

SABINA MOSER TRALAMAZZA

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO NA
TAXONOMIA E SISTEMÁTICA DO GÊNERO *Aspergillus***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia do Rocio Dalzoto

Co-orientador: Dr. Jaime Iván Rodríguez Fernández

CURITIBA

2011

“Só sei que no fim tudo dá certo”

AGRADECIMENTOS

Passaram dois anos e os agradecimentos não mudaram muito desde a monografia, a mesma linda família, mesmo namorado maravilhoso, mesmos amigos muito legais e mesmas orientadoras atenciosas. Mas também conheci alguns novos colegas, amigos e conselheiros. Meus agradecimentos continuam verdadeiros e faço questão de re-expressá-los aqui, por isso agradeço a todos vocês por todo o apoio, amor, sabedoria, ensino, paciência, carinho e confiança, por me tranquilizarem, me fazerem rir e me ajudarem a finalizar mais esta jornada.

Enfim, obrigada:

Minha família: Irene, Flávio, Daniel e titia Anita, meu namorado Gregory, minha outra família curitibana: Suy, Álvaro, Thagla e Minny, meus orientadores: Ida, Patrícia e Jaime, meus amigos de mestrado: Angela, Mariana, Izabel, Paulo, Vívien, Elisa e Melissa, meus colegas do LabMicro: João, Diogo, Tássia, Rafaela, Elaine, Bruno, Franciele, Amanda e Wellison, meu amigos da Bio: Eloisa, Paloma, Priscila, Celso e Juliana, minhas companheiras de república: Nayara e Talita, minha amiga mineira Marcy e minhas amigas catarinas: Anna, Bárbara e Tharcy, ao Reuni pelo apoio financeiro, e aos meus queridos funguinhos por cooperarem! Por fim, agradeço a Deus/ Cosmos/ Energia/ Algo lá em cima que eu não sei o que é/ Força Superior, por tudo ter terminado bem!

RESUMO

Espécies e linhagens fúngicas são difíceis de diferenciar por exames visuais e microscópicos. Chaves de identificações são limitantes e muitas vezes a identificação de espécies muito próximas se torna inviável. As técnicas moleculares permitiram e facilitaram as identificações, porém seus reagentes são caros quando comparado a técnicas clássicas. A espectroscopia no infravermelho vem como uma nova ferramenta para auxiliar na taxonomia de micro-organismos de maneira rápida, barata e eficiente. O objetivo deste trabalho foi testar a viabilidade da técnica de espectroscopia no infravermelho na taxonomia do gênero *Aspergillus*, utilizando como parâmetros de validação análises morfológicas e oligonucleotídeos espécie-específicos. Foi realizado também, a comparação de duas metodologias, Reflectância Total Atenuada (ATR) utilizando esporos fúngicos em solução salina e Reflectância Difusa (DR) utilizando micélio fúngico liofilizado em pó. Foram analisados 11 isolados pertencentes as espécies *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*, em quintuplicatas, totalizando 110 espectros, 55 espectros por metodologia. Os espectros passaram por dois pré-tratamentos, 1º derivada + alisamento, somente alisamento ou nenhum pré-tratamento e foram analisados por quadrados mínimos parciais (PLS) e predição. Observou-se que a metodologia por DR apresentou melhores resultados. Os modelos tratados por alisamento identificaram corretamente 100% das amostras de validação externa na predição. Também foi observado que a forte influência da água prejudicou a sensibilidade nas análises por ATR. Concluiu-se que a espectroscopia no infravermelho é uma técnica viável e sensível para identificar espécies muito próximas de um mesmo grupo fúngico.

Palavras-chave: Espectroscopia. Infravermelho. *Aspergillus*.

ABSTRACT

Fungal species and strains are difficult to differentiate by visual and microscopic inspection. Keys for identification are limiting or unviable for closely related species. Molecular techniques extended and facilitated identifications, however they are expensive compared to classical techniques. Infrared spectroscopy comes as a new tool to help microorganism taxonomy as a fast, low cost and effective technique. The aim of this study was to assess the viability of infrared spectroscopy technique in *Aspergillus* genus taxonomy, using morphology and species-specific primers as validation parameters. Also, it was performed a comparison between two methodologies, Total Attenuated Reflectance (ATR), using fungal spores in saline solution and Diffuse Reflectance (DR), using lyophilized powder mycelia. Eleven isolates in quintuplicate, of *A. niger*, *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* were analyzed, a total of 110 spectra, 55 spectra of each methodology. Spectra were tested with two pre-treatment, 1^o derivative plus smoothing, just smoothing or raw data. Data was analyzed with Partial Least Squares (PLS) and prediction. Results showed that Diffuse Reflectance had better results. The smoothing model was able to correctly identify 100% of external validation samples in prediction. Also, water showed to be a strong and bad influence in ATR resulting spectra. Thus, we conclude infrared spectroscopy is a sensitive and viable identification technique for closely related species.

Key words: Spectroscopy. Infrared. *Aspergillus*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESPECTRO MAGNÉTICO DA LUZ	22
FIGURA 2. VIBRAÇÕES MOLECULARES ENCONTRADAS NA MOLÉCULA DA ÁGUA (H ₂ O) E SUAS BANDAS NO ESPECTRO NO INFRAVERMELHO.	24
FIGURA 3. MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DO ESPECTRÔMETRO POR DISPERSÃO	25
FIGURA 4. MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DE FT-IR (ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO – TRANSFORMADA DE FOURIER).....	26
FIGURA 5. ESQUEMA BÁSICO SOBRE O FUNCIONAMENTO DOS MECANISMOS DE REFLECTÂNCIA DIFUSA PARA DETECÇÃO DE AMOSTRAS SÓLIDAS	29
FIGURA 6. SUPORTE ATR PARA A COLOCAÇÃO DA AMOSTRA LÍQUIDA.	43
FIGURA 7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS COM DR	44
FIGURA 8. SUPORTE PARA A COLOCAÇÃO DA AMOSTRA EM PÓ.B: ACESSÓRIO DR ACOPLADO AO ESPECTRÔMETRO	45
FIGURA 9. ALGUNS ISOLADOS ANALISADOS NO ESTUDO PERTENCENTES AS ESPÉCIES <i>A.niger</i> , <i>A.ochraceus</i> E <i>A.westerdijkiae</i>	47
FIGURA 10. AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Aspergillus</i> sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS OPX7 ₃₇₂ F E OPX7 ₃₇₂ R PARA <i>A. niger</i>	48
FIGURA 11. AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Aspergillus</i> sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS OPX7 ₃₇₂ F E OPX7 ₃₇₂ R PARA <i>A. niger</i>	48
FIGURA 12. AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Aspergillus</i> sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS OCHRA-PaF E OCHRA-PaR PARA <i>A. ochraceus</i>	49
FIGURA 13. AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Aspergillus</i> sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS BT12Aw F E BT12Aw R PARA <i>A. westerdijkiae</i>	45

FIGURA 14. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 6 TRATADO COM ALISAMENTO	53
FIGURA 15. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 6 TRATADO COM ALISAMENTO APÓS RETIRADA DE VARIÁVEIS SEM INFORMAÇÃO DO ESPECTRO	54
FIGURA 16. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 12 TRATADO COM ALISAMENTO APÓS RETIRADA DE VARIÁVEIS SEM INFORMAÇÃO DO ESPECTRO	56
FIGURA 17. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 18 POR ALISAMENTO	59
FIGURA 18. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 19 TRATADO COM ALISAMENTO	61
FIGURA 19. VISÃO GERAL DAS REGIÕES ANALISADAS NOS ESPECTROS DOS GRUPOS/ ESPÉCIE A (<i>A.niger</i>), C (<i>A.ochraceus</i>) E D (<i>A.westerdijkiae</i>) ANALISADOS PELA METODOLOGIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA (DR)	62
FIGURA 20. VISÃO GERAL DAS REGIÕES ANALISADAS NOS ESPECTROS DOS GRUPOS/ ESPÉCIE A (<i>A.niger</i>), C (<i>A.ochraceus</i>) E D (<i>A.westerdijkiae</i>) TRATADOS POR ALISAMENTO E MSC, ANALISADOS PELA METODOLOGIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA (DR)	63
FIGURA 21. REGIÃO A AMPLIADA QUE APRESENTA BANDAS DISTINTAS ENTRE OS GRUPOS A, C e D ANALISADOS PELA METODOLOGIA DE DR	63
FIGURA 22. REGIÃO B AMPLIADA QUE APRESENTA BANDAS DISTINTAS ENTRE OS GRUPOS A, C e D ANALISADOS PELA METODOLOGIA DE DR	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ISOLADOS FÚNGICOS SELECIONADOS PARA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	42
TABELA 2. ANÁLISE DOS ESPECTROS POR REFLECTÂNCIA DIFUSA (DR) PARA A SEPARAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>A.niger</i> EM RELAÇÃO A <i>A. ochraceus</i> E <i>A. westerdijkiae</i>	51
TABELA 3. ANÁLISE DOS ESPECTROS REFLECTÂNCIA DIFUSA (DR) PARA A SEPARAÇÃO DE <i>A. ochraceus</i> E <i>A. westerdijkiae</i>	55
TABELA 4. ANÁLISE DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR) PARA A SEPARAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>A. niger</i> EM RELAÇÃO A <i>A. ochraceus</i> e <i>A. westerdijkiae</i> ..	58
TABELA 5. ANÁLISE DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR) PARA A SEPARAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>A. ochraceus</i> E <i>A. westerdijkiae</i>	60
TABELA 6. ANÁLISE POR PLS DE REGIÕES ESPECÍFICAS DOS ESPECTROS PARA A DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>A.niger</i> , <i>A.ochraceus</i> e <i>A.westerdijkiae</i>	65

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. PRINCIPAIS VANTAGENS COM O ADVENTO DA TECNOLOGIA DE FT-IR	27
QUADRO 2. PRINCIPAIS REGIÕES CONHECIDAS NO INFRAVERMELHO DE ALGUMAS MACROMOLÉCULAS E SEUS COMPOSTOS DOMINANTES.....	31
QUADRO 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E CONDIÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE PCR DE ISOLADOS DE <i>Aspergillus</i> sp	40
QUADRO 4. CONCENTRAÇÕES DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA AS DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Aspergillus</i> AVALIADAS NO PRESENTE TRABALHO	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ANN	- Artificial Neural Network (Rede Neural Artificial)
A/R	- Absorbance / Reflectance (Reflectância / Absorbância)
ATR	- Attenuated Total reflectance (Reflectância Total Atenuada)
BaF ₂	- Fluoreto de Bário
BDA	- Batata Dextrose Ágar
CaF ₂	- Fluoreto de Cálcio
CIA	- Clorofórmio Álcool Isoamílico
CTAB	- Brometo de Cetiltrimetilamônio
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DON	- Deoxinivalenol
DR	- Diffuse Reflectance (Reflectância Difusa)
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
FIR	- Far Infrared (Infravermelho distante)
FT-IR	- Infrared Fourier Transform (Infravermelho Transformada de Fourier)
IAPAR	- Instituto Agronômico do Paraná
IARC	- International Agency Research of Cancer (Agência Internacional de Pesquisa ao câncer)
IV	- Infravermelho
LabMicro	- Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
MEA	- Malte Extrato Ágar
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
MIR	- Mid Infrared (Infravermelho médio)
MSC	- Multiplicative Scatter Correction (Correção do espalhamento multiplicativo)
NaCl	- Cloreto de Sódio
NIR	- Near Infrared (Infravermelho próximo)
NIRS	- Near Infrared Spectroscopy (Espectroscopia no infravermelho próximo)
OTA	- Ocratoxina A
pb	- Pares de base
PCR	- Polimerase Chain Reaction Reação em Cadeia da Polimerase

PLS	- Partial Least Squares (Mínimos Quadrados Parciais)
PR	- Paraná
PVP	- Polivinilpirrolidona
RFLP	- Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Tamanhos dos Fragmentos de Restrição)
RNA	- Ácido ribonucléico
TBE	- Tris-borato-EDTA
U.V	- Ultra Violeta
ZnSe	- Seleneto de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 FUNGOS	16
3.1.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	16
3.2 MICOTOXINAS	17
3.3 TÉCNICAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS	18
3.3 ESPECTROSCOPIA	21
3.3.1 Espectroscopia no infravermelho	23
3.3.2 Espectrômetro no infravermelho	25
3.3.3 Técnicas de medidas de amostra no infravermelho	28
3.3.3.1 Reflectância Total Atenuada (ATR)	28
3.3.3.2 Reflectância Difusa.....	28
3.3.3.3 Transmissão /Absorbância (T/A)	29
3.3.3.4 Reflectância / Absorbância (R/ A)	29
3.3.4 Espectroscopia no Infravermelho em Microbiologia	30
4 MATERIAS E MÉTODOS	33
4.1 MEIOS DE CULTURA	33
4.1.1 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA).....	33
4.1.2 Meio Saboraud	34
4.1.3 Meio comercial Extrato de Malte (MERCK)	34
4.2 SOLUÇÕES	35
4.2.1 Lactofenol de Amann.....	35
4.2.2 Tampão CTAB.....	35
4.2.3 Clorofil/CIA – Clorofórmio Álcool Isoamílico	35
4.2.4 Tampão de extração.....	36
4.2.5 TBE 5X	36
4.2.6 TBE 1X	36
4.2.7 Solução Salina 0,85%	37

4.3 MATERIAL BIOLÓGICO	37
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	37
4.4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	37
4.4.1.1 Microcultivo	38
4.4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE PCR.....	38
4.4.2.1 Extração de DNA.....	38
4.4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	39
4.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	41
4.5.1 Reflectância Total Atenuada (ATR).....	42
4.5.1.1 Preparo da amostra.....	42
4.5.1.2 Análise da amostra no espectrômetro	43
4.5.2 Reflectância Difusa (DR)	44
4.5.2.1 Preparo da amostra.....	44
4.5.2.2 Análise da amostra no espectrômetro	45
4.5.3 Análise dos espectros	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	46
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE PCR	47
5.2.1 <i>A. niger</i>	47
5.2.2 <i>A. carbonarius</i>	49
5.2.3 <i>A. ochraceus</i>	49
5.2.4 <i>A. westerdijkiae</i>	50
5.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	51
5.3.1 Reflectância Difusa (DR)	51
5.3.2 Reflectância Total Atenuada (ATR).....	57
5.3.3 Caracterização dos espectros gerados pela metodologia de Reflectância Difusa (DR).....	61
6 DISCUSSÃO	67
6.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE PCR	67
6.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	68
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

A identificação de micro-organismos por meio de metodologias clássicas possui vantagens por ser econômica, entretanto, costuma ser demorada e muitas vezes limitante. Em fungos, a identificação ao nível de espécie através das características morfológicas, é laboriosa, pois necessita de uma série de técnicas de identificação, como microcultivo, crescimento em diferentes pH, diferentes meios de cultura e temperaturas. É necessário um micólogo experiente para atestar com grande certeza a espécie de um fungo visualizando unicamente suas características morfológicas.

Diversos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são produtores de micotoxinas, metabólitos secundários prejudiciais ao homem e outros animais, além disso, esses fungos são muitas vezes de difícil identificação, indistinguíveis morfológicamente.

Grande aliadas dos taxonomistas nos últimos anos, são as técnicas moleculares, como PCR, RFLP e sequenciamento de DNA. Por meio destas, é possível diferenciar não somente espécies, mas também linhagens de uma mesma espécie. Contudo, seus reagentes e materiais são caros, limitando seu uso rotineiro a grandes centros e institutos de pesquisa.

Assim, fica clara a importância em buscar novas estratégias para identificar micro-organismos de forma mais rápida, barata e com um alto nível de sensibilidade. Esta é a proposta para o uso de Espectroscopia no infravermelho.

Essa técnica se caracteriza pelo uso de um feixe de luz infravermelho que incide sobre a matéria de interesse, no caso, isolados fúngicos, e que, pela diferença de luz que foi transmitida e absorvida pela matéria cria-se uma identidade única, como uma impressão digital do isolado em questão.

A espectroscopia no infravermelho vem sendo utilizada com sucesso ao longo dos anos de diversas formas e com objetivos diferentes, principalmente envolvida na identificação de compostos químicos como também na área agrícola, visando avaliar a qualidade de grãos e outros alimentos (DELWICHE; MASSIE, 1996; HANS, 2003; MIRALBES, 2004; ARGYRIA, *et al.*, 2009). O uso de infravermelho para a identificação de micro-organismos vem aumentando ao longo dos anos, entretanto, a maioria dos estudos envolvem organismos unicelulares,

bactérias e leveduras (HELM, 1991; SANDT, *et al.*, 2003; ERUKHIMOVITCH, *et al.*, 2005; KUHM, *et al.*, 2009).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia eficiente para a identificação de isolados fúngicos através da espectroscopia no infravermelho, visando uma opção mais barata e rápida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Testar a eficiência da espectroscopia no infravermelho em identificar diferentes isolados fúngicos do gênero *Aspergillus* potencialmente produtores de micotoxina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as espécies de *Aspergillus* por meio de morfologia e oligonucleotídeos espécie-específicos para a validação da técnica de espectroscopia no infravermelho;
- Comparar duas metodologias, Reflectância Total Atenuada (ATR) e Reflectância Difusa (DR) para a identificação de isolados fúngicos do gênero *Aspergillus*;
- Estabelecer um banco de dados de espectros a partir dos isolados do trabalho com intuito de agregar novos isolados, ao longo do tempo, no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) da Universidade Federal do Paraná e criar uma livreria de espectros de fungos para identificação rotineira no laboratório.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FUNGOS

3.1.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi primeiramente descrito por Micheli (1729), e abrange aproximadamente 150 espécies reconhecidas. Membros deste grupo ocorrem em uma vasta variedade de habitats, mas são mais comuns como sapróbios em solo, comida armazenada e vegetação morta em regiões subtropicais e tropicais. (DOMSCH *et al.* 1980; CHRISTENSEN; TUTHILL, 1985). Raper e Fennel (1965) dividiram o gênero *Aspergillus* em grupos de acordo com suas características morfológicas e com a coloração do conidióforo do fungo e Gams *et al.*, em 1985 separaram os grupos por seções. No presente trabalho, enfatiza-se as seções *Circumdati* e *Nigri*.

Desde o seu agrupamento, a seção *Nigri* já foi reformulada diversas vezes e o número de espécies que fazem parte dela também. O maior problema é a dificuldade em separar as espécies muito semelhantes morfológicamente, como também a diferença de agrupamentos dependendo da metodologia utilizada.

Atualmente 14 espécies são aceitas (SAMSON *et al.*, 2004) e dentro da seção *Nigri* os produtores de ocratoxina estão separados como *A.niger* agregados e *A. carbonarius* (BELLI *et al.*, 2004), entretanto novos táxons foram descritos recentemente, como *A. ibericus* (SERRA, MENDONÇA, VENÂNCIO, 2006), *A. brasiliensis* (VARGA *et al.*, 2007), *A. uvarium* (PERRONE *et al.*, 2008), exigindo uma nova reformulação da seção.

A seção *Nigri* abriga espécies muito importantes por serem muito utilizadas em biotecnologia. *A. niger* obteve sua primeira importante função em 1919 na indústria de alimentos, pois apresentou uma alta produtividade na formação de ácido cítrico. Entretanto, a partir de 1960 seu uso foi expandido e se tornou uma grande fonte de enzimas passando a ser utilizado no processo alimentício (SCHUSTER, 2002).

Já *A. carbonarius* é reconhecido principalmente por ser um dos maiores produtores de ocratoxina A, sendo encontrado em outros alimentos mas

principalmente em uvas, vinhos e cafés (PITT, HOCKING, 1997; JOOSTEN *et al.*, 2001; CABANES, *et al.*, 2002; SERRA *et al.*, 2003; SERRA *et al.*, 2004; MAGNANI *et al.*, 2005; SERRA *et al.*, 2005; NOOMIN, *et al.*, 2008; SPADARO *et al.*, 2010).

Membros da seção *Circumdati* são conhecidos principalmente por produzirem micotoxinas. Na verdade, dentre todas as espécies incluídas no grupo, somente uma, *A. robustus*, não produz qualquer tipo de micotoxina. As toxinas mais encontradas são: ocratoxina A, ácido penicílico, xantomegnina, viomelina e vioxantina (FRISVAD *et al.*, 2004).

Frisvad *et al.*, (2004), através do sequenciamento do gene da β -tubulina, desmembraram a espécie *A. ochraceus* em duas: *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. Com essa descoberta, Morello *et al.*, (2007) criaram um par oligonucleotídeos específico para a identificação de *A. westerdijkiae* e perceberam, surpreendentemente, que 84% das amostras originalmente consideradas *A. ochraceus*, na verdade eram *A. westerdijkiae*. Noomin *et al.*, (2008 b) também obtiveram um predomínio de *A. westerdijkiae* e ausência de *A. ochraceus* trabalhando com café *Coffea arabica* da Tailândia. Assim, percebe-se o quanto as duas espécies são próximas morfologicamente, tornando um desafio sua diferenciação.

3.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos, que, quando ingeridas por animais, incluindo o homem, causam alterações biológicas prejudiciais à saúde (ABRUNHOSA, 2008).

As micotoxinas mais comuns são aflatoxinas, fusariotoxinas, fumonisinas e ocratoxinas. Embora aproximadamente 300 micotoxinas diferentes tenham sido identificadas, apenas 20 tipos de micotoxinas, produzidas por diferentes espécies, são encontradas com frequência em quantidades suficientes para constituírem um verdadeiro risco para a saúde alimentar (GEISEN, 1998).

A ocratoxina A (OTA) é a micotoxina com maior notoriedade no grupo *Aspergillus*, devido a *A. ochraceus* e, agora, *A. westerdijkiae*, serem um dos maiores contaminantes de produtores de ocratoxina em alimentos, principalmente

em grãos de café (LEVI, TRANK, MOHR, 1974; BATISTA *et al.*, 2003; TANIWAKI *et al.*, 2003; SUAREZ-QUIROZ *et al.*, 2004).

Sua estrutura molecular consiste em uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina, mediante ligação amida. Ela apresenta uma molécula de cloro em sua estrutura, responsável pelo caráter tóxico (EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002).

Quando ingerida, a OTA é absorvida pelo trato gastrointestinal, entra na circulação sanguínea e liga-se às proteínas do soro. A maior toxicidade da OTA em mamíferos está relacionada aos rins, o que se deve, em parte, à reabsorção ativa pelo túbulo proximal, no sistema de transporte de ânions, acumulando altas concentrações de OTA neste órgão (FUNGARO, *et al.*, 2004). A OTA foi classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possível carcinogênico humano (IARC, 1993).

Recentemente pesquisas têm indicado que a OTA pode afetar também o sistema nervoso. Embora o potencial neurotóxico da OTA seja conhecido, os mecanismos moleculares de sua neurotoxicidade ainda não estão bem elucidados (ZHANG, *et al.*, 2009).

3.3 TÉCNICAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS

Sistemas baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detecção de espécies de fungos produtores de micotoxinas têm sido recentemente publicados e provam ser técnicas confiáveis na detecção de organismos de interesse.

A PCR é uma ferramenta composta basicamente de dois oligonucleotídeos sintéticos, cada um complementar às sequências das fitas opostas do DNA alvo em posições justamente flanqueadoras das extremidades do segmento a ser amplificado. Possui grande sensibilidade devido à possibilidade de se amplificar quantidades mínimas de ácido nucleico, os oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) auxiliam a iniciação da replicação das cópias do fragmento alvo, com a extremidade 3'-OH das sondas hibridizadas uma em direção oposta a outra e posicionadas para

moldar a síntese de DNA através do DNA molde (LANE et al., 1985). A partir do conceito básico de PCR, são vários os desdobramentos possíveis da metodologia quando associadas a outras ferramentas moleculares.

Pouco utilizada atualmente, na técnica RAPD (Amplificação Randômica do DNA Polimórfico), utiliza-se apenas um iniciador arbitrário por reação e a amplificação ocorre quando esta mesma sequência reconhece um sítio de homologia em uma das fitas e também o mesmo sítio, com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA (WILLIAMS *et al.*, 1990). Uma das grandes vantagens do RAPD é que não se escolhe *a priori* a região a ser amplificada (FUNGARO; VIEIRA, 2001 *apud* SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001). Os polimorfismos gerados após amplificação com oligonucleotídeos arbitrários são reconhecidos pela ausência ou presença de fragmentos amplificados num genótipo em relação a outro (FUNGARO *et al.*, 2004).

O perfil de bandas amplificadas entre isolados permite sua análise filogenética como também o desenvolvimento de oligonucleotídeos espécie específicos quando trabalhando com isolados previamente identificados. Fungaro *et al.* (2004) desenvolveram oligonucleotídeos específicos para a identificação de *A.carbonarius* utilizando a técnica de RAPD. Sartori *et al.* (2006) utilizando a mesma técnica desenvolveram oligonucleotídeos específicos para *A.niger* comparando o perfil de bandas entre as espécies *A.niger* e *A.tubingensis*.

Outra técnica utilizada é AFLP (Análise de Polimorfismo de Fragmentos Amplificados), descrita por Vos *et al.* (1995), que também passou a contribuir na identificação de sequências empíricas passíveis de distinguir espécies ou até mesmo, linhagens toxigênicas e não toxigênicas. A técnica baseia-se na amplificação de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da clivagem do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição, que clivam o DNA em sítios específicos de corte raro e de corte frequente. A técnica utiliza a propriedade que certas enzimas de restrição tem, de deixar após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequências reconhecidas. Assim, é possível construir sequências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominados “adaptadores”. Uma vez que a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição são conhecidas, pode-se construir oligonucleotídeos iniciadores específicos a essas sequências.

Schmidt *et al.* (2003) utilizaram a técnica de AFLP para identificar isolados de *A.carbonarius* encontrados em grãos de café.

Perrone *et al.* (2004) identificaram *A.carbonarius* e *A. japonicus* por sequenciamento da amplificação parcial do gene calmodulina. Resumidamente, na técnica de sequenciamento, utiliza-se um iniciador com o objetivo de alongar uma fita do DNA e além dos desoxirribonucleotídeos são utilizados também análogos chamados didesoxi, que não possuem a hidroxila - 3' marcados radioativamente ou por corantes fluorescentes, para que interrompam o alongamento da cadeia de nucleotídeos, gerando vários fragmentos de tamanhos diferentes. Atualmente o sequenciamento automático utiliza um sistema a laser que detecta fluorescência para a separação dos fragmentos.

O gene calmodulina é uma região de interesse em taxonomia juntamente com as regiões 28S do rDNA, regiões espaçadoras internas (ITS1 e ITS2) , gene da β -tubulina e fatores de alongamento. Essas regiões são ideais para a discriminação intra e interespecífica, pois são altamente variáveis (GEISER *et al.*, 2000).

Patino *et al.* (2005) desenvolveram oligonucleotídeos espécie específicos para *A. carbonarius* e *A. ochraceus* através da técnica de sequenciamento da região ITS.

Outra técnica utilizada é RFLP (Polimorfismos de Tamanhos de Fragmentos de Restrição), nela o DNA cromossomal e plasmidial podem ser digeridos com enzimas de restrição que cortam em posições específicas no DNA e o perfil dos fragmentos resultantes podem ser observados em gel de agarose (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008)

Accensi *et al.* (1999) sequenciaram regiões 5,8S rDNA, ITS1 e ITS2 e realizaram um RFLP com a enzima de restrição Rsa I para a identificação de *A.niger* e *A. tubingensis*. Em 2005, Gonzales- Salgado *et al.* sequenciaram regiões ITS1 e utilizaram Rsa I pela técnica de RFLP para diferenciar espécies pertencentes à seção *Nigri* do gênero *Aspergillus*.

Chamberlain *et al.* (1988), descreveram uma outra variante da PCR, a PCR Multiplex (PCR-m), que consiste na amplificação de várias sequências alvo simultaneamente, devido ao uso de vários pares de oligonucleotídeos iniciadores em uma mesma reação. A PCR-m permite a amplificação simultânea de determinados locos em diferentes organismos, ou então de diferentes locos de um mesmo organismo.

Logotheli *et al.* (2009) através da PCR-m diferenciaram as espécies *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* pela distinção dos fragmentos amplificados de tamanho 250pb, 200pb, 150pb e 450pb, respectivamente.

O aumento no uso de técnicas moleculares em diagnóstico fúngico forneceu ferramentas para responder questões para a taxonomia que com identificação morfológica somente, não era possível.

3.3 ESPECTROSCOPIA

Espectroscopia é o estudo da matéria utilizando radiação eletromagnética. sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Cada átomo ou molécula da matéria absorve, transmite e emite uma quantidade de energia diferente em contato com a radiação, criando um padrão de espectro único e exclusivo (BALL, 2001).

Radiação eletromagnética é uma energia ondulatória que possui propriedades elétricas e magnéticas com características de onda e partícula. Quando a luz incide sobre a matéria pode ser absorvida por átomos ou moléculas e estes podem ser excitados a maiores níveis energéticos, dependendo do comprimento de onda e da intensidade da fonte de luz. Este processo se chama absorção. O processo de espalhamento define-se como uma parte da radiação eletromagnética que passa pelo material e se espalha em outras direções. Já quando as moléculas excitadas com alta energia, retornam a um nível de baixa energia pela radiação, o processo é denominado emissão (SINGH *et al.*, 2006).

A radiação eletromagnética foi dividida em diversas regiões dependendo da sua intensidade, o conjunto é chamado de espectro eletromagnético. O espectro está dividido em regiões ou bandas cujas denominações estão relacionadas com a forma com que as radiações podem ser produzidas ou detectadas (FIGURA 1). Normalmente, as transições eletrônicas são situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas e, em casos particulares, também na região do infravermelho distante (BALL, 2001)

Em 1859, os cientistas alemães Robert Bunsen e Gustav Kirchhoff criaram o primeiro mecanismo para medir um espectro, um espectrômetro. Nele uma fonte

de emissão de luz passava por um prisma e depois para a amostra que era projetada em uma tela. Observando a variedade de amostras pelo espectrômetro, Bunsen e Kirchhoff foram capazes de mostrar que cada elemento gerava uma série de características nos comprimentos de onda da luz absorvida. Diversos elementos foram detectados através de espectroscopia, Bunsen e Kirchhoff descobriram o césio e rubídio, ambos os nomes derivados da coloração do espectro gerado, azul para césio e vermelho para rubídio. Outro elemento importante detectado, o hélio, foi detectado espectroscopicamente no Sol em 1868 por Jansen e na Terra em 1895 por Ramsey (MISTRY, 2009).

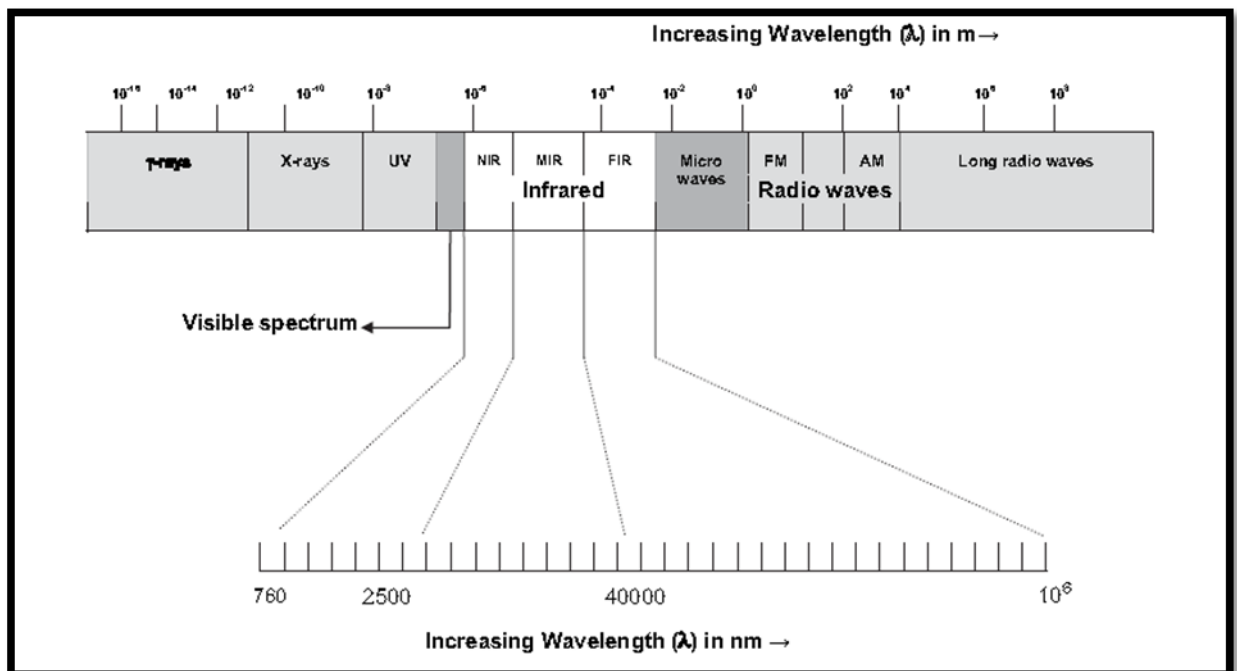


FIGURA 1. ESPECTRO MAGNÉTICO DA LUZ

Fonte: Santos *et al.* (2010)

Nota: A região do infravermelho está localizada entre as regiões de micro-ondas e luz visível. O infravermelho está dividido entre distante (FIR), médio (MIR) e próximo (NIR). As regiões estão medidas em comprimento de onda (λ) em nm.

3.3.1 Espectroscopia no infravermelho

O astrônomo William Herschel descobriu radiação por infravermelho em 1800, estudando o efeito do aquecimento do espectro solar. Utilizando um prisma de vidro, ele dispersou a luz solar em três termômetros e percebeu que a temperatura aumentava a partir do espectro vermelho, mas que uma temperatura ainda maior era emitida onde não havia mais luz visível. Infelizmente, devido à falta de equipamentos adequados para a detecção de espectros além da luz visível, estudos sobre o infravermelho ficaram estagnados por décadas (MISTRY, 2009). A região do infravermelho está situada entre a luz visível e microondas. Sua característica básica é que a radiação se origina por emissão térmica de uma fonte de calor. Sua região é normalmente expressa pelo número de onda (ν) por cm^{-1} .

Por convenção, a região do infravermelho (IF) é dividida em três: próxima, média e distante (FIGURA 1). O infravermelho distante, aproximadamente $10\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ($1000\text{ - }30\text{ }\mu\text{m}$) encontra-se junto à região das micro-ondas, possui baixa energia e pode ser utilizado na espectroscopia rotatória (relacionada com a rotação das moléculas). O infravermelho médio, aproximadamente $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ($30\text{ - }1.4\text{ }\mu\text{m}$) e o infravermelho próximo aproximadamente $4000\text{-}14000\text{ cm}^{-1}$ ($1.4\text{ - }0.8\text{ }\mu\text{m}$) podem ser utilizados para estudar as vibrações moleculares e a estrutura rotatória-vibratória associada (SANTOS *et al.*, 2010)

Os espectros formados a partir da emissão do feixe de infravermelho na amostra são originados da interação entre a luz e a vibração e rotação das moléculas excitadas pela luz (NAUMANN, 2000). Entretanto, é difícil detectar os movimentos rotacionais das moléculas, assim a espectroscopia no infravermelho trabalha somente com as vibrações moleculares dos átomos (WILSON, DELCIUS, CROSS, 1980).

As moléculas apresentam diferentes movimentos de vibrações e cada um deles absorve ou emite uma quantidade de energia diferente que é detectada pelo espectrômetro no infravermelho. Cada molécula não linear possui exatamente $3N-6$ (N sendo o número de átomos da molécula) modos normais de vibração. Porém, para ocorrer a absorção ou emissão de infravermelho pela molécula é necessário que ela esteja no seu momento dipolo (ABRAMS, 1993).

O momento dipolo ocorre em moléculas polares, onde a interação do átomo com carga negativa interage com o átomo de carga positiva criando uma atração contínua (MISTRY, 2009). No caso de H_2 , não existe momento dipolo e por isso ele não absorve infravermelho e conseqüentemente não é detectado no espectro. Existem diversos movimentos vibracionais, no caso da água são estiramento simétrico, estiramento assimétrico e flexão (FIGURA 2).

Cada movimento absorve em uma determinada região do espectro, assim uma mesma molécula dependendo do seu tamanho e diferentes movimentos vibracionais, pode apresentar várias bandas no espectro. Essa individualidade de cada molécula absorver diferentes níveis de energia em diferentes números de onda, gera uma impressão digital de cada molécula no espectro, permitindo a diferenciação dos materiais analisados (SANTOS *et al.*, 2010).

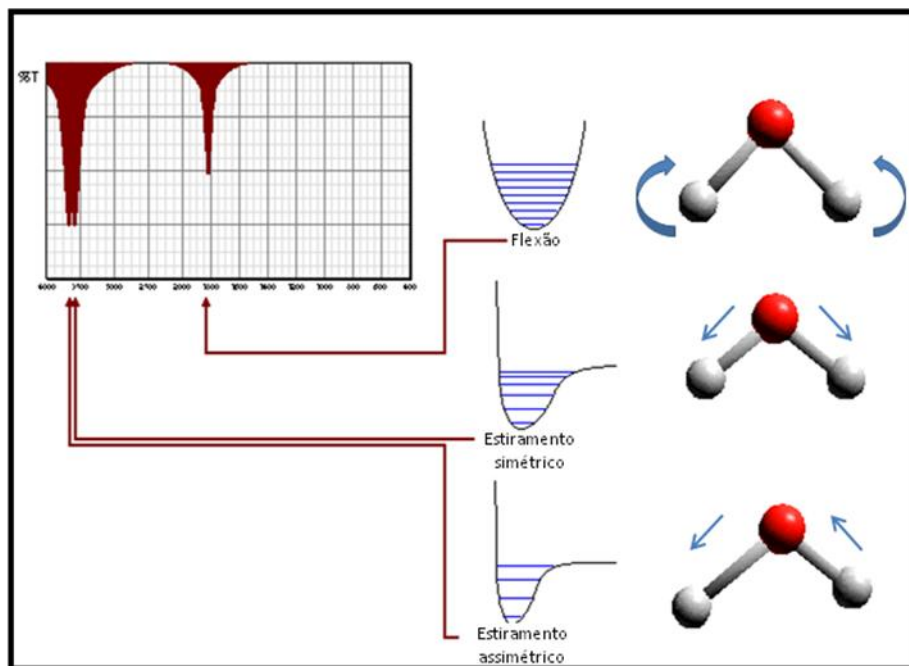


FIGURA 2. VIBRAÇÕES MOLECULARES ENCONTRADAS NA MOLÉCULA DA ÁGUA (H_2O) E SUAS BANDAS NO ESPECTRO NO INFRAVERMELHO.

Fonte: Abrams (1993)

3.3.2 Espectrômetro no infravermelho

Existem dois tipos básicos de espectrômetro utilizados no infravermelho, o dispersivo e o FT-IR (Espectrômetro Infravermelho – Transformada de Fourier).

O espectrômetro dispersivo devido limitações principalmente ao tempo de análise, é pouco utilizado atualmente. O feixe de luz que sai da fonte é refletido para 2 espelhos, um reflete o feixe para uma célula de referência e o outro para a célula contendo a amostra. Devido a um separador, num momento o feixe de referência é detectado e no outro o da amostra. Os feixes então são refletidos por um prisma ou grade monocromática que dispersa a luz em diversas faixas e reflete novamente o feixe para o detector e somente uma faixa de cada vez é detectada. Pela diferença de energia dos dois feixes é possível saber quanta energia foi absorvida pela amostra gerando o espectro (FIGURA 3) . Entretanto por analisar somente uma frequência por vez é uma técnica muito demorada e é pouco utilizada em infravermelho (BALL, 2001).

A grade monocromática consiste em uma série de sulcos podendo chegar a 1μ entre si, colocados em um vidro duro ou um material metálico capaz de dispersar a luz que está sendo emitida. A grade é normalmente revestida por alumínio, atuando também como um espelho (HOLLAS, 2004).

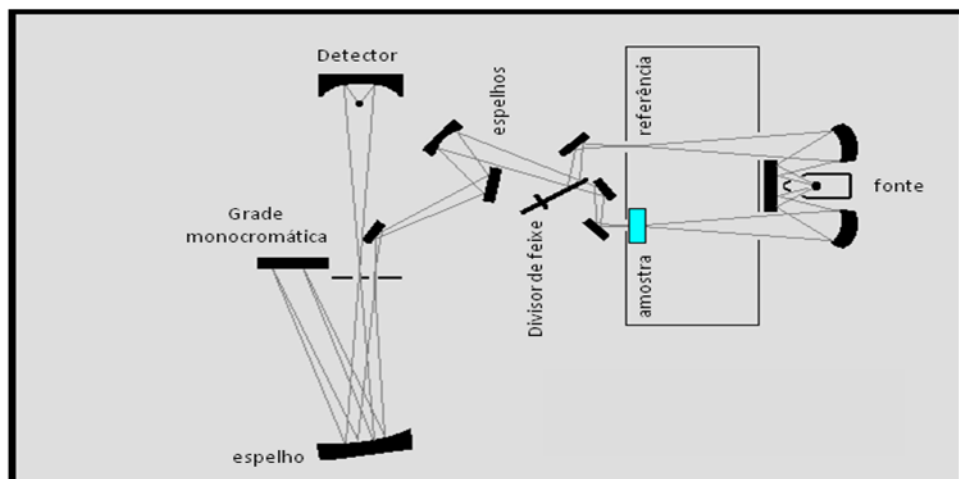


FIGURA 3. MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DO ESPECTRÔMETRO POR DISPERSÃO.

O FT-IR foi desenvolvido para superar as limitações de instrumentos dispersivos, principalmente o longo tempo para realizar a varredura de todas as frequências de infravermelho em uma amostra.

Para solucionar esse problema foi desenvolvido um equipamento óptico chamado interferômetro. O interferômetro produz um sinal único que é capaz de codificar todas as frequências simultaneamente (HOLLAS, 2004). O sinal é medido muito rapidamente, 1 ou 2 segundos por amostra, ao contrário do espectrômetro dispersivo que pode levar minutos.

O feixe sai da fonte que normalmente é uma lâmpada de halogênio, o interferômetro possui um divisor de feixe que divide o feixe saindo da fonte em dois. Um feixe reflete num espelho fixo e o outro feixe reflete num espelho móvel, quando os feixes são refletidos eles se encontram novamente no divisor. Devido ao caminho que um feixe viaja ser fixo e o comprimento é conhecido e o outro está em constante movimento, o sinal que sai do interferômetro é o resultado dos dois feixes interferindo entre eles (FIGURA 4). O sinal resultante é chamado de interferograma, com a propriedade única que todo ponto que compõem o sinal possui informação sobre toda a frequência de infravermelho que sai da fonte. Isso significa que todas as frequências são medidas simultaneamente, gerando resultados muito rápidos. (NAUMANN, 2000). Além disso, o FT-IR possui outras vantagens sobre o espectrômetro dispersivo (QUADRO 1).

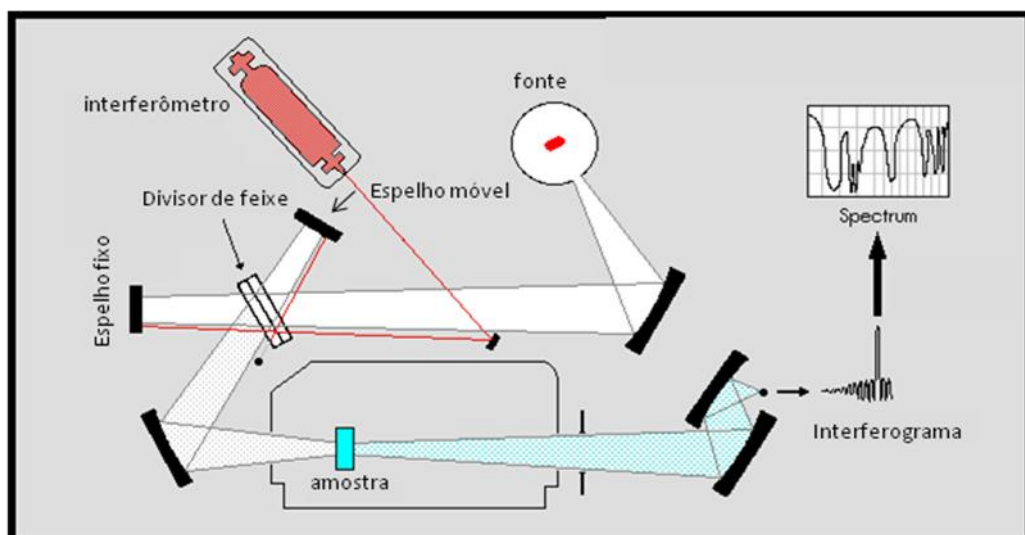


FIGURA 4. MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DE FT-IR (ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO – TRANSFORMADA DE FOURIER).

Fonte: Abrams (1993)

Vantagem	Efeito
Vantagem Jaquinot	No FT-IR não há fendas como no dispersivo, que limitam a quantidade de energia chegando ao detector. Isso é útil para pequenas amostras
Vantagem Fellgett	Como o detector observa as frequências simultaneamente, um scaneamento completo leva somente uma fração do tempo que espectrômetro dispersivo precisaria
Vantagem Connes	O FT-IR utiliza um laser de HeNe para monitorar a posição dos espelho. Ele também padroniza a calibração do comprimento de onda e o mantém sempre preciso.
Vantagem de Manipulação dos dados	Devido ao interferômetro e o computador mais eficientes controlando o interferograma e calculando o espectro no infravermelho, os dados agora podem ser facilmente manipulados, melhorando a análise final.

QUADRO 1. PRINCIPAIS VANTAGENS COM O ADVENTO DA TECNOLOGIA DE FT-IR.

Fonte: Naumann (2000)

Como o analista precisa de um espectro de frequência (uma plotagem de intensidade a cada frequência individual) para fazer uma identificação, a medida do interferograma não pode ser medida diretamente. É preciso decodificar as frequências individuais. Uns dos métodos mais conhecidos para isso é através da técnica matemática chamada Transformada de Fourier, realizada por um *software* específico que transforma os dados crus em um espectro. (HOLLAS, 2004)

Para analisar as amostras de modo eficaz, é importante escolher técnicas de medidas adequadas ao tipo de amostra e região da radiação que se quer utilizar. Diferentes materiais são transparentes para diferentes tipos de comprimento de onda, tornando ideais para a leitura, pois o interessante é a amostra absorver a luz emitida e não o material para suporte da amostra. (MISTRY, 2009)

3.3.3 Técnicas de medidas de amostra no infravermelho

3.3.3.1 Reflectância Total Atenuada (ATR)

Na Reflectância Total Atenuada (ATR), o princípio deste tipo de espectroscopia baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão. A fração do feixe de luz incidente que é refletida aumenta conforme aumenta o ângulo de incidência, e quando excede um determinado ângulo crítico, a reflexão é completa. No ponto de reflexão o feixe atua como se penetrasse a uma pequena distância dentro da amostra. Seleneto de zinco (ZnSe) é um cristal para suporte da amostra ideal na análise de infravermelho pois ele transmite luz infravermelho e absorve luz visível (BALL, 2001).

3.3.3.2 Reflectância Difusa

Reflectância difusa é uma excelente ferramenta na espectroscopia no infravermelho para análise de materiais cristalizados ou em pó. Também pode ser utilizado para amostras sólidas intratáveis. As amostras são normalmente moídas e podem ser misturadas a um solvente como brometo de potássio (KBr) para facilitar a análise. A maior vantagem de trabalhar com reflectância difusa é utilizar amostras sólidas, sem a necessidade de prepará-las antes (BALL, 2001).

Reflectância difusa baseia-se na projeção do feixe de infravermelho na amostra, onde ele é refletido, espalhado e transmitido na amostra (FIGURA 5). Uma parte refletida penetra difusamente em diferentes níveis da amostras e é coletada pelo acessório e direcionada aos detectores ópticos. Somente a luz que é espalhada da amostra para a superfície é considerada reflexão difusa (PIKE, 2009).

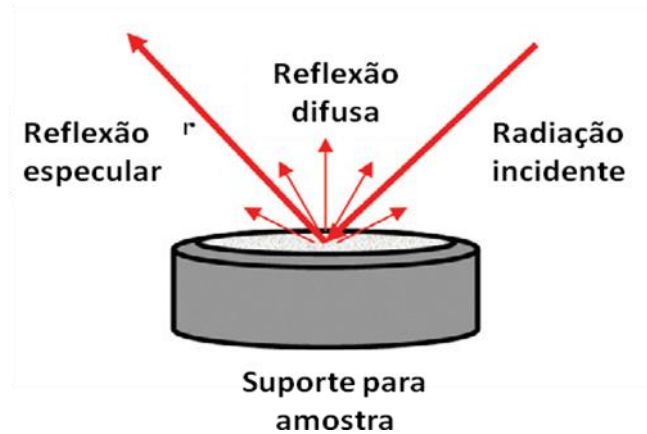


FIGURA 5. ESQUEMA BÁSICO SOBRE O FUNCIONAMENTO DOS MECANISMOS DE REFLECTÂNCIA DIFUSA PARA DETECÇÃO DE AMOSTRAS SÓLIDAS.

Fonte: Pike (2009)

3.3.3.3 Transmissão /Absorbância (T/A)

T/A pode ser obtido por soluções líquidas, suspensões, filmes viscosos ou sólidos. Como a água está presente em todas as amostras biológicas, o material óptico (cristal) para a colocação da amostra deve ser insolúvel à água e transparente ao IF. Os mais utilizados são: CaF_2 , BaF_2 , ZnSe , ZnS ou germânio. O feixe infravermelho passa pelo cristal e depois pela amostra e o feixe é transmitido até o detector. A análise é feita pela diferença do que foi transmitido antes e depois da passagem do feixe pela amostra (NAUMANN, 2000).

3.3.3.4 Reflectância / Absorbância (R/ A)

Também chamada de reflectância externa, as amostras são colocadas em um material que reflete e não transmite o infravermelho. Os materiais podem ser ouro,

prata ou aço polido. O feixe de infravermelho não transmite como no R/A, mas reflete na amostra e a análise é realizada pela diferença entre o feixe inicial e o que foi absorvido pela amostra (NAUMANN, 2000).

3.3.4 Espectroscopia no Infravermelho em Microbiologia

Em 1911 W.W. Coblentz foi provavelmente o primeiro cientista a sugerir que seria lucrativa a análise de material biológico através de espectroscopia no infravermelho. Estudos de identificação de bactérias foram extensivamente reportados no início dos anos 50 e 60 (NORRIS, 1959 *apud* NAUMANN, 2000).

Para compreender o espectro IF de células microbianas é necessário ter um conhecimento geral da composição, tipos de células e estruturas químicas presentes. Na análise de um organismo, o espectro gerado é uma visão geral dos principais componentes orgânicos da célula, como lipídios, proteínas, DNA/RNA, fosfolipídios, entre outros. Em bactérias, suas estruturas citoplasmáticas são menos organizadas que em leveduras e fungos filamentosos, entretanto diferenças estruturais como a parede celular, membrana externa e cápsula permitem sua diferenciação pela espectroscopia no infravermelho (NAUMANN, 2000).

Em fungos, proteínas, lipídios, polissacarídeos que fazem parte da membrana, parede celular e cápsulas de leveduras capsuladas, possuem um impacto significativo na identificação e diferenciação de espécies através de espectroscopia no infravermelho. Sua membrana contém diversos lipídios que não estão presentes nas células bacterianas, como esteróis, esfingolipídios, ergosterinas, melanina, entre outros. Além de componentes de membrana como glucanas e mananas (NAUMANN, 2000).

Algumas regiões do espectro já são conhecidas e identificadas como importantes para a diferenciação de micro-organismos (QUADRO 2).

Intervalo	Número de onda (cm ⁻¹)	Macromoléculas dominantes	Grupos Funcionais
I	3700 – 2996	Diversas	-OH, N-H
II	2996 – 2800	Lipídeos	-CH
III	1800 – 1485	Proteínas	Amida I + II
IV	1498 – 1185	Proteínas, lipídeos, compostos fenólicos	CH ₂ , CH ₃ , P-O
V	1185 – 900	Polissacarídeos	C – O - C, C –O – P
VI	900 – 600	Região impressão digital	

QUADRO 2. PRINCIPAIS REGIÕES CONHECIDAS NO INFRAVERMELHO DE ALGUMAS MACROMOLÉCULAS E SEUS COMPOSTOS DOMINANTES.

Fonte: Naumann (2009)

A região I, entre 3700 e 2996 cm⁻¹ no espectro é dominada por bandas referente a ligações –OH (~3400 cm⁻¹) como também por estiramentos de N-H (grupos amida). A região II, entre 2996 e 2800 cm⁻¹ exibe vibrações de estiramento da ligação C-H dos grupos funcionais – CH₃ e > CH₂, normalmente dominada por cadeias de ácido graxos de membranas e por algumas cadeias de aminoácidos. A terceira região, entre 1800 e 1485 cm⁻¹ é dominada por bandas de amida, que são as bandas de maior intensidade encontradas em bactérias ligadas a proteínas. Na região IV são encontradas vibrações de flexão pertencentes a – CH₃ e > CH₂ de lipídios e proteínas. Como também perto de 1230 cm⁻¹ ocorre a sobreposição de bandas de diferentes > P = O por vibrações de estiramento de ligações fosfodiéster, fosfato livre e monofosfato. Em 1220 cm⁻¹ ocorrem bandas de fraca intensidade ocasionadas provavelmente pela ligação fosfodiéster de DNA e RNA. A quinta região entre 1200 cm⁻¹ e 900 cm⁻¹ é normalmente dominada por vibração por estiramento simétrico de PO₂⁻ de ácido nucleicos e complexas sequências de picos devido principalmente por vibrações de estiramento de ligações C – O – C e

C – O – P de oligo e polissacarídeos. A sexta região, entre 900 e 600 cm⁻¹ exibe uma variedade de fracas, mas extremamente características ,sobreposições de bandas. Ocorrem principalmente de anéis aromáticos de nucleotídeos. É chamada de a “verdadeira região de impressão digital” por ter bandas

caracterizando a molécula toda e somente ligações químicas separadas, porém, devido à sobreposição de informação é difícil de analisar adequadamente (NAUMANN, 2000).

A partir de estudos feitos por Naumann *et al.*, (1991), diversas pesquisas relacionadas a micro-organismos começaram a utilizar a espectroscopia de IV, combinadas a análises estatísticas.

Devido à sua importância muitos trabalhos envolvem a diferenciação e identificação de diversas espécies bacterianas. Helm *et al.*, (1991) obtiveram sucesso em identificar corretamente diversos grupos de bactérias através de IV. Goodacre *et al.*, (1996) utilizando a técnica de Reflectância – absorvância difusa identificaram corretamente, através da análise Rede Neural Artificial (ANN – *Artificial Neural Network*) espécies pertencentes aos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*.

Whittaker *et al.*, (2003) diferenciaram diversos grupos de bactérias pelo seu perfil de éstermitilício de ácido graxo (*FAME - fatty acid methyl esters*) pela análise de espectros de infravermelho. Também obtiveram sucesso, estudos identificando várias espécies de *Bacillus* (FORRESTER, 2009; GARIP, GOZEN, SEVERCON, 2009). Trabalhando também com bactérias, Kuhm *et al.*, (2009) conseguiram diferenciar diversas espécies de *Yersinia*, entre elas a espécie patogênica *Yersinia enterocolitica* isolada de pacientes.

Em fungos, a maioria dos estudos contemplam leveduras, entretanto nos últimos anos houve um aumento de estudos com fungos filamentosos. Devido à sua importância clínica, diversas espécies de *Candida* sp já foram analisadas por espectroscopia no infravermelho (TINTELNOT *et al.*, 2000; SUCI, GEESEY, TYLER, 2001; TOUBAS *et al.*, 2007, ESSENDUBI *et al.*, 2007). BASTERT *et al.* (1999) analisaram através Ft-IR os principais dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*.

Wenning, Seiler e Scherer (2002) obtiveram sucesso em identificar ao nível de espécie linhagens de *Debaryomyces hansenii* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Szeghalmi *et al.*, (2007) utilizaram a técnica de infravermelho para analisar diferenças na composição de hifas de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Neurospora* sob condições de *stress*. Em 2005, Erukhimovitch *et al.*, analisaram o potencial de identificar e discriminar gêneros de fungos como *Fusarium* e *Pythium*, através da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS). Além de taxonomia, a

técnica de IV pode ser aplicada em microbiologia na detecção de componentes ou micro-organismos relacionados à alimentação.

Erukhimovitch *et al.* (2007) detectaram o fungo *Colletotrichum coccodes* na superfície de batatas por espectroscopia. Dowell, Ram e Seitz (1999) utilizaram FT-IR para detectar níveis de deoxynivalenol (DON) e ergosterol em amêndoas.

Hernández-Hierro, García-Villanova e González-Martína (2008) utilizando NIRS detectaram concentrações de micotoxinas, aflatoxina e ocratoxina A em páprica. Bozza *et al.* (2010) utilizaram duas técnicas, ATR e transmissão também com o objetivo de identificar ocratoxina A em fungos isolados de grãos de café e observaram que a técnica por transmissão foi mais eficiente em detectar menores concentrações de ocratoxina A.

Um estudo comparou o nível microbiano de carne bovina em três estágios diferentes de deterioração: fresco, semi-fresco e deteriorado com os espectros no infravermelho e os autores obtiveram uma alta taxa de sucesso separando os tipos de carne pelos espectros gerados do FT-IR (ARGYRI, *et al.*, 2010).

Fatores como tipo e pH do meio de cultura, temperatura e tempo de crescimento alteram os níveis destes compostos, exigindo um controle rígido para a reprodutibilidade do experimento quando utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho (NAUMANN, 2009).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA

4.1.1 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

Batata	200g
Dextrose	20g
Ágar	15g
Água destilada	1000mL
pH± 5,6	

Ferveu-se a batata com 800mL de água destilada por 15 minutos. O líquido foi coado em um filtro de papel e o volume completado para 1000mL, misturou-se a dextrose e o ágar e ferveu-se por 5 minutos. Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

4.1.2 Meio Saboraud

Glicose	40g
Peptona	10g
Ágar	15g
Água destilada	1000mL

pH± 5,6

Dissolveu-se a glicose em 500mL de água destilada, ferveu-se até dissolvê-la por completo. Adicionou-se a peptona e o ágar e mais 500mL de água, ferveu-se por 5 minutos. Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

4.1.3 Meio comercial Extrato de Malte (MERCK)

Meio pronto	39g
Água destilada	1000ml

pH ±4,7

Dissolveu-se o meio em água destilada. Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

4.2 SOLUÇÕES

4.2.1 Lactofenol de Amann

Ácido láctico	10g
Ácido fênico	10g
Glicerina	20g
Água destilada	10mL

4.2.2 Tampão CTAB

CTAB	2g
NaCl	8,12g
EDTA	4mL
Tris	10mL
PVP	10g
Água milliQ	q.s.p 100mL

4.2.3 Clorofil/CIA – Clorofórmio Álcool Isoamílico

Clorofórmio	96mL
Álcool Isoamílico	4mL

4.2.4 Tampão de extração

Tris-HCl pH 8,0	200mM
NaCl	250mM
EDTA	25mM
SDS(p/v)	1%

A solução foi preparada e aquecida a 60°C no momento de uso.

4.2.5 TBE 5X

Tris-base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5M	20mL

Os sais foram dissolvidos em 800mL de água milliQ. Completou-se o volume para 1000mL.

4.2.6 TBE 1X

TBE 5X	100mL
Água milliQ	400mL

4.2.7 Solução Salina 0,85%

NaCl	0,85 g
Água destilada	100mL

Dissolveu-se o sal em água destilada e autoclavou-se por 20 min a 120°C.

4.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram selecionados 30 fungos do gênero *Aspergillus*, originados do trabalho de Tralamazza (2008) a partir de isolamento de grãos de café *Coffea arabica* de diversos municípios do Estado do Paraná, cedidos pelo Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR). Os isolados estão depositados no banco biológico do LabMicro (Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular) na Universidade Federal do Paraná.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

4.4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Foi realizada com o objetivo de identificar os isolados do gênero *Aspergillus* e as seções às quais pertenciam.

4.4.1.1 Microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999)

Foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura BDA (item 4.1.1) foi cortado e colocado sobre uma lâmina contida no interior da placa. Inoculou-se o isolado em todos os lados do cubo, o qual posteriormente foi coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa incubada em estufa por 7 a 14 dias, a aproximadamente 28°C. Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol de Amann (item 4.2.2), sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio óptico.

4.4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE PCR

A partir da caracterização morfológica, foram selecionados isolados das seções *Nigri* e *Circumdati* para estudos moleculares.

4.4.2.1 Extração de DNA (modificado por Vicente, 2000)

Os isolados foram cultivados em meio BDA sólido, à 28°C por 5 dias. Em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL com sílica e celite (2:1) foi colocado cerca de 1 cm² de micélio das culturas, evitando trazer o meio de cultivo. Verteram-se 300 µL de tampão CTAB (item 4.2.3.) no *ependorf* e macerou-se o micélio com maceradores. Adicionou-se mais 200 µL de tampão CTAB e misturou-se bem em um agitador de tubos. Foi incubado em banho-maria por 10 minutos à 65°C. Adicionou-se 500 µL de CIA (item 4.2.4.) e centrifugou-se por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro *ependorf*. Repetiu-se a adição de 500 µL de CIA e centrifugação por 7 minutos a 12000 rpm. Transferiu-se o

sobrenadante para outro *eppendorf*. Foram adicionados 2 volumes de etanol 96% gelado. Agitou-se delicadamente. O DNA foi precipitado, colocando o *eppendorf* no *freezer* (-20°C) *overnight*. Centrifugou-se por 7 minutos a 12000 rpm e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente (etanol). O *pellet* de DNA foi lavado em 500 µL de etanol 70% gelado e misturou-se levemente. Centrifugou-se mais 7 minutos a 12000 rpm, o sobrenadante (etanol) foi retirado com auxílio de uma micropipeta e deixou-se o DNA desidratar por uns 15 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de água milliQ. O *pellet* permaneceu *overnight* em temperatura ambiente. Reservou-se em *freezer* -20°C.

4.4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a reação de PCR foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores, descritos na literatura, que amplificam regiões específicas de espécies de *Aspergillus* (QUADRO 3) . A PCR específica é de extrema importância para a identificação das 4 principais espécies de *Aspergillus* sp., produtoras de ocratoxina A no café no Brasil, sendo elas: *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae*, *A. niger* e *A. ochraceus*.

Espécie	Oligonucleotídeos iniciadores (5'→3')	Condições para PCR	Referência	Tamanho do Fragmento
<i>A. carbonarius</i>	OPX ₈₀₉ F - AGGCTAATGTTGATAACGGATGAT OPX ₈₀₉ R - GCTGTCAGTATTGGACCTTAGAG	35X { 95°C – 2 min. 95°C – 1 min. 62°C – 1 min. 72°C – 1 min. 72°C – 5 min.	FUNGARO, <i>et al.</i> (2004).	809 pb
<i>A. westerdijkiae</i>	Bt2Aw F - TGATACCTTGCGCTTGTGACG Bt2Aw R - CGGAAGCCTAAAAATGAAGAG	35X { 94°C – 5 min. 94°C – 1 min. 64°C – 30s. 72°C – 1 min. 72°C – 5 min.	MORELLO, <i>et al.</i> (2007).	347 pb
<i>A. niger</i>	OPX ₇₃₇₂ F - CAGTCGTCCAGTACCCTAAC OPX ₇₃₇₂ R - GAGCGAGGCTGATCTAAGTG	35X { 95°C – 2 min. 95°C – 1 min. 62°C – 1 min. 72°C – 1 min. 72°C – 5 min.	SARTORI, <i>et al.</i> (2006).	372 pb
<i>A. ochraceus</i>	Ochra pA-F - TTAACAGGGAACAATCCATATAG Ochra pA-R - GAATTCACCCAGAACTTGCCG	35X { 94°C – 4 min. 94°C – 30s. 55°C – 30s. 72°C – 30s. 72°C – 5 min.	SCHMIDT, <i>et al.</i> (2003).	260 pb

QUADRO 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E CONDIÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE PCR DE ISOLADOS DE *Aspergillus* sp.

FONTE: Bozza (2010)

As condições de cada reação de PCR (QUADRO 4) seguiram os protocolos descritos na literatura.

Reagentes	<i>A. carbonarius</i> Fungaro, <i>et al.</i> (2004).	<i>A. westerdijkiae</i> Morello, <i>et al.</i> (2007).	<i>A. niger</i> Sartori, <i>et al.</i> (2006).	<i>A. ochraceus</i> Schmidt, <i>et al.</i> (2003).
Taq tampão	1X	1X	1X	1X
dNTP	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
MgCl ₂	1 mM	2 mM	1 mM	5 mM
Primer I	0,77 µM	0,4 µM	0,77 µM	0,4 µM
Primer II	0,77 µM	0,4 µM	0,77 µM	0,4 µM
Taq DNA polimerase	0,04 U/µL	0,04 U/µL	0,04 U/µL	0,04 U/µL
DNA	20 ng	20 ng	20 ng	20 ng
Volume final	13 µL	13 µL	13 µL	13 µL

QUADRO 4. CONCENTRAÇÕES DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA AS DIFERENTES ESPÉCIES DE *Aspergillus* AVALIADAS NO PRESENTE TRABALHO

FONTE: Bozza (2010)

A amplificação foi realizada no termociclador *Eppendorf Mastercycler* programado segundo as especificações de cada oligonucleotídeo iniciador (QUADRO 3) e os fragmentos visualizados em gel de agarose 1,4%, corados com brometo de etídeo sob transiluminador U.V. e fotodocumentados.

Os padrões de *A. ochraceus* e *A. carbonarius* foram gentilmente cedidos pela Prof^a Dr^a Maria Helena Fungaro da Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Já os padrões de *A. niger*, *A. westerdijkiae* foram cordialmente cedidos pela Dr^a Marta Taniwaki do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

4.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Após a identificação dos isolados ao nível de espécie através da morfologia e pela técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, foram selecionados com o objetivo de validar a técnica de espectroscopia no infravermelho, 11 isolados

de 3 espécies diferentes sendo: 5 isolados da espécie *A.niger* , 3 da espécie *A. ochraceus* e 3 da espécie *A. westerdijkiae* (TABELA 1). Cada isolado foi cultivado separadamente em quintuplicata nas duas metodologias utilizadas ATR e DR, totalizando 110 amostras para análise.

TABELA 1. ISOLADOS FÚNGICOS SELECIONADOS PARA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.

Grupo	Isolado	Espécie	Origem/ Localidade
A	02	<i>A.niger</i>	Café/ Cambé – PR
A	03	<i>A.niger</i>	Café/ Cambé – PR
A	15	<i>A.niger</i>	Café/ Tamarana – PR
A	89	<i>A.niger</i>	Café/ Londrina – PR
A	AN	<i>A.niger</i> (Padrão)	Nd
C	158	<i>A.ochraceus</i>	Café/ Maringá – PR
C	223	<i>A.ochraceus</i>	Café/ Congonhinhas - PR
C	AO	<i>A.ochraceus</i> (Padrão)	Nd
D	196	<i>A.westerdijkiae</i>	Café/ Bela V. Paraíso - PR
D	433	<i>A.westerdijkiae</i>	Café/ Uraí – PR
D	AW	<i>A.westerdijkiae</i> (Padrão)	Nd

Nota: Nd - a localidade não foi determinada.

Fonte: O autor (2010)

4.5.1 Reflectância Total Atenuada (ATR)

4.5.1.1 Preparo da amostra

Os isolados foram cultivados em quintuplicatas em placa de Petri contendo meio BDA e incubados em BOD por 5 dias a $\pm 28^{\circ}\text{C}$. Aproximadamente 10^7

esporos de cada isolados foram colocados em 4 mL de solução salina, deste uma alíquota de 1mL era retirada e estocada em tubo Eppendorf e mantido sob refrigeração até seu uso.

4.5.1.2 Análise da amostra no espectrômetro

Os espectros no infravermelho foram capturados com o espectrômetro Biorad, realizando 32 scans na faixa de número de onda de 4500 a 600 cm^{-1} , e resolução de 2 cm^{-1} e 390 μL de cada amostra foi colocado em cristal de seleneto de zinco (ZnSe) para análise do espectrômetro.(FIGURA 6)



FIGURA 6. SUPORTE ATR PARA A COLOCAÇÃO DA AMOSTRA LÍQUIDA

FONTE: Bozza (2010)

4.5.2 Reflectância Difusa (DR)

4.5.2.1 Preparo da amostra

Os isolados foram cultivados em placas de Petri em quintuplicatas contendo meio Sabouraud líquido e incubados entre 7-10 dias a $\pm 28^{\circ}\text{C}$. Após o crescimento completo do micélio (FIGURA 7 a), este foi retirado (FIGURA 7 b) e desidratado em frascos de vidro através do processo de liofilização (FIGURA 7 c). Após a desidratação do micélio, ele foi pulverizado com o uso de nitrogênio líquido e pistilo de porcelana resultando num pó fino (FIGURA 7 d). As amostras foram armazenadas a 4°C até seu uso.

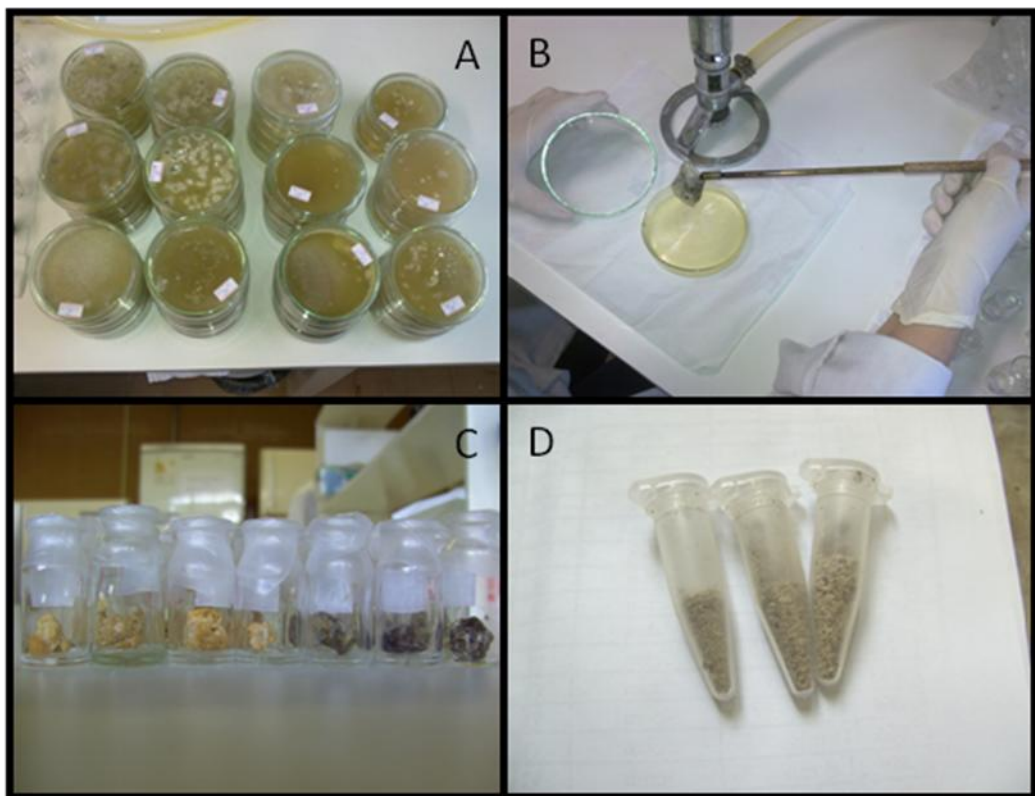


FIGURA 7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS COM DR

NOTA: A: isolados cultivados em meio Saboraud líquido de 7 – 10 dias a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ em BOD. B: retirada do micélio para liofilização. C: micélio dos isolados após a liofilização. D: micélio em pó após ser pulverizado com nitrogênio líquido.

FONTE: O autor (2010)

4.5.2.2 Análise da amostra no espectrômetro

Os espectros no infravermelho foram capturados com o espectrômetro Biorad, realizando 32 scans na faixa de número de onda de 7500 a 400 cm^{-1} , e resolução de 2 cm^{-1} . As amostras em pó eram colocadas em um suporte de aço (FIGURA 8 a) e este era colocado no acessório DR acoplado ao espectrômetro (FIGURA 8 b).

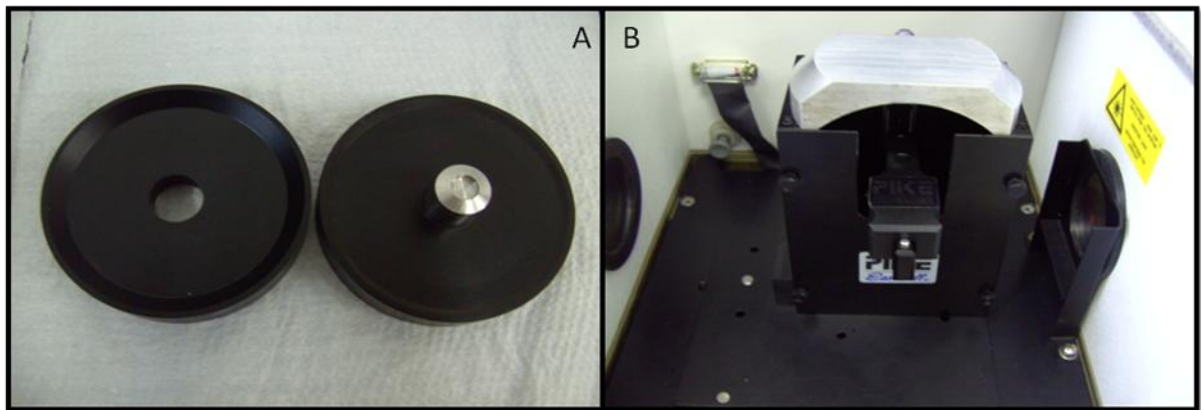


FIGURA 8. SUPORTE PARA A COLOCAÇÃO DA AMOSTRA EM PÓ. B: ACESSÓRIO DR ACOPLADO AO ESPECTRÔMETRO.

FONTE: O autor (2010)

4.5.3 Análise dos espectros

Os espectros resultantes pelo ATR e DR foram analisados no *software The Unscrambler v.9.1* (CAMO PROCESS, 2004). A Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS - *partial least squares*) foi utilizada neste caso pois é muito útil para predizer um conjunto de variáveis dependentes (eixo y, espécie do fungo) com um grande número de variáveis independentes (eixo x, as bandas dentro de um espectro) (ABDI, 2003). Especificamente, PLS-regressão irá encontrar componentes (variáveis latentes) que expliquem da melhor forma a covariância entre X e Y. Entretanto, tratamentos nos espectros anteriores ao PLS são normalmente feitos para diminuir ruídos e melhorar a análise dos espectros. Os pré-tratamentos utilizados nesse trabalho foram: 1º derivada seguida por 11

pontos de alisamento (*smoothing*) e somente alisamento com o objetivo de minimizar ruídos instrumentais.

Os 11 isolados fúngicos selecionados, foram divididos em 3 grupos de acordo com a espécie de cada isolado. Os isolados identificados como *A.niger*, *A.ochraceus* e *A. westerdijkiae* formaram os grupos A, C e D, respectivamente.

Para descobrir a melhor maneira de trabalhar com os dados foram realizados diversos PLS seguido por predição, variando o grupo analisado, o tipo de pré-tratamento e o número de amostras para validação externa. Os grupos foram sempre divididos em 2 e uma variável artificial era incluída para que o PLS soubesse discriminar os grupos, um grupo sempre recebia a variável com o valor 0 e o outro com o valor 1. Isso permitia que o PLS procurasse as maiores similaridades entre os indivíduos de um mesmo grupo e as maiores diferenças entre indivíduos de grupos diferentes. Além disso, após a criação do modelo a predição de amostras externas ao modelo gerava valores próximos de 0 ou 1 o que permitia avaliar se o modelo utilizado conseguiu atribuir os indivíduos nos grupos corretamente.

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Através da técnica de microcultivo foi possível visualizar as estruturas microscópicas dos 33 isolados do gênero *Aspergillus* selecionados. São 24 isolados pertencentes à seção *Nigri* e 9 isolados pertencentes à seção *Circumdati* (FIGURA 9). Trinta destes isolados, foram previamente obtidos de grãos de café *Coffea arabica* proveniente de diversos municípios do Paraná (TRALAMAZZA, 2008). Os demais (3 isolados) foram gentilmente cedidos pela Prof^a Dr^a Maria Helena Fungaro da Universidade Estadual de Londrina, Paraná para serem utilizados como padrões.

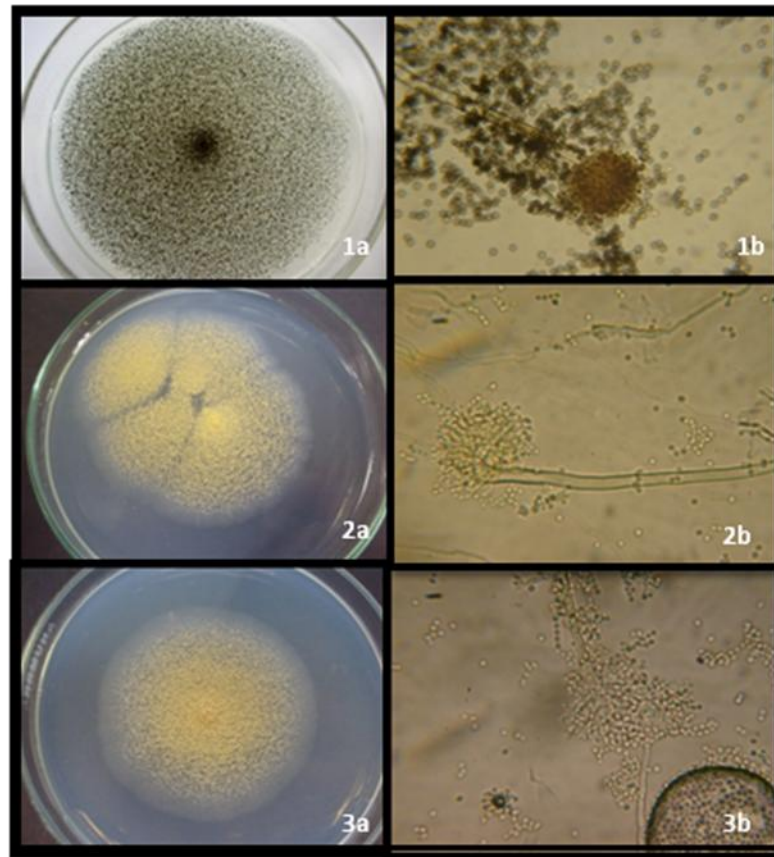


FIGURA 9. ISOLADOS ANALISADOS NO ESTUDO PERTENCENTES ÀS ESPÉCIES *A.niger*, *A.ochraceus* E *A.westerdijkiae*.

Nota: Macro (a) e micromorfologia (b) de *A.niger* (1), *A. ochraceus* (2) e *A. westerdijkiae* (3). Os isolados foram cultivados em meio BDA a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ em BOD por 5 dias. A microscopia está no aumento de 400X.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE PCR

5.2.1 *A. niger*

Os isolados submetidos à amplificação com os oligonucleotídeos OPX7₃₇₂ F e OPX7₃₇₂ R que amplificaram uma banda de 372pb (SARTORI, *et al.*, 2006) foram identificados como pertencentes à espécie *A. niger* (FIGURA 10 e FIGURA 11). Ao todo, das 23 amostras, foram identificados 14 isolados pertencentes a esta espécie.

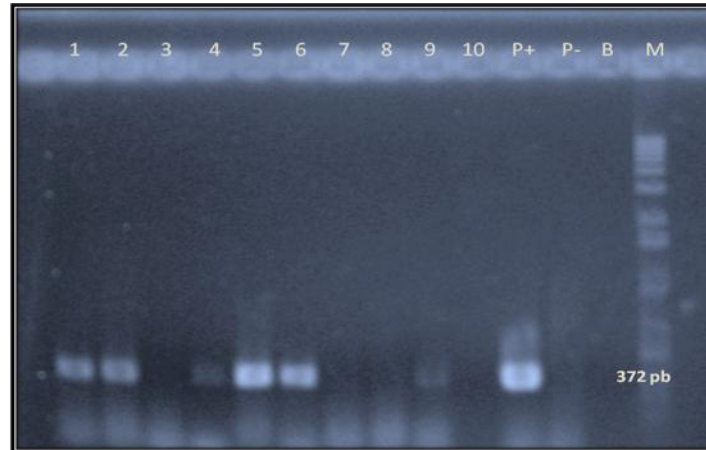


FIGURA 10. AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE *Aspergillus* sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS OPX7₃₇₂F e OPX7₃₇₂R PARA *A. niger*.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: P + :controle positivo de *A. niger*, P -: controle negativo (*Penicillium* sp), B: Branco, M: Marcador de peso molecular DNA ladder 1 Kb.

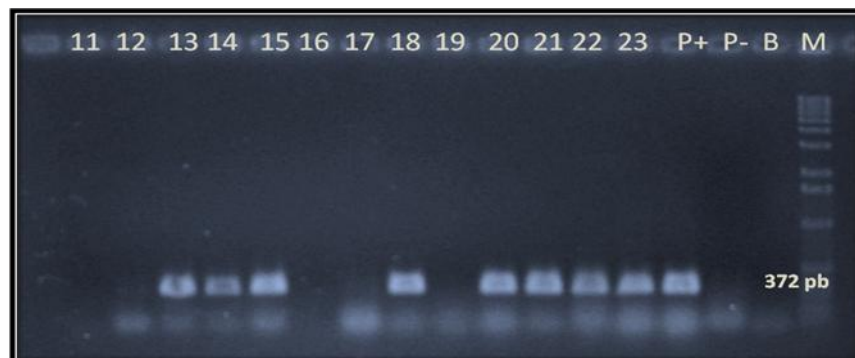


FIGURA 11. AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE *Aspergillus* sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS OPX7₃₇₂F E OPX7₃₇₂R PARA *A. niger*.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: P + :controle positivo (*A. niger*), P -: controle negativo (*Penicillium* sp), B: Branco, M: Marcador de peso molecular DNA ladder 1 Kb.

5.2.2 *A. carbonarius*

Quando utilizado o par de oligonucleotídeos específicos OPX₈₀₉ (FUNGARO, 2004) os quais geram um fragmento de 809 pb característico para *A. carbonarius*, nem o próprio padrão de *A. carbonarius* foi amplificado. Vários testes foram realizados como, preparo de todos os reagentes, novas diluições das amostras de DNA, alterações na temperatura de anelamento, aumento e diminuição do volume de DNA. Entretanto nenhuma mudança foi suficiente para que a amplificação fosse visualizada.

5.2.3 *A. ochraceus*

A figura 12 mostra a amplificação do fragmento de 260 pb de 4 isolados para *A. ochraceus* no fragmento de 260 pb, amostras 24, 26, 28 e 29. Entretanto, o par de oligonucleotídeos utilizados, Ochra pA, foi desenvolvido por Schmidt *et al.* (2003), antes da descoberta da nova espécie *A. westerdijkiae*, anteriormente considerada *A. ochraceus*.

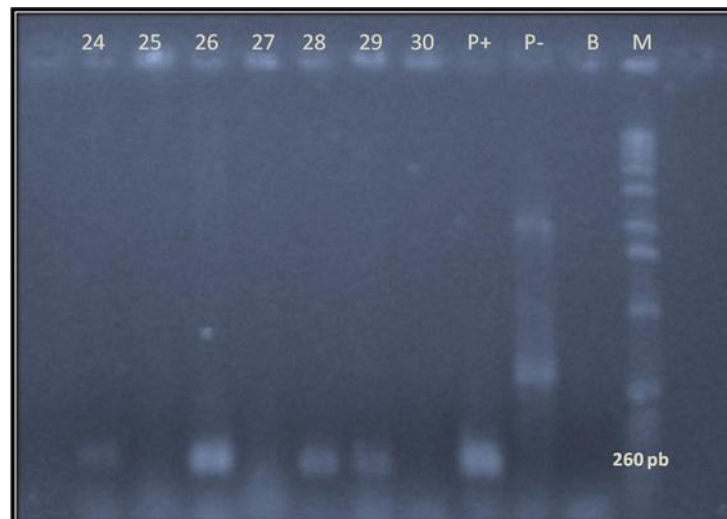


FIGURA 12. AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE *Aspergillus* sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS OCHRA-PaF E OCHRA-PaR PARA *A. ochraceus*

FONTE: O autor (2010)

NOTA: P + :controle positivo (*A. ochraceus*), P -: controle negativo (*Penicillium* sp), B: Branco, M: Marcador de peso molecular DNA ladder 1 Kb.

5.2.4 *A. westerdijkiae*

Como citado anteriormente, *A.westerdijkiae* é uma espécie relativamente nova, tendo sido separada de *A.ochraceus* em 2004 através do sequenciamento do gene da β - tubulina (FRISVAD *et al.*, 2004). O par de oligonucleotídeos utilizado neste trabalho foi criado em 2007 (MORELLO *et al.*, 2007) e apresenta especificidade para *A. westerdijkiae*. Somente 2 espécies, amostras 24 e 26, amplificaram fragmentos de 347 pb. Assim foi possível concluir por eliminação que as amostras 24 e 26 não são da espécie *A. ochraceus*, mas correspondem a *A. westerdijkiae* (FIGURA 13).

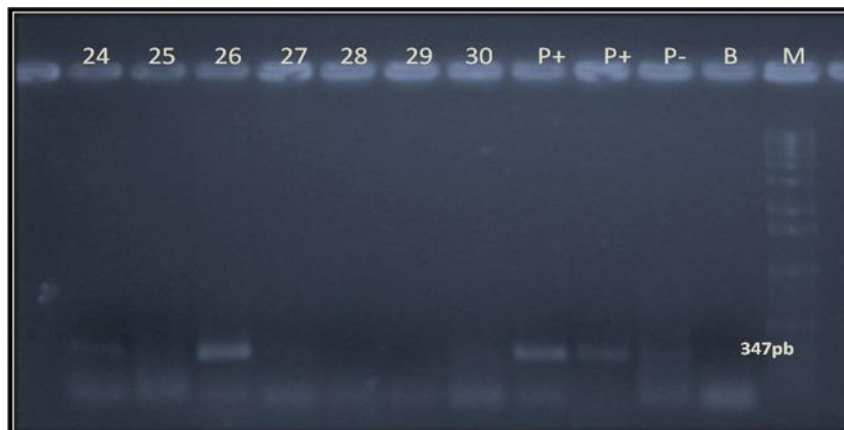


FIGURA 13. AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE *Aspergillus* sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS BT12AwF E BT12AwR PARA *A. westerdijkiae*

FONTE: O autor (2010)

NOTA: P + :controle positivo (*A. westerdijkiae*), P -: controle negativo (*Penicillium* sp), B: Branco, M: Marcador de peso molecular DNA ladder 1 Kb.

Os oligonucleotídeos espécie-específicos utilizados nos permitiram identificar 17 isolados de um grupo de 30. Foram encontrados 14 isolados pertencentes a

espécie *A.niger*, 2 *A.westerdijkiae* e 2 *A.ochraceus*. Não foi possível identificar *A.carbonarius* nas amostras analisadas.

5.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

5.3.1 Reflectância Difusa (DR)

Para a identificação de *A.niger*, o grupo A recebeu a variável artificial de valor 0 e o grupo C e D receberam a variável artificial de valor 1, dessa forma separando o grupo A de C e D. A tabela 2 apresenta os resultados encontrados.

TABELA 2. ANÁLISE DOS ESPECTROS POR REFLECTÂNCIA DIFUSA (DR) PARA A SEPARAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Aspergillus niger* EM RELAÇÃO A *A. ochraceus* E *A. westerdijkiae*.

Modelo	Pré-tratamento	Validação externa	Calibração	Validação	Nº Variáveis Latentes	$\Sigma=v(o-e)^2$	A.E	A.E*
1	Sem tratamento	13	0,99	0,97	5	3,866	2	3
2	1º Derivada + alisamento	13	0,99	0,95	4	4,231	4	5
3	Alisamento	13	0,99	0,95	6	2,124	1	1
4	Sem tratamento	10	0,98	0,94	3	2,932	3	4
5	1º Derivada + alisamento	10	0,97	0,93	3	4,368	3	6
6	Alisamento	10	0,98	0,96	4	1,843	--	--

Nota: A validação externa refere-se ao número de espectros utilizados para fazer a predição e validar o modelo. A fórmula $\Sigma=v(o-e)^2$ refere-se a somatória dos erros das predições de todos os espectros. A.E refere-se ao número de espectros classificados erroneamente na predição e A.E* refere-se ao número de espectros classificados erroneamente na predição considerando o desvio padrão individual. O melhor resultado está destacado em cinza.

Os espectros passaram por 2 pré – tratamentos diferentes, 1º derivada + alisamento, alisamento ou não foram tratados. A parte superior da tabela 3 mostra os resultados utilizando 13 espectros externos pertencentes a 13 isolados diferentes para validar o modelo encontrado. Ou seja, 42 espectros foram utilizados para a criação de um modelo e 13 foram utilizados posteriormente para a predição. Na parte inferior foi utilizada uma validação menor, com 10 espectros sendo estes isolados diferentes aos anteriores. Os dados da calibração e validação são referentes ao PLS, a calibração demonstra a qualidade da separação do grupo A ao grupo C e D, sendo o melhor valor possível 1(100%). A validação mostra o quanto o valor da calibração é preciso. Um valor baixo significaria que a repetição dessa análise poderia gerar valores diferentes já quanto maior o valor, mais confiável é o modelo. No caso das variáveis latentes, o ideal é encontrar o menor valor que mantenha o modelo coeso porém não muito específico, pois pode dificultar a entrada de novos espectros.. A tabela também apresenta a somatória dos erros da predição, ou seja, a somatória do valor esperado, dependendo do grupo, pode ser 0 ou 1, menos o valor encontrado na predição, ao quadrado. Isso permite junto com os valores de A.E e A.E*, avaliar adequadamente o quanto o modelo foi eficiente em identificar amostras externas.

Pela tabela 2 é possível observar que os resultados da calibração e validação não diferiram muito entre pré-tratamentos, por isso não foi um critério utilizado para definir o melhor modelo.

Através do resultado da somatória dos erros da predição foi possível observar que o modelo 6 foi o melhor para diferenciar o grupo A (*A.niger*) do grupo C e D (*A.ochraceus* e *A. westerdijkiae*). Ele obteve alta calibração e validação, 0.98 e 0.96 respectivamente, apresentou um baixo número de variáveis latentes, 3, e o mais importante foi a somatória dos erros da predição que foi a mais baixa de todos (1,843) o que fez com que todas as amostras externas para validar o modelo tenham sido identificadas corretamente na predição. O modelo 3 passou pelo mesmo pré-tratamento e apesar da predição ter identificado uma amostra errada, foi o melhor modelo com 13 amostras externas, apresentando menor erro na predição que os outros dois modelos, 1 e 2.

Os modelos com os piores resultados foram o 2 e o 5, ambos foram tratados com 1º derivada + alisamento e apresentaram uma alta somatória do erro da predição. Consequentemente várias amostras foram identificadas erroneamente.

A figura 14 mostra o resultado, no *software The Unscrambler*, do modelo 6 e no primeiro quadrante é possível observar a separação entre o grupo A (azul) e C/D (vermelho). Mesmo colocados como um grupo único, as amostras de C e D aparecem relativamente separadas. No segundo quadrante observa-se o perfil de todas as variáveis dentro do espectro. A figura 15 também representa o modelo 6 porém uma etapa adiante da análise, na qual a maioria das variáveis, as que não forneceram informação interessante na separação dos grupos, foram retiradas (quadrante 2). Das 7364 variáveis existentes (FIGURA 14 - 2) restaram somente 347 (FIGURA 15 - 2) que possuíam informação de interesse na diferenciação dos dois grupos e conseqüentemente a retirada das variáveis fez os valores de calibração e validação aumentarem de 0,86 e 0,77 (FIGURA 14 - 4) para 0,98 e 0,96 (FIGURA 15 - 4), tornando o modelo mais preciso e robusto. Todos os modelos tiveram suas variáveis diminuídas visando resultados melhores.

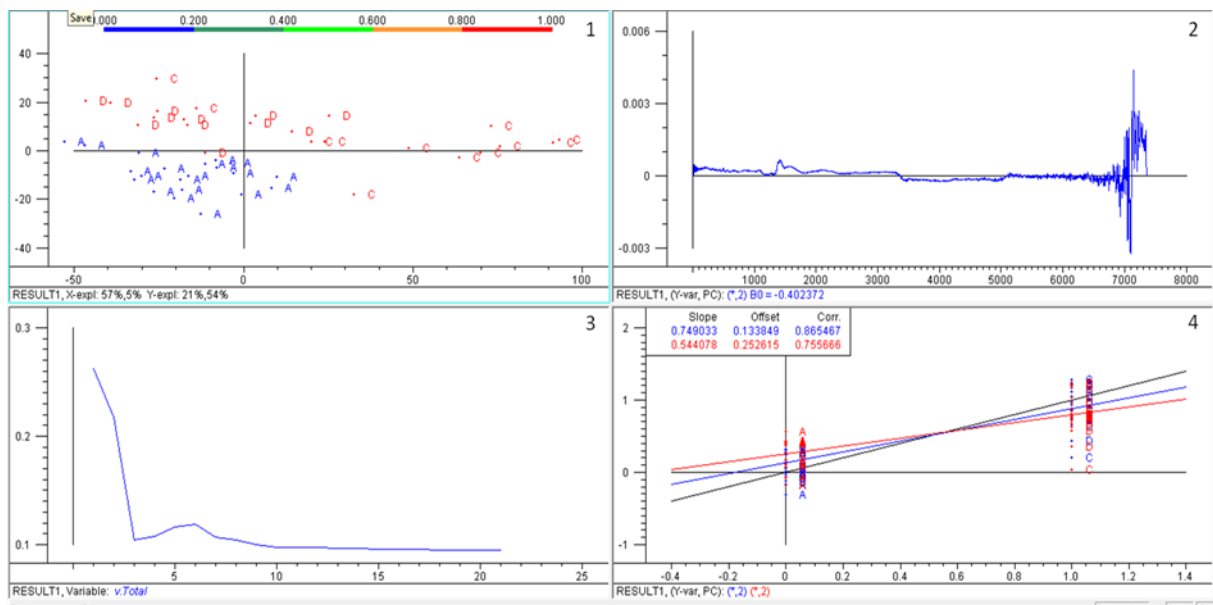


FIGURA 14. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 6 TRATADO COM ALISAMENTO.

Nota: Quadrante 1 – Separação dos grupos A (azul) e C/D (vermelho). Quadrante 2- Espectro total do modelo. Quadrante 3- Variância residual. Quadrante 4 – Relação entre os valores de calibração e validação.

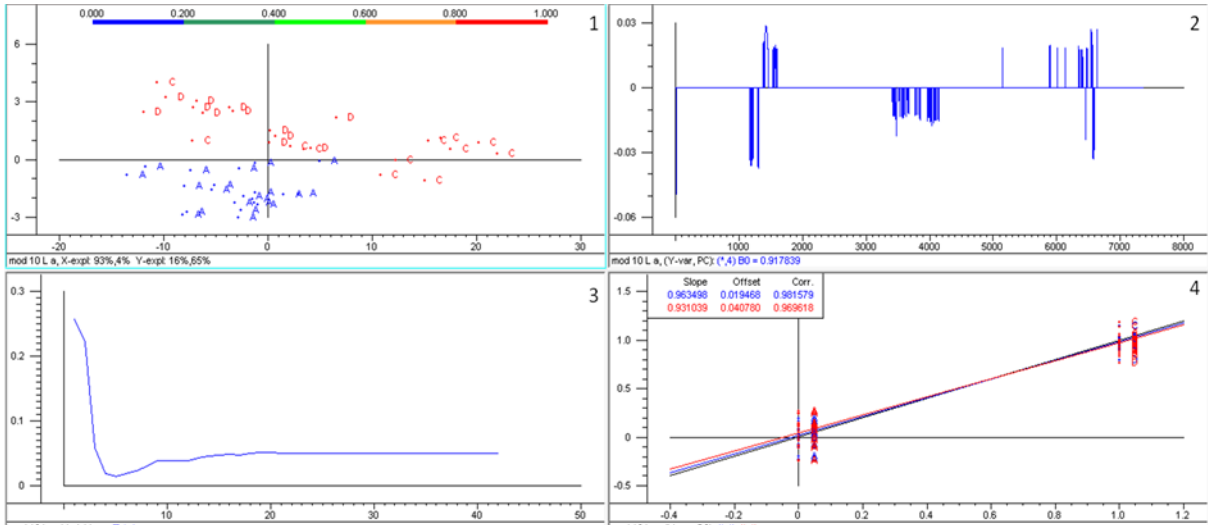


FIGURA 15. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 6 TRATADO COM ALISAMENTO APÓS RETIRADA DE VARIÁVEIS SEM INFORMAÇÃO DO ESPECTRO.

Nota: Quadrante 1 – Separação dos grupos A (azul) e C/D (vermelho). Quadrante 2- Espectro do modelo com somente as variáveis de interesse. Quadrante 3- Variância residual. Quadrante 4 – Relação entre os valores de calibração e validação.

Após a diferenciação entre os grupos A contra C e D, foi realizado a separação entre os grupos C (*A.ochraceus*) e D (*A.westerdijkiae*). Nesta análise com a retirada dos espectros pertencentes ao grupo A, cada grupo possuía três isolados e foram feitas 5 repetições por isolado, totalizando 30 espectros, 15 pertencentes ao grupo A e 15 ao grupo B. A tabela 3 mostra os resultados da análise dos espectros.

TABELA 3. ANÁLISE DOS ESPECTROS POR REFLECTÂNCIA DIFUSA (DR) PARA A SEPARAÇÃO DE *A. ochraceus* E *A. westerdijkiae*.

Modelo	Pré-tratamento	Validação externa	Calibração	Validação	Nº Variáveis Latentes	$\Sigma=v(o-e)^2$	A.E	A.E*
7	Sem tratamento	6	0,98	0,97	2	0,880	1	1
8	1º Derivada + alisamento	6	0,99	0,95	3	1,726	--	2
9	Alisamento	6	0,99	0,98	3	1,509	1	1
10	Sem tratamento	6	0,99	0,98	3	1,387	--	1
11	1º Derivada + alisamento	6	0,99	0,98	2	1,508	1	2
12	Alisamento	6	0,99	0,99	3	0,684	--	--

Nota: A validação externa refere-se ao número de espectros utilizados para fazer a predição e validar o modelo. A fórmula $\Sigma=v(o-e)^2$ refere-se a somatória dos erros das predições de todos os espectros. A.E refere-se ao número de espectros classificados erroneamente na predição e A.E* refere-se ao número de espectros classificados erroneamente na predição considerando o desvio padrão individual. O melhor resultado está destacado em cinza.

Novamente a calibração e a validação em todos os modelos foram altas e homogêneas, impedindo sua utilização como critério. É importante frisar que a validação devido ao número menor de amostras gerais diminuiu para 6, entretanto as 6 amostras para validação externa dos três primeiros modelos (7, 8, e 9) são diferentes dos 3 últimos modelos (10, 11 e 12).

Observando a tabela, novamente o tratamento com alisamento apresentou os melhores resultados. O modelo 12 não obteve o menor número de variáveis latentes, ou seja, seu modelo não foi o mais simples. No caso, foi o modelo 11 com somente 2 variáveis latentes contra 3 do modelo 12. Entretanto, o modelo 12 apresentou a menor somatória dos erros da predição (0,684) e todas as amostras externas foram corretamente identificadas na predição, o que não ocorreu com o modelo 11, em que uma amostra foi identificada incorretamente e considerando o

erro individual de cada amostra na predição, duas amostras foram mal classificadas.

O modelo 9 também foi tratado por alisamento, sendo a única diferença ao modelo 12 as amostras que geraram o modelo e validaram o modelo através da predição. Porém é possível observar que o erro da somatória foi maior no modelo 9 (1,509) e que uma amostras foi incorretamente classificada.

A figura 16 mostra o modelo 12 que apresentou o melhor resultado em separar os grupos C e D. Neste caso o modelo já teve suas variáveis de interesse lecionadas, totalizando 440. É possível observar no primeiro quadrante que os grupos C em azul e D em vermelho estão visivelmente bem separados, confirmando os ótimos resultados da calibração e validação, ambos com 0.99.

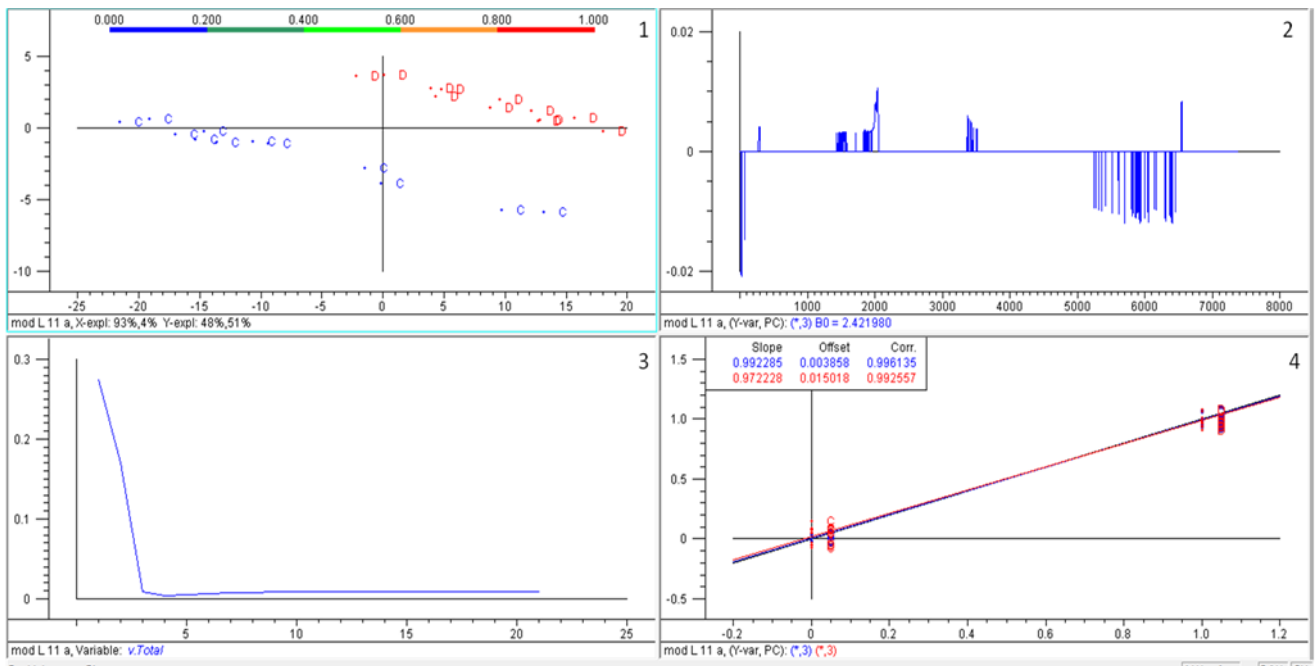


FIGURA 16. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 12 TRATADO COM ALISAMENTO APÓS RETIRADA DE VARIÁVEIS SEM INFORMAÇÃO DO ESPECTRO.

Nota: Quadrante 1 - Separação dos grupos C (azul) e D (vermelho). Quadrante 2 - Espectro do modelo com somente as variáveis de interesse. Quadrante 3 - Variância residual. Quadrante 4 - Relação entre os valores de calibração e validação.

5.3.2 Reflectância Total Atenuada (ATR)

Para realizar uma comparação adequada entre as duas metodologias, DR e ATR, foram utilizados os mesmos isolados, e os 55 espectros gerados através do ATR passaram pelas mesmas análises que os 55 espectros gerados através do DR.

A tabela 4 apresenta os resultados para a diferenciação do grupo A (*A.niger*) contra o C (*A.ochraceus*) e D (*westerdijkiae*). Diferentemente dos espectros gerados no DR, todos os modelos neste caso, apresentaram ótimos resultados. Mesmo o modelo 13, que em sua predição obteve uma amostra classificada errada, no geral teve bons resultados como os outros modelos.

Os resultados mostram que a separação do grupo A e C/D apresentaram modelos com resultados similares. Os modelos 16 e 17 obtiveram uma somatória dos erros baixa, 0,707 e 0,699 respectivamente e o número de variáveis latentes de 3 e 7 respectivamente. Porém o modelo 18 tratado por alisamento apresentou a menor somatória dos erros (0,525) e 6 variáveis latentes, mesmo não sendo o modelo mais simples foi considerado o melhor.

TABELA 4. ANÁLISE DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR) PARA A SEPARAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Aspergillus niger* EM RELAÇÃO A *A. ochraceus* E *A. westerdijkiae*.

Modelo	Pré-tratamento	Validação externa	Calibração	Validação	Nº Variáveis Latentes	$\Sigma = v(o-e)^2$	A.E	A.E*
13	Sem tratamento	13	0,98	0,97	2	1,232	--	1
14	1º Derivada + alisamento	13	0,99	0,96	8	1,138	--	--
15	Alisamento	13	0,98	0,96	4	1,586	--	--
16	Sem tratamento	10	0,99	0,97	3	0,707	--	--
17	1º Derivada + alisamento	10	0,98	0,96	7	0,699	--	--
18	Alisamento	10	0,98	0,96	6	0,525	--	--

Nota: A validação externa refere-se ao número de espectros utilizados para fazer a predição e validar o modelo. A fórmula $\Sigma=v(o-e)^2$ refere-se a somatória dos erros das predições de todos os espectros. A.E refere-se ao número de espectros classificados erroneamente na predição e A.E* refere-se ao número de espectros classificados erroneamente na predição considerando o desvio padrão individual. O melhor resultado está destacado em cinza

Pela figura 17 é possível observar o resultado através do PLS do modelo 18 tratado por alisamento, e que o perfil do espectro (quadrante 2) resultante da metodologia de ATR difere significativamente da metodologia DR. No primeiro quadrante observa-se uma boa separação entre o grupo A em azul e o grupo C/D em vermelho, também é possível observar que os grupos C e D estão completamente misturados. Essa boa separação observa-se também nos valores da calibração e validação, 0,98 e 0,96 respectivamente (quadrante 4).

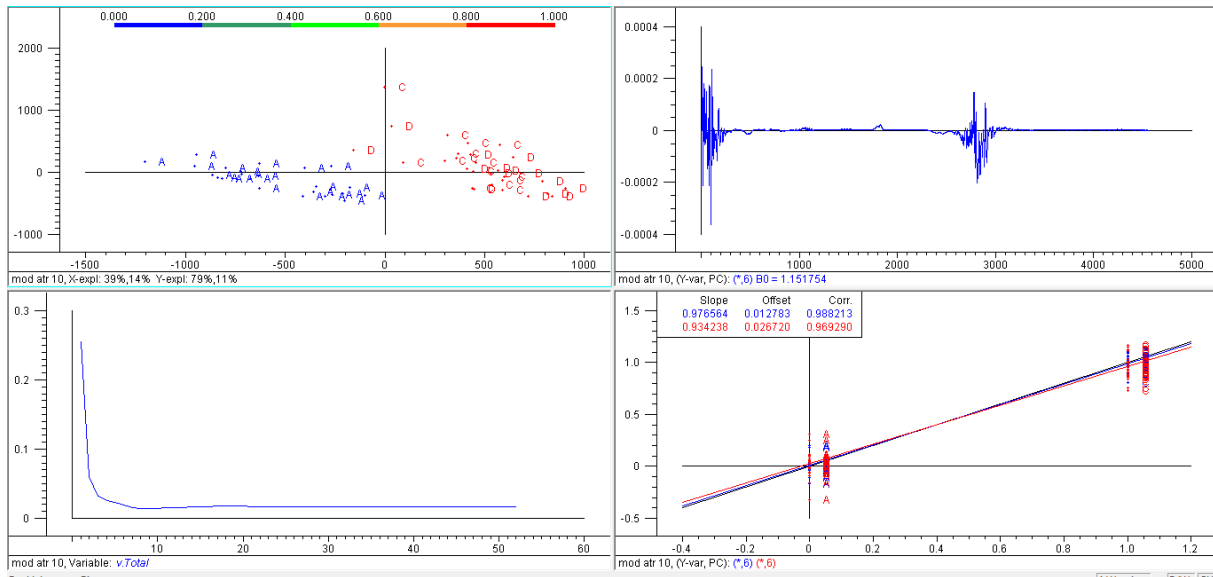


FIGURA 17. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 18 POR ALISAMENTO.

Nota: Quadrante 1 – Separação dos grupos A (azul) e C/D (vermelho). Quadrante 2- Espectro do modelo com as variáveis. Quadrante 3 - Variância residual. Quadrante 4 – Relação entre os valores de calibração e validação.

Na diferenciação entre *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* utilizando a técnica de ATR, os resultados foram insatisfatórios. Nenhum dos modelos criados obteve resultados satisfatórios (TABELA 5). Diferentemente dos outros casos, os valores de calibração e validação foram todos baixos, ou seja, o PLS não conseguiu separar perfeitamente as duas espécies como também essa separação não foi confiável devido à baixa validação. Mesmo as variáveis latentes tendo sido baixas, todos os modelos tiveram uma somatória dos erros muito alta e, com isso, muitas amostras foram classificadas erroneamente na predição. É possível observar que quando foi considerado o erro individual de predição de cada espectro, o número de amostras erradas aumentou consideravelmente, mostrando mais uma vez que esses modelos não foram precisos.

Dentre todos, o modelo 19, tratado com alisamento, mesmo não apresentando os maiores valores de calibração e validação, obteve os melhores resultados na predição, porém 3 amostras foram incorretamente classificadas em 6, somente 50% de acerto, um resultado muito inferior ao esperado. A figura 18 mostra o resultado do PLS do modelo 19. É possível observar no primeiro quadrante que

algumas amostras do grupo C e D estão mais próximas entre si, que em seu respectivo grupo.

TABELA 5. ANÁLISE DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR) PARA A SEPARAÇÃO DOS ISOLADOS DE *A. ochraceus* E *A. westerdijkiae*.

Modelo	Pré-tratamento	Validação externa	Calibração	Validação	Nº Variáveis Latentes	$\Sigma = v (o-e)^2$	A.E	A.E*
19	Sem tratamento	6	0,87	0,63	2	1,465	1	3
20	1º Derivada + alisamento	6	0,51	0,31	1	3,114	2	6
21	Alisamento	6	0,79	0,67	2	1,515	1	3
22	Sem tratamento	6	0,91	0,7	2	2,511	2	5
23	1º Derivada + alisamento	6	0,69	0,24	1	3,203	1	4
24	Alisamento	6	0,86	0,71	2	2,069	1	4

Nota: A validação externa refere-se ao número de espectros utilizados para fazer a predição e validar o modelo. A fórmula $\Sigma = v(o-e)^2$ refere-se a somatória dos erros das predições de todos os espectros. A.E refere-se ao número de espectros classificados erroneamente na predição e A.E* refere-se ao número de espectros classificados erroneamente na predição considerando o desvio padrão individual. O melhor resultado está destacado em cinza.

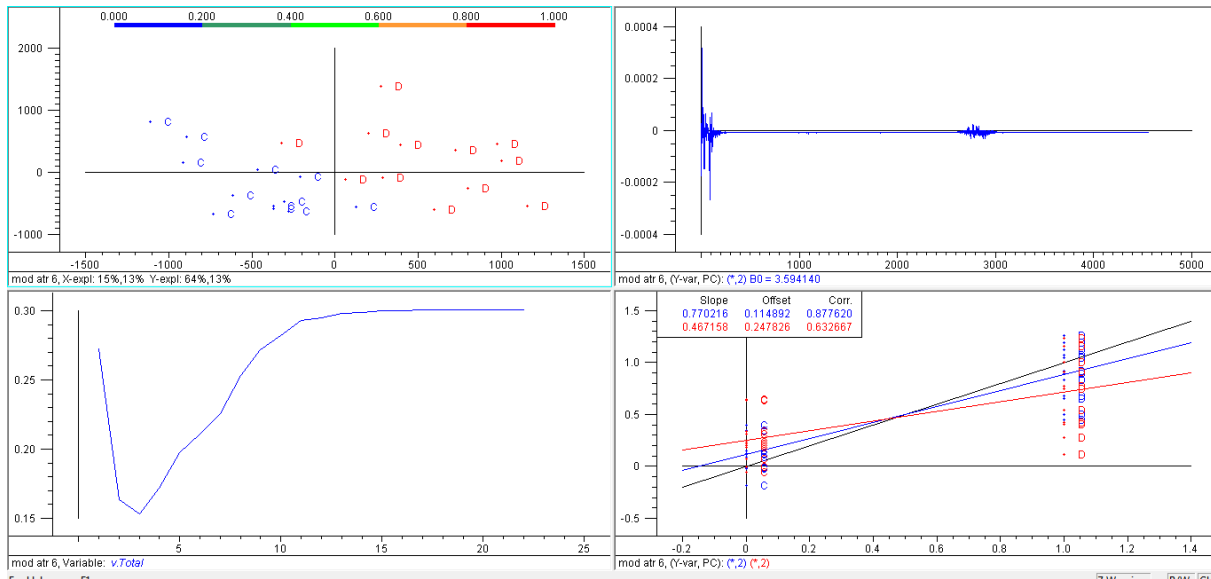


FIGURA 18. RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PLS (QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS) DO MODELO 19 TRATADO COM ALISAMENTO.

Nota: Quadrante 1 – Separação dos grupos C (azul) e D (vermelho). Quadrante 2- Espectro do modelo com as variáveis. Quadrante 3 - Variância residual. Quadrante 4 – Relação entre os valores de calibração e validação.

5.3.3 Caracterização dos espectros gerados pela metodologia de Reflectância Difusa (DR)

Por ter apresentado os melhores resultados foi estudada mais profundamente a metodologia que utilizou as amostras liofilizadas e o acessório de DR. Na figura 19, os 55 espectros foram reduzidos a um espectro por grupo (espécie) através de média sendo o grupo A, em azul, C em vermelho e D em verde, sem qualquer tratamento.

A figura 20 mostra também a média dos espectros, porém estes passaram por pré-tratamentos. Primeiramente eles foram alisados para diminuir os ruídos e após o alisamento, os espectros foram selecionados de acordo com o grupo ao que pertencem e foram reduzidos. Após a redução de 55 para 3 espectros, estes passaram pelo tratamento MSC (*Multiplicative scatter correction*) para diminuir as diferenças entre níveis de bases. Comparando as figuras 19 e 20, observa-se a

diferença entre os espectros tratados, com a diminuição de ruídos e o nivelamento entre os espectros, permitindo uma análise mais adequada dos resultados.

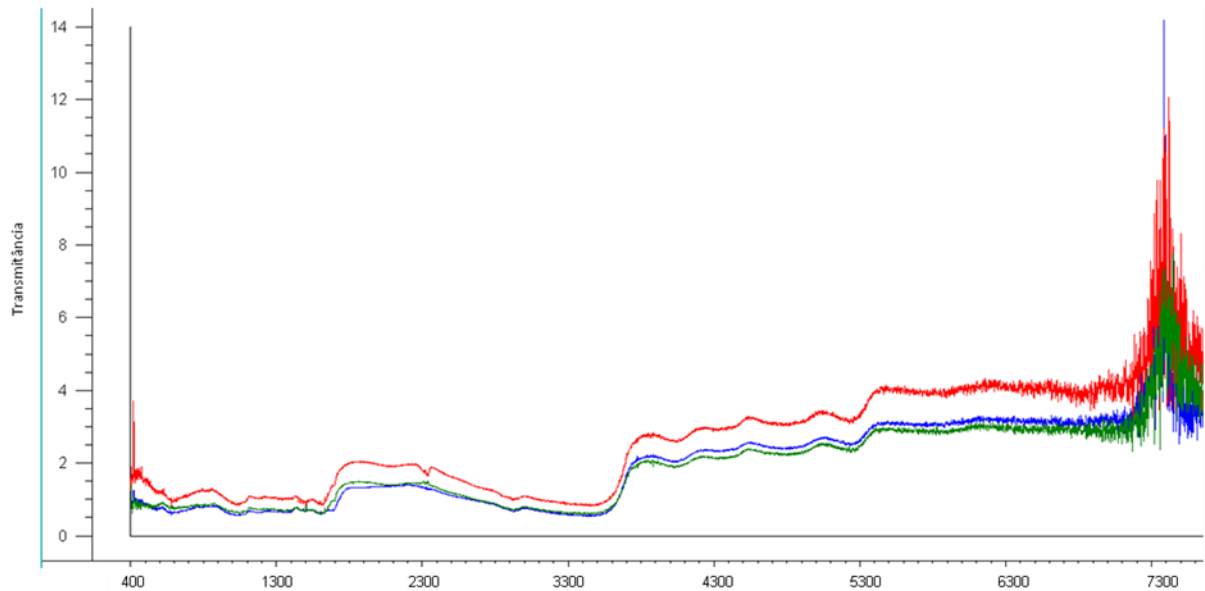


FIGURA 19. VISÃO GERAL DAS REGIÕES ANALISADAS NOS ESPECTROS DOS GRUPOS/ ESPÉCIE A (*A.niger*), C (*A.ochraceus*) E D (*A.westerdijkiae*) ANALISADOS PELA METODOLOGIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA (DR).

Na figura 20 é possível observar que mesmo sendo possível distinguir as três espécies, a maior parte dos espectros são muito semelhantes. Porém, duas áreas marcadas como A e B apresentam bandas que diferem entre as espécies de *Aspergillus*. As figuras 21 e 22 mostram as áreas A e B ampliadas.

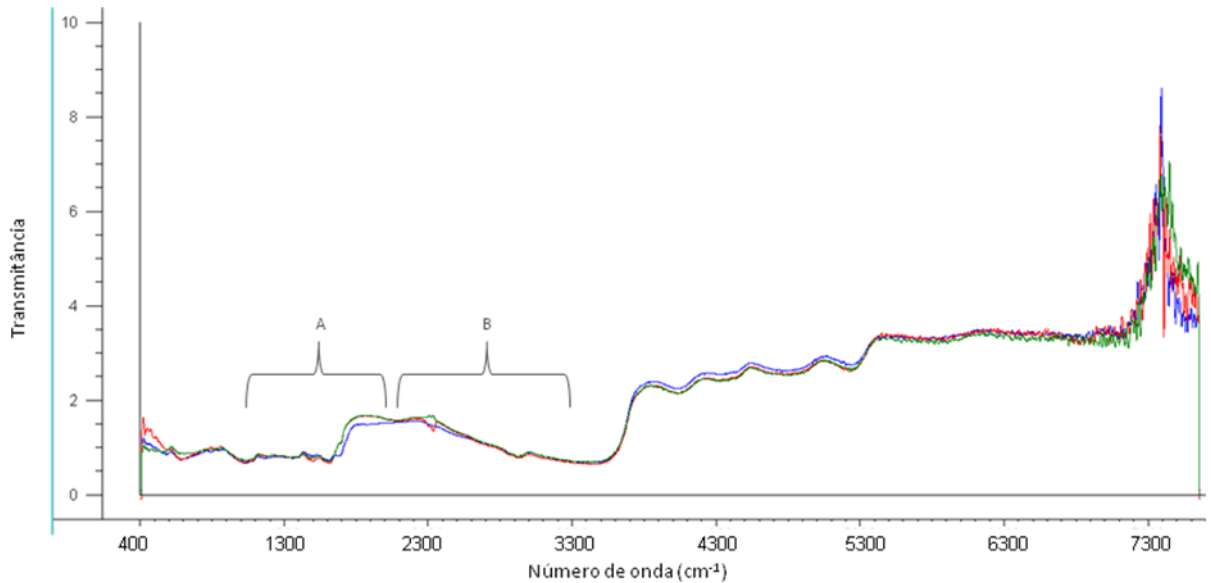


FIGURA 20. VISÃO GERAL DAS REGIÕES ANALISADAS NOS ESPECTROS DOS GRUPOS/ ESPÉCIE A (*A.niger*), C (*A.ochraceus*) E D (*A.westerdijkiae*) TRATADOS POR ALISAMENTO E MSC, ANALISADOS PELA METODOLOGIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA (DR).

Nota: Os espectros foram tratados com alisamento, reduzidos pela média de cada grupo de espectros, A,C e D e foi realizado um MSC. O grupo A está em azul, C em vermelho e D em verde. As regiões destacadas por A e B possuem características visíveis que distinguem os grupos entre si.

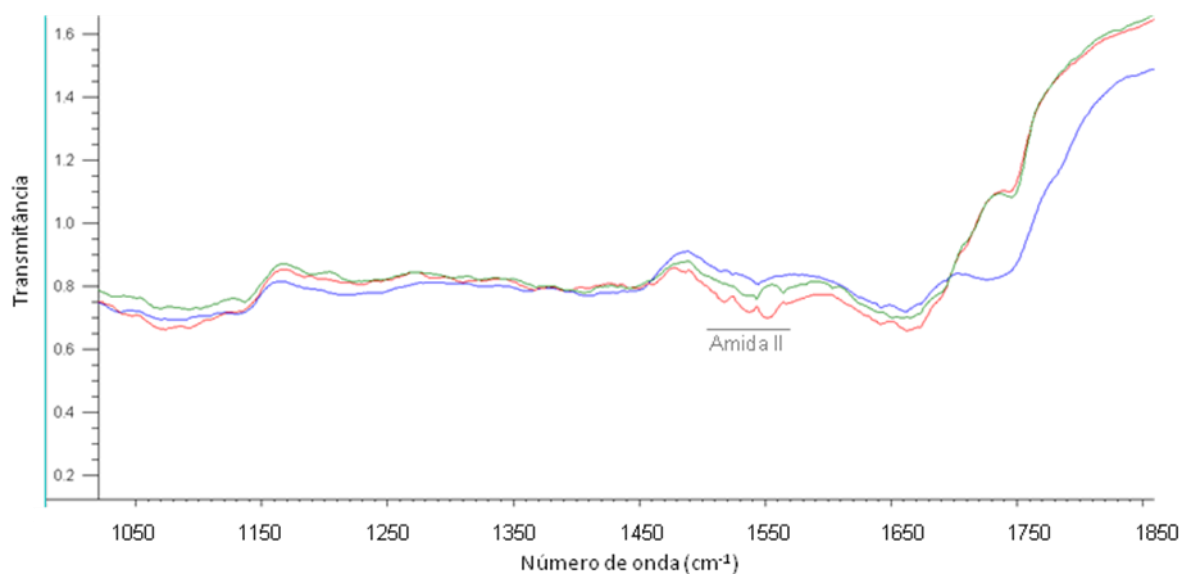


FIGURA 21. REGIÃO A AMPLIADA QUE APRESENTA BANDAS DISTINTAS ENTRE OS GRUPOS A, C e D ANALISADOS PELA METODOLOGIA DE DR.

Nota: A região entre 1520-1550 cm^{-1} no espectro representa o grupo amida II. O espectro em azul corresponde ao grupo A, em vermelho o grupo C e em verde o grupo D.

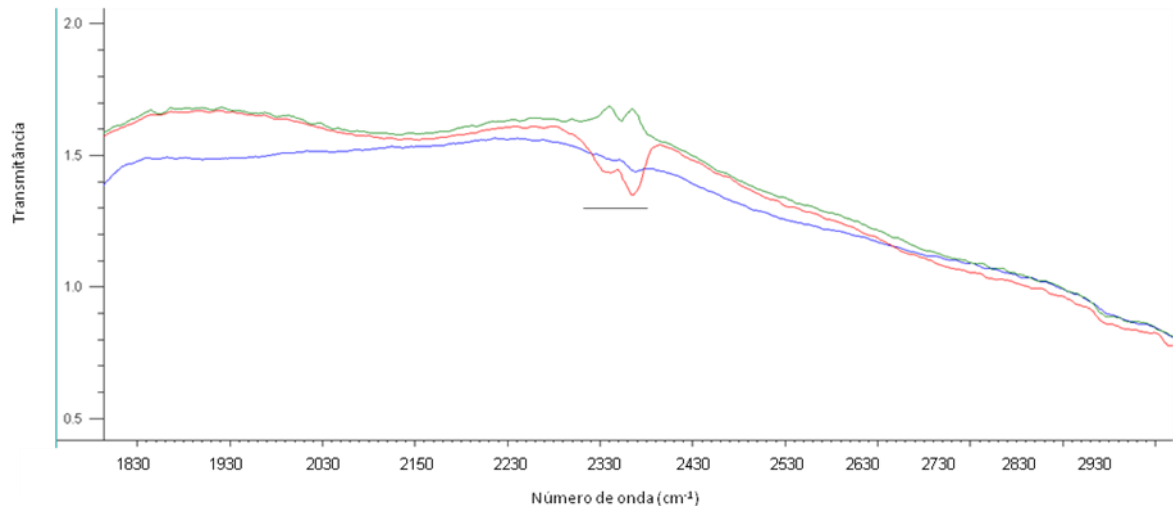


FIGURA 22. REGIÃO **B** AMPLIADA QUE APRESENTA BANDAS DISTINTAS ENTRE OS GRUPOS A, C e D ANALISADOS PELA METODOLOGIA DE DR.

Nota: A região marcada corresponde a 2335- 2360 cm^{-1} . O espectro em azul corresponde ao grupo A, em vermelho o grupo C e em verde o grupo D.

A figura 21 foi escolhida do espectro completo, pois apresenta uma área visivelmente distinta entre os grupos, essa região entre 1520 - 1550 corresponde à banda do grupo amida II, composto derivado do NH_3 pela substituição de um, dois ou três hidrogênios por radicais acilas, sendo o grupo relacionado à proteínas (NAUMANN, HELM, LABISCHINSKI 1991).

A figura 22 mostra a região B que compreende entre 2335 – 2360 cm^{-1} e que também apresentou diferenças facilmente visíveis nas bandas. Segundo MISTRY (2009) a região entre 2325 - 2500 cm^{-1} apresenta grupos amins carregadas (NH^+) com vibrações de estiramento. Entretanto não foi possível correlacionar essa região com bandas conhecidas para a identificação de micro-organismos.

Analisando os espectros ampliados é possível observar que os grupos C e D correspondentes às espécies *A.ochraceus* (espectro vermelho) e *A.westerdijkiae* (espectro verde), estão mais próximas entre si que *A.niger*, grupo A (espectro azul).

Devido às duas regiões A e B apresentarem diferenças visuais nos espectros, foi realizado diversas análises através de PLS para determinar o quanto cada região

possui de informação para diferenciar as espécies. Foi utilizado somente as duas regiões para observar o potencial em separar as três espécies de fungos. As regiões utilizadas para o PLS foram A (1517-1600 cm^{-1}) e B (2300- 2400 cm^{-1}). Os dados foram tratados com alisamento e MSC. A tabela 7 mostra os resultados.

TABELA 6. ANÁLISE POR PLS DE REGIÕES ESPECÍFICAS DOS ESPECTROS PARA A DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES *A.niger*, *A.ochraceus* e *A.westerdijkiae*.

Modelo	Região no espectro (cm^{-1})	Separação de grupos	Calibração	Validação	Nº Variáveis Latentes	$\Sigma= v (o-e)^2$	A.E	A.E*
25	1517-1600 + 2300-2400	A de C/D	0,88	0,65	6	2,580	2	5
26	1517-1600 + 2300-2400	C e D	0,91	0,85	3	1,118	1	2
27	1517-1600	A de C/D	0,71	0,45	5	3,756	2	7
28	1517-1600	C e D	0,20	-0,25	1	2,341	2	6
29	2300- 2400	A de C/D	0,89	0,79	5	3,092	1	5
30	2300-2400	C e D	0,88	0,85	2	1.112	-	1

Nota: Os espectros foram tratados com alisamento seguido por MSC.

Foram gerados 6 modelos pelo PLS para determinar o quanto cada região influenciou na diferenciação das espécies e foi realizado uma predição com dez amostras externas ao modelo. Os dois primeiros modelos, 25 e 26 correspondem às duas regiões A e B com 1517 - 1600 e 2300- 2400 cm^{-1} , respectivamente. O modelo 25 que separa o grupo A (*A.niger*) de C (*A.ochraceus*) e D (*A.westerdijkiae*) obteve um resultado satisfatório com uma calibração de 0,88 e validação de 0,65. O modelo 26 que separa os grupos C e D obtiveram resultados melhores, com uma calibração de 0,91 e uma validação de 0,85. A predição mostrou que os dois

modelos, 25 e 26, classificaram erroneamente 2 e 1 amostras externas respectivamente. Porém considerando o desvio padrão o valor aumenta para 5 e 2 respectivamente.

Os modelos 27 e 28 analisaram somente a região do espectro entre 1517 – 1600 cm^{-1} . Essa região corresponde ao grupo funcional amida I e apresentou resultados insatisfatórios. O modelo 27 separando o grupo A de C e D obteve uma calibração e validação de 0,71 e 0,45, respectivamente. O modelo 28 obteve resultados piores com uma calibração de 0,20 e validação de -0,25. A somatória do erro da predição no modelo 27, com 3,756 foi a mais alta de todos os modelos e várias amostras foram classificadas em grupos errados. O modelo 28 apresentou a maior somatória dos erros da predição entre os modelos que separam somente o grupo C e D, e considerando o desvio padrão todas as amostras externas foram classificadas erradas.

Os modelos 29 e 30 testaram somente a região entre 2300-2400 cm^{-1} . Região caracterizada por grupo funcional amina. Os resultados demonstraram que a maior parte da informação demonstrada nos modelos 25 e 26, vinham somente da região entre 2300-2400 cm^{-1} . O modelo 29 apresentou uma calibração e validação de 0,89 e 0,79, respectivamente, na separação entre os grupos A de C e D. E o modelo 30, separando os grupos C e D obteve resultados ainda melhores com uma calibração de 0,88 e validação de 0,85. Porém o modelo 29 quando considerando o valor do desvio padrão na predição classificou erroneamente 5 amostras. O modelo 30 apresentou os melhores resultados, com a somatória do erro mais baixa (1,112) e também todas as amostras foram classificadas corretamente e, considerando o desvio padrão, somente uma amostra foi classificada erroneamente.

6 DISCUSSÃO

6.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR MEIO DE PCR

Por meio da técnica de PCR utilizando os nucleotídeos específicos para *A.carbonarius*, *A.niger*, *A.ochraceus* e *A.westerdijkiae* observou-se que dos 23 isolados analisados pertencentes à seção *Nigri*, a grande maioria, 17 (73,9%) pertencem à espécie *A.niger*.

Magnani *et al.* (2005) trabalhando com isolados do café também obtiveram *A.niger* como a espécie mais frequente, sequenciando a região ITS do DNA ribossomal dos isolados com os oligonucleídeos ITS1 e ITS2. Noomin *et al.* (2008 a) encontraram resultados similares sequenciando regiões ITS, do gene da β -tubulina e do gene da calmodulina do isolados.

Quando utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores específico para *A. carbonarius* nem o próprio padrão de *A. carbonarius* foi amplificado. Vários testes foram realizados como, preparo de todos os reagentes, novas diluições dos DNAs, alterações na temperatura de anelamento, aumento e diminuição do volume de DNA. Entretanto nenhuma mudança foi suficiente para que a amplificação fosse visualizada.

Como hipóteses para a não amplificação dos fragmentos esperados, acredita-se que as condições ideais da PCR não foram alcançadas para a amplificação pelos oligonucleotídeos iniciadores, já que o isolado utilizado como padrão não amplificou para o fragmento esperado (809pb). O padrão doado estava liofilizado e armazenado em sílica e, diferentemente dos outros padrões, este não cresceu em meio de cultura. Entretanto, foi possível extrair seu DNA diretamente do micélio impregnado na sílica, porém este DNA pode não estar viável. Além disso, é possível que, dentre os 30 isolados analisados no trabalho, não houvesse nenhum pertencente à espécie *A.carbonarius*.

Dos 7 isolados pertencentes à seção *Circumdati*, 4 amplificaram para *A.ochraceus*. Porém, 2 isolados que amplificaram para *A.ochraceus* também amplificaram com o par de oligonucleotídeos específico para a espécie *A.westerdijkiae*. Essa dupla amplificação ocorreu porque o par de oligonucleotídeos

utilizado para *A.ochraceus* foi desenvolvido em 2003 por Schimidt *et al.* e a espécie *A. westerdijkiae* ainda não havia sido descrita e desmembrada de *A.ochraceus*. Isso ocorreu em 2004 (Frisvad *et al.*, 2004), através do sequenciamento do gene da β -tubulina de diversos isolados da seção *Circumdati*. Após a separação das espécies observou-se, em outros trabalhos, que a maioria dos isolados encontrados, inicialmente considerados *A.ochraceus*, correspondiam na verdade a *A.westerdijkiae*. Morello *et al.* (2007) desenvolveram o par de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho (bt2AW) e observaram que 84% dos isolados identificados anteriormente por eles como *A.ochraceus*, correspondiam a *A.westerdijkiae*.

Para os isolados que não amplificaram nenhum fragmento, outros métodos disponíveis na literatura podem ser futuramente empregados, como o sequenciamento de regiões ITS, gene da β -tubulina ou do gene da camodulina (GONZALES-SALGADO *et al.*, 2005; PATINO *et al.* 2005; VARGA, *et al.*, 2007; NOOMIN *et al.*, 2008 a). Outra opção seria utilizar outros oligonucleotídeos específicos desenvolvidos para as espécies de interesse (LOGOTHELI *et al.*, 2009; GIL-SERNA *et al.*, 2009)

6.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os 11 isolados selecionados para a análise no infravermelho fazem parte do mesmo gênero. Estão divididos em três espécies: *A.niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. As duas últimas até 2004 eram consideradas uma mesma espécie, tendo sido separadas através do seu perfil morfológico, extração de metabólitos secundários e sequenciamento do gene da β -tubulina (FRISVAD *et al.*, 2004). Isso demonstra o desafio em identificar diferentes espécies de micro-organismos, pois muitas vezes sua separação morfológica fica impraticável. Assim, a capacidade de separar espécies muito semelhantes no infravermelho mostra a eficácia da técnica na identificação de fungos.

A utilização de duas técnicas e diferentes modos de preparo das amostras, essencialmente, um com alta concentração de água (ATR) e a outra sem a presença de água (DR), permitiu uma maior compreensão da influência da água na espectroscopia no infravermelho na análise de fungos.

As amostras liofilizadas e trituradas com auxílio de nitrogênio líquido, analisadas em DR obtiveram bons resultados. Os modelos 6 e 12 e , ambos tratados com alisamento foram capazes de separar os grupos A (*A.niger*) dos outros dois, C (*A.ochraceus*) e D (*A. westerdijkiae*) (TABELA 2) como também separaram os grupos C e D, respectivamente (TABELA 3). A predição dos dois modelos classificou corretamente 100% das amostras externas mesmo quando considerando o erro da predição individual (A.E*). Através das figuras 14 e 15 foi possível observar a importância de retirar as variáveis que não possuem informação de interesse, no caso a separação das três espécies, aumentando significativamente a robustez do modelo.

No caso das amostras de esporos em solução salina analisadas em ATR, somente a separação do grupo A obteve bons resultados (TABELA 4). Além disso, todas as formas de pré-tratamento avaliadas neste caso obtiveram boas predições, com baixa somatória dos erros das predições. Isso demonstra que os espectros estavam sendo separados por bandas muito distintas e que foram capazes de separar facilmente o grupo A dos outros grupos. Na figura 16, que mostra o resultado do modelo 18, fica evidente a separação entre o grupo A e C/D, e também percebe-se que, diferentemente do modelo 6 utilizando a técnica de DR (FIGURA 15), o PLS do modelo 18 por ATR (FIGURA 17) , agrupou mais uniformemente os grupos C e D o que pode indicar uma dificuldade da metodologia por ATR em separar os dois grupos C e D.

Esse fato fica evidente com os resultados da tabela 5, na separação dos grupos C e D. Nenhum modelo obteve sucesso em separar as amostras da validação externa. O melhor modelo 19, identificou somente 50% das amostras corretamente. Esses resultados mostram a grande dificuldade de separar os grupos C e D pela metodologia aplicada no ATR. Acredita-se, portanto, que essa metodologia não foi sensível o suficiente para separar espécies tão semelhantes.

Erukhimovitch *et al.* (2005) utilizaram filmes a partir de soluções salina e esporos e obtiveram sucesso ao separar dois gêneros diferentes, *Pythium* sp e *Fusarium* sp. por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho . Entretanto, os autores não testaram sua eficiência trabalhando ao nível de espécie ou linhagens.

O acessório ATR não parece influenciar os resultados encontrados, pois diversos estudos o utilizaram com sucesso na identificação de micro-organismos.

Porém, em nenhum deles trabalhou-se com solução aquosa, e sim com filmes desidratados ou amostras sólidas, em pó ou o próprio micélio.

Naumann (2009) utilizou regiões específicas do espectro, conhecidas por terem a maior quantidade de informações de amostras biológicas. O autor trabalhou com amostras sólidas, em pó, com a técnica de ATR. Cultivou os fungos por duas semanas em meio MEA (extrato de malte 2%) com papel celofane sobre o meio de cultura. Raspou o micélio do celofane e formou um pó das amostras com nitrogênio líquido. Obteve ótimos resultados, separando 26 espécies pertencentes a 12 famílias diferentes dos filos Basidiomyceto e Ascomycota. Conseguiu classificá-los corretamente ao nível de linhagem utilizando uma análise de cluster. Também realizou uma análise supervisionada, rede neural artificial e obteve 95% de sucesso na identificação correta dos espectros ao nível de linhagem.

O preparo de um filme homogêneo utilizando hifas miceliais é muito difícil. O uso do micélio em pó é uma alternativa para homogeneizar diferenças químicas entre hifas novas e antigas e para obter espectros mostrando a composição geral da cultura (NAUMANN, 2009).

Winder e Goodacre (2004) compararam a eficiência de reflectância difusa/absorbância e ATR na identificação de bactérias, e, em seus resultados, a metodologia por ATR apresentou melhores resultados na separação de espécies bacterianas.

Petisco *et al.* (2008) trabalharam com três espécies pertencentes ao gênero *Epichloë*: *E. sylvatica*, *E. typhina* e *E. festucae*. Todas são semelhantes e não podem ser distinguidas por sua morfologia. Os autores cultivaram os isolados em meio BDA por 4 semanas e discos da cultura incluindo o meio foram retirados e colocados em cristal de quartzo para a análise. Foram utilizados reflectância/absorbância, diversos pré-tratamentos e análises multivariadas, entre elas PLS. Como no presente trabalho, dividiram as espécies em grupos binários e conseguiram separar corretamente entre 90 – 100% das amostras, sendo a 1ª derivada o melhor pré-tratamento encontrado.

A utilização da água nas amostras apresenta grandes vantagens, por ser um solvente limpo (água milliQ), de fácil acesso e barato. Entretanto, sua utilização no infravermelho não é bem recebida na comunidade científica, pois sua molécula absorve muita energia na faixa do infravermelho mascarando outras bandas e diminuindo a qualidade do espectro (BAKEEV, 2005). Isso pode ter influenciado o

resultado no ATR no presente trabalho, pois no caso do DR o material foi liofilizado, sem a presença de água.

Fischer *et al.* (2006) testaram diversos protocolos para análise de esporos de fungos do ambiente. Observaram que soluções que continham pelo menos 40% de álcool ou metanol misturados à água, apresentaram resultados muito mais significativos que soluções formadas somente por água e esporos. Os autores identificaram os fungos filamentosos ao nível de linhagem, utilizando filmes desidratados a partir de soluções de álcool/água (40/60%).

Fischer *et al.* (2006) acreditam que soluções contendo somente água prejudiquem os espectros, devido aos esporos desses fungos filamentosos serem extremamente hidrofóbicos, ao contrário de bactérias e leveduras, o que impede uma homogeneização adequada da solução aquosa e dos esporos. Além disso, acrescentar outro solvente, como também retirar mecanicamente os esporos mais superficiais e hidrofóbicos da solução aumenta muito a qualidade dos espectros.

Contudo, nos últimos anos um grupo científico conhecido como AquaPhotomics defende a utilização da água nas análises, sugerindo que a presença da água não prejudica as análises mas na verdade, pode ajudar na emissão de sinais metabólitos importantes (TSENKOVA, 2007).

No presente trabalho, além dos esporos hidrofóbicos, outro fator que pode ter prejudicado as análises foi a escolha do acessório de análise. O feixe de infravermelho refletido no cristal de ZnSe no ATR não possui uma alta penetração nas amostras (BALL, 2001) e os esporos hidrofóbicos na solução devem ter ficado na superfície, sem contato com o feixe de infravermelho.

Provavelmente modificando o protocolo de preparação da amostra, utilizando uma solução como uma menor concentração de água e formando finos filmes, o ATR teria gerado resultados muito mais significativos.

Garon *et al.* (2010) também utilizaram o protocolo sugerido por Fischer *et al.* (2006) e diferenciaram *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. fumigatus* por espectroscopia no infravermelho. Os autores cultivaram os isolados por duas semanas, retiraram os esporos e colocaram em solução de etanol/água (40/60, v/v). Após procedimentos de centrifugação e ultrasonicação, resuspenderam o *pellet* m 50 µL de etanol/água e depositaram 10 µL da suspensão em poços de silicone e eliminaram o excesso de água por dessecação. Com a formação de um filme eles analisaram as amostras por

IV de transmissão. Através de uma análise por *cluster* foram capazes de separar as três espécies.

Como a metodologia utilizada com ATR obteve um ótimo resultado separando o grupo A, *A.niger* dos outros dois grupos, C e D, pode-se sugerir que a metodologia seja utilizada como uma forma de *screening* para separar os isolados do grupo A e diminuir o número de amostras a serem utilizadas na metodologia com DR, por ser mais laboriosa. Porém, para confirmar essa hipótese será necessário analisar amostras de uma espécie muito similar a *A.niger*, como por exemplo, *A.tubingensis* e observar se é possível separá-las ou se ocorreria o mesmo problema como ocorreu com a separação dos grupos C e D.

O DR com amostras liofilizadas em pó, mesmo sendo uma metodologia mais complexa e laboriosa, apresentou os melhores resultados e foi capaz de identificar as três espécies fungos.

Devido ao bom resultado apresentado pela metodologia utilizando DR, os espectros resultantes foram analisados mais profundamente. A figura 19 apresentou os espectros reduzidos para observar com maior facilidade as diferenças entre eles, entretanto sem um tratamento prévio há dificuldades em analisar visualmente devido a grande quantidade de ruídos. Assim, os espectros foram tratados por alisamento seguido pro MSC (FIGURA 20), dessa forma diminuindo diferenças e ruídos.

Os espectros azul, vermelho e verde correspondem as espécies *A.niger*, *A.ochraceus* e *A.westerdijkiae*, respectivamente. É possível observar na figura 20 que os espectros de *A.ochraceus* e *A.westerdijkiae* estão mais próximos entre si e possui um espectro mais semelhante, o que era esperado já que até 2004 eram consideradas a mesma espécie (FRISVAD *et al.*, 2004).

Duas regiões se destacaram nos espectros por apresentarem bandas visualmente distintas nos três grupos. A primeira região corresponde ao número de ondas de 1520-1550 cm^{-1} (FIGURA 21). Segundo a literatura ela corresponde às bandas de amida II, associadas às proteínas. Além disso, é considerada uma das bandas com maior intensidade nos espectros relacionada à caracterização de micro-organismos (NAUMANN, HELM, LABISCHINSKI 1991; HELM *et al.*, 1991).

A Figura 22 mostra a segunda região ampliada, que corresponde ao número de ondas de 2330-2360 cm^{-1} . De acordo com MISTRY (2009) a regiões entre 2325-2500 cm^{-1} são caracterizadas pela presença do grupo funcional amina (NH^+) com vibrações de estiramento. Porém, a literatura até o momento, descreve as regiões

de 1800 -2800 cm^{-1} como não tendo relevância no estudo de micro-organismos e estas são normalmente retiradas das análises (NAUMANN, HELM, LABISCHINSKI 1991; HELM *et al.*, 1991, MAQUELIN *et al.*, 2002; FISCHER *et al.*, 2006; NAUMANN, 2009, GARON, *et al.*, 2010).

Como entre o número de ondas de 2330-2360 cm^{-1} , considerado pela literatura uma região sem importância relativa aos micro-organismos, apresentou padrões distintos entre os grupos, foi considerado relevante analisar essas regiões separadamente para observar se elas possuíam algum caráter informativo de interesse na diferenciação das espécies analisadas.

A tabela 6 mostra os resultados realizados por PLS seguido por predição para separar as três espécies de fungo, avaliando as duas regiões simultaneamente, assim como separadamente. Foi possível observar que, juntas, elas obtiveram um resultado satisfatório, com uma média de calibração de aproximadamente 0,89, considerando que foram utilizadas somente 183 variáveis das quase 7400 que representam todo o espectro.

Porém, analisando as regiões separadamente fica evidente que a região entre 1517- 1600 cm^{-1} apresenta pouca informação relevante para a diferenciação das espécies. Seus valores de calibração e validação foram muito baixos e segundo a literatura a região amida I e amida II normalmente possuem grande quantidade de informação (NAUMANN, 2000, BURGULA *et al.*, 2007). O que pode ter ocorrido é que os níveis de proteínas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados ou que o tratamento utilizado não foi capaz de ressaltar essas diferenças adequadamente.

Já a análise da região entre 2300-2400 cm^{-1} , mostrou resultados satisfatórios, com valores de calibração acima de 0,85. Isso demonstra que o PLS gerado das análises das duas regiões, na realidade, foi resultado em sua maior parte, somente pela região entre 2300-2400 cm^{-1} . E essa informação é interessante, pois essa região é normalmente negligenciada pela a maioria dos estudos (NAUMANN, HELM, LABISCHINSKI 1991; HELM *et al.*, 1991, MAQUELIN *et al.*, 2002; FISCHER *et al.*, 2006; NAUMANN, 2009, GARON, *et al.*, 2010) relacionados a identificação de micro-organismos.

Este trabalho demonstrou que existe uma nível de informação significativa para a diferenciação das espécies *A.niger*, *A.ochraceus* e *A.westerdijkiae* na região entre 2300-2400 cm^{-1} . Portanto, pelos resultados obtidos no trabalho, a

espectroscopia no infravermelho demonstrou ser uma técnica viável e eficaz para a identificação de isolados fúngicos, principalmente utilizando a metodologia por reflectância difusa e amostras liofilizadas.

A partir deste trabalho iniciou-se um banco de dados dos espectros e pretende-se, em projetos futuros, uma continua agregação de outros isolados e espectros, dessa forma aumentando a robustez do modelo empregado, com o intuito de utilizar rotineiramente a técnica de espectroscopia no infravermelho na taxonomia de micro-organismos.

7 CONCLUSÃO

- Através da caracterização morfológica observou-se que, dos 30 isolados fúngicos analisados, 23 pertencem a seção *Nigri* e 7 a seção *Circumdati* do gênero *Aspergillus*.
- Utilizando PCR e oligonucleotídeos específicos, demonstrou-se que 14 isolados são da espécie *A.niger*, 2 *A.ochraceus* e 2 *A. westerdijkiae*. Os outros isolados não foram determinados.
- Os melhores resultados na diferenciação e identificação da espécies *A.niger*, *A.ochraceus* e *A.westerdijkiae* na espectroscopia no infravermelho foram obtidos a partir de amostras sólidas analisadas por reflectância difusa (DR)
- Os resultados analisados por reflectância total atenuada (ATR), com amostras em solução salina, demonstraram que é provável que a forte influência da água diminua a qualidade dos sinais nos espectros no infravermelho, impedindo que diferenças mais sutis, como a separação de duas espécies muito semelhantes, como *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* seja alcançada.
- Através dos espectros gerados neste trabalho foi possível montar um banco de dados e iniciar a livreria de espectros por infravermelho do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro).
- A espectroscopia no infravermelho demonstrou ser uma técnica rápida, de baixo custo e eficiente para a identificação de espécies de fungos intimamente relacionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI, H. Partial Least Squares (PLS) Regression. In LEWIS-BECK M.; BRYMAN, A.; FUTING T. Encyclopedia of Social Sciences Research Methods. **Thousand Oaks**, 2003.

ABRAMS, C.B. IR Tutor. **Columbia University, Perkin Elmer Ltd., Beaconsfield, Bucks**, 1993.

ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.

ACCENSI, F.; CANO, J.; FIGUERA, L.; ABARCA, M.L. ; CABAÑES, F.J. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 191-196, 1999.

ARGYRIA, A.A.; PANAGOUA, E.Z.; TARANTILIS, P.A.; POLYSIOUC, C. M.; NYCHASA, G.J.E. Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. **Sensors and Actuators B: Chemical journal**, v.145, p. 146-154, 2010

BAKEEV, K.A. Process analytical technology: spectroscopic tools and implementation strategies for the chemical and pharmaceutical industries. Wiley-Blackwell, 2005.

BALL, D.W. The basics of spectroscopy. **Spie press**, 2001.

BASTERT, J. KORTING, H. C.; TRAENKLE, P.; SCHMALREACK, A.F. Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Mycoses**, v.42, p. 525-528, 1999.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, p. 293-300, 2003.

BELLI, N.; PARDO, E.; MARIN, S.; FARRE, G.; RAMO, R.J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, p. 541–546, 2004.

BOZZA, A. **Detecção e quantificação de ocratoxina A produzida por espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2010.

BURGULA, Y.; KHALI, D.; KIM, S.; KRISHNAN, S.S.; COUSIN, M.A.; GORE, J.P.; REUHS, B.L; MAUER, L.J. review of mid-infrared fourier transform-infrared spectroscopy applications for bacterial detection. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v.15, p. 146-175, 2007.

CABAÑES, F.J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CASTELLÁ, G.; MINGUEZ, S; PONS, A. What is the source of ochratoxin A in wine?. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 213–215, 2002.

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 11141 -11156, 1988.

CHRISTENSEN, M.; TUTHILL, D.E. *Aspergillus*: An overview. In Advances in Penicillium and *Aspergillus* systematics. (Eds. Samson, R.A. e Pitt, J.I), **Plenum Press**, p. 195-210, 1985.

DELWICHE, S.R.; MASSIE, D.R. Classification of wheat by visible and near-infrared reflectance from single kernels. **Cereal Chemistry**, v. 73, p. 399-405, 1996.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of Soil Fungi. London **Academic Press**, 1980.

DOWELL, F.E.; RAM, M.S.; SEITZ, L.M. Predicting Scab, Vomitoxin, and Ergosterol in Single Wheat Kernels Using Near-Infrared Spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.76, p. 573-576, 1999.

EDWARDS, S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, London, v. 106, p. 1005-1025, 2002.

ERUKHIMOVITCH, V.; PAVLOV, V.; TALYSHINSKY, M.; SOUPRUN, Y.; HULEIHEL, M. FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 1105 -1108, 2005.

ERUKHIMOVITCH, V; TSROR, L.; HAZANOVSKY, M.; TALYSHINSKY, M.; SOUPRUN, Y.; HULEIHEL, M. Early and Rapid Detection of Potato's Fungal Infection by Fourier Transform Infrared Microscopy. **Applied Spectroscopy**, v.61, p.1052-1056, 2007.

ESSENDOUBI, M.; TOUBAS, D. LEPOUSE, C.; LEON, A.; BOURGEADE, M.; PINON, J.M.; MANFAIT, M., SOCKALINGUM, G.D. Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 325–331, 2007.

FISCHER, G.; BRAUN, S.; THISSEN, R.; DOTT, W. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods** , v. 64, p. 63-77, 2006.

FORRESTER, J.B.; VALENTINE, N.B.; JOHNSON, T.J. Chemometric analysis of multiple species of Bacillus bacterial endospores using infrared spectroscopy: Discrimination to the strain level. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, p. 24–30, 2009.

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

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

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

GAMS, W.; CHRISTENSEN, M.; ONIONS, A. H. S.; PITT, J. I.; AND SAMSON, R. A. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. *In Advances in Aspergillus and Penicillium Systematics* (R. A. Samson and J. I. Pitt, Eds.), p. 55–62. **Plenum Press**, 1985.

GARIP, S.; GOZEN, A. C.; SEVERCAN, F. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1301-1307, 2008.

GARON, D.; EL KADDOUMI, A.; CARAYON, A.; AMIEL, C. FT-IR spectroscopy for rapid differentiation of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* and characterization of aflatoxigenic isolates collected from agricultural environments. **Mycopathologia**, v.170, n. 2, p. 131 – 142, 2010.

GEISEN, R. PCR methods for the detection of mycotoxin producing fungi. 1998 *In*: SARTORI, D.; FURLANETO, M. C. ; MARTINS, M. K. ; PAULA, M. R. F.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P . PCR methods for the detection of ochratoxin producing fungal species in coffee beans. **Research in Microbiology**, Paris, v.157, n. 4, p. 350-354, 2006.

GEISER, D.M.; DORNER, J.W.; HORN,B.W.; TAYLOR, J.W. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, p. 169-179, 2000.

GIL-SERNA, J.; GONZÁLEZ-SALGADO, A.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; VÁZQUEZ, C.; PATIÑO, B. ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 162-167, 2009.

GONZÁLEZ-SALGADO, A.; PATIÑO, B.; VÁZQUEZ, C. GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section Nigri by PCR assays. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 353- 361, 2005.

GOODACRE, R.; TIMMINS, K. M.; ROONEY, P.J.; ROWLAND, J.J.; KELL, D.B. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. **FEMS Microbiology Letters**, v. 140, p. 233 – 239, 1996.

HANS, B.P. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.82, p., 107-115, 2003.

HELM,D.; LABISCHINSKI, H.; SCHALLEHN, G.; NAUMANN, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared Spectroscopy. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 69-79, 1991.

HERNÁNDEZ-HIERRO, J.M.; GARCÍA-VILLANOVA, R.J.; GONZÁLEZ-MARTÍNA, I. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p. 189–194, 2008.

HOLLAS, J. M. Modern Spectroscopy. **Wiley**, 2004.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. v. 56, Lyon: IARC, p. 489-452, 1993.

JOOSTEN, H. M. L. J., GOETZ, J., PITTET, A., SCHELLENBERG, M., BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 39- 44, 2001.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas.** 2. ed. São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KUHM, A.E.; SUTER, D.; FELLEISEN, R.; RAU, J. Identification of *Yersinia enterocolitica* at the Species and Subspecies Levels by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5809-5813, 2009.

LANE, D.L.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LEVI, C.P.; TRENK, H.L.; MOHR, H.K.. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal-Association of Official Analytical Chemists** v. 57, p. 866–870, 1974.

LOGOTHETI, M. KOTSOVILI-TSELENI, A.; ARSENIS, G.; LEGAKIS, N.I. Multiplex PCR for the discrimination of *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* and *A. terreus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, p. 209-211, 2009.

MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; PRETE, C. E. ; HOMECHIN, M. ; ONO, E. Y. ; VILASBOAS, L. A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P . Molecular Identification of *Aspergillus* spp. Isolated from Coffee Beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45-49, 2005.

MAQUELIN, K.; KORSCHNER, C.; CHOO-SMITH, L.P.; VAN DEN BRAAK, N.; ENDTZ, H.; NAUMANN, D.; PUPPELS, G.J. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, p. 255- 271, 2002.

MIRALBES, C. 2004. Quality control in the milling industry using near-infrared transmittance spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 88, p. 621-628, 2004.

MISTRY, B.D. A Handbook of Spectroscopic Data. **Oxford Book Company**, 2009.

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

NAUMANN, A. A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. **Analyst**, v.134, p. 1215-1223, 2009.

NAUMANN, D; HELM, D; LABISCHINSKI, H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. **Nature**, v. 351, p. 81-82, 1991

NAUMANN, D. Infrared spectroscopy in Microbiology. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, ed. R. A Meyers, Chichester, p. 102-131, 2000.

NOOMIN, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v, 58, p. 1727-1734, 2008a.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxina A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food microbiology**. v. 128, p. 197-202, 2008b.

NORRIS, K.P. Infrared Spectroscopy and its Application to Microbiology, **J. Hyg.**, v. 57, p. 326–345, 1959. In NAUMANN, D. Infrared spectroscopy in Microbiology. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, ed. R. A Meyers, Chichester, p. 102-131, 2000.

PATIÑO, B.; GONZÁLEZ-SALGADO, A.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; VÁZQUEZ, C. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 207 – 214, 2005.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; STEA, G.; MULÈ, G. PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 641-649, 2004.

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

PETISCO, C.; DOWNEY, G.; MURRAY, I.; ZABALGOGEAZCOA, I.; GARCÍA-CRIADO, B.; GARCÍA-CIUDAD, A. Direct classification of related species of fungal endophytes (*Epichloe* spp.) using visible and near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. **FEMS Microbiol Letters**, v. 284, p. 135-141, 2008.

PIKE, 2009.

Disponível

em:

http://www.piketech.com/technical/applicationpdfs/Diffuse_Theory&Appl.pdf

Acessado em: 04/12/2010

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd ed. **Blackie Academic and Professional**, 1997.

PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. PCR methods for the detection of ochratoxin producing fungal species in coffee beans. **Research in Microbiology**, Paris, v.157, n. 4, p. 350-354, 2006.

RAPER, K. B.; FENNELL, D.I. *The genus Aspergillus*, **Williams and Wilkins**, 1965.

SANDT, C.; SOCKALINGUM, G.D.; AUBERT, D.; LEPAN, H.; LEPOUSE, C.; JAUSSAUD, M.; LEON, A.; PINON, J.M.; MANFAIT, M.; TOUBAS, D. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 954-959, 2003.

SANTOS, C.; FRAGA, M. E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 168-175, 2010.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; KUIJIPERS, F.A.; FRANK, J.M.; FRISVAD, J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 45-61, 2004.

SARTORI, D.; FURLANETO, M. C. ; MARTINS, M. K. ; PAULA, M. R. F.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P . PCR methods for the detection of ochratoxin producing fungal species in coffee beans. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 4, p. 350-354, 2006.

SCHMIDT,H.; EHRMANN, M.; VOGEL, R.F.; TANIWAKI, M.H.; NIESSEN,L. Molecular Typing of *Aspergillus ochraceus* and Construction of Species Specific SCAR-Primers Based on AFLP. **System. Appl. Microbiol**, v. 26, p. 138–146, 2003.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.C.; VAN DIJCK, P.W.M. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.59, p. 426-435, 2002.

SPADARO, D.; LORÈ, A.; GARIBALDI, A.; GULLINO M.L. Occurrence of ochratoxin A before bottling in DOC and DOCG wines produced in Piedmont (Northern Italy). **Food Control**, v. 21, p. 1294-1297, 2010.

SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENÂNCIO, A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 63–68, 2003.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin producing and other fungi isolated from grapes for wine production with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 515–521, 2005.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; ABRUNHOSA, L.; PIETRI, A.; VENÂNCIO, A. Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 513,p. 41–47, 2004.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 42-47, 2006.

SINGH, C. B.; PALIWAL, J.; JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G. Near-infrared spectroscopy: Applications in the grain industry. **The Canadian Society for Bioengineering**, n. 6-189, 2006.

SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 629-634, 2004.

SUCI, P.A.; GEESEY, G.G.; TYLER, B.J. Integration of Raman microscopy, differential interference contrast microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy to investigate chlorhexidine spatial and temporal distribution in *Candida albicans* biofilms. **Journal of Microbiology Methods**, v. 46, p. 193– 208, 2001.

SZEGHALMI, A.; KAMINSKY, S; GOUGH, K. M. A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions. **Anal Bioanal Chemistry**, v. 387, p. 1779-1789, 2007.

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

TINTELNOT, K.; HAASE, G.; MICHAEL SEIBOLD, M.; FRANK BERGMANN, F.; STAEMMLER, M.; FRANZ, T.; NAUMANN, D. Evaluation of Phenotypic Markers for Selection and Identification of *Candida dubliniensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1599-1608, 2000.

TOUBAS, D.; ESSENDOUBI, M.; ADT, I.; PINON, J.M.; MANFAIT, M.; SOCKALINGUM, G.D. FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. **Anal Bioanal Chem**, v. 387, p. 729–1737, 2007.

TSENKOVA, R. AquaPhotomics: water absorbance pattern as a biological marker for disease diagnosis and disease understanding. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**. v. 18, n. 14, 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. **Atheneu**, 5^oed, 2008.

TRALAMAZZA, S. M. **Isolamento e identificação de fungos do café verde de regiões cafeeiras do Estado do Paraná**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2008.

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

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Piracicaba, 200p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2000.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407 – 4414, 1995.

WENNING, M.; SEILER, H.; SCHERER, S. Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4717-4721, 2002.

WINDER, C.; GOODACRE, R. Comparison of diffuse-reflectance absorbance and attenuated total reflectance FT-IR for the discrimination of bacteria **Analyst**, v. 129, p. 1116- 1122, 2004.

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

WILSON, E.B.; DECIUS, J.C.; CROSS, P.C. Molecular vibrations: the theory of infrared and Raman vibrational spectra. **Courier Dover Publications**, 1980.

WHITTAKER, P.; MOSSOBAB, M.M.; AL-KHALDIC, S.; FRYB, F.S.; DUNKELD, V.C.; TALL, B.D.; YURAWECZA, M.P . Identification of foodborne bacteria by infrared spectroscopy using cellular fatty acid methyl esters. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 709 – 716, 2003.

ZHANG X.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; LOU, Y.;; WOLFFFRAN, S.; HUEBBE, P.; RIMBACH, G. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. **Genes and Nutrition**, v. 4, p. 41-48, 2009.