalagens para evitar ao máximo o contato do consumidor com o produto. Um estudo realizado em 1990 pela empresa Procter & Gamble, em Ohio, Estados Unidos, analisou três diferentes tipos de fechamento de embalagens para xampus e três diferentes tipos de fechamento de embalagens para loção corporal, em três e duas semanas de estudo, respectivamente. Foi detectado que a contaminação microbiológica realizada após o uso pelos consumidores foi maior nas embalagens de maior exposição dos produtos com o ar e com o consumidor. Os pesquisadores concluíram que mesmo o produto menos protegido quimicamente (por conservantes), tem menor possibilidade de contaminação armazenada em embalagem com maior proteção, do que o produto mais protegido quimicamente em embalagens com menor proteção (BRANNAN; DILLE, 1990).

O Guia de estudo de estabilidade de produtos cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (2004b), recomenda para talcos e outros pós cosméticos, um ambiente livre de umidade, principal fator de danos causados à estes produtos. A umidade pode causar alterações nas características físico-químicas dos produtos, como alteração de cor, odor, sensação tátil e também o surgimento de um ambiente propício para o desenvolvimento de micro-organismos. Desta forma, o consumidor necessita ter a consciência de armazenar bem seus

produtos, pois as indústrias vêm cada vez mais fazendo seu papel pela qualidade e o consumidor deve manter os produtos em boas condições de uso até a expiração do seu prazo de validade.

3.2 DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

As unidades de reprodução dos fungos filamentosos são os conídios capazes de resistir à condições adversas tanto ambientais quanto químicas e podem variar morfológicamente de acordo com a espécie. Variam em tamanho, em cor e em forma e alguns podem apresentar mais de um tipo de conídios sendo característico da espécie (LACAZ *et al.*, 1998).

Em um meio favorável, os conídios absorvem água e nutrientes e então germinam, formando um ou mais tubos germinativos. Este tubo germinativo alonga-se na fração apical formando longos filamentos que podem se ramificar (FUNDER, 1968). Tais filamentos são denominados hifas que são estruturas alongadas, cilíndricas ou tubulares, cobertas por uma membrana, que contém o protoplasma, e fora dela, pela parede celular (HERRERA; ULLOA, 1990). As hifas podem formar uma corrente de células pela formação de uma parede transversal caracterizando as hifas septadas que podem conter um, dois ou mais núcleos. Quando não ocorre a separação, ou esta ocorre apenas na base das estruturas reprodutivas, em hifas com pouca nutrição, velhas ou com danos, elas são denominadas de hifas cenocíticas ou não septadas. A ocorrência de divisão das hifas, assim como a frequência com que ocorrem, é espécie-específica. Enquanto umas hifas são simples e outras complexas, todos os septos se formam de forma centrípeta, de fora para dentro através da parede da hifa. Em muitos casos, um septo já desenvolvido, possui um poro único central no qual o protoplasma da hifa adjacente se faz contínuo e por onde pode ocorrer a passagem de elementos através deste poro, até mesmo núcleos. Pelo formato dos poros e septos das hifas serem considerados conservados pela evolução das espécies, dados obtidos por estudos de ultra-estruturas são importantes em classificações taxonômicas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Embora o micélio vegetativo (aquele que se desenvolve no interior do substrato - meio de cultura - que também tem a função de sustentação e de absorção dos nutrientes) não tenha especificamente funções de reprodução, alguns fragmentos de hifas podem se desprender deste e cumprir funções de propagação e são denominados de taloconídios. O micélio que se desenvolve acima da superfície do meio de cultivo é chamado de micélio aéreo onde normalmente ocorre a reprodução (HERRERA; ULLOA, 1990).

Os fungos filamentosos se reproduzem de duas formas, sexuada e assexuada. Os esporos assexuados provêm de corpos frutíferos que podem ser endógenos, concentrados no interior de um esporângio, ou exógenos que são os conídios e artroconídios. Os esporos sexuados são originados da divisão meiótica de um zigoto, seguido de uma ou mais divisões mitóticas (LOPEZ, 1998).

A reprodução assexuada possui a seguinte sequência: 1) a célula mãe dá origem a um novo artroconídio; 2) fissão das células somáticas em novas células filhas; 3) produção de células somáticas, com produção de um novo indivíduo, e 4) produção de esporos assexuados onde cada um geralmente germina para a formação do tubo germinativo que dá origem ao micélio. Os fungos geralmente empregam a fragmentação como maneira de propagação, o que também é frequente na natureza e no meio laboratorial, onde forças externas podem agir sobre estes micro-organismos, como vento, chuva, força mecânica, entre outros, proporcionando a ruptura do micélio. Quando esta fração atinge um ambiente adequado com condições favoráveis ao desenvolvimento, forma-se um novo indivíduo (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Na reprodução sexuada em fungos filamentosos, ocorre um processo de fusão de duas células sexuais, em três passos. O primeiro passo denomina-se plasmogamia, o segundo cariogamia e o terceiro, meiose. Estes passos ocorrem nesta sequência em épocas específicas da vida do fungo filamentoso. Na plasmogamia, ocorre a união de dois protoplastos, resultando dois núcleos em uma única célula; na cariogamia ocorre à fusão dos dois núcleos, resultando em uma única célula diplóide e na fase da meiose, ocorre a divisão da célula diplóide (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Aspergillus fumigatus é um fungo oportunista presente na atmosfera, sendo considerado de risco para pessoas imunossuprimidas. Podem causar doenças invasivas, e é associado com asma severa e sinusite. Este micro-organismo possui

um ciclo sexual heterotático reprodutivo completo, o que leva à formação de ascósporos e cleistotécio, assim como seu teleomorfo *Neosartorya fumigata* (O'GORMAN; FULLER; DYER, 2009). Outras espécies de *Aspergillus*, importantes na economia e na medicina, tiveram seus ciclos sexuais recentemente descobertos: *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Estes fungos possuem uma fertilidade reduzida, exigem condições específicas para a reprodução sexuada, quando comparada a outros micro-organismos do mesmo gênero, sendo eles heterotáticos ou homotáticos. (KWON-CHUNG; SUGUI, 2009). A reprodução sexuada de *Aspergillus*, não diferencia a hifa que se forma em elemento feminino ou masculino (GEISER, 2009).

Um estudo genético realizado em 2008 sugeriu a existência de um ciclo reprodutivo sexuado para *Penicillium chrysogenum*. O gênero *Penicillium*, possui muitas espécies que se reproduzem assexuadamente. As análises genéticas realizadas permitiram a detecção de genes associados com a reprodução sexual e produção e detecção de feromônios em *Penicillium chrysogenum*, sendo este o primeiro fungo de interesse industrial (produção do antibiótico penicilina) a ter estes genes de reprodução descobertos (HOFF; POGGELER; KUCK, 2008).

3.3 ATIVIDADE DE ÁGUA

O crescimento e o metabolismo dos micro-organismos demandam a presença de água em forma disponível. A medida mais comumente empregada para expressar a disponibilidade de água em produtos, como alimentos, cosméticos ou farmacêuticos, é a atividade água que é baseada na Lei de Raoult's para soluções ideais e não leva em consideração interações com o soluto e outros componentes que não a água (GRANT, 2004).

Os fungos filamentosos podem ser classificados em dois grupos em termos de necessidade de água para seu crescimento e desenvolvimento, podendo ser xerófilos ou não-xerófilos. Fungos xerófilos possuem a capacidade de crescimento em ambientes secos ou em ambientes com grande quantidade de solutos como o sal e o açúcar. Pitt (1975 apud HUANG *et al.*, 2009), definiu fungos xerófilos como micro-organismos que crescem em ambientes com atividade de água abaixo de

0,85. No entanto, Pelhate (1968 apud HUANG *et al.*, 2009), definiu os fungos xerófilos como tendo um crescimento em ambientes com no máximo 0,95 de atividade de água (HUANG *et al.*, 2009).

A influência da atividade de água em micro-organismos é complexa, combinando fatores intrínsecos (potencial nutritivo, pH e compostos antimicrobianos, como dióxido de enxofre, nitratos e nitritos) e ambientais (temperatura, oxigênio, tratamentos químicos e irradiação), os quais variam em função do tipo de produtos e do micro-organismo (LAROUCHE; FINE; GERVAIS, 2005).

Murrel e Scott, (1966), relataram que esporos e células vegetativas são mais resistentes à temperaturas em ambiente, ou produtos secos do que em meios líquidos. Estudos são realizados na área alimentícia, demonstrando a resistência de esporos e células vegetativas em alimentos em pó, mas pouco é relatado em produtos cosméticos. A dificuldade de descontaminação de alimentos em pó é relacionada com a presença de microflora específica adaptada ao desenvolvimento em ambiente com pouca atividade de água. Ambos, esporos e células vegetativas, são encontrados em produtos secos e desidratados (FINE; GERVAIS, 2003).

Em alimentos, os fungos são considerados os organismos vivos mais resistentes a pouca atividade de água, sendo os principais responsáveis pela deterioração dos mesmos na faixa entre 0,60 e 0,71. Isto se deve ao fato de não haver competição com as bactérias nesta faixa de atividade de água (DITCHFIELD, 2000). Porém, para os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicilium* a atividade de água entre 0,980 e 0,994 é considerada ótima para o crescimento (HUANG *et al.*, 2009).

A Tabela 1 indica a atividade de água mínima necessária para o desenvolvimento de alguns fungos filamentosos.

TABELA 1 – LIMITES INFERIORES DE ATIVIDADE DE ÁGUA PARA O CRESCIMENTO MICROBIANO

Micro-organismo	Atividade de água
<i>Aspergillus clavatus</i>	0,85
<i>A. flavus</i>	0,78
<i>A. ochraceus</i>	0,77
<i>A. ochraceus</i>	0,76
<i>A. parasiticus</i>	0,82
<i>Byssochlamys nivea</i>	0,84
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,82
<i>P. expansum</i>	0,83
<i>P. isladicum</i>	0,83
<i>P. martensii</i>	0,79
<i>P. patulum</i>	0,81
<i>P. veridicatum</i>	0,83

Fonte: DITCHFIELD, 2000

A presença de fungos filamentosos em alimentos é fortemente dependente de fatores ambientais. A temperatura, atividade de água e composição do substrato são fatores críticos no crescimento de fungos e na produção de toxinas. Um estudo realizado em 1998 analisou o crescimento do *Penicillium citrinum* e a produção de citrinina (metabólito secundário neurotóxico), variando atividade de água do meio (0,760; 0,775; 0,790; 0,800; 0,810; 0,825 e 0,885) a 30 °C por dois meses. Foi verificado que a produção da toxina foi detectada nos meios com atividade de água maior que 0,800 e que o micro-organismo *Penicillium citrinum* só não apresentou crescimento no meio com atividade água de 0,760 (COMERIO; PINTO; VAAMONDE, 1998).

Uma investigação realizada com amostras de farelo de trigo na Eslováquia detectou 65 diferentes espécies de fungos filamentosos pertencentes a 23 diferentes gêneros. A atividade de água desses farelos de trigo foram medidas e seus valores variaram de 0,45 a 0,64 e as contaminações encontradas foram de $1,82 \times 10^1$ a $3,42 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ sendo que o aceitável para farelos de trigo destinados à

alimentação segundo o autor é de $1,0 \times 10^4$ UFC.g⁻¹. Espécies produtoras de toxinas foram encontradas, sendo que os micro-organismos com maior incidência foram do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, com 100%, 89% e 72% de frequência, respectivamente, seguidas de *Alternaria*, *Fusarium* e *Eurotium* (TANCINOVA; LABUDA, 2009).

O conhecimento do valor de atividade de água colabora com o desenvolvimento de produtos auto preservantes possibilitando a diminuição de testes microbiológicos, concentração de anti-microbianos e os custos finais dos produtos (DECAGON, 2008).

A velocidade de crescimento radial é uma medida intrínseca de cada espécie de fungo filamentosos, em determinadas condições. Ocorre a formação do micélio vegetativo em condições favoráveis para tal, seguido do desenvolvimento de hifas pelo alongamento apical, caracterizando o crescimento do fungo. Alguns parâmetros importantes que influenciam o crescimento dos fungos filamentosos são a quantidade de água disponível, fonte de nutrientes (carbono e nitrogênio), temperatura e presença de oxigênio.

A velocidade de crescimento radial permite a observação das estruturas diferenciadas formadas durante o processo que evoluem do centro até a periferia da colônia (Figura 1).

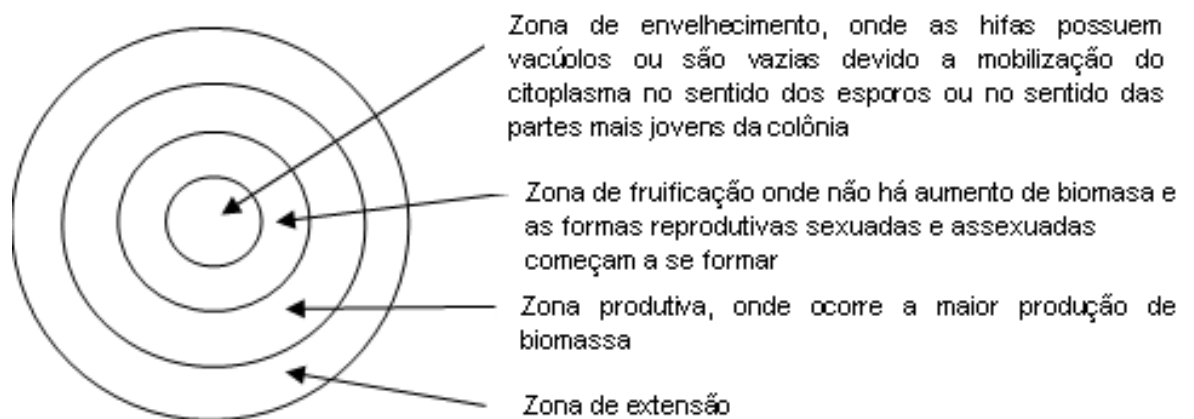


FIGURA 1 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UMA COLÔNIA DE FUNGO FILAMENTOSO EM SEUS DIFERENTES ESTÁGIOS DE DIFERENCIAÇÃO DURANTE O CRESCIMENTO RADIAL
 FONTE: LOPEZ, 1998

Dantigny, *et al.*, (2005), pesquisaram o efeito do etanol no crescimento de fungos filamentosos *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Eurotium herbariorum*, *Mucor circinelloides*, *M. racemosus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum*, *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma harzianum*, utilizando a velocidade de crescimento radial, em meio de cultura Agar Dextrose Batata com atividade de água de 0,99, a 25 °C. O perfil de distribuição das velocidades variou muito entre os micro-organismos, em torno de 0,42 mm.h⁻¹ (*M. Circinelloides*) a 0,04 mm.h⁻¹ (*C. cladosporoides*) para o meio sem adição de etanol, podendo-se observar que há variações significativas de velocidade de crescimento radial em espécies distintas. Dentro de um mesmo gênero, como por exemplo, para o gênero *Aspergillus*, ocorreu uma variação de 0,08 a 0,17 mm.h⁻¹ no meio sem etanol; para o gênero *Penicillium*, ocorreu uma variação de aproximadamente 0,13 à 0,30 mm.h⁻¹ no meio sem etanol; e para o gênero *Mucor*, ocorreu uma variação de 0,38 a 0,42 mm.h⁻¹ no meio sem etanol. A velocidade de crescimento radial foi importante para o estudo da tolerância ao etanol para cada micro-organismo, sendo uma característica específica de cada espécie, possibilitando a comparação entre gêneros e espécies. Esta medição depende de vários fatores, como temperatura de cultivo, meio de cultura, atividade de água do meio, espécie do micro-organismo, entre outros (DANTIGNY *et al.*, 2005).

Outra pesquisa realizada na Argentina em 2003, verificou o crescimento e produção de toxina por *Aspergillus* seção Flavi, utilizando os antioxidantes 2–3–terc-butil-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-diterc-butil-p-cresol (BHT), trihidroxibutirofenona (THB) e propilparabeno em diferentes condições de pH e de atividade de água. O Meio extrato de malte modificado com glicerol foi utilizado para alterar a atividade de água. O meio modificado foi inoculado com *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus* e foi medida a velocidade de crescimento radial dos micro-organismos. Foi determinado que tanto para o *A. flavus* quanto para o *A. parasiticus*, a melhor inibição de crescimento foi para o BHA a uma atividade de água de 0.982 variando de aproximadamente 0,33 mm.h⁻¹ sem o antioxidante (controle) a 0,20 mm.h⁻¹ com THB a 1 mmol.L⁻¹, sendo que não houve crescimento na concentração de 10 mmol.L⁻¹ (NESCI; RODRIGUEZ; ETCHEVERRY, 2003).

Alternaria alternata é um fungo toxigênico, predominantemente responsável pelo desenvolvimento de fungos pretos em frutos de tomate maduro, doença que causa perdas substanciais na agricultura do tomate, especialmente aqueles

utilizados para a indústria de conservas. Cinco cepas de *A. alternata* isoladas de frutos do tomateiro afetadas por esta doença foram utilizadas por Pose *et al.* (2009) para determinar o efeito da atividade de água (0,904, 0,922, 0,954, 0,982) e temperatura (6, 15, 21 e 35 °C) na germinação e na taxa de crescimento micelial. O menor tempo de germinação, de um dia e meio, foi observado em atividade de água de 0,982 a 21 °C e 35 °C. A taxa de crescimento mais rápida (0,35 mm.h⁻¹), mensurada pela velocidade de crescimento radial, foi registrado em atividade de água de 0,982 a 21 °C. As taxas de crescimento foram maiores aumentando a atividade de água do meio. O conhecimento sobre as taxas de crescimento das cepas de *A. alternata* neste substrato é necessário para a elaboração de estratégias futuras para a agricultura a fim de evitar o desenvolvimento destas cepas e avaliar os riscos para a saúde do consumidor.

O crescimento dos fungos filamentosos *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger*, isolados de ambiente de produção de iogurte, foi investigada em ágar extrato de malte com pH 4,2 e atividade de água de 0,997, em condições isotérmicas variando de -1,3 °C a 35 °C e de 5 °C a 42,3 °C. A taxa de crescimento, medida pela velocidade de crescimento radial, foi estudada utilizando o modelo cardinal com inflexão (CMI). *P. expansum* possui uma velocidade de crescimento radial de aproximadamente 0,025 mm.h⁻¹ a 0 °C e a 30 °C e um crescimento máximo de 0,25 mm.h⁻¹ a aproximadamente 23 °C e *A. niger* apresentou velocidade de crescimento radial de 0,1 mm.h⁻¹ a 13 °C e 43 °C e um crescimento máximo de 1,0 mm.h⁻¹ a aproximadamente 30 °C nas condições descritas acima. O estudo forneceu dados úteis para a compreensão do comportamento de *P. expansum* e *A. niger* em condições de temperatura dinâmica, enquanto os modelos desenvolvidos podem ser utilizados como ferramentas eficazes na avaliação do risco de deterioração por fungos e previsão de vida útil dos alimentos (GOUGOULIA; KOUTSOUMANIS, 2010).

Três diferentes fungos filamentosos isolados de ovelhas no Brasil de *Conidiobolus lamprauges*, causador de zigomicose subcutânea, foram estudados segundo suas características morfológicas e identificados molecularmente. A velocidade de crescimento radial em dois diferentes meios de cultura (Agar Sabouraud Dextrose e Agar Dextrose Batata), assim como as características das colônias nestes meios, foram relatadas. As características microscópicas dos três

isolados foram estudadas em Agar Dextrose Batata. A região ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) foi estudada para a identificação molecular (VILELA *et al.*, 2010).

3.4 RECONHECIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

O reconhecimento de fungos filamentosos pode ser realizado pela observação das características morfológicas macroscópicas, microscópicas e por técnicas de biologia molecular. A verificação das características macroscópicas como cor, aspecto, presença de exsudatos, difusão de pigmentos, odor, quantidade de micélio aéreo é realizada pelo estudo da colônia do fungo filamentoso crescido em diferentes meios de cultura. No estudo das características microscópicas utiliza-se a técnica de micro-cultivo para visualização das estruturas reprodutivas, as quais auxiliam na distinção taxonômica em nível de gênero. (LARONE, 2002; WATANABE, 2002; ANVISA, 2004a).

As características morfológicas e as técnicas moleculares para a identificação de fungos filamentosos são os instrumentos de investigação de muitos pesquisadores. Os fungos isolados destas pesquisas possuem origens variadas, como fungos filamentosos causadores de doenças em animais e no homem (CANO; GUARRO; GENÉ, 2004; BOSCO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VILELA *et al.*, 2010), estudos de pragas e doenças em plantações (CASTLE *et al.*, 1998; KISS, 2002; CHOI *et al.*, 2010), de micorrizas em florestas (AMICUCCI *et al.*, 2001; NOUHRA *et al.*, 2005; HONTI *et al.*, 2008), de espécies de fungos filamentosos produtores de enzimas (CARDOSO *et al.*, 2007), em uma estação espacial (MAKIMURA *et al.*, 2001) e estudo de fungos filamentosos contaminantes de sistemas de água na Noruega, (HAGESKAL *et al.*, 2006) a fim de avaliar os riscos para a população, são citadas.

Os métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), sequenciamento genético, entre outros, são utilizados nos estudos de identificação (GUIMARAES *et al.*, 2006; GODET; MUNAUT, 2009).

A PCR é uma técnica baseada na amplificação de uma região específica do DNA delimitada pela sequência dos oligonucleotídeos iniciadores. Esta reação

consiste em três passos chave: fase de desnaturação da dupla fita de DNA em alta temperatura, geralmente em temperaturas de 94 °C a 96 °C; fase de anelamento, onde o par de oligonucleotídeos iniciadores se liga à sequência complementar na fita de DNA; e, finalmente, a fase de extensão da fita de DNA (CHEN; JANES, 2002).

O uso de técnicas moleculares que exploram as variações na sequência de nucleotídeos no gene que codifica o RNA ribossomal e os espaços intergênicos, fez com que ocorresse, na última década, progresso no estudo da ecologia de fungos (PINHEIRO, 2004; ANDERSON; PARKIN, 2007). Duas regiões que flanqueiam os genes rDNA apresentam sequência de nucleotídeos que permite a distinção entre micro-organismos. Denominados Espaçadores Internos Transcritos, ou no inglês *Internal Transcribed Spacer*, ITS 1 e ITS 2, estas regiões permaneceram pouco conservadas no curso da evolução (Figura 02) (LARENA *et al.*, 1999). A região ITS 1 foi descrita por possuir uma rápida evolução e a região ITS 2 uma evolução moderada rápida a rápida (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

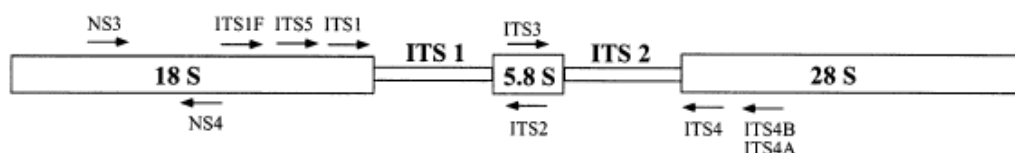


FIGURA 2 - MAPA DAS REGIÕES DE rDNA DE FUNGOS

FONTE: LARENA, *et al.*, 1999

Devido ao seu alto grau de variabilidade, a sequência correspondente ao ITS é a região de escolha para a identificação de micro-organismos em nível específico (ANDERSON; CAIRNEY, 2004; PINHEIRO, 2004; ANDERSON; PARKIN, 2007). Estudos têm revelado que até mesmo espécies de fungos estreitamente relacionadas, contêm sequências distintas nessas regiões que podem ser exploradas para a identificação destes micro-organismos usando uma sequência específica de oligonucleotídeos iniciadores (HAUGLAND; HECKMAN; WYMER, 1999). Esta região com cerca de 600 pb a 800 pb pode ser amplificada usando oligonucleotídeos iniciadores universais. Por estar presente como múltiplas cópias

no genoma, é uma região relativamente fácil de amplificar, mesmo o material genético sendo diluído ou degradado (LARENA *et al.*, 1999).

Uma das mais importantes bases de dados para a classificação de fungos é o GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy), do National Center for Biotechnology Information (NCBI) em colaboração com laboratórios internacionais que reúne sequências de mais de 100.000 organismos distintos. Além do GenBank, outras bases de dados fornecem informações relativas à sequências de micro-organismos, como o *Tree of Life Web Project* (tolweb.org/tree), a série on-line Myconet (www.fieldmuseum.org/myconet), o Index Fungorum (www.indexfungorum.org), o MycoBank (www.mycobank.org), entre outras (HIBBETT *et al.*, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Relação de materiais utilizados nos experimentos e sua procedência

- a) As amostras de talcos comerciais utilizados foram adquiridas em três diferentes redes de supermercados e quatro farmácias distintas da cidade de Curitiba no estado do Paraná. As amostras dos talcos foram escolhidas ao acaso de três diferentes marcas. Foram analisadas quinze diferentes embalagens da marca A e B e 20 diferentes embalagens da marca C. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade, alguns sendo do mesmo lote e outras não.
- b) Os meios de cultura utilizados foram das marcas Merck, Difco, Biobrás, EEL, Synth, Reagen e Biotec;
- c) Os oligonucleotídeos iniciadores ITS-4 e ITS-1F foram sintetizados pela Bioneer;
- d) Marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder da Invitrogen;
- e) A agarose utilizada nas corridas eletroforéticas foi adquirida da Invitrogen.

4.2 MÉTODOS GERAIS

- a) As pesagens foram realizadas em balança digital analítica Bioprecisa modelo FA 2104N e em balança Shimadzu BL 3200H (Departamento de Farmácia, UFPR);
- b) As medidas de pH foram realizadas em aparelho WTW, modelo pH330i (Departamento de Farmácia, UFPR);
- c) As esterilizações dos meios de cultura foram realizadas à pressão de 1 atm a 121 °C durante 20 minutos e os materiais foram esterilizados por 40 minutos

- à 1 atm de pressão a 121 °C em autoclave Phoenix (Departamento de Farmácia, UFPR);
- d) Todos os procedimentos de sementeiras dos micro-organismos, e experimentos de biologia molecular foram realizados em fluxo laminar TROX do Brasil, modelo FLV classe I (Departamento de Farmácia, UFPR);
 - e) As contagens de esporos foram realizadas em câmara de Neubauer (CARVALHO, 1994).
 - f) Os cultivos em meio sólido foram realizados em estufa microbiológica Fabbe, BOD Tecnal modelo TE-391 e os cultivos em meio líquido em incubadora com agitação orbital refrigerada Tecnal modelo TE 421 (Departamento de Farmácia, UFPR);
 - g) As observações macroscópicas foram realizadas em lupa Olympus SZ-ST (Departamento de Farmácia, UFPR);
 - h) A microscopia foi realizada em microscópios óticos modelo Olympus CX 41 e modelo Olympus CH30RF100 (Departamento de Farmácia, UFPR);
 - i) As fotos da microscopia foram feitas com câmara digital SONY Cyber-Shot DSC P-92 e as fotos para a macroscopia foram realizadas com câmara digital CANON- IXUS (Departamento de Farmácia, UFPR);
 - j) O tratamento das fotos de microscopia foi realizado com o auxílio do software COREL PHOTO PAINT (Departamento de Farmácia, UFPR);
 - k) As filtrações a vácuo foram realizadas com o auxílio de bomba de vácuo Brasil modelo 56-RC-6334 (Departamento de Farmácia, UFPR);
 - l) As secagens de biomassa celular foram realizadas em estufa DeLeo modelo 495 a 60 °C (Departamento de Farmácia, UFPR);
 - m) As centrifugações foram realizadas em centrífuga Incibrás, modelo Spin 1 a 14.000 rpm (Departamento de Farmácia, UFPR);
 - n) As soluções utilizadas nos ensaios de biologia molecular foram preparadas como descrito por SAMBROOK; FRITSCH; MANIATTIS (1989) e XUFRE, *et al.*, (2000).
 - o) As reações de PCR e de sequenciamento foram realizadas em aparelho termociclador Applied Biosystems- Veriti 96 Well e em Termociclador Biocycler – Peltier Thermal Cyler (Departamento de Patologia Médica, UFPR);

- p) As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático modelo ABI Prism 377 (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR)
- q) O material genético e os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, observado em detector de luz ultravioleta e fotografados no equipamento U.V.P. Bioimaging Systems EC3 (Departamento de Patologia Médica, UFPR);

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA DE TALCOS COMERCIAIS COSMÉTICOS

A atividade de água dos talcos foi avaliada em equipamento Acqua-Lab CX-2 da Decagon, utilizando uma solução aquosa padrão de Cloreto de Sódio 6,0 M com atividade de água de 0,760 e de água destilada a qual tem atividade de água 1,00 como referência. A medição da atividade de água dos talcos foi realizada em duplicata a 27 °C.

4.4 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura empregados apresentam as seguintes composições:

4.4.1 Caldo nutriente

Peptona bacteriológica	5,0 g
Extrato de levedura	2,5 g
Dextrose	10,0 g
Caldo tioglicolato	1,0 g
Tiosulfato de sódio	6,0 g
Bissulfito de sódio	2,5 g

Polissorbato 80	10,0 g
Lecitina de soja	7,0 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

4.4.2. Meio Sabouraud Dextrose 4%

Peptona de caseína	5,0 g
Peptona de carne	5,0 g
Glucose	40,0 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

4.4.3 Meio Extrato de Malte

Extrato de malte	5,0 g
Peptona universal	1,0 g
Glucose	20,0 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

4.4.4 Meio Czapeck

Sacarose	20,0 g
Cloreto de sódio	0,5 g
Sulfato de Magnésio	0,5 g
Cloreto de ferro	0,001 g
Nitrato de sódio	2,0 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

Os meios extrato de malte e czapeck foram acrescidos de 2 g% de agar para serem utilizados na forma sólida.

4.5 DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Dez gramas de talco comercial foram acrescentados a 90 ml de caldo nutriente e homogeneizado por inversão. Um mililitro da suspensão contendo talco foi transferido assepticamente para a placa de Petri, adicionado o meio de cultura Sabouraud Dextrose 4% e homogeneizado em oito, para melhor contato da suspensão com o meio. Após a solidificação, as placas foram mantidas em estufa a $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias e realizada a contagem de unidades formadoras de colônia por grama de talco cosmético ($\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$). Posteriormente, com auxílio de agulha estéril as colônias dos fungos filamentosos isoladas foram semeadas em meio sólido extrato de malte e mantidos a $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 dias. O experimento foi realizado em duplicata e para cada amostra de talco foram empregadas duas placas de Petri, totalizando quatro placas. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

4.6 CONSERVAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS

Os fungos filamentosos isolados após crescimento em meio sólido inclinado extrato de malte a $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias foram conservados a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (SMITH, 1991).

4.7 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS ASSEXUADOS (CONÍDIOS)

Em tubos de ensaio contendo os fungos filamentosos recém crescidos foi adicionado 5 ml de solução estéril de Tween 80 a 0,1% p.v⁻¹ em água destilada e com auxílio de alça estéril os conídios foram removidos e a suspensão transferida para um frasco Erlenmeyer contendo barra magnética previamente esterilizados. Em seguida, a suspensão de conídios foi submetida à agitação por no mínimo 15

minutos para a desagregação e realizado a contagem do número de esporos assexuados por mililitro de suspensão utilizando câmara de Neubauer segundo Carvalho (1994).

4.8 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

4.8.1 Características macroscópicas e determinação do crescimento radial

A identificação das características morfológicas macroscópicas e determinação do crescimento radial de cada fungo filamentoso isolado, foram realizadas pela inoculação de 10 µl de suspensão de conídios (item 4.7) no centro de placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura sólido extrato de malte e czapeck e placas foram mantidas em estufa a 26 °C ±2 °C. Durante o crescimento os fungos filamentosos foram observados em relação às características de cor, tamanho, textura da colônia e presença de exsudato, macroscopicamente com auxílio de lupa e fotografados.

A determinação do crescimento radial foi realizada pela leitura nos sentidos horizontal, vertical e diagonal da colônia formada, com o auxílio de um paquímetro. As medições foram realizadas de 12 em 12 horas aproximadamente até o crescimento do fungo atingir uma das bordas da placa de Petri e o resultado foi expresso em mm/h (BRAND, 2006). Cada fungo filamentoso foi inoculado em quintuplicata para cada meio empregado no experimento e calculado o desvio padrão.

4.8.2 Características microscópicas

Os fungos filamentosos também foram cultivados entre lâmina e lamínula para a verificação de suas características microscópicas. Sessenta microlitros de meio sólido extrato de malte liquefeito foram adicionados sobre uma lâmina estéril e o micro-organismo foi inoculado com auxílio de uma agulha estéril e uma lamínula foi colocada sobre o meio inoculado. Em seguida, as lâminas inoculadas foram colocadas em placa de Petri úmida e mantidas em estufa a $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 5 dias. As estruturas morfológicas microscópicas foram observadas diariamente em microscópio ótico em fator de aumento de 100x, 400x e 1.000x e fotografadas. Os micro-organismos foram identificados com base em literatura científica (SMITH, 1991).

4.9 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS

4.9.1 Extração de DNA dos fungos filamentosos isolados

4.9.1.1 Cultivo dos fungos filamentosos isolados

Os fungos filamentosos isolados foram cultivados em meio sólido inclinado extrato de malte e colocados em estufa à $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco dias. Após o período de crescimento, foi preparada uma suspensão de esporos de cada fungo isolado conforme item 4.7. Foi inoculado 1 ml de cada suspensão de esporos, com concentração de 10^6 esporos por ml, em 50 ml de meio líquido extrato de malte, previamente preparado e esterilizado em frasco Erlenmeyer de 250 ml capacidade. Os cultivos dos fungos filamentosos foram mantidos a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 170 rpm por tempo determinado previamente por meio de curva de crescimento. Os pellets (biomassa celular) utilizados na extração do DNA foram obtidos na fase logarítmica de crescimento.

4.9.1.2 Extração do DNA

A metodologia de extração do DNA foi adaptada de Ausubel, *et al.* 1999.

Cerca de 250 mg da biomassa celular dos fungos filamentosos (item 4.9.1.1), foi recolhida com o auxílio de uma espátula, colocada em tubos tipo eppendorf e centrifugados a 14.000 rpm. O meio de cultura líquido excedente foi retirado com auxílio de uma pipeta. Um mililitro de tampão Tris-EDTA (1 mM EDTA; 10 mM Tris HCl) foi adicionado à biomassa celular (sem o meio de cultura líquido), submetidas a agitação por 30 segundos em vórtex para lavagem da biomassa. Estas foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm e o tampão Tris-EDTA removido com auxílio de uma pipeta. Quinhentos microlitros de tampão de lise (200 mM Tris HCl; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA) e 10 µl de Dodecil Sulfato de Sódio 10% foram adicionados e a biomassa celular mantida a 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida a 60 °C por mais 10 minutos. Duzentos e cinquenta microlitros de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados às células assim como pérolas de vidro (de 5 a 7). A biomassa foi posteriormente submetida à agitação mecânica por 1 a 2 minutos e centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo eppendorf e 1 ml de etanol puro foi adicionado. A mistura foi homogeneizada e mantida por 10 minutos a temperatura ambiente e então centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 ml de etanol 80% ao resíduo homogeneizado por inversão com posterior centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos tipo eppendorf foram incubados a 40 °C para evaporação do álcool e secagem do material. Trinta microlitros de água ultrapura estéril foram adicionados ao tubo para solubilizar o DNA, que foi adicionado de 5 µl de RNase, mantido a 37 °C por 4 horas a fim de eliminar o RNA presente. Após esse período o DNA foi armazenado a 4 °C até o momento da utilização (AUSUBEL *et al.*, 1999).

4.9.1.3 Extração do DNA com o emprego de kit comercial

A extração do DNA dos fungos filamentosos 4 e 10, foi também realizada com o kit de extração Kit Ultra Clean Microbial Kit - MO BIO® (KARAKOUSIS *et al.*, 2006). O procedimento de extração foi seguido conforme o protocolo do fabricante.

4.9.2 Análise do DNA purificado

A qualidade do DNA purificado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (Tris- Borato EDTA) 1X. A corrida eletroforética foi realizada a 60 V por 1 hora e meia, e o gel foi corado com brometo de etídio $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, visualizado em detector de luz ultravioleta e fotografado no equipamento U.V.P. Bioimaging Systems EC3. A quantificação do DNA foi realizada pela comparação com o marcador λ *HindIII* (Fermentas) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

4.9.3 Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 μl , contendo 10 pmol de cada um dos iniciadores, 1,5 μl de MgCl_2 (25 mM), 1,0 μl de dNTP (5 mM) 2,5 μl de tampão da Taq 10X, 1U de Taq DNA Polimerase e 20 ng de DNA (Fermentas). Foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores ITS-1F e ITS-4. Estes oligonucleotídeos são complementares às regiões do rDNA 18S e 28S e permitem amplificar parcialmente o rDNA 18S, completamente as regiões ITS1, rDNA 5.8S e ITS2 e o início do rDNA 28S. A sequência dos iniciadores está indicada na Tabela 2.

TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência do iniciador
ITS-4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'
ITS- 1F	5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3'

Fonte: (ANDERSON; CAIRNEY, 2004)

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Applied Biosystems programado da seguinte forma: um ciclo a 94 °C durante quatro minutos, seguido de 30 ciclos de um minuto a 94 °C (desnaturação), rampa de 40 °C a 55 °C aumentando 0,5 °C a cada segundo (totalizando 30 segundos) (anelamento), e um minuto a 72 °C (extensão), e um ciclo a 72 °C por cinco minutos.

Os produtos da reação de amplificação foram detectados utilizando eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris- Borato EDTA) 1X (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), e a corrida eletroforética realizada a 36 V durante duas horas. Foi utilizado o marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). O gel foi corado com solução de brometo de etídio 0,5 µg/ml durante 15 minutos, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado no equipamento U.V.P. Bioimaging Systems EC3.

4.10. Sequenciamento dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase

Os produtos de PCR (6 µl) foram tratados com as enzimas Exonuclease I (USB, 3,3 U) e SAP (Fosfatase alcalina de camarão, USB, 0,66 U) com o objetivo de eliminar os resíduos de oligonucleotídeos iniciadores e dNTP. Os tubos contendo a mistura foram mantidos a 37 °C durante 45 minutos e então a 80 °C por 15 minutos. O produto foi utilizado na reação de sequenciamento, baseado no método de SANGER (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) modificado utilizando dideoxinucleotídeos fluorescentes utilizando sequenciador automático modelo ABI Prism 377. As reações foram realizadas em volume final de 10 µl contendo 0,5 µl dos oligonucleotídeos iniciadores separadamente, 6 µl do produto de PCR tratado,

como descrito acima, e 4 µl do reagente *DYEnamic ET Sequence Premix Terminator* (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Amersham Bioscience). Foi utilizado o seguinte programa em termociclador Applied Biosystems- Veriti 96 Well: 30 ciclos de 96 °C por 30 segundos, 40 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto. Vinte microlitros da reação de sequenciamento foram transferidos para um tubo estéril e acrescentado de 20 µl de água miliQ, e 60 µl de isopropanol. A mistura foi homogeneizada em vórtex, mantida a temperatura ambiente por 20 minutos e então centrifugada. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 250 µl de etanol a 70% e seco a estufa a 37 °C. O DNA foi dissolvido em 4 µl de *Formamide Loading Dye* e submetido à eletroforese em sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas utilizando os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e CLUSTAL W (<http://ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>). As tabelas 6 a 12 mostram os resultados do alinhamento das sequências obtidas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE DE ÁGUA

Não existe uma legislação no Brasil que determine o valor de atividade de água ideal para talcos comerciais. Nos talcos comerciais cosméticos em estudo não houve desenvolvimento de micélio visível, no entanto foi determinada a atividade de água e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - VALORES DE ATIVIDADE DE ÁGUA DOS TALCOS COSMÉTICOS A 27 °C

Talco	Atividade de água
A -14	0,491 ± 0,004
B - 2	0,481 ± 0,005
C - 10	0,480 ± 0,003
C - 18	0,458 ± 0,008

Gock, *et al.*, (2003), relataram o crescimento de sete fungos xerófilos importantes na indústria de alimentos responsáveis pela contaminação de alimentos. Verificaram que os fungos xerófilos *Chrysosporium xerophilum* e *Xeromyces bisporus*, foram os que se desenvolveram nos meios com atividade de água testada de 0,70

Os efeitos da atividade de água para esporulação e germinação sobre a distribuição da taxa de crescimento dos tubos germinativos e o tempo de germinação de conídios de *Penicillium chrysogenum* foram determinados pelo acompanhamento do comprimento do tubo germinativo. Neste trabalho os valores de atividade de água utilizados variaram de 0,95 à 0,99, sendo que a taxa de crescimento dos tubos germinativos foi maior a uma atividade de água de 0,99 do que em 0,95 (JUDET *et al.*, 2008).

Huang, *et al.*, (2009), estudaram a velocidade de crescimento radial de fungos xerófilos e não xerófilos, variando a atividade de água do meio de cultura de 0,90 a

0,95. Estes micro-organismos se desenvolveram nos meios empregados e o crescimento variou de acordo com a atividade de água. O micro-organismo *Aspergillus flavus* cresceu 45% a mais no meio com atividade de água de 0,95 do que no meio com 0,90 e para os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti* esta diferença foi de 40% e 65% nos mesmos meios, respectivamente (HUANG *et al.*, 2009).

NEVAREZ, *et al.*, (2009), utilizaram o meio sólido czapeck e avaliaram diferentes atividades de água, temperatura e pH a fim de conhecer as condições e características de crescimento do fungo filamentoso *Penicillium glabrum* visando encontrar medidas de prevenção de contaminações de alimentos por esta espécie de *Penicillium*.

Percebe-se que o fator de atividade de água tem influência no crescimento de micro-organismos. Todos os fungos filamentosos isolados foram originados de amostras de talco comercial com valores de atividade de água menores do que 0,491.

5.2 DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

As 50 amostras de talco comercial em pó foram semeadas para a determinação das unidades formadoras de colônias por grama (UFC.g⁻¹) e foram isolados sete fungos filamentosos. O número de unidades formadoras de colônias por grama, bem como, a denominação que cada fungo recebeu após o isolamento, estão relacionadas na Tabela 4.

TABELA 4 – NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR GRAMA E A RELAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE DIFERENTES TALCOS COMERCIAIS COSMÉTICOS

Talco Comercial	UFC.g ⁻¹ de Talco	Denominação dos fungos
A-14	10	Fungo Filamentoso 04
B-2	10	Fungo Filamentoso 05
C-10	30	Fungo Filamentoso 09
		Fungo Filamentoso 10
		Fungo Filamentoso 11
C-18	20	Fungo Filamentoso 12
		Fungo Filamentoso 13

Os talcos comerciais em estudo contêm o número de micro-organismos (UFC.g⁻¹ de talco) inferior ao número máximo estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999). Porém, a utilização destes talcos e a armazenagem dos mesmos em condições favoráveis ao desenvolvimento dos micro-organismos, podem permitir o crescimento dos fungos filamentosos, como relatado no estudo realizado em 2003 onde foi detectado a presença de esporos e células vegetativas em alimentos em pó com pouca atividade de água (FINE; GERVAIS, 2003). A possibilidade de desenvolvimento desses micro-organismos pode trazer consequências indesejáveis ao consumidor mesmo dentro dos limites estabelecido pela legislação principalmente por pessoas debilitadas, como pacientes com baixa imunidade, bebês com assaduras e feridas em diabéticos (ÁLVAREZ-LERMA *et al.*, 2008).

5.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

5.3.1 Características macroscópicas

Foram realizadas a observação das características macroscópicas e determinação de velocidade de crescimento radial utilizando os meios de cultura sólido extrato de malte e czapeck.

De acordo com a Tabela 4 o fungo filamentososo 4 foi isolado da amostra de talco comercial cosmético A-14. Após crescimento em meio sólido czapeck e extrato de malte verificou-se a presença de colônias de coloração marrom e acinzentada, respectivamente, aspecto aveludado e sem a formação de exsudatos como pode ser observado nas Figuras 3 e 4, respectivamente.



FIGURA 3 – CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 4 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK



FIGURA 4 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 4 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE

O fungo filamentososo 5 apresentou, em meio sólido czapeck (Figura 5) e meio sólido extrato de malte (Figura 6), colônia de coloração esverdeada e aspecto aveludado, sem a formação de exsudatos.

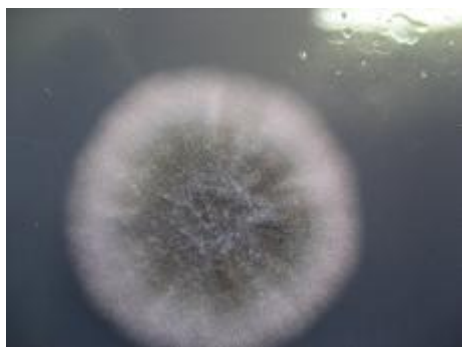


FIGURA 5 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 5 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK



FIGURA 6 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 5 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE

Nas Figuras 7 e 8 observam-se características morfológicas macroscópicas do fungo filamentososo 9. Verifica-se colônia de coloração verde em meio sólido extrato de malte, e de aspecto aveludado nos meios de cultura sólido extrato de malte e czapeck. Não houve a formação de exsudatos.



FIGURA 7- CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 9 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK



FIGURA 8 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 9 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE

O fungo filamentososo 10 apresentou colônias de coloração verde e aspecto pulverulento para os meios de cultura sólidos czapeck (Figura 9) e extrato de malte (Figura 10), sem a formação de exsudatos em ambos os meios estudados.

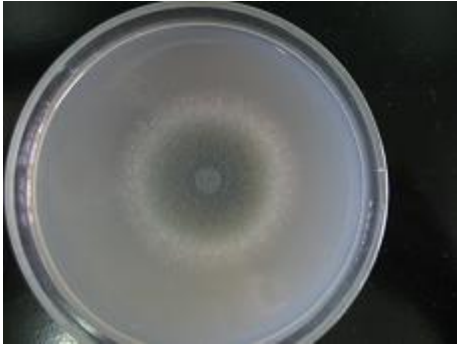


FIGURA 9 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 10 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK

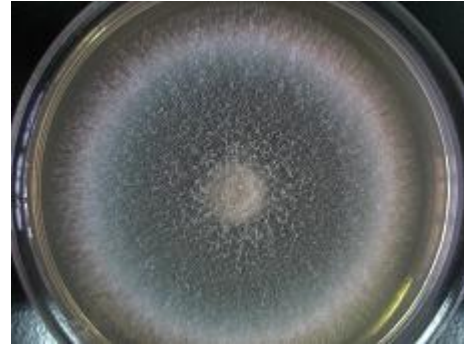


FIGURA 10 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 10 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE

Nas Figuras 11 e 12 estão demonstradas as características morfológicas macroscópicas do fungo filamentoso 11. Verifica-se colônia de coloração verde em meio sólido extrato de malte e de aspecto aveludado em meio czapeck e extrato de malte. Não houve a formação de exsudatos em nenhum dos meios.



FIGURA 11 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 11 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK.



FIGURA 12 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 11 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE

O fungo filamentoso 12, em meio sólido czapeck (Figura 13) e extrato de malte (Figura 14), apresentou colônia de coloração verde e aspecto aveludado. Não houve desenvolvimento de exsudatos em nenhum dos meios.



FIGURA 13 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 12 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK



FIGURA 14 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 12 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE

A colônia do fungo filamentoso 13 em meio sólido czapeck, apresenta coloração esverdeada e aspecto aveludado (Figura 15). Já o crescimento em meio sólido extrato de malte apresenta-se com coloração verde, com o centro branco, e de aspecto aveludado (Figura 16). Não houve desenvolvimento de exsudatos em nenhum dos meios.



FIGURA 15 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 13 EM MEIO SÓLIDO CZAPECK



FIGURA 16 - CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO 13 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE

5.3.2 Determinação do crescimento radial

Os resultados da determinação da velocidade de crescimento radial dos fungos filamentosos isolados de talcos comerciais cosméticos estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL (mm.h^{-1}) DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS CULTIVADOS NOS MEIOS SÓLIDOS EXTRATO DE MALTE E CZAPECK

Fungo filamentososo	Extrato de malte (mm.h^{-1})	Czapeck (mm.h^{-1})
04	$0,16 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,03$
05	$0,23 \pm 0,05$	$0,16 \pm 0,00$
09	$0,28 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,02$
10	$0,59 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,06$
11	$0,22 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,00$
12	$0,29 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,02$
13	$0,24 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,01$

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, os valores de velocidade de crescimento radial para o fungo filamentososo 10 são cerca de duas vezes maior do que as velocidades apresentadas pelos fungos filamentosos 5, 9, 11, 12 e 13 para os meios de cultura extrato de malte e czapeck. Já o fungo filamentososo 4 possui velocidade de crescimento radial inferior quando comparado aos fungos filamentosos 5, 9, 11, 12 e 13 em cerca de duas vezes.

Samapundoa, *et al.*, (2007), estudaram o crescimento dos fungos filamentosos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em milho, através da velocidade de crescimento radial, variando a atividade de água do meio de cultura de 0,801 a 0,982 e temperatura (16, 22, 25, 30 e 37 °C). Não foi observado crescimento de ambos os fungos filamentosos em atividade de água de 0,801. Houve crescimento de ambos a 25 °C e 30 °C em uma atividade de água de 0,822.

5.3.3 Características microscópicas

Pela observação das características morfológicas microscópicas, o fungo filamentososo 4 apresenta conídios elípticos, e hifas septadas (Figura 17). A Figura 18 demonstra o micélio vegetativo e aéreo deste fungo filamentososo, onde pode ser visualizado o micélio vegetativo do tipo rizóide (LACAZ *et al.*, 1998).



FIGURA 17 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 4 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 36 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO DE 400X

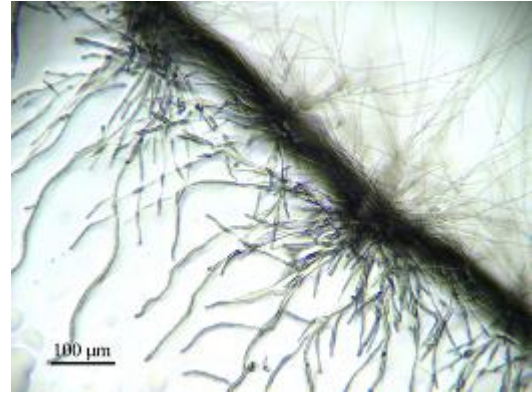


FIGURA 18 - FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DO MICÉLIO VEGETATIVO E AÉREO DO FUNGO FILAMENTOSO 4 COM 24 HORAS DE CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE, AUMENTO DE 100X.

O fungo filamentoso 5 (Figura 19) isolado da amostra do talco comercial B-2, os fungos 9 (Figura 20) e 11 (Figura 21) isolados da amostra C-10, e o fungo 12 (Figura 22) isolado da amostra C-18, apresentam-se na forma de monoverticilado, hifas septadas e com conídios esféricos e lisos, estruturas características do gênero *Penicillium sp* (LACAZ *et al.*, 1998).

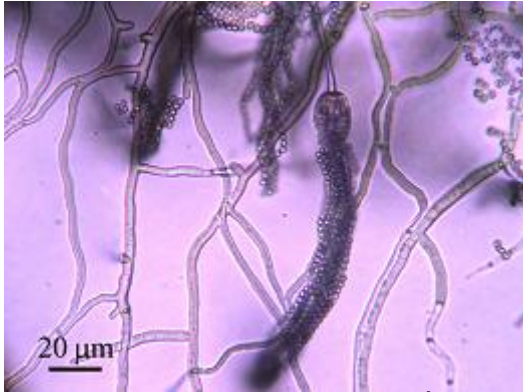


FIGURA 19 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 5 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 96 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO DE 400X.



FIGURA 20 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 9 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO DE 400X.



FIGURA 21 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 11 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO 1000X



FIGURA 22 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 12 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO, AUMENTO DE 400X.

O fungo filamentoso 10 apresenta hifa hialina, septada e conidióforo globoso, características do gênero *Aspergillus sp.* de acordo com a Figura 23 (LACAZ et al., 1998).



FIGURA 23 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 10 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO. AUMENTO DE 400X

As características morfológicas microscópicas do fungo filamentoso 13 (Figura 24) sugerem que este micro-organismo seja do gênero *Penicillium sp.* por apresentar conídios cilíndricos, lisos, hifas septadas, e apresenta-se de forma biverticilada (LACAZ *et al.*, 1998).



FIGURA 24 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DO FUNGO FILAMENTOSO 13 EM MEIO SÓLIDO EXTRATO DE MALTE COM 72 HORAS DE CULTIVO

De acordo com o observado nas estruturas reprodutivas por microscopia óptica os fungos filamentosos 5, 9, 11, 12 e 13 apresentam estruturas reprodutivas distintas dos fungos filamentosos 4 e 10. Pode-se sugerir, pela avaliação conjunta das características morfológicas macroscópicas e microscópicas, que os fungos

filamentosos 5, 9, 11, 12 e 13 são do gênero *Penicillium sp.*, o fungo filamentoso 4 é do gênero *Cladosporium sp* e o fungo filamentoso 10 é do gênero *Aspergillus sp.*

5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS

5.4.1 Extração de DNA dos fungos filamentosos isolados

A extração do DNA de todos os fungos em estudo foi realizada conforme descrito no item 4.9.1. A Figura 25 representa um gel de agarose a 1% contendo o DNA extraído dos fungos filamentosos.

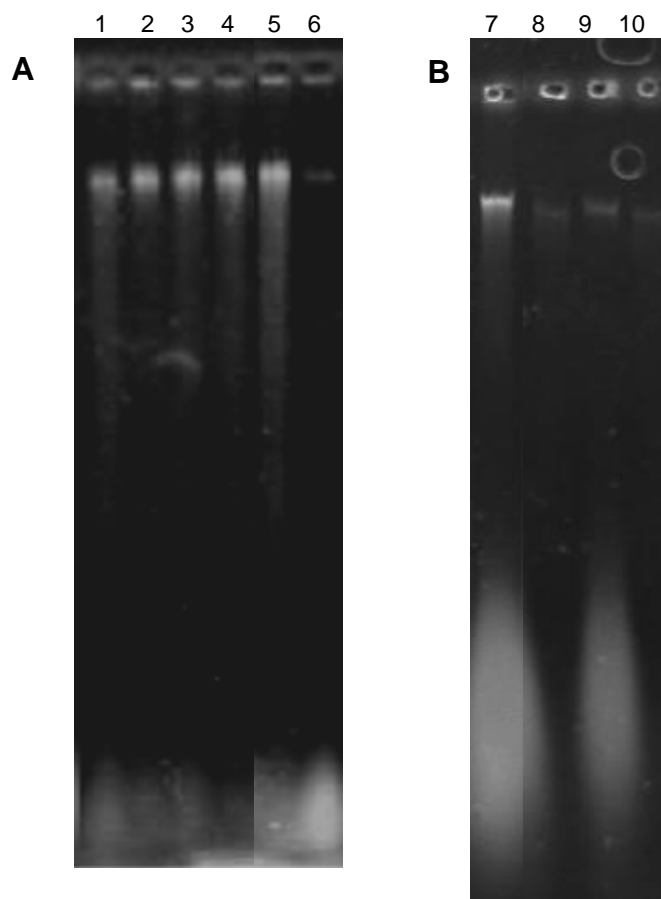


FIGURA 25 - ELETROFORESE DE DNA EXTRAÍDO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Gel A - 1. DNA extraído do fungo filamentososo 13 2. DNA extraído do fungo filamentososo 12 3. DNA extraído do fungo filamentososo 11 4. DNA extraído do fungo filamentososo 9 5. DNA extraído do fungo filamentososo 5 6. DNA extraído do fungo filamentososo 4 Gel B- 7. DNA extraído do fungo filamentososo 4 8. DNA do fungo filamentososo 10 extraído com o kit 9. DNA do fungo filamentososo 10 10. DNA do fungo filamentososo 4 extraído com o kit

Pode-se observar que em algumas amostras há quebras no DNA (fungos filamentosos 13, 9 e 5), enquanto nas demais há apenas a presença de uma banda bem definida. Também se pode observar nas amostras que tiveram o DNA extraído pelo método de Ausubel, *et al.*, 1999, a presença de RNA, razão pela qual o produto da extração foi posteriormente tratado com a enzima RNase conforme descrito no item 4.9.3. O processo utilizado pelo kit comercial elimina o RNA durante a extração de DNA. Isto pode ser verificado no gel B posições 8 e 10 onde se observa apenas a presença de banda de DNA.

O DNA foi então quantificado conforme descrito no item 4.9.2 e aproximadamente 20 ng foram utilizados nas reações de PCR, realizadas como descrito no item 4.9.3.

5.4.2 Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Figura 26 mostra as bandas de amplificação de DNA da região ITS dos fungos filamentosos.

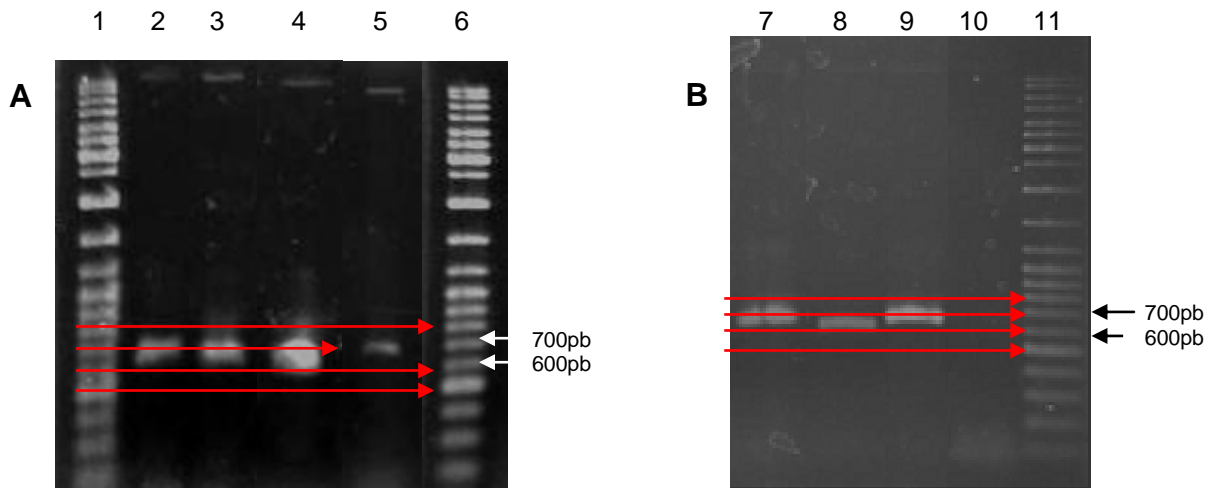


FIGURA 26 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR

Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS dos diferentes fungos. Gel A: **1 e 6.** Marcador 1Kb plus DNA Ladder **2.** Amostra 9 **3.** Amostra 4 **4.** Amostra 5 **5.** Amostra 11 Gel B: **7.** Amostra 10 **8.** Amostra 12 **9.** Amostra 13 **10.** Branco **11.** Marcador 1Kb plus DNA Ladder

Observa-se que os fragmentos de DNA obtidos na PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para amplificar a região ITS dos fungos diferem quanto ao tamanho, que variou entre 650 pares de bases e 700 pares (pb), o que sugere que existem fungos distintos entre os isolados.

5.4.3 Sequenciamento dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase

Os produtos de PCR foram sequenciados, e as sequências obtidas foram analisadas com os programas BioEdit, BLAST e ClustalW. O BLAST compara as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank e fornece informações quanto à homologia entre elas. As Figuras 27 a 33 e as Tabelas 6 a 12 mostram os resultados das análises das sequências. Estão indicados os organismos com os quais foi encontrada homologia na região do respectivo número de acesso entre parênteses, o score e o valor de e .

O score dá um indicativo de quanto o alinhamento é bom. Quanto maior o valor do score, melhor o alinhamento. Em termos gerais, o score é calculado a partir de uma fórmula que leva em conta o alinhamento de resíduos semelhantes ou idênticos, bem como as eventuais lacunas introduzidas para alinhar as sequências. O valor de e é um parâmetro que descreve a similaridade que se espera encontrar ao acaso entre sequências. Diminui exponencialmente com o valor de score. Por exemplo, um valor de e igual a 1 pode significar que em um banco de dados de determinado tamanho espera-se encontrar alguma homologia com score similar simplesmente pelo acaso. Isto significa que quanto menor for o valor de e , ou mais próximo de zero, maior é o significado da similaridade. No entanto, é importante notar que sequências curtas podem ser praticamente idênticas e ter valor de e relativamente alto. Isso ocorre porque o cálculo de e também leva em conta o comprimento da sequência em análise. E a similaridade entre sequências mais curtas tem uma elevada probabilidade de ocorrer puramente por acaso (GENBANK, 2010).

5.4.3.1 Fungo filamentososo 4

A sequência do fungo filamentososo 4 foi analisada pelo BLAST e os resultados que apresentaram maior homologia estão indicados na Tabela 6.

TABELA 6 - SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 4

Fungo Filamentoso 4	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
Nº de nucleotídeos 556 pb	<i>Cladosporium coralloides</i> (AF393695)	1003	0.0	100
	<i>Cladosporium tenuissimum</i> (AJ300331)	1003	0.0	100

Fungo 4
AJ300331
AF393695
ATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATT 60
ATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATT 60
ATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATT 60

Fungo 4
AJ300331
AF393695
ACAAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTG 120
ACAAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTG 120
ACAAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTG 120

Fungo 4
AJ300331
AF393695
CCTCCGGGGCGACCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGT 180
CCTCCGGGGCGACCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGT 180
CCTCCGGGGCGACCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGT 180

Fungo 4
AJ300331
AF393695
AACTTTCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTTAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTG 240
AACTTTCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTTAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTG 240
AACTTTCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTTAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTG 240

Fungo 4
AJ300331
AF393695
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA 300
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA 300
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA 300

Fungo 4
AJ300331
AF393695
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTG 360
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTG 360
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTG 360

Fungo 4
AJ300331
AF393695
TTCGAGCGTCATTTCAACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCATCGCGGTCCGCCGCGT 420
TTCGAGCGTCATTTCAACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCATCGCGGTCCGCCGCGT 420
TTCGAGCGTCATTTCAACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCATCGCGGTCCGCCGCGT 420

Fungo 4
AJ300331
AF393695
GCCTCAAATCGACCGGTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTTCGTAAA 480
GCCTCAAATCGACCGGTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTTCGTAAA 480
GCCTCAAATCGACCGGTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTTCGTAAA 480

Fungo 4
AJ300331
AF393695
GGGTGTTCCGGGAGGCTACGCCGTAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGG 540
GGGTGTTCCGGGAGGCTACGCCGTAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGG 540
GGGTGTTCCGGGAGGCTACGCCGTAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGG 540

Fungo 4 TAGGGATACCCGCTGA 556
 AJ300331 TAGGGATACCCGCTGA 556
 AF393695 TAGGGATACCCGCTGA 556

FIGURA 27 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 4 COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK

AJ300331 e AF393695 são os números de acesso do GenBank as sequências de *Cladosporium tenuissimum* e *Cladosporium coralloides* respectivamente, que apresentaram maior homologia com a região sequenciada do fungo filamentoso 4. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos em todas as sequências.

5.4.3.2. Fungo filamentoso 5

Os resultados da sequência do fungo filamentoso 5, analisados pelo BLAST, estão indicados na Tabela 7.

TABELA 7 - SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 5

Fungo Filamentoso 5	Homologia	Score	Valor de e	Identidade (%)
Nº de nucleotídeos 522 pb	<i>Penicillium griseofulvum</i> (GQ241285)	978	0.0	99
	<i>Penicillium citrinum</i> (EU645714)	978	0.0	99

Fungo 5 TCGTAACAAGGTT-CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCCCTC 59
 EU645714 TCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCCCTC 60
 GQ241285 TCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCCCTC 60

Fungo 5 GGGGCCCAACCTCCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCC 119
 EU645714 GGGGCCCAACCTCCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCC 120
 GQ241285 GGGGCCCAACCTCCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCC 120

Fungo 5 GCCGACGGCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGT 179
 EU645714 GCCGACGGCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGT 180
 GQ241285 GCCGACGGCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGT 180

```

Fungo 5          TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG 239
EU645714        TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG 240
GQ241285        TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG 240
*****

Fungo 5          ATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC 299
EU645714        ATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC 300
GQ241285        ATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC 300
*****

Fungo 5          CTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTG 359
EU645714        CTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTG 360
GQ241285        CTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTG 360
*****

Fungo 5          TGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGC 419
EU645714        TGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGC 420
GQ241285        TGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGC 420
*****

Fungo 5          GTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAG 479
EU645714        GTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAG 480
GQ241285        GTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAG 480
*****

Fungo 5          CCGACCCCAACCTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAG 522
EU645714        CCGACCCCAACCTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAG 523
GQ241285        CCGACCCCAACCTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAG 523
*****

```

FIGURA 28 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 5 COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK

GQ241285 e EU645714 são os números de acesso do GenBank as sequências de *Penicillium griseofulvum* e *Penicillium citrinum* respectivamente, que apresentaram maior homologia com a região sequenciada do fungo filamentososo 5. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos em todas as sequências.

5.4.3.3. Fungo filamentososo 9

A sequência do fungo filamentososo 9 foi analisada pelo BLAST e os resultados que apresentaram maior homologia estão indicados na Tabela 8.

TABELA 8 - SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 09

Fungo Filamentososo 9	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
Nº de nucleotídeos 540 pb	<i>Penicillium sp.</i> (DQ861286)	975	0.0	100
	<i>Penicillium sumatrense</i> (AY213678)	975	0.0	100

```

Fungo 9          TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGGCCCCCTCGGGGTCCAACCTC 60
AY213678        TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGGCCCCCTCGGGGTCCAACCTC 60
DQ861286        TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGGCCCCCTCGGGGTCCAACCTC 60
*****

Fungo 9          CCACCCGTGTTTTAACGAACCTTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGG 120
AY213678        CCACCCGTGTTTTAACGAACCTTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGG 120
DQ861286        CCACCCGTGTTTTAACGAACCTTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGG 120
*****

Fungo 9          CTCCTGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGCCCCCCTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCA 180
AY213678        CTCCTGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGCCCCCCTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCA 180
DQ861286        CTCCTGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGCCCCCCTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCA 180
*****

Fungo 9          GTCTGAGAACTAGCTAAATTAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCAT 240
AY213678        GTCTGAGAACTAGCTAAATTAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCAT 240
DQ861286        GTCTGAGAACTAGCTAAATTAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCAT 240
*****

Fungo 9          CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC 300
AY213678        CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC 300
DQ861286        CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC 300
*****

Fungo 9          GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC 360
AY213678        GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC 360
DQ861286        GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC 360
*****

Fungo 9          ATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCCTCTGCCGGGGGGA 420
AY213678        ATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCCTCTGCCGGGGGGA 420
DQ861286        ATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCCTCTGCCGGGGGGA 420
*****

Fungo 9          CGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTAC 480
AY213678        CGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTAC 480
DQ861286        CGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTAC 480
*****

Fungo 9          CCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAACCCTAAATTTTTTTCAGGTTGA 540
AY213678        CCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAACCCTAAATTTTTTTCAGGTTGA 540
DQ861286        CCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAACCCTAAATTTTTTTCAGGTTGA 540
*****

```

FIGURA 29 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 9 COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK

DQ861286 e *AY213678* são os números de acesso do GenBank as sequências de *Penicillium sp* e *Penicillium sumatrense* respectivamente, que apresentaram maior homologia com a região sequenciada do fungo filamentoso 9. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos em todas as sequências.

5.4.3.4. Fungo filamentoso 10

Os resultados da sequência do fungo filamentoso 10, analisados pelo BLAST, estão indicados na Tabela 9.

TABELA 9 - - SEQUÊNCIA DO GENBANK QUE PRODUZIU ALINHAMENTO SIGNIFICATIVO COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 10

Fungo Filamentoso 10	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
Nº de nucleotídeos 537 pb	<i>Aspergillus fumigatus</i> (FJ810502)	969	0.0	100%

```

Fungo 10      ACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCT 60
FJ810502     ACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCT 60
*****

Fungo 10      ATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCCGGGAGGCCTTGCGC 120
FJ810502     ATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCCGGGAGGCCTTGCGC 120
*****

Fungo 10      CCCCggGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCT 180
FJ810502     CCCCggGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCT 180
*****

Fungo 10      GAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGA 240
FJ810502     GAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGA 240
*****

Fungo 10      TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAG 300
FJ810502     TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAG 300
*****

Fungo 10      TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT 360
FJ810502     TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT 360
*****

Fungo 10      GCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGACGGGCC 420
FJ810502     GCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGACGGGCC 420
*****

Fungo 10      CGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCTGCTC 480
FJ810502     CGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCTGCTC 480
*****

Fungo 10      TGTAGGCCCGCGCGCCAGCCGACACCCAACTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCG 537
FJ810502     TGTAGGCCCGCGCGCCAGCCGACACCCAACTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCG 537
*****

```

FIGURA 30 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 10 COM UMA DAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADA NO GENBANK

FJ810502 é o número de acesso do GenBank à sequência de *Aspergillus fumigatus* que apresentou maior homologia com a região sequenciada do fungo filamentoso 10. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos em todas as sequências.

5.4.3.5. Fungo filamentososo 11

Os resultados da sequência do fungo filamentososo 11, analisados pelo BLAST, estão indicados na Tabela 10.

TABELA 10 - SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 11

Fungo Filamentososo 11	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
Nº de nucleotídeos 377 pb	<i>Penicillium sp.</i> (DQ861286)	646	0.0	97
	<i>Penicillium sumatrense</i> (AY213678)	646	0.0	97
	<i>Penicillium meleagrinum</i> (EF198531)	646	0.0	97

```
DQ861286      AAGTTTGCAGTCTGAGAACTAGCTAAATTAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG 60
AY213678      AAGTTTGCAGTCTGAGAACTAGCTAAATTAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG 60
EF198531      AAGTTTGCAGTCTGAGAACTAGCTAAATTAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG 60
Fungo 11      AAGTTTGCAGTCTGAGAACTAGCTAAATTAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG 60
*****
```

```
DQ861286      TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAG 120
AY213678      TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAG 120
EF198531      TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAG 120
Fungo 11      TTCCGGNATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAG 120
*****
```

```
DQ861286      TGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGGCATGCCTGT 180
AY213678      TGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGGCATGCCTGT 180
EF198531      TGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGGCATGCCTGT 180
Fungo 11      TGAATCATCGAGTNTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGGCATGCNTGT 180
*****
```

```
DQ861286      CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCCTCTG 240
AY213678      CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCCTCTG 240
EF198531      CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCCTCTG 240
Fungo 11      CNAGAGCGTCATTGATGCCNTCAAGCACGGNTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCCTNTG 240
* *****
```

```
DQ861286      CCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGG 300
AY213678      CCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGG 300
EF198531      CCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGG 300
Fungo 11      CCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGG 300
*****
```

```

DQ861286      CTTTCGTCACCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCCAGCCGACCCCAACCCTAAATTTTTT 360
AY213678      CTTTCGTCACCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCCAGCCGACCCCAACCCTAAATTTTTT 360
EF198531      CTTTCGTCACCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCCAGCCGACCCCAACCCTAAATTTTTT 360
Fungo 11      CTTTCGTCACCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCCAGCCGACCCCAACCCTAAATTTTTT 360
                *****

DQ861286      TCAGGTTGACCTCGGAT 377
AY213678      TCAGGTTGACCTCGGAT 377
EF198531      TCAGGTTGACCTCGGAT 377
Fungo 11      TCAGGTTGACCTCGGAT 377
                *****

```

FIGURA 31 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 11 COM AS TRÊS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK

DQ861286, AY213678 e EF198531 são os números de acesso do GenBank as sequências de *Penicillium sp.*, *Penicillium sumatrense* e *Penicillium meleagrinum* respectivamente, que apresentaram maior homologia com a região sequenciada do fungo filamentoso 11. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos em todas as sequências.

5.4.3.6. Fungo filamentoso 12

Os resultados da sequência do fungo filamentoso 12, analisados pelo BLAST, estão indicados na Tabela 11.

TABELA 11 - SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 12

Fungo Filamentoso 12	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
Nº de nucleotídeos 522 pb	<i>Penicillium griseofulvum</i> (GQ241285)	985	0.0	100
	<i>Penicillium citrinum</i> (EU645714)	985	0.0	100
	<i>Penicillium sp.</i> (EU069417)	985	0.0	100

```

Fungo 12      TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCCTCGGGGCCCAACCT 60
GQ241285     TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCCTCGGGGCCCAACCT 60
EU645714     TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCCTCGGGGCCCAACCT 60
EU069417     TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCCTCGGGGCCCAACCT 60
*****

Fungo 12      CCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCC 120
GQ241285     CCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCC 120
EU645714     CCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCC 120
EU069417     CCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCC 120
*****

Fungo 12      CCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACCTTTCAA 180
GQ241285     CCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACCTTTCAA 180
EU645714     CCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACCTTTCAA 180
EU069417     CCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACCTTTCAA 180
*****

Fungo 12      CAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTG 240
GQ241285     CAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTG 240
EU645714     CAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTG 240
EU069417     CAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTG 240
*****

Fungo 12      AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC 300
GQ241285     AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC 300
EU645714     AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC 300
EU069417     AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC 300
*****

Fungo 12      GGAGGGCATGCCGTGCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCC 360
GQ241285     GGAGGGCATGCCGTGCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCC 360
EU645714     GGAGGGCATGCCGTGCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCC 360
EU069417     GGAGGGCATGCCGTGCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCC 360
*****

Fungo 12      CGTCCCCCCCCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCG 420
GQ241285     CGTCCCCCCCCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCG 420
EU645714     CGTCCCCCCCCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCG 420
EU069417     CGTCCCCCCCCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCG 420
*****

Fungo 12      AGCGTATGGGGCTTCGTACCCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAAC 480
GQ241285     AGCGTATGGGGCTTCGTACCCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAAC 480
EU645714     AGCGTATGGGGCTTCGTACCCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAAC 480
EU069417     AGCGTATGGGGCTTCGTACCCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAAC 480
*****

Fungo 12      CTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACC 522
GQ241285     CTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACC 522
EU645714     CTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACC 522
EU069417     CTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACC 522
*****

```

FIGURA 32 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 12 COM AS TRÊS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK

GQ241285, EU645714 e EU069417 são os números de acesso do GenBank as sequências de *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium sp.*, respectivamente, que apresentaram maior homologia com a região sequenciada do fungo filamentoso 12. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos em todas as sequências.

5.4.3.7. Fungo filamentososo 13

Os resultados da sequência do fungo filamentososo 13, analisados pelo BLAST, estão indicados na Tabela 12.

TABELA 12 - SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS COM A REGIÃO SEQUENCIADA DO FUNGO FILAMENTOSO 13

Fungo Filamentososo 13	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
Nº de nucleotídeos 550 pb	<i>Penicillium sp.</i> (FJ770066)	993	0.0	100
	<i>Penicillium granulatum</i> (DQ681334)	993	0.0	100
	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AB479305)	993	0.0	100

```
Fungo 13          CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCA 60
FJ770066         CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCA 60
AB479305         CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCA 60
DQ681334         CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCA 60
*****
```

```
Fungo 13          CCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCCGGGGGGCT 120
FJ770066         CCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCCGGGGGGCT 120
AB479305         CCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCCGGGGGGCT 120
DQ681334         CCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCCGGGGGGCT 120
*****
```

```
Fungo 13          TACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTC 180
FJ770066         TACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTC 180
AB479305         TACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTC 180
DQ681334         TACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTC 180
*****
```

```
Fungo 13          TGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGA 240
FJ770066         TGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGA 240
AB479305         TGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGA 240
DQ681334         TGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGA 240
*****
```

```
Fungo 13          TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGT 300
FJ770066         TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGT 300
AB479305         TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGT 300
DQ681334         TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGT 300
*****
```

```

Fungo 13      CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG 360
FJ770066     CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG 360
AB479305     CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG 360
DQ681334     CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG 360
*****

Fungo 13      CTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCG 420
FJ770066     CTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCG 420
AB479305     CTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCG 420
DQ681334     CTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCG 420
*****

Fungo 13      AAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTG 480
FJ770066     AAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTG 480
AB479305     AAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTG 480
DQ681334     AAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTG 480
*****

Fungo 13      TAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAG 540
FJ770066     TAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAG 540
AB479305     TAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAG 540
DQ681334     TAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAG 540
*****

Fungo 13      GTAGGGATAC 550
FJ770066     GTAGGGATAC 550
AB479305     GTAGGGATAC 550
DQ681334     GTAGGGATAC 550
*****

```

FIGURA 33 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DO FUNGO FILAMENTOSO 13 COM AS TRÊS SEQUÊNCIAS DE MAIOR HOMOLOGIA DEPOSITADAS NO GENBANK

FJ770066, *AB479305* e *DQ681334* são os números de acesso do GenBank às sequências de *Penicillium* sp, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium granulosum*, respectivamente, que apresentaram maior homologia com a região sequenciada do fungo 13. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos em todas as sequências.

O tamanho dos produtos de PCR dos diferentes fungos filamentosos isolados variou de 650 pb a 700 pb. Para os fungos 5 e 12 o fragmento amplificado foi de aproximadamente 650 pb, para os fungos filamentosos 9, 11, 13 e 10 foi de aproximadamente 680 pb e para o fungo filamentoso 4 foi de aproximadamente 700 pb.

O fungo filamentoso isolado 4 apresentou produto de PCR de aproximadamente 700 pb. O fragmento foi sequenciado e a análise da sequência pelas ferramentas de bioinformática indicou que a maior similaridade foi observada com espécies de *Cladosporium*. Esses resultados confirmam as análises fenotípicas. De acordo com o sequenciamento o fungo filamentoso 4 pode pertencer às espécies *Cladosporium tenuissimum* ou *Cladosporium coralloides*. Para realizar a

diferenciação destas espécies seria necessário repetir o sequenciamento para obter maior cobertura da região sequenciada.

Entre os quatro fungos isolados que apresentaram produtos da reação de PCR de aproximadamente a 680 pb, três foram identificados como *Penicillium* com base no sequenciamento, e um como *Aspergillus fumigatus*. Os dois fungos isolados que apresentaram produtos de PCR de aproximadamente 650 pb também foram identificados como *Penicillium*.

Portanto, dos sete fungos isolados, cinco pertencem ao gênero *Penicillium* como definido pelo método fenotípico e sequenciamento da região ITS. As análises fenotípicas realizadas não permitiram a diferenciação morfológica entre as espécies. Os dados do sequenciamento indicam que os fungos 5 e 12 pertencem às espécies *P. griseofulvum* ou *P. citrinum*; os fungos 11 e 9 as espécies *P. meleagrinum* ou *P. sumatrense*; o fungo 13 as espécies *P. chrysogenum* ou *P. granulatum*; o fungo 4 *Cladosporium tenuissimum* ou *Cladosporium coralloides*. O fungo filamentoso 10 foi identificado como *Aspergillus fumigatus*.

Nenhuma das técnicas utilizadas permitiu a identificação em nível de espécie de todos os fungos filamentosos isolados.

Muitos estudos sobre a contaminação de alimentos por fungos filamentosos são encontrados na literatura (COMERIO; PINTO; VAAMONDE, 1998; XUFRE *et al.*, 2000; GOCK *et al.*, 2003; PLAZA *et al.*, 2004; DANTIGNY *et al.*, 2005; GUIMARÃES, 2005; LAROCHE; FINE; GERVAIS, 2005; ASTORECA *et al.*, 2007; FLOREZ *et al.*, 2007; GIORNI *et al.*, 2007; SAMAPUNDOA *et al.*, 2007; VALERO *et al.*, 2007; JUDET *et al.*, 2008; SELMA; MARTINEZ-CULEBRAS; AZNAR, 2008; BARBERIS *et al.*, 2009; HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009; HUANG *et al.*, 2009; NEVAREZ *et al.*, 2009; POSE *et al.*, 2009; GOUGOULIA; KOUTSOUMANIS, 2010), mas poucos envolvendo a contaminação de produtos cosméticos (MISLIVEC; BANDLER; ALLEN, 1993; TRAN; HITCHINS, 1994; ANELICH; KORSTEN, 1996; ÁLVAREZ-LERMA *et al.*, 2008; LUNDOV, M. D.; ZACHARIAE, 2008).

Neste trabalho foram isolados diferentes fungos filamentosos de talco comercial cosmético, cinco fungos do gênero *Penicillium sp.*, um do gênero *Cladosporium sp.* e o *Aspergillus fumigatus*, os quais possuem entre suas espécies micro-organismos patogênicos. A identificação de fungos filamentosos presentes como contaminantes em talcos comerciais cosméticos é uma ferramenta eficaz na avaliação do risco de deterioração por fungos e previsão de vida útil dos cosméticos.

Os fabricantes e os consumidores de talcos comerciais cosméticos devem estar cientes dos riscos e cuidados com a produção, armazenamento e o uso de talcos amplamente utilizados pela população brasileira.

6. CONCLUSÃO

Foram isolados 7 fungos filamentosos de 50 amostras de talcos comerciais cosméticos com pouca atividade de água.

A identificação morfológica macroscópica e microscópica sugere que o fungo filamentoso 10 é do gênero *Aspergillus sp.*, o fungo filamentoso 4 é do gênero *Cladosporium sp* e os fungos filamentosos 5, 9, 11, 12 e 13 são do gênero *Penicillium sp.*,

Nos meios de cultura extrato de malte e czapeck o fungo filamentoso 10 apresentou valores de velocidade de crescimento radial de $0,59 \text{ mm.h}^{-1}$ e $0,41 \text{ mm.h}^{-1}$ e o fungo filamentoso 4 valores de $0,16 \text{ mm.h}^{-1}$ e $0,09 \text{ mm.h}^{-1}$, respectivamente, e os fungos filamentosos 5, 9, 11, 12 e 13 apresentaram valores próximos entre si.

O sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal permitiu identificar o fungo filamentoso 10 como *Aspergillus fumigatus*, o fungo filamentoso 4 no gênero *Cladosporium sp.* e os fungos filamentosos 5, 9, 11, 12 e 13 no gênero *Penicillium sp.*.

REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. Dados do mercado - Panorama do setor. p. disponível em: <http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado_panorama_setor.php>. Acesso em 28/02/2010. 2009.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 th edition. John Wiley & Sons, INC, 1996.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v.25, n.17, p. 3389-402. 1997.
- ÁLVAREZ-LERMA, F. *et al.* Moisturizing body milk as a reservoir of Burkholderia cepacia: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. **Critical Care**. v.12, n.1, p. 1-6. 2008.
- AMICUCCI, A. *et al.* Morphological and molecular characterisation of *Pulvinula constellatio* ectomycorrhizae. **FEMS Microbiological Letters**. v.194, p. 121-125. 2001.
- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**. v.6, p. 769-779. 2004.
- ANDERSON, I. C.; PARKIN, P. I. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. **Journal of Microbiological Methods**. v.68, n.2, p. 248-253. 2007.
- ANELICH, L. E.; KORSTEN, L. Survey of micro-organisms associated with spoilage of cosmetic creams manufactured in South Africa. **International Journal of Cosmetics Science**. v.18, p. 25-40. 1996.
- ANVISA. **Detecção e identificação dos fungos de importância médica**. 2004a.
- ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: 2004b.
- ASTORECA, A. *et al.* Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. **International Journal Food Microbiology**. v.119, n.3, p. 314-318. 2007.
- AUSUBEL, M. F. *et al.* **Short Protocols in Molecular Biology**. New York: Wiley, 1999.
- BARBERIS, C. *et al.* Use of propyl paraben to control growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* section Nigri species on peanut meal extract agar. **International Journal Food Microbiology**. v.136, n.1, p. 133-136. 2009.
- BONTORIM, G. **Estudo de estabilidade de emulsão cosmética utilizando reologia e técnicas convencionais de análise**. Curitiba, 2009. f. - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná.
- BOSCO, S. M. G. *et al.* Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region. **Medical Micology**. v.46, p. 557-565. 2008.

BRAND, D. **Fisiologia de crescimento e de esporulação de fungos nematófagos cultivados em meio sólido**. Curitiba, 2006. f. - Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná.

BRANNAN, D. K.; DILLE, J. C. Type of closure prevents microbial contamination of cosmetics during consumer use. **Applied and environmental microbiology**. v.56, p. 1476-1479. 1990.

BRASIL. RDC nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução. **ANVISA**, Brasília, DF, 1999.

BRASIL. Resolução RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001. **ANVISA**, Brasília, DF, 2001. p. Disponível em <e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?> Acesso em: 02/03/2010.

BRASIL. Decreto Nº. 79.094, de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. p. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16611>> Acesso em: 27/2/2010. Brasília, 1977.

CANO, J.; GUARRO, J.; GENÉ, J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.6, p. 2450-2454. 2004.

CARDOSO, P. G. *et al.* Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p. 71-77. 2007.

CARVALHO, W. C. **Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia - Contagem de células sanguíneas**. Coopmed Editora, 1994.

CASTLE, A. *et al.* Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. **Applied and environmental microbiology**. v.64, n.1, p. 133-137. 1998.

CHEN, B. Y.; JANES, H. W. **PCR Cloning Protocols**. second edition. New Brunswick, NJ: Humana Press, 2002.

CHOI, Y. J. *et al.* Morphological and molecular characterization of the causal agent of Downy Mildew on quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Mycopathologia**. p. 2010.

COMERIO, R.; PINTO, V. E. F.; VAAMONDE, G. Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. **International Journal of Food Microbiology**. v.42, p. 219-223. 1998.

DANTIGNY, P. *et al.* Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. **International Journal of Food Microbiology**. v.98, p. 261-269. 2005.

DECAGON, Ed. **Water Activity News**. Washington ed. 2008.

DITCHFIELD, C. **Estudo dos métodos para a medida da atividade de água**. São Paulo, 2000. f. - Engenharia Química, Escola Politécnica.

- FINE, F.; GERVAIS, P. Decontamination des poudres alimentaires: revue bibliographique et nouvelles perspectives. **Sciences des Aliments**. v.23, p. 367-394. 2003.
- FISHER, G.; DOTT, W. Quality assurance and good laboratory practice in the mycological laboratory compilation of basic techniques for the identification of fungi. **International Journal Hygiene Environmental Health**. v.205, n.6, p. 433-442. 2002.
- FLOREZ, A. B. *et al.* Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. **International Dairy Journal**. v.17, n.4, p. 350-357. 2007.
- FUNDER, S. **Practical Mycology- Manual for identification of fungi**. New York: Hafner Publishing Company INC, 1968.
- GEISER, D. M. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. **Medical Micology**. v.47, p. 521-529. 2009.
- GENBANK. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: Acesso em: 24 de abril de 2010.
- GIORNI, P. *et al.* Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. **International Journal of Food Microbiology**. v.122, p. 109-113. 2007.
- GOCK, M. A. *et al.* Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. **International Journal of Food Microbiology**. v.81, n.1, p. 11-19. 2003.
- GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. **FEMS Microbiological Letters**. p. 1-12. 2009.
- GOUGOULIA, M.; KOUTSOUMANIS, K. P. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. **International Journal Food Microbiology**. v.doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.021 p. 2010.
- GRANT, W. D. Life at low water activity. **Phil. Trans. R. Soc. Land**. v.359, p. 1249-1267. 2004.
- GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. Curitiba, 2005. f. - Departamento Farmácia, Universidade Federal do Paraná.
- GUIMARAES, T. M. *et al.* Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.22, p. 119-126. 2006.
- HAGESKAL, G. *et al.* Diversity and significance of mold species in norwegian drinking water. **Applied and environmental microbiology**. v.72, n.12, p. 7586-7593. 2006.
- HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. The study of fungi in drinking water. **Mycological Research** v.113, p. 165-172. 2009.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.** v.41, p. 95-98. 1999.

- HAUGLAND, R. A.; HECKMAN, J. L.; WYMER, L. J. Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. **Journal of Microbiological Methods**. v.37, p. 165-176. 1999.
- HERRERA, T.; ULLOA, M. **El reino de los hongos - Mycologia básica y aplicada**. 1. Universidad Nacional Autónoma de México, 1990.
- HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research III**. p. 509-547. 2007.
- HOFF, B.; POGGELER, S.; KUCK, U. Eight years after its discovery, Fleming's *Penicillium* strain discloses the secret of its sex. **Eukariotic Cell**. v.7, n.3, p. 465-470. 2008.
- HONTI, Z. E. *et al.* Morphological and molecular characterization of *Humaria* and *Genea* ectomycorrhizae from Hungarian deciduous forests. **Mycorrhiza**. v.18, p. 133-143. 2008.
- HUANG, Y. *et al.* Effect of agar concentration on the matric potential of glycerol agar media and the germination and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi. **International Journal of Food Microbiology**. v.133, p. 179-185. 2009.
- JUDET, D. *et al.* Distributions of the growth rate of the germ tubes and germination time of *Penicillium chrysogenum* conidia depend on water activity. **Food Microbiology**. v.25, p. 902-907. 2008.
- KARAKOUSIS, A. *et al.* An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. **Journal of Microbiological Methods**. v.65, n.1, p. 38-48. 2006.
- KISS, L. Advances in the identification of emerging powdery mildew fungi using morphological and molecular data. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. v.49, p. 1217-1225. 2002.
- KUTTY, P. K. *et al.* Multistate outbreak of *Burkholderia cenocepacia* colonization and infection associated with the use of intrinsically contaminated alcohol-free mouthwash. **Chest**. v.132, p. 1825-1831. 2007.
- KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. Sexual reproduction in *Aspergillus* species of medical or economical importance: why so fastidious? **Trends in Microbiology**. v.17, n.11, p. 481-487. 2009.
- LACAZ, C. D. S. *et al.* **Guia de identificação de Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico**. 1. São Paulo: FAPESP, 1998.
- LARENA, I. *et al.* Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**. v.75, p. 187-194. 1999.
- LAROCHE, C.; FINE, F.; GERVAIS, P. Water activity affects heta resistance of microorganisms in food powders. **International Journal of Food Microbiology**. v.97, p. 307-315. 2005.
- LARONE, D. H. **Medically important fungi - A guide to identification**. 4 edição. Washington: American Society for Microbiology Press, 2002.
- LINTNER, K.; GENET, V. A physical method for preservation of cosmetic products. **International Journal of Cosmetics Science**. v.20, n.2, p. 103-115. 1999.

LOPEZ, J. A. C. **Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide**. Montpellier, 1998. f. - Sciences et techniques du Languedoc, Université Montpellier II.

LUNDOV, M. D. *et al.* Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. **Contact Dermatitis**. v.60, p. 70-78. 2009.

LUNDOV, M. D.; ZACHARIAE, C. Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008. **International Journal of Cosmetics Science**. v.30, p. 471-474. 2008.

MAKIMURA, K. *et al.* Fungal flora on board the Mir-Space Station, identification by morphological features and ribosomal DNA sequences. **Microbial Immunology**. v.45, n.5, p. 357-363. 2001.

MINAMOTO, K. Skin sensitizers in cosmetics and skin care products. **Japan Journal of Hygiene**. v.65, p. 20-29. 2010.

MISLIVEC, P. B.; BANDLER, R.; ALLEN, G. Incidence of fungi in shared-use cosmetics available to the public. **Journal of AOAC International**. v.2, p. 430-436. 1993.

MURREL, W. G.; SCOTT, W. J. The heat resistance of bacterial spores at various water activities **Journal of General Microbiology**. v.43, p. 411-425. 1966.

NESCI, A.; RODRIGUEZ, M.; ETCHEVERRY, M. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. **Journal of Applied Microbiology**. v.95, p. 279-287. 2003.

NEVAREZ, L. *et al.* Physiological traits of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water. **International Journal of Food Microbiology**. v.130, p. 166-171. 2009.

NOUHRA, E. R. *et al.* Morphological and molecular characterization of selected *Ramaria* mycorrhizae. **Mycorrhiza**. v.15, p. 55-59. 2005.

O'GORMAN, C. M.; FULLER, H. T.; DYER, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**. v.475, p. 471-475. 2009.

OLIVEIRA, M. *et al.* Main airborne Ascomycota spores: characterization by culture, spore morphology, ribosomal DNA sequences and enzymatic analysis. **Environmental biotechnology**. p. 2010.

PACK, L. D. *et al.* Microbial contamination associated with mascara use. **Optometry**. v.79, p. 587-593. 2008.

PINHEIRO, M. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção de fungos produtores de aflotoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju**. Brasília, 2004. 149 f. - Universidade Católica de Brasília - UCB.

PLAZA, P. *et al.* Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. **International Journal of Food Microbiology**. v.90, p. 75-92. 2004.

- POSE, G. *et al.* Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. **International Journal Food Microbiology**. v.135, n.1, p. 60-63. 2009.
- SAMAPUNDOA, S. *et al.* Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. **Food Microbiology**. v.24, p. 517-529. 2007.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning- a laboratory manual**. New York: CSH, 1989.
- SAMPAIO, M. A. R. D.; OLIVEIRA, V. A. G. Qualidade Assegurada de Talco para uso Infantil. **Cosmetics & Toiletries**. v.5, n.4, p. 1993.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.74, n.12, p. 5463-7. 1977.
- SELMA, M. V.; MARTINEZ-CULEBRAS, P. V.; AZNAR, R. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**. v.122, n.1-2, p. 126-134. 2008.
- SMITH, D. **Maintenance of filamentous fungi**. London: Academic Press, 1991.
- TANCINOVA, D.; LABUDA, R. Fungi on wheat bran and their toxinogenicity. **Annal of Agricultural and Environmental Medicine**. v.16, p. 325-331. 2009.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. San Francisco: Benjamin Cummings, 2002.
- TRAN, T. T.; HITCHINS, A. D. Microbial survey of shared-use cosmetic test kits available to the public. **Journal of Industrial Microbiolog**. p. 389-391. 1994.
- USP. Microbiological attributes of non sterile pharmaceutical products. **United States Pharmacopeia**. v.25, p. 2205. 2002.
- VALERO, A. *et al.* Studies on the interaction between grape-associated filamentous fungi on a synthetic medium. **International Journal of Food Microbiology**. v.113, n.3, p. 271-276. 2007.
- VARVARESOU, A. *et al.* Self-preserving cosmetics. **International Journal of Cosmetics Science**. v.31, p. 163-175. 2009.
- VILELA, R. *et al.* Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep. **Journal of Clinical Microbiology**. v.48, n.2, p. 427-432. 2010.
- WATANABE, T. **Soil and Seed Fungi - Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species**. CRC Press, 2002.
- XUFRE, A. *et al.* Use of RAPD analysis for differentiation among six enological *Saccharomyces spp.* strains. **Food Technology and Biotechnology**. v.30, p. 53-58. 2000.
- YABLONSKI, J. I.; MANCUSO, S. E. Preservative efficacy testing: accelerating the process. **Cosmetics & Toiletries**. p. 51-60. 2007.

ANEXOS

GenBank: GU270579.1

Cladosporium sp. FPCLad04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

LOCUS GU270579 556 bp DNA linear
 PLN 20-JAN-2010

DEFINITION Cladosporium sp. FPCLad04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;

internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and

internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal

RNA gene, partial sequence.

ACCESSION GU270579

VERSION GU270579.1 GI:283975961

KEYWORDS .

SOURCE Cladosporium sp. FPCLad04

ORGANISM [Cladosporium sp. FPCLad04](#)

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;

Saccharomyceta;

Pezizomycotina; Leotiomyceta; Dothideomyceta;

Dothideomycetes;

Dothideomycetidae; Capnodiales; Davidiellaceae;

mitosporic

Davidiellaceae; Cladosporium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 556)

AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B., Bonfim, T.M.B., Brand, D. and Fadel-Picheth, C.M.T.

TITLE Identification of filamentous fungi isolated from commercial talc

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 556)

AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B., Bonfim, T.M.B., Brand, D. and Fadel-Picheth, C.M.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-DEC-2009) Pharmacy, Universidade Federal do Parana,

Av. Lothario Meissner 632, Curitiba, Parana

80.210-170, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..556

/organism="Cladosporium sp. FPCLad04"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="FPCLad04"

/isolation_source="talc"

/db_xref="taxon:[707014](#)"

```

rev_name: ITS4" /note="PCR_primers=fwd_name: ITS1F,
  rRNA <1..9
  /product="18S ribosomal RNA"
  misc RNA 10..158
  /product="internal transcribed spacer 1"
  rRNA 159..316
  /product="5.8S ribosomal RNA"
  misc RNA 317..471
  /product="internal transcribed spacer 2"
  rRNA 472..>556
  /product="28S ribosomal RNA"

```

ORIGIN

```

  1 atttagagga agtaaaagtc gtaacaaggt ctccgtaggt gaacctgcgg agggatcatt
  61 acaagtgacc cgggtctaac caccgggatg ttcataacc tttgttgtcc gactctgttg
  121 cctccggggc gaccctgcct tcgggcgggg gctccgggtg gacacttcaa actcttgctg
  181 aactttgcag tctgagtaaa cttaatattt aaattaaaac ttttaacaac ggatctcttg
  241 gttctggcat cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgataagt aatgtgaatt gcagaattca
  301 gtgaatcatc gaatctttga acgcacattg cgccccctgg tattccgggg ggcattgcctg
  361 ttcgagcgtc atttcaccac tcaagcctcg cttggtattg ggcattgcgg tccgccgcgt
  421 gcctcaaadc gaccggctgg gtcttctgtc ccctaagcgt tgtggaaact attcgctaaa
  481 ggggtgttcgg gaggctacgc cgtaaaacaa cccatttct aaggttgacc tcggatcagg
  541 tagggatacc cgctga

```

//

GenBank: GU270574.1

Penicillium sp. FPPen05 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

LOCUS GU270574 522 bp DNA linear
 PLN 20-JAN-2010

DEFINITION *Penicillium* sp. FPPen05 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
 internal transcribed spacer 2, complete sequence;
 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION GU270574
 VERSION GU270574.1 GI:283975956

KEYWORDS .

SOURCE *Penicillium* sp. FPPen05

ORGANISM [Penicillium sp. FPPen05](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
 Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
 Trichocomaceae;
 mitosporic Trichocomaceae; *Penicillium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 522)

AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B.,
 Bonfim, T.M.B., Brand, D. and
 Fadel-Picheth, C.M.T.

TITLE Identification of filamentous fungi isolated from commercial talc

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 522)

AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B.,
 Bonfim, T.M.B., Brand, D. and
 Fadel-Picheth, C.M.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-DEC-2009) Pharmacy, Universidade
 Federal do Parana,
 Av. Lothario Meissner 632, Curitiba, Parana
 80.210-170, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..522
 /organism="Penicillium sp. FPPen05"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="FPPen05"
 /isolation_source="talc"
 /db_xref="taxon:[707015](#)"
 /note="PCR_primers=fwd_name: ITS1F,

rev_name: ITS4"

rRNA <1..43
 /product="18S ribosomal RNA"
misc RNA 44..183
 /product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 184..340
 /product="5.8S ribosomal RNA"
misc RNA 341..507
 /product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 508..>522
 /product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 tcgtaacaag gttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat taccgagtgc gggcccctcg
61 gggcccaacc tcccaccgt gttgcccga cctatggtgc ctcggcgggc cccgcgccg
121 ccgacggccc cctgaacgc tgtctgaagt tgcagtctga gacctataac gaaattagtt
181 aaaactttca acaacggatc tcttggttcc ggcacgatg aagaacgcag cgaaatgcga
241 taactaatgt gaattgcaga attcagtgaa tcatcgagtc tttgaacgca cattgcgccc
301 tctggtattc cggagggcat gcctgtccga gcgtcattgc tgccctcaag cccggcttgt
361 gtggtgggcc ccgtccccc cgccgggggg acgggcccga aaggcagcgg cggcaccgcg
421 tccggtcctc gagcgtatgg ggcttcgtca cccgctctag taggccggc cggcgccagc
481 cgaccccaaa cctttaatta tctcaggttg acctcgatc ag
  
```

//

GenBank: GU270576.1

Penicillium sp. FPPen09 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

LOCUS GU270576 540 bp DNA linear
 PLN 20-JAN-2010
 DEFINITION *Penicillium* sp. FPPen09 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
 internal transcribed spacer 2, complete sequence;
 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION GU270576
 VERSION GU270576.1 GI:283975958
 KEYWORDS .
 SOURCE *Penicillium* sp. FPPen09
 ORGANISM [Penicillium sp. FPPen09](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
 Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
 Trichocomaceae;
 mitosporic Trichocomaceae; *Penicillium*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 540)
 AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B.,
 Bonfim, T.M.B., Brand, D. and
 Fadel-Picheth, C.M.T.
 TITLE Identification of filamentous fungi isolated from
 commercial talc
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 540)
 AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B.,
 Bonfim, T.M.B., Brand, D. and
 Fadel-Picheth, C.M.T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-DEC-2009) Pharmacy, Universidade
 Federal do Parana,
 Av. Lothario Meissner 632, Curitiba, Parana
 80.210-170, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..540
 /organism="Penicillium sp. FPPen09"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="FPPen09"
 /isolation_source="talc"
 /db_xref="taxon:707016"
 /note="PCR_primers=fwd_name: ITS1F,
 rev_name: ITS4"

rRNA <1..30
 /product="18S ribosomal RNA"
misc RNA 31..206
 /product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 207..363
 /product="5.8S ribosomal RNA"
misc RNA 364..536
 /product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 537..>540
 /product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 tccgtagtg aacctgcgga aggatcatta ctgagtgagg gccctcggg gtccaacctc
61 ccaccctgt ttaacgaacc tttggtgctt cggcgggcc gcctcacggc cgccgggggg
121 ctctgcccc cgggcccgcg cccgccgaag ccccccttg aacgctgtct gaagtttgca
181 gtctgagaaa ctagctaaat tagttaaaac tttcaacaac ggatctcttg gttccggcat
241 cgatgaagaa cgcagcgaat tgcgataact aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcatc
301 gagtctttga acgcacattg cgccctctgg tattccggag ggcattgctg tccgagcgtc
361 attgctgccc tcaagcacgg cttgtgtgtt gggccccctg cccccctct gccgggggga
421 cgggcccgaa aggcagcggc ggcaccgctg ccggtcctcg agcgtatggg gcttcgtcac
481 ccgctcttgt aggcccgcc ggcgccagcc gacccaacc ctaaattttt ttcaggttga

```

//

GenBank: GQ499183.1

Aspergillus fumigatus strain FPAf10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

LOCUS GQ499183 537 bp DNA linear
 PLN 30-SEP-2009

DEFINITION *Aspergillus fumigatus* strain FPAf10 18S ribosomal RNA gene, partial

sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION GQ499183
 VERSION GQ499183.1 GI:259563642

KEYWORDS .

SOURCE *Aspergillus fumigatus*

ORGANISM [Aspergillus fumigatus](#)

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;

Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae; mitosporic Trichocomaceae; *Aspergillus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 537)

AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B., Bonfim, T.B., Brand, D. and

Fadel-Picheth, C.M.T.

TITLE Identification of filamentous fungi isolated from commercial talc

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 537)

AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B., Bonfim, T.B., Brand, D. and

Fadel-Picheth, C.M.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (20-AUG-2009) Pharmacy, Universidade Federal do Parana, Av. Lothario Meissner 632, Curitiba, Parana 80.210-170, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..537

/organism="Aspergillus fumigatus"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="FPAf10"

/isolation_source="talc"

/db_xref="taxon:5085"

/note="PCR_primers=fwd_name: ITS1F,

rev_name: ITS4"

rRNA <1..19
 /product="18S ribosomal RNA"
misc RNA 20..204
 /product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 205..360
 /product="5.8S ribosomal RNA"
misc RNA 361..528
 /product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 529..>537
 /product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 acctgcggaa ggatcattac cgagtgaggg ccctctgggt ccaacctccc acccgtgtct
61 atcgtacctt gttgcttcgg cgggcccgcg gtttcgacgg ccgccgggga ggccttgcg
121 ccccgggccc gcgcccgcg aagaccccaa catgaacgct gttctgaaag tatgcagtct
181 gagttgatta tcgtaatcag ttaaaacttt caacaacgga tctcttggtt ccggcatcga
241 tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgag
301 tctttgaacg cacattgcgc cccctggtat tccggggggc atgcctgtcc gagcgtcatt
361 gctgccctca agcacggcct gtgtgttggg cccccgtccc cctctcccgg gggacgggcc
421 cgaaaggcag cggcggcacc gcgtccggtc ctcgagcgta tggggctttg tcacctgctc
481 tgtaggcccg gccggcgcca gccgacacc aactttattt ttctaaggtt gacctcg

```

//

GenBank: GU270575.1

Penicillium sp. FPPen11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

LOCUS GU270575 377 bp DNA linear
 PLN 20-JAN-2010

DEFINITION Penicillium sp. FPPen11 internal transcribed spacer 1, partial

sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer

2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION GU270575

VERSION GU270575.1 GI:283975957

KEYWORDS .

SOURCE Penicillium sp. FPPen11

ORGANISM [Penicillium sp. FPPen11](#)

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;

Pezizomycotina;

Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;

Trichocomaceae;

mitosporic Trichocomaceae; Penicillium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 377)

AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B., Bonfim, T.M.B., Brand, D. and Fadel-Picheth, C.M.T.

TITLE Identification of filamentous fungi isolated from commercial talc

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 377)

AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B., Bonfim, T.M.B., Brand, D. and Fadel-Picheth, C.M.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-DEC-2009) Pharmacy, Universidade Federal do Parana,

Av. Lothario Meissner 632, Curitiba, Parana

80.210-170, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..377

/organism="Penicillium sp. FPPen11"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="FPPen11"

/isolation_source="talc"

/db_xref="taxon:[707017](#)"

/note="PCR_primers=fwd_name: ITS1F,

rev_name: ITS4"

[misc RNA](#)

<1..34

[rRNA](#) /product="internal transcribed spacer 1"
 35..191
[misc RNA](#) /product="5.8S ribosomal RNA"
 192..363
[rRNA](#) /product="internal transcribed spacer 2"
 364..>377
 /product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 aagtttgag tctgagaaac tagctaaatt agttaaact ttcaacaacg gatctcttgg
61 ttccggnatc gatgaagaac gcagcgaat gcgataacta atgtgaattg cagaattcag
121 tgaatcatcg agtntttgaa cgcacattgc gccctctggt attccggagg gcatgcntgt
181 cngagcgtca ttgatgcct caagcacggn ttgtgtgttg ggcccccgtc cccccctntg
241 ccggggggac gggcccgaac ggcagcggcg gcaccgctc cggtcntcga gcgtatgggg
301 cttcgtcacc cgctcttcta ggcccggccg gcgccagccg accccaacc taaatTTTT
361 tcaggttgac ctcgat

```

//

GenBank: GU270577.1

Penicillium sp. FPPen12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

LOCUS GU270577 522 bp DNA linear
 PLN 20-JAN-2010
 DEFINITION *Penicillium* sp. FPPen12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
 internal transcribed spacer 2, complete sequence;
 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION GU270577
 VERSION GU270577.1 GI:283975959
 KEYWORDS .
 SOURCE *Penicillium* sp. FPPen12
 ORGANISM [Penicillium sp. FPPen12](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
 Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
 Trichocomaceae;
 mitosporic Trichocomaceae; *Penicillium*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 522)
 AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B.,
 Bonfim, T.M.B., Brand, D. and
 Fadel-Picheth, C.M.T.
 TITLE Identification of filamentous fungi isolated from
 commercial talc
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 522)
 AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B.,
 Bonfim, T.M.B., Brand, D. and
 Fadel-Picheth, C.M.T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-DEC-2009) Pharmacy, Universidade
 Federal do Parana,
 Av. Lothario Meissner 632, Curitiba, Parana
 80.210-170, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..522
 /organism="Penicillium sp. FPPen12"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="FPPen12"
 /isolation_source="talc"
 /db_xref="taxon:707018"
 /note="PCR_primers=fwd_name: ITS1F,
 rev_name: ITS4"

rRNA <1..31
 /product="18S ribosomal RNA"
misc RNA 32..171
 /product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 172..328
 /product="5.8S ribosomal RNA"
misc RNA 329..496
 /product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 497..>522
 /product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1  ttccgtaggt gaacctgctg aaggatcatt accgagtgcg ggcccctcgg ggcccaacct
61  cccaccgctg ttgcccgaac ctatgttgcc tcggcgggcc ccgcccgcgc cgacggcccc
121 cctgaacgct gtctgaagtt gcagtctgag acctataacg aaattagtta aaactttcaa
181 caacggatct cttggttccg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcatg aactaatgtg
241 aattgcagaa ttcagtgaat catcgagtct ttgaacgcac attgcccctt ctggtattcc
301 ggagggcatg cctgtccgag cgctcattgct gccctcaagc ccggcttctg tggtggggcc
361 cgtccccccc gccgggggga cgggcccgaag aggcagcggc ggcaccgcgt ccggtcctcg
421 agcgtatggg gcttcgtcac ccgctctagt aggcccggcc ggcgcccagc gacccccaac
481 ctttaattat ctcaggttga cctcgatca ggtaggata cc

```

//

GenBank: GU270578.1

Penicillium sp. FPPen13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

LOCUS GU270578 550 bp DNA linear
 PLN 01-FEB-2010
 DEFINITION *Penicillium* sp. FPPen13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
 internal transcribed spacer 2, complete sequence;
 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION GU270578
 VERSION GU270578.1 GI:283975960
 KEYWORDS .
 SOURCE *Penicillium* sp. FPPen13
 ORGANISM [Penicillium sp. FPPen13](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
 Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
 Trichocomaceae;
 mitosporic Trichocomaceae; *Penicillium*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 550)
 AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B.,
 Bonfim, T.M.B., Brand, D. and
 Fadel-Picheth, C.M.T.
 TITLE Identification of filamentous fungi isolated from
 commercial talc
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 550)
 AUTHORS Jastale Pinto, F.C., Dallagassa, C.B.,
 Bonfim, T.M.B., Brand, D. and
 Fadel-Picheth, C.M.T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-DEC-2009) Pharmacy, Universidade
 Federal do Parana,
 Av. Lothario Meissner 632, Curitiba, Parana
 80.210-170, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..550
 /organism="Penicillium sp. FPPen13"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="FPPen13"
 /isolation_source="talc"
 /db_xref="taxon:707019"
 /note="PCR_primers=fwd_name: ITS1F,
 rev_name: ITS4"

rRNA <1..27
 /product="18S ribosomal RNA"
misc RNA 28..201
 /product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 202..358
 /product="5.8S ribosomal RNA"
misc RNA 359..524
 /product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 525..>550
 /product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1  cgtaggtgaa cctgcggaag gatcattacc gagtgagggc cctctgggtc caacctcca
61  cccgtgttta ttttaccttg ttgcttcggc gggcccgcct taactggccg ccggggggct
121  tacgcccccg ggcccgcgcc cgccgaagac accctcgaac tctgtctgaa gattgtagtc
181  tgagtgaaaa tataaattat ttaaaacttt caacaacgga tctcttggtt ccggcatcga
241  tgaagaacgc agcgaaatgc gatacgtaat gtgaattgca aattcagtga atcatcgagt
301  ctttgaacgc acattgcgcc ccctggattt ccggggggca tgccctgtccg agcgtcattg
361  ctgccctcaa gcacggcttg tgtgttgggc cccgtcctcc gatcccgggg gacgggcccg
421  aaaggcagcg gcggcaccgc gtccggtcct cgagcgtatg gggctttgtc acccgctctg
481  taggcccgcg cggcgcttgc cgatcaacc aaatttttat ccaggttgac ctcgcatcag
541  gtagggatac
  
```

//