



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

MARIA TAMARA DE CALDAS FELIPE

**EFEITO DA PRESERVAÇÃO PELO MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO SOBRE A
ESTABILIDADE FENOTÍPICA DE *Aspergillus niger* E *Aspergillus oryzae***

Recife

2019

MARIA TAMARA DE CALDAS FELIPE

**EFEITO DA PRESERVAÇÃO PELO MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO SOBRE A
ESTABILIDADE FENOTÍPICA DE *Aspergillus niger* E *Aspergillus oryzae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos a para obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Básica

Orientador: Prof. Dr. Cleidir Rodrigues Santos

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Maria de Souza Motta

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Felipe, Maria Tamara de Caldas
Efeito da preservação pelo método de liofilização sobre a estabilidade fenotípica de
Aspergillus niger e *Aspergillus oryzae* / Maria Tamara de Caldas Felipe. – 2019.

58 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Cledir Rodrigues Santos.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos,
Recife, 2019. Inclui referências.

1. Fungos. I. Santos, Cledir Rodrigues (Orientador). II. Motta, Cristina
Maria de Souza (Coorientadora). III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 387

MARIA TAMARA DE CALDAS FELIPE

**EFEITO DA PRESERVAÇÃO PELO MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO SOBRE A
ESTABILIDADE FENOTÍPICA DE *Aspergillus niger* E *Aspergillus oryzae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 08/03/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Coorientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º Dr. Reginaldo Gonçalves Lima Neto (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Sou primeiramente e imensamente grata a Deus por tudo o que ele proporciona em minha vida, e principalmente por mais esta conquista.

A toda minha família, mas em especial aos meus pais e irmãs (José Josivan, Maria Zeneide, Samara e Tais Felipe) que sempre me apoiam em tudo, que me ajudam a seguir em frente e a nunca abaixar a cabeça diante das dificuldades. Também ao meu namorado (Eviomarcio da Silva), por toda a paciência que teve durante esses anos, por todo o companheirismo e compreensão.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, por toda a vivência e aprendizado com o maravilhoso corpo docente e discente.

Aos meus orientadores professores Cleidir Santos e Cristina Motta. E a todos da grande equipe do Laboratório Micologia Ambiental (Professora Laura Paiva, Jadson Bezerra, Karla Freire, Gianne Rizzuto, Leticia Silva, Ana Patrícia Pádua, Layanne Ferro, Anthony Cavalcanti, Alexandre Machado, Sandy Nascimento) em especial aos que me acompanham desde a graduação.

As pessoas da minha turma de mestrado, foi a melhor turma que eu poderia ter, levarei vocês sempre comigo (Aline Cunha, Thays Oliveira, Amanda Cupertino, Amanda Alves, Juliana Mello, Sarah Signe, Joenny Maria, Ianca Albuquerque, Lidiane Alves, Adryelle Alves, Edna Xavier, Felipe Barbosa e Ewerton Santos).

A todos do laboratório Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (Professor Tercilio Calsa Junior, Fabiana Cavalcante, Geisenilma Rocha, Elton Nunes, Mara Danielle, Lucas Freitas, Sheyla Silva, José Mogahid, Tainara Dantas, Rodrigo Silva e Georon Ferreira) e todos aqueles que mesmo não sendo do laboratório dedicaram parte do seu tempo para me ajudar (Paulo Martins e Barbara Belchior).

Sou muito grata a todos!

RESUMO

Os fungos possuem grande importância tanto para o meio ambiente quanto para a humanidade, necessitando assim de serem preservados, garantindo sua disponibilidade para utilizações futuras e manutenção da biodiversidade. Dentre os fungos, o gênero *Aspergillus* se destaca por possuir grande potencial biotecnológico, e dentre as técnicas de preservação mais utilizadas, se destaca a liofilização por ser um método a longo prazo mais utilizado na preservação de fungos objetivando manter a viabilidade e estabilidade genética das cepas liofilizadas. Contudo, são poucos os estudos que avaliam a capacidade deste método em preservar tais características. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi determinar o efeito da liofilização sobre a estabilidade fenotípica de *Aspergillus niger* (URM 5162) e *Aspergillus oryzae* (URM 5638), em função do tempo e do uso de meios de cultura diferentes, através de análises proteômicas por SDS-PAGE. As cepas, obtidas da Coleção de Culturas Micoteca URM, foram repicadas em placas de Petri contendo meio Ágar Extrato de Malte a 25 °C por 5 dias, liofilizadas e submetidas a dois tratamentos: controle (mantidos a 4 °C) e estresse (submetidos ao armazenamento acelerado a 40 °C por 15 dias), utilizando seis réplicas para cada tratamento. Após este período, as cepas foram reativadas e submetidas às mesmas condições de cultivo anterior. Posteriormente, três fragmentos circulares de 5 mm desse material inoculados em 100 mL dos meios líquidos: extrato de malte e extrato de malte 2% Tween 80. Os inóculos foram mantidos sob agitação a 120 rpm e 25 °C e coletadas nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As culturas foram filtradas para separar o secretoma do proteoma e ambos foram armazenados para posterior análise. A extração das proteínas totais solúveis intra e extracelulares foi realizada utilizando Metanol/TCA/Fenol e quantificada pelo método de Bradford. Foi confirmada a eficiência do processo de extração e identificação preliminar de bandas diferenciais entre os tratamentos. Os resultados da análise SDS-PAGE indicaram a maior eficiência na extração e detecção de proteínas no tratamento realizado com *A. oryzae*, em meio contendo Tween 80 e no tempo de 48 horas. Tais parâmetros foram utilizados para análise 2D seguido de espectrometria de massas MALDI-ToF-ToF. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar diferenças em ambas as análises (1 e 2D), indicando assim que houve alteração fenotípicas resultantes do acúmulo de proteínas diferenciais. Foram identificadas proteínas envolvidas em diversos processos biológicos especialmente regulação biológica, processo celular e processo metabólico. Contudo, apenas estes resultados não são suficientes para se definir se a liofilização é ou não eficiente na manutenção das características fenotípicas, sendo necessário a identificação das proteínas do gel 2D ou análise enzimática.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Envelhecimento acelerado. Método de preservação. SDS-PAGE.

Espectrometria de massas

ABSTRACT

Fungi play an important role in environment as well as in humanity and thus they need to be preserved, ensuring their availability for future use and biodiversity maintenance. Among the fungi, the *Aspergillus* genus stands out for its great biotechnological potential and among the most used preservation techniques, lyophilization is the most used method for the preservation of fungi aiming to maintain the viability and genetic stability of lyophilized strains. However, few studies have evaluated the ability of this method to preserve such characteristics. In this context, the aim of the present study was to determine the effect of lyophilization on the phenotypic stability of *Aspergillus niger* (URM 5162) and *Aspergillus oryzae* (URM 5638), as a function of time and the usage of culture media by SDS-PAGE proteomic analyzes. The strains, obtained from the URM Micoteca Culture Collection, were plated on Petri dishes containing malt extract agar medium at 25 °C for 5 days, lyophilized and subjected to two treatments: control (maintained at 4 °C) and stress (subjected to accelerated storage at 40 °C for 15 days) using six replicates for each treatment. After this period, the strains were reactivated and subjected to the same conditions of previous cultivation. Afterwards, three 5 mm circular fragments of this material were inoculated in 100 mL of the liquid media: malt extract and malt extract with 2% Tween 80. The inoculate were kept under agitation at 120 rpm and 25 °C and collected at 24, 48 and 72 hours. The cultures were filtered to separate the proteome from secretome and both were stored for later analysis. The extraction of total soluble intra and extracellular proteins was performed using Methanol/TCA/Phenol and quantified by the Bradford method. The efficiency of the extraction process and the preliminary identification of differential bands between treatments were confirmed. The results of the SDS-PAGE analysis indicated the highest efficiency in protein extraction and detection in *A. oryzae* treatment in Tween 80 medium in 48 hours. These parameters were used for 2D analysis followed by MALDI-ToF-ToF mass spectrometry. According to the results obtained, it was possible to observe differences in both analyzes (1 and 2D), thus indicating that there were phenotypic alterations resulting from the accumulation of differential proteins. Proteins involved in various biological processes have been identified especially biological regulation, cellular process and metabolic process. Nonetheless, these results are not enough to define whether lyophilization is efficient in maintaining phenotypic characteristics, requiring identification of 2D gel proteins or enzymatic analysis.

Keywords: *Aspergillus*. Accelerated aging. Method of preservation. SDS-PAGE. Mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Gel unidimensional SDS-PAGE das amostras de proteínas intracelulares de <i>Aspergillus niger</i> , controle (sem envelhecimento acelerado de vida útil) e estresse (envelhecidas as 40 °C por 15 dias), crescidas nos meios Extrato de Malte (EM) e Extrato de Malte com 2% de Tween 80 (EM + T80)	36
Figura 2-	Gel unidimensional SDS-PAGE das amostras de proteínas extracelulares de <i>Aspergillus niger</i> , controle (sem envelhecimento acelerado de vida útil) e estresse (envelhecidas as 40 °C por 15 dias), crescidas nos meios Extrato de Malte (EM) e Extrato de Malte com 2% de Tween 80 (EM + T80)	37
Figura 3-	Gel unidimensional SDS-PAGE das amostras das proteínas intracelulares de <i>Aspergillus oryzae</i> , controle (sem envelhecimento acelerado de vida útil) e estresse (envelhecidas as 40 °C por 15 dias), crescidas nos meios Extrato de Malte (EM) e Extrato de Malte com 2% de Tween 80 (EM + T80)	38
Figura 4-	Gel unidimensional SDS-PAGE das amostras de proteínas extracelulares de <i>Aspergillus oryzae</i> , controle (sem envelhecimento acelerado de vida útil) e estresse (envelhecidas as 40 °C por 15 dias), crescidas nos Extrato de Malte (EM) e Extrato de Malte com 2% de Tween 80 (EM + T80)	39
Figura 5-	Imagem do gel 2D com localização de <i>spots</i> utilizando extrato de proteínas totais intracelulares do isolado de <i>A. oryzae</i> , amostra controle. Em vermelho estão evidenciados os <i>spots</i> totais decotados pelo programa e em verde são destacados os <i>spots</i> significativos de acordo com a análise do programa <i>Image Master</i>	42
Figura 6-	Imagem do gel 2D com localização de <i>spots</i> utilizando extrato de proteínas totais intracelulares do isolado de <i>A. oryzae</i> , amostra estresse. Em vermelho estão evidenciados os <i>spots</i> totais decotados pelo programa e em verde são destacados os <i>spots</i> significativos de acordo com a análise do programa <i>Image Master</i>	42
Figura 7-	Cromatograma da análise de micotoxina de <i>Aspergillus niger</i>	45
Figura 8-	Cromatograma da análise de micotoxina de <i>Aspergillus oryzae</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS

MEA	Ágar Extrato de Malte
EM	Extrato de Malte
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
DTT	Ditiotreitol
IAA	Iodoacetamida
mA	Mili ampere
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Gel de eletroforese de poliacrilamida)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
TFA	Ácido tricloroacético
Micoteca URM	Coleção de culturas do Departamento de Micologia da UFPE
2D	Eletroforese Bidimensional
TOF	<i>Time of flight</i>
Mascot	<i>Software</i> que utiliza dados de espectrometria de massa para identificar proteínas a partir de bancos de dados de sequências de peptídeos
Uniprot	Base de dados de informação de sequências de proteínas e as suas funções
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
PTFE	Teflon, polímero fluorado similar ao polietileno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	OS FUNGOS	15
2.1.1	<i>Aspergillus</i>	16
2.1.1.1	<i>Aspergillus niger</i>	17
2.1.1.2	<i>Aspergillus oryzae</i>	18
2.2	COLEÇÕES DE CULTURAS	19
2.2.1	Aspectos Gerais	19
2.2.2	Importância das Coleções de Culturas	20
2.3	MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO	21
2.3.1	Liofilização	22
2.4	PROTEÔMICA	23
2.5	SECRETÔMICA	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	CEPAS FÚNGICA	27
3.2	LIOFILIZAÇÃO	27
3.3	ABERTURA DAS AMPOLAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO FÚNGICO	28
3.4	PROMOÇÃO DO ENVELHECIMENTO ACELERADO DE VIDA ÚTIL DOS FUNGOS	28
3.5	PRODUÇÃO E OBTENÇÃO DO PROTEOMA E DO SECRETOMA	28
3.6	EXTRAÇÃO PROTEICA	29
3.6.1	Extração de proteína totais do secretoma	29
3.6.2	Extração de proteínas totais do proteoma	30
3.7	QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS SOLÚVEIS	30
3.8	ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)	31
3.9	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	31
3.9.1	Focalização Isoelétrica (IEF) - 1ª dimensão	31
3.9.2	2D-PAGE - 2ª dimensão	32
3.10	VISUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS	32
3.11	DIGITALIZAÇÃO E OBTENÇÃO DAS IMAGENS	32
3.12	ANÁLISE DE IMAGENS	32
3.13	DIGESTÃO COM TRIPSINA	33
3.14	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	34
3.15	BIOINFORMÁTICA	34
3.16	TESTE DE MICOTOXINAS	34
4	RESULTADOS	35
4.1	LIOFILIZAÇÃO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	35
4.2	QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA	35
4.3	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA EXTRACELULAR E INTRACELULAR DE PROTEÍNAS TOTAIS	35
4.4	ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)	35
4.5	ANÁLISE DE IMAGENS	39
4.5.1	Análises das imagens dos géis 1-D (SDS)	39

4.5.2	Análises das imagens dos géis 2D	41
4.6	EXCISÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS	43
4.7	TESTE DE MICOTOXINAS	45
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

O Reino Fungi é composto por espécies amplamente distribuídas na natureza, encontradas em quase todos os ecossistemas, podendo ser uni ou multicelulares de vida livre ou simbiótica, apresentando diversas morfologias (STAJICH, 2017). É considerado como um grupo extremamente vasto e diverso (MENOZZI et al., 2017), com uma riqueza estimada em torno de 5,1 milhões de espécies, das quais apenas cerca de 100 mil foram descritas até ao momento (MENOZZI et al., 2017). A diversidade deste Reino torna necessária a preservação de seus integrantes em coleções de culturas, pois tais infraestruturas são de essencial relevância na preservação, identificação, disponibilidade e geração de conhecimento (PALÁCIO-CABRERA et al., 2016).

Dentre os fungos de importância econômica, destacam-se espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* por possuírem ampla distribuição e por serem produtoras de vários compostos, tais como enzimas, antibióticos, antitumorais e micotoxinas (KRIJGSHELD et al., 2013; ARZANLOU et al., 2016; SILVA et al., 2018; COSTA et al., 2019; FRISVAD et al., 2019), como também por algumas de suas espécies serem consideradas como patógenas de humanos e animais (RODRIGUES et al., 2011; SAMSON et al., 2014).

Aspergillus niger e *Aspergillus oryzae* são exemplos de espécies deste gênero que possuem grande importância econômica e industrial na produção de enzimas, ácidos orgânicos e na produção de alimentos asiáticos. Estas espécies são muito utilizadas na indústria alimentar para a manufatura de produtos de consumo humano seguros e, por isso, o seu potencial é reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA). Considerando a grande importância dos organismos pertencentes ao reino dos fungos, estes necessitam de boas técnicas de manutenção, preservação, como também de identificação e caracterização de linhagens que produzam compostos de importância biotecnológica, farmacêutica e industrial (ARZANLOU et al., 2016; BRANDI; ANDERSEN, 2017; DI COLOGNA et al., 2017; SILVA et al., 2018; MACHIDA; YAMADA; GOMI, 2008).

Entre as diversas técnicas de preservação de microrganismos utilizadas para preservar os fungos filamentosos, podemos citar: subcultura, óleo mineral, água (método de Castellani), gel de sílica, congelamento em nitrogênio líquido (criopreservação) e liofilização (SOLA et al., 2012; MICOTECA, 2013; BEZERRA et al., 2017a). Dentre estas técnicas destaca-se a liofilização por ser um método a longo prazo considerado como o um dos mais confiáveis e que pode ser utilizado para uma ampla gama de microrganismos (SOLA et al., 2012). Porém, pouco ainda se sabe sobre os efeitos da preservação a longo prazo, na variabilidade das características genéticas dos organismos preservados. Com isso, é importante a verificação desses fatores antes

e depois dos microrganismos serem submetidos a preservação, armazenamento.

Alguns estudos têm demonstrado o grande potencial das análises proteômicas na identificação de proteínas em misturas complexas, como também em estudos comparativos em que são observadas alterações de proteínas perante a diferentes condições ambientais (HERNÁNDEZ-MACEDO et al., 2002; MEDINA et al., 2003; PUNT et al., 2011). Entretanto, no que se diz respeito a estudos de conhecimento do proteoma e secretoma de fungos filamentosos, podemos perceber que ainda é pouco explorada. Não há relato na literatura de estudos que relacionem os perfis proteicos de fungos com os potenciais efeitos da liofilização.

Desta forma o presente estudo teve por objetivo determinar o efeito da liofilização, em função do tempo e através de ferramentas proteômicas, sobre a estabilidade fenotípica de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 OS FUNGOS

O Reino Fungi encontra-se subdividido em sete filos, são eles: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (HIBBETT et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2017). Os fungos são caracterizados por ter parede celular composta por quitina e glucanas, por serem eucariotos, uni ou multinucleados, homo ou heterocarióticos, haploides, dicarióticos ou diploides. Apresentando um modo de reprodução que pode ser sexual (cariogamia e meiose), parassexual (cariogamia seguida de aneuploidia) e/ou assexual (divisão nuclear mitótica). Além de serem quimio-heterotróficos (obtendo nutrientes por absorção) (MAIA; CARVALHO-JUNIOR, 2010; TAKAHASHI et al., 2017).

Os Chytridiomycota são caracterizados por possuírem centríolos e flagelos e esporos sexuais chamados oósporos (MAIA; CARVALHO-JUNIOR 2010). Juntamente com os Blastocladiomycota e os Neocallimastigomycota fazem, os Chytridiomycota compõe o grupo de fungos aquáticos que produzem zoósporos flagelados. Os Microsporidia são parasitas obrigatórios que crescem e se reproduzem apenas dentro das células hospedeiras e seus esporos contém um aparelho de infecção semelhante a um arpão que penetra no plasma do hospedeiro (MONEY, 2016).

Os Glomeromycota são caracterizados por formar micorriza arbuscular, unicelulares e multinucleados, não se conhece a reprodução ou esporos sexuais, contudo seus esporos assexuais são denominados glomerosporos. Os Basidiomycota apresentam esporos de reprodução sexual denominados basidiosporos, os quais são formados em estruturas especializadas (basídios), localizados em basidiomas, os quais podem se apresentar com tamanho ressaltado.

Os Ascomycota apresentam reprodução sexual formados em estruturas especializadas denominadas ascos, que de maneira geral ficam protegidos dentro de ascomas, este filo se destaca por apresentar espécies importância econômica mundial, como as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (MAIA; CARVALHO-JUNIOR, 2010; (MONEY, 2016).

Os fungos são considerados como decompositores, simbioses, mutualistas e parasitas, desempenhando assim um papel fundamental na natureza (KNIEMEYER, 2011; JONES et al., 2011; ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2018).

Apesar da sua grande importância, estes microrganismos ainda são pouco conhecidos

no que diz respeito a sua diversidade. O número total estimado de espécies de fungos é de 1,5 milhão. Porém, até ao momento apenas cerca de 100.000 espécies foram descritas (KNIEMEYER, 2011; SIMÕES et al., 2013), o que ressalta ainda mais a importância da preservação e manutenção de tais organismos.

Segundo Takahashi et al. (2017), só no Brasil existem cerca de seis mil espécies, as quais estão subdivididas em 1.246 gêneros, 102 ordens e 13 divisões. Dentre as espécies fúngicas com potencial biotecnológico podemos destacar as do gênero *Aspergillus*, por ser amplamente distribuído mundialmente e pela sua grande importância em diversos setores, como por exemplo, pela sua capacidade de produzir enzimas recombinantes (JONES et al., 2011; ABREU; ROVIDA; PAMPFILE, 2018).

2.1.1. *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* está contido na ordem Eurotiales, família Trichocomaceae (BATTAGLIA et al., 2011). Trata-se de um gênero amplamente distribuído e frequentemente encontrado em regiões de clima tropical a subtropical (MAIA; FRAGA, 2017), crescendo em uma ampla faixa de temperatura que varia de 6-55 °C (KRIJGSHELD et al., 2013). Foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli (ARZANLOU et al., 2016). e atualmente, compreende cerca de 260 espécies de fungos filamentosos.

São caracterizados como saprófitos (presentes no solo e matéria orgânica em decomposição), patógenos de humanos (KRIJGSHELD et al., 2013; ARZANLOU et al., 2016; SILVA et al., 2018), animais e plantas (KRIJGSHELD et al., 2013), e também são conhecidos por produzirem metabólitos secundários bioativos e enzimas extracelulares, tais como proteases, lipases, amilases e celulasas (ARZANLOU et al., 2016; SILVA et al., 2018) e ácidos orgânicos, tal como o ácido cítrico, produzido largamente por *Aspergillus niger* (KNIEMEYER, 2011).

Dentre as espécies do gênero *Aspergillus* mais utilizadas em processos biotecnológicos para a produção enzimática, podem-se mencionar *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus*, e *A. versicolor*. Evidenciando as espécies da seção *Nigri*, as quais são mais estudadas devido ao seu potencial na produção de amilase, celulase, pectinase, protease e fitase (MAIA; FRAGA, 2017).

A FDA reconhece a utilização de tais microrganismos na produção de enzimas e considera que os produtos derivados destes podem ser utilizados para o consumo humano de forma segura. Algumas espécies até detêm o estatuto de Geralmente Reconhecido como Seguro

(GRAS), por apresentar baixa toxicidade e por apresentar um histórico de uso no preparo e na produção de alimentos e bebidas (ex. cerveja) (MAIA; FRAGA, 2017).

Os fungos pertencentes a este gênero também desempenham grande importância na saúde, podendo causar doenças em humanos e animais como é o caso da aspergilose, causada especialmente pelas espécies *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. lentulus*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. ustus*, *A. niger* e *A. oryzae* (KNIEMEYER, 2011; VIVEK-ANANTH et al., 2018).

Segundo Vivek-Ananth et al. (2018) os resultados de estudos realizados com análises “ômicas” tem se mostrados promissores para a descoberta de novos biomarcadores, por meio da análise de proteomas e secretomas fúngicos, como os das espécies do gênero *Aspergillus*, levando assim ao melhor entendimento da relação fungo-hospedeiro e patogenicidade.

2.1.1.1 *Aspergillus niger*

O *Aspergillus niger* é uma espécie que se encontra taxonômicamente inserida na seção *Nigri* do gênero *Aspergillus*, a qual inclui os *Aspergillus* negros (MEIJER et al., 2011). *A. niger* é uma espécie de fungo filamentosos encontrada no solo, caracterizada por apresentar colônia negra e por crescer geralmente em matéria orgânica em decomposição (SCHUSTER et al., 2002).

Muito isolados desta espécie têm sido encontrados em diferentes posições geográficas do globo, contudo, com maior frequência em regiões mais quentes (SAMSON et al., 2010). Esta espécie é capaz de se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura que varia entre 6 a 47 °C, apresentando crescimento ótimo em temperaturas entre 35 a 37 °C (SCHUSTER et al., 2002; PALACIOS-CABRERA et al., 2005). Além dessa ampla faixa de temperatura, esta espécie também é capaz de crescer em uma ampla faixa de pH que varia entre 1,4 a 9,8. Desta forma, pode-se dizer que estas características conferem a este microrganismo a capacidade de sobreviver em vários ambientes, principalmente ambientes quentes e úmidos (SCHUSTER et al., 2002).

A espécie *A. niger* possui grande interesse em vários setores econômicos, para indústria química (HOSSAIN et al., 2016) e principalmente para a indústria alimentícia. Consequentemente, *A. niger* tem sido relatada como promissora para a produção de poligalacturonases (PG) a nível industrial (MACIEL et al., 2013) e apresenta um importante potencial na produção industrial de ácidos orgânicos como o ácido cítrico; sendo um dos fungos

filamentosos mais utilizados, por desempenhar uma alta produção do ácido e uma mínima produção de metabólitos secundários.

Esta espécie também apresenta importância na produção de várias outras enzimas de interesse comercial (SCHUSTER et al., 2002; BRAAKSMA et al., 2010; KNIEMEYER, 2011; ODONI et al., 2017). Dentre estas enzimas podemos citar as amilases, proteases, hemicelulases, lipases, tanases, celulases, pecninasas (SHI et al., 2016), asparaginases, beta-galactosidases, glicose oxidase, glicosidases, fosfolipases e fitases (BRAAKSMA et al., 2010).

De acordo com o tipo de utilização desses microrganismos, eles podem receber o título de GRAS pela FDA, que considera seguro para o consumo humano os produtos derivados obtidos de isolados de *A. niger*, mesmo quando são produtores de micotoxinas em baixas concentrações (SCHUSTER et al., 2002; NASSER et al., 2003; BRAAKSMA et al., 2010; PERRONE et al., 2011; SHI et al., 2016).

2.1.1.2 *Aspergillus oryzae*

O *Aspergillus oryzae* é uma espécie que se encontra inserida da secção *Flavi* do gênero *Aspergillus*. Esta espécie é considerada como não patogênica, não apresentando potencial produção de aflatoxinas (FRISVAD et al., 2019). Durante o período de crescimento, apresenta colônias inicialmente brancas e posteriormente amarelo-esverdeadas. A sua temperatura ótima de crescimento é entre 32 a 36 °C. Quanto à sua distribuição geográfica, é encontrado nos cinco continentes. É amplamente utilizado na indústria biotecnológica alimentícia, principalmente na China e no Japão, onde é usado para a produção de alimentos fermentados (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1991; KATAYAMA et al., 2015).

O *Aspergillus oryzae* é considerado como uma variedade domesticada de *A. flavus* (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1991; UDATHA et al., 2015; FRISVAD et al., 2019), gerada através da sua ampla utilização biotecnológica, que fez com que esta espécie fosse domesticada, perdendo algumas de suas características (como caracteres morfológicos e capacidade de produção de aflatoxinas). A origem do seu nome se deu devido ao tipo de aplicação, pois tem sido muito utilizado, em alguns países asiáticos, na fermentação de arroz e soja (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1991).

Há muitos anos, a aplicação deste fungo já havia sido autorizada pelo Ministério de Saúde da Dinamarca (MSD) através de uma permissão para o seu uso na produção de enzimas. O MSD considerou que este organismo cumpre com os requisitos para *Good Industrial Large Scale Practice Organisms* (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1991). Além disso, o longo histórico de uso desse fungo o conduziu o status de GRAS, atribuído pela

FDA (ODA et al., 2006; MACHIDA et al., 2005; KRIJGSHELD et al., 2013; BRANDI; ANDERSEN, 2017). Sua utilização como segura também é apoiada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (MACHIDA; YAMADA; GOMI, 2008).

2.2 COLEÇÕES DE CULTURAS

2.2.1 Aspectos Gerais

Coleções de culturas podem ser definida como, local onde se encontram reunidos organismos vivos (RAMIREZ-GARCIA et al., 2016; SBM, 2018), suas células e partes replicáveis; tais como genoma, plasmídeos, vírus e cDNAs (SBM, 2018). Apresentando os objetivos de preservar, manter e fornece informações associadas a estes organismos. Contribuindo de forma direta para estudos de classificação e biodiversidade (CANHOS, 2006; FIGUEIREDO, 2001; SIMÕES et al., 2013; SBM, 2018).

De acordo aos dados disponíveis no Centro Mundial de Microrganismos da Federação Mundial de Coleções de Culturas (WFCC), atualmente as coleções de culturas estão distribuídas nos 5 continentes: África com um total de 18 coleções e 17.277 culturas, América com 196 coleções e 583.498 culturas, Ásia com 281 coleções e 1.266.274 culturas, Oceânia com 42 coleções e 120.379 culturas e Europa com 250 coleções e 1.126.150 culturas. As três primeiras posições do ranking mundial de países e regiões com maior número de cepas está ocupada atualmente pelos EUA, Bélgica e China, com respectivamente com 32 coleções de cultura e 337.006 cepas, 7 coleções de culturas e 281.040 cepas, e 44 coleções de cultura e 267.982 cepas. O Brasil ocupa a sétima posição com cerca de 84 coleções de culturas registradas e 121.186 cepas (Tabela 1) (WFCC, 2019).

Tabela 1- Distribuição das coleções de culturas e culturas mundialmente

Continentes	Coleções de Cultura	Culturas
África	18	17.277
América	196	583.498
Ásia	281	1.266.274
Europa	250	1.126.150
Oceânia	42	120.379

Fonte: WFCC, 2019.

Mediante um levantamento realizado pelo Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA) e pelo Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICo), foram reconhecidas 26 coleções brasileiras, das quais sete destacam-se por fornecer coleções microbianas e dispor de controle de qualidade, são elas: a Coleção de Culturas do

Instituto Adolfo Lutz - São Paulo/SP; Fiocruz – RJ; EMBRAPA; CBMAI (CPQBA – UNICAMP) Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de Campinas e a Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. A Micoteca URM se destaca por ser um dos mais importantes centros de preservação da biodiversidade fúngica brasileira, contribuindo com a preservação *ex situ* de parte da diversidade de fungos tropicais do Brasil, principalmente das Regiões Norte e Nordeste (BEZERRA et al., 2017).

O aumento de número de coleções de culturas de microrganismos no mundo ocasionou a necessidade de harmonização e acesso a informações disponíveis por estes, surgindo assim em 1972, o primeiro Diretório Mundial de Coleções de Culturas de Microrganismos, o qual estabeleceu o banco de dados CCINFO (*Culture Collections Information Worldwide*) criado a partir da *World Data Center For Microorganisms* (WDCN) (MCCLUSKEY, 2017; WU et al., 2017).

De acordo com CCINF existem 785 coleções de culturas registradas na WFCC, distribuídas em 76 países e regiões, as quais armazenam um total de 3.120.602 cepas de microrganismos, distribuídas entre 1.341.819 bactérias, 824.897 fungos, 38.622 vírus e 32.220 linhagens celulares. Estas coleções de culturas estão inseridas em universidades (323), órgãos governamentais (299), semigovernamentais (61), privados (52) e em indústrias (24). Dentre os serviços prestados podemos citar: depósitos de patente (112), serviços de armazenamento (350), distribuição (355), identificação (388), treinamento (312) e consulta (314) (Tabela 2) (WFCC, 2019).

Tabela 2- Distribuição das coleções de cultura nos diversos seguimentos

Apoiado por	Nº de coleções
Universidade	323
Governamental	299
Semi-governamental	61
Privado	52
Indústria	24

Fonte: WFCC, 2019.

2.2.2 Importância das Coleções de Culturas

As coleções desempenham um papel muito importante na preservação de materiais biológicos (SIMÕES et al., 2013; LIMA-NETO et al., 2014; RAMIREZ-GARCIA et al., 2016; SANTOS et al., 2016) – como os fungos – principalmente no que se refere a conservação da biodiversidade *ex situ* e a informações relacionadas a estes (LIMA-NETO et al., 2014; RAMIREZ-GARCIA et al., 2016). Desta forma, a manutenção desses organismos pode garantir

estudos que buscam compreender seu papel no meio ambiente (MONTE et al., 2016; SOLA et al., 2012), gerando conhecimento, desenvolvimento científico e tecnológico (ABREU; TUTUJIN, 2008; PRAKASH; NIMONKAR; SHOUCHE, 2013; SBM, 2018). Tal compreensão tem grande importância, pois contribui com a biotecnologia através do desenvolvimento de novas aplicações, como também com a biossegurança, fornecendo informações essenciais sobre a patogenicidade de muitos agentes (FORTI et al., 2016; SIMÕES et al., 2013; SMITH, 2012; SMITH; MARTIN; NOVOSSIOLOVA, 2016).

Alguns estudos evidenciam a importância das coleções de culturas para a preservação da biodiversidade relatando principalmente a relevância na manutenção de culturas, suas aplicações e o fornecimento seguro (SIMÕES et al., 2013; SMITH, 2012; SMITH; MARTIN; NOVOSSIOLOVA, 2016) de culturas de interesse biológico e histórico, como por exemplo a preservação das linhagens de *Penicillium* de Fleming (SMITH, 2012).

2.3 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

Inicialmente os fungos eram preservados e mantido pelo método de repicagem contínua. Este método é de curta duração e as cepas ficam sujeitas a mudanças, tanto fisiológicas quanto morfológicas, devido à necessidade de adaptação destas aos meios quimicamente definidos utilizados em sua manutenção. Esta desvantagem fez com que houvesse a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de preservação, que foram sendo desenvolvidos com o objetivo de manter a viabilidade, pureza, evitando mudanças genéticas nos indivíduos, como também levando em consideração o custo, o transporte, a frequência de uso e importância do microrganismo (BLATNIK; GUNDE-CIMERMAN; CIMERMAN, 1994; HOMOLKA, 2013).

Dentre os métodos de preservação empregados para os fungos filamentosos estão: subcultura, óleo mineral, Castellani, gel de sílica, criopreservação e liofilização (SOLA et al., 2012; PRAKASH; NIMONKAR; SHOUCHE, 2013; BEZERRA et al., 2017). Porém, cada técnica possui suas vantagens e desvantagens, e a escolha do método ideal depende das características de cada microrganismo (BLATNIK; GUNDE-CIMERMAN; CIMERMAN, 1994; SIMÕES et al., 2013). Estas técnicas são utilizadas principalmente em coleções de culturas as quais necessitam de um armazenamento de qualidade dos microrganismos, dependendo assim de bons métodos de preservação, que possam garantir as características originais destes (viabilidade, morfologia, fisiologia e genética), por longos períodos (retardando ou paralisando o desenvolvimento) e que estejam livres de contaminação (BASTOS, 2008; PRAKASH et al., 2013; SOLA et al., 2012). Entretanto, apesar do desenvolvimento de técnicas de manutenção e preservação de microrganismos, pouco ainda se sabe sobre se estes protocolos

utilizados realmente garantem, a longo prazo, a estabilidade genética do material biológico. Porém, nenhum método de preservação assume garantir a estabilidade fisiológica e genética total de um indivíduo. Garantir tais aspectos é necessário para que essas culturas possam ser usadas por muitos anos com propósitos didáticos, em estudos comparativos, industriais e experimentais (SOLA et al., 2012; SIMÕES et al., 2013).

Dentre as técnicas mais utilizadas destaca-se a liofilização, por ser um método de longo prazo e por poder ser utilizada para a maioria dos microrganismos. Apesar do principal receio quando se trata de métodos de preservação está relacionado aos efeitos sobre a estabilidade das linhagens, pouco ainda se sabe a respeito das reações e transformações morfofisiológicas decorrentes das circunstâncias de armazenamento (SOLA et al., 2012; PRAKASH; NIMONKAR; SHOUCHE, 2013). Necessitando de estudos mais detalhados para uma melhor compreensão sobre os efeitos dos métodos de preservação na estabilidade e viabilidade dos microrganismos.

2.3.1 Liofilização

A liofilização é uma das técnicas de preservação de microrganismos, a longo prazo, mais utilizadas e considerada até o momento, como uma das mais eficientes, devido a capacidade de ser utilizada para a maioria dos organismos garantindo a viabilidade destes por um longo período. Assim como os outros métodos de preservação, a liofilização tem por finalidade manter as características dos microrganismos (viabilidade e estabilidade genética) com o intuito de evitar alterações que possam a vir modificar as suas características (SOLA et al., 2011; ROJAS-TAPIAS et al., 2013; SIMÕES et al., 2013).

Segundo Sola et al. (2011) esta técnica pode garantir a viabilidade dos organismos por 17 a 20 anos, podendo ser usada para a maioria deles, exceto para algas e protozoários. Por estes motivos a técnica é utilizada por diversas coleções de culturas no mundo todo, e considerada como método de referência, quando se trata de conservação a longo prazo.

O processo consiste no congelamento das amostras, seguido de desidratação a vácuo (remoção da água por sublimação), até a formação do material liofilizado estável. Apesar de ser um método bastante utilizado as etapas da técnica podem causar injúrias ou danos celulares, degradação de enzimas e até mesmo morte dos agentes (SOLA et al., 2011). Contudo, o uso desta técnica tem como vantagem garantir o máximo de estabilidade possível para as culturas preservadas, permitir que estas sejam estocadas (ocupando pouco espaço) e transportadas com facilidade em temperatura ambiente, não necessitando inspeção e manutenção frequentes (HOMOLKA, 2013; SOLA et al., 2011).

Por outro lado, a liofilização como método de preservação, tem como desvantagem a necessidade de equipamento para a desidratação do material, o tempo gasto pelo método, o seu custo e a carência com relação a protocolos específicos para cada grupo taxonômico de microrganismo (SOLA et al., 2011; ROJAS-TOBIAS et al., 2013; SIMÕES et al., 2013).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos avaliando a capacidade deste método em preservar as características fenotípicas dos fungos, utilizando para este fim o método de caracterização morfológica e/ou fisiológica de alguns fungos antes e após serem liofilizados, obtendo resultados positivos quanto a manutenção de tais características. Alguns dos trabalhos realizados avaliando este método foram realizados por: Ashcar (1973); Berny; Hennerbert (1991); Garcia (2007); Simões et al. (2013); Smith (2012) e Soto et al. (2017).

2.4 PROTEÔMICA

O termo proteômica se refere a um conjunto de proteínas expressas por um determinado genoma em um dado momento (GALDO-REVERSOS et al., 2010) ou a todas as proteínas presentes em uma célula, tecido ou organismo em uma determinada condição (DI COLOGNA et al., 2017). O surgimento deste termo no final da década de 70, na qual pesquisadores começaram a criar um banco de dados de proteínas, utilizando a técnica de eletroforese em gel bidimensional (2-DE), que havia sido recém desenvolvida. Contudo, o termo proteômica só veio ser utilizado nos anos 90, quando foi apresentado por Wilkins e Willians (GALDO-REVERSOS et al., 2010).

O desenvolvimento da proteômica teve por objetivo auxiliar um melhor entendimento sobre a expressão, função e regulação de proteínas codificadas por um organismo (o conjunto destas proteínas recebe o nome de proteoma). Diferentemente do genoma o proteoma encontra-se em constante movimento, podendo ser alterado através do estado fisiológico e das fases de diferenciação celular, não sendo então considerado como uma característica fixa de um organismo (desta forma o proteoma é considerado como dinâmico e variável) (BARBOSA et al., 2012; EMÍDIO et al., 2015). Pensando nisso o estudo da proteômica pode nos proporcionar uma maior compreensão dos genes através do perfil de proteínas associadas a patogenicidade de um organismo, auxiliando em novos diagnósticos, tratamentos e métodos de prevenção (tal como vacinas) (TAN et al., 2009; GALDOS-RIVEROS et al., 2010).

Pode-se dizer com isso que, a proteômica fundamenta-se a partir da análise de um conjunto de proteínas expressas pelo genoma (através de uma célula, tecido ou organismo) (DI COLOGNA et al., 2017) e que necessita assim de técnicas de separação e identificação bastante eficientes, tais como: a eletroforese em gel bidimensional (2-DE), a espectrometria de massa,

a cromatografia e as ferramentas de bioinformática (BARBOSA et al., 2012; EMÍDIO et al., 2015). Contudo, a espectrometria de massa destaca-se, para este tipo de análise, por ser altamente sensível, por requerer uma quantidade pequena de material e por ter uma eficiência mais elevada se comparada aos métodos de sequenciamento convencionais (GALDO-REVERSO et al., 2010).

De modo geral, as metodologias empregadas em proteômica podem ser classificadas em dois tipos, são elas: *bottom-up* e *top-down*. A primeira, também conhecida como *shotgun*, a qual engloba a separação de peptídeos em misturas complexas, através da cromatografia líquida seguida análise de espectrometria de massas (MS), com sem prévia digestão trípica. Já o segundo, *top-down*, envolve não mais peptídeos, mas proteínas intactas as quais são analisadas por MS. Cada uma dessas metodologias têm suas vantagens e desvantagem, no caso da *bottom-up* apresenta vantagem com relação a sensibilidade e reprodutibilidade, e desvantagem no que diz respeito a perda de peptídeos durante o processo de cromatografia, e por isso muitas vezes acaba não gerando bons espectros de massas (BARBOSA et al., 2012).

Dentre estas técnicas, a análise 2-DE em conjunto com a espectrometria de massas ainda tem sido bastante utilizada para análises tanto de proteoma quando de secretoma, especialmente no que diz respeito a análises utilizando fungos, quando se fala de proteômica de microrganismos as espécies mais utilizadas para esta análise pertencem ao gênero *Aspergillus*, devido a suas características e grande importância para a humanidade (BRAAKSMA et al., 2010). Estudos com análise proteômica tem se tornado cada dia mais frequentes, pois a mesma apresenta alta sensibilidade na identificação de proteínas em misturas complexas, sendo possível, assim, a realização de estudos comparativos em que podem ser observadas alterações no acúmulo de proteínas diante de diferentes condições ambientais. Consequentemente, a análise proteômica pode auxiliar na observação e identificação de alterações de proteínas presentes em um determinado microrganismo em uma dada condição, indicando assim, se houve ou não alteração na estabilidade fenotípica e/ou genética dos fungos, como o objetivo do presente estudo, preservados por liofilização e armazenados por um longo período.

2.5 SECRETÔMICA

O termo secretoma foi usado pela primeira vez por Tjalsma et al. (2000) quando estavam trabalhando com uma cepa de *Bacillus subtilis*. De modo geral, o secretoma pode ser considerado como um sub-proteoma e engloba proteínas solúveis secretadas extracelularmente (chamadas de secretoma), as quais são de grande importância para que os microrganismos consigam colonizar um determinado substrato. Porém, o secretoma fúngico não se restringe

apenas a isto, ele também está relacionado às interações entre o fungo e seu hospedeiro e como já mencionado anteriormente também à patogenicidade fúngica (como as espécies do gênero *Aspergillus*) (BRAAKSMA et al., 2010; GANESAN, 2016; RAMIREZ-GARCIA et al., 2017). O secretoma pode representar até 30% do proteoma de um organismo (GANESAN, 2016).

Desta forma, pode-se dizer que o secretoma fúngico determina em grande proporção o nicho ecológico desses organismos, tendo papel significativo na nutrição destes (Medina et al., 2003), sua importância na saúde, agricultura e utilidade em diversos setores de produção industriais, pois grande parte das proteínas secretadas por esses microrganismos estão relacionadas a sua capacidade de adquirir nutrientes, colonizar diversos substratos, como também podem estar envolvidas na relação com outros indivíduos (BRAAKSMA et al., 2010; RAMIREZ-GARCIA et al., 2017).

Durante o processo de colonização do substrato pelo fungo é necessária a produção de enzimas que vão ser secretadas para fazer a digestão deste, permitindo assim, que o fungo possa adquirir sua fonte de nutrientes. Tais enzimas possuem importância não só para a sobrevivência dos fungos, mas também para a indústrias (produção e venda), principalmente as de bioprocessos. Portanto, a produção de enzimas por estes microrganismos tem se tornado cada vez mais o foco de muitos estudos (KIM et al., 2008).

Estes estudos têm evidenciados alguns fatores interessantes como é o caso do gênero *Aspergillus*, em que se pode observar que o secretoma produzido por estes fungos estão relacionados às condições de cultura e fonte de nutrientes (KIM et al., 2008). Porém, apesar dessas análises serem tão importantes para o entendimento destes microrganismos, eles necessitam de técnicas que tenham alta resolução, sensibilidade, rendimento e confiabilidade, já que o secretoma é composto por uma mistura complexa de proteínas (MENDOZA, 2013).

O secretoma dos fungos é composto por diversas proteínas/enzimas que possuem grande interesse mercadológico. Dentre estas enzimas, podemos citar: amilases, proteases, hemicelulases, lipases, tanases, celulasas, pecninasas, beta-galactosidases, glicose oxidase, glicosidases, fosfolipases, xilanases, entre outras (BRAAKSMA et al., 2010; SHI et al., 2016; RAMIREZ-GARCIA et al., 2017; VIVEK-ANANTH et al., 2017). Muitos estudos relatam a importância destas enzimas em diversos setores industriais, as amilases, por exemplo, são muito utilizadas em processos fermentativos na indústria de cerveja e na produção de pães; as proteases e lipases são bastante utilizadas na indústria de produtos lácteos para a hidrólise de lactose acelerando a maturação de queijos e para realçar o sabor dos alimentos; as xilanases por sua vez, são utilizadas na indústria alimentícia, na clarificação de sucos, em processos

fermentativos e na melhoria da consistência de cervejas (ZHANG et al., 2010; CUZZI et al., 2011; GHAZALA et al., 2016; PARVEEN et al., 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CEPAS FÚNGICA

Os fungos utilizados neste estudo foram as cepas *Aspergillus niger* URM 5162, isolada de argamassa em 2005 e *Aspergillus oryzae* URM 5638, isolada de água de viveiro de camarão em 2007. Ambas as culturas se encontram preservadas em óleo mineral e liofilizadas na Coleção de Culturas – Micoteca URM da UFPE (ISO 9001:2008) que disponibilizou tais culturas em tubos de ensaio contendo meio Ágar Extrato de Malte para a realização do presente estudo. Após obtidas, as cepas foram repicadas em placas de Petri contendo o mesmo meio. As placas foram mantidas por 7 dias a 25 °C em incubadora BOD e logo após o crescimento os fungos foram submetidos à liofilização.

3.2 LIOFILIZAÇÃO

O processo de liofilização foi realizado no Liofilizador L108 da Liobras, presente na Micoteca URM, seguindo as recomendações do fabricante. Para a liofilização foram pesados 5 g de leite desnatado, diluído em 25 mL de água destilada e 2,5 g glutamato de sódio (substância criopreservante) que também foi diluído em 25 mL de água destilada, e autoclavado por duas vezes, para a perfeita esterilização. Após este processo o glutamato de sódio foi misturado ao leite desnatado e foram distribuídos 1 ml da mistura em tubos de penicilina esterilizados, e posteriormente adicionado os esporos das culturas crescidas, com o auxílio de uma alça. Ampolas foram levadas a geladeira por 3 horas e posteriormente ao congelador onde ficaram armazenadas por 10-11 horas (KAWAMURA; MURAKAMI; MIYAMOTO; KIMURA, 1995).

Após esse período o liofilizador foi ligado e preparado para receber as ampolas, seguindo-se as recomendações do fabricante. As ampolas foram colocadas no liofilizador, foi esperado o equipamento alcançar o vácuo adequado, após isto o liofilizador foi observado a cada hora e neste mesmo período foram anotados alguns parâmetros para o controle do equipamento. Logo após ao ciclo de 24 horas de liofilização o aparelho foi desligado e as ampolas foram tampadas ainda dentro do equipamento, de acordo com o possível, e posteriormente lacradas com lacre de alumínio com auxílio de um alicate recrave e mantidas em geladeira até seguir os demais passos do experimento (KAWAMURA; MURAKAMI; MIYAMOTO; KIMURA, 1995). Das 12 ampolas liofilizadas metade foram destinadas para o processo de envelhecimento acelerado de vida útil e a outra metade seguiu para a reativação e posterior crescimento em meio líquido.

3.3 ABERTURA DAS AMPOLAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO FÚNGICO

As ampolas tanto do controle, quanto do estresse (com envelhecimento acelerado) foram abertas, em capela de fluxo laminar, com o auxílio de uma pinça e hidratadas com 1 ml de água destilada e esterilizada. A agitação foi evitada e as amostras ficaram em repouso por 30 min, em seguida, o conteúdo das ampolas foi sub cultivado em placas Petri contendo 21 mL do meio Ágar Extrato de Malte (MEA) e incubadas por 5 dias a 25 °C.

Para a análise de extração de proteínas intra- e extracelulares das amostras iniciais, três fragmentos de 5 mm de diâmetro da colônia com 5 dias de crescimento, foram inoculados em diferentes frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL dos meios: 1) Extrato de Malte e Extrato de Malte com 2% de Tween 80. Após a inoculação, os fungos foram mantidos sob agitador orbital a 120 rpm a 25 °C por 24h, 48h e 72h. Na etapa final foi realizada uma nova inoculação com 4 fragmentos de 5 mm de diâmetro da cultura de *A. oryzae* crescida com 5 dias, incubadas em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL do meio Extrato de Malte com 2% de Tween 80 e mantidas sob agitador orbital nas mesmas condições descritas acima.

3.4 PROMOÇÃO DO ENVELHECIMENTO ACELERADO DE VIDA ÚTIL DOS FUNGOS

Seis ampolas com os liofilizados foram separadas – três de cada fungo – para a etapa de envelhecimento acelerado de vida útil, em que foram submetidas a um período de conservação prolongado, mantidas incubadora BOD a uma temperatura de 40 °C durante 15 dias, de acordo com Yordanova; Stoimenova; Donev (1996) e Sakane; Koroshima (1997) modificados.

3.5 PRODUÇÃO E OBTENÇÃO DO PROTEOMA E DO SECRETOMA

Para caracterização enzimática foi utilizado inicialmente 45 mL dos meios (Tabela 3), de cada tratamento e fungo. Obtidos pela filtração do conteúdo dos frascos de Erlenmeyer, nos períodos 24, 48 e 72 horas, para observação da curva de crescimento. O conteúdo foi filtrado para separação do extrato e da biomassa. A filtração foi realizada com auxílio de uma bomba a vácuo e papel de filtro *Whatman* nº 1. A biomassa foi colocada em placas de Petri esterilizadas para posteriormente serem pesadas pelo menos 500 mg, colocadas em tubos de criopreservação. Quanto ao extrato, foi armazenado 45 mL dos meios (de cada amostra) em tubos Falcon de 50 mL. Todas amostras do secretoma e do proteoma foram mantidas em freezer a -20° C até a realização dos demais até a extração das proteínas.

Após o processo de extração das proteínas totais de todas as amostras e realização dos

géis 1-D, foi escolhido apenas um fungo *Aspergillus oryzae*, um meio (Extrato de Malte com 2% de Tween 80) e um tempo para ser analisados por gel 2-DE. As ampolas do controle e do estresse foram reativadas, seguindo o que foi descrito anteriormente, cultivadas em Placas de Petri descartáveis contendo 21 mL do meio Ágar Extrato de Malte e incubadas a 25 °C por 5 dias. Após este período foram cortados 4 discos de 5mm e inoculados em meio Extrato de Malte com 2% de Tween 80, e deixadas a 120 rpm, a 25° C por 48 horas. Posteriormente o material foi filtrado como descrito acima. A biomassa foi colocada em microtubos de 2 mL esterilizados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a -20°C até a realização da etapa de extração.

3.6 EXTRAÇÃO PROTEICA

3.6.1 Extração de proteínas totais do secretoma

Para extração de proteínas extracelulares das amostras iniciais, foi utilizado 45 mL dos meios, utilizando uma amostra de cada tratamento (meio, tempo e fungo). Os quais foram descongeladas e precipitadas com 2x o volume de metanol com acetato de amônio e deixadas precipitando overnight a -20 °C, para um melhor rendimento. Após este período as amostras foram centrifugadas a 7.000 rpm por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, permanecendo apenas o *pellet* e adicionado no mesmo Falcon a amostra do outro tubo e centrifugados novamente. Restando no final do processo apenas o *pellet*.

A extração das proteínas totais solúveis foi feita com o método de Hurkman e Tanaka (1986), modificado. Foi adicionado 1ml de tampão de extração fenol (contendo 2-β-Mercaptoetanol) em cada tubo contendo o *pellet*, foram agitados em vórtex até a diluição do *pellet*, posteriormente adicionado 1 mL de fenol e agitados em vórtex. Em seguida, os tubos foram colocados em um isopor com gelo, em mesa orbital por 30 min, para a extração das proteínas. Logo após o conteúdo dos tubos Falcon foi transferido para microtubos (2 mL), centrifugados a 12.000 rpm, por 10 min a 4 °C, recuperado o sobrenadante para um tubo Falcon de 15 mL, mantidos refrigerados e realizada a re-extração. Para a re-extração foi adicionado, nos mesmos microtubos contendo as amostras, 600 µL do tampão de extração e 500 µL, seguindo os mesmos passos descritos acima no processo de extração. O material recuperado foi unido ao da extração e verificada a quantidade total de sobrenadante recuperado e adicionado 5x o volume de Metanol com Acetato de amônio (gelado), e deixados a -20 °C overnight.

No dia seguinte o conteúdo dos tubos Falcon foi transferido para microtubos (de 2 em 2 mL) e centrifugados a 12.000 rpm, a 4 °C por 10 min. Descartado o sobrenadante ficando

apenas com o *pellet*. Após todas as centrifugações foram realizadas lavagens nos *pellets*, a primeira lavagem foi feita em metanol com acetato de amônio, a segunda apenas em metanol, terceira com etanol 70%, a terceira e a quarta em acetona. As lavagens foram feitas da seguinte forma, foi adicionado 1 mL da solução, os tubos foram passados no vórtex até diluir o *pellet*, centrifugados a 12.000 rpm, a 4 °C por 10 min e descartado o sobrenadante. Ficando no final apenas o *pellet*, os *pellets* foram secos em superfície gelada e após totalmente secos foram ressuspensos em 50 µL de solução de ressolubilização (7M Uréia – 2M Tiouréia).

Para as amostras finais diferiu apenas na quantidade de extrato, em que foi utilizado 100 mL e no processo de extração, pois este teve andamento no mesmo dia da filtração. As amostras filtradas foram imediatamente precipitadas em Metanol com Acetato de Amônio e deixadas overnight para um melhor rendimento.

3.6.2 Extração de proteínas totais do proteoma

Foi utilizado para as amostras iniciais 500 mg de biomassa e para as amostras finais foi utilizado ± 1 mg (em triplicada). A biomassa colocada em um cadinho, macerada até pó fino e precipitados em ácido tricloroacético (TCA) diluído em acetona a 10%, e deixados precipitando por pelo menos 3 horas (ou overnight), após este tempo colocar na centrífuga por 10 min, a 4 °C e 12.000 rpm (MÉCHIN et al., 2007), descartar o sobrenadante e lavar as amostras com 1 mL de acetona com β -mercaptoetanol, as amostra foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e seguiu-se com o método de extração fenol modificado (HURKMAN; TANAKA, 1986). Como realizado para amostras das proteínas extracelulares, diferindo apenas na quantidade de lavagens finais, pois não foi realizada a lavagem com etanol 70%.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS SOLÚVEIS

Após a extração foi realizada a quantificação das proteínas solúveis totais pelo método de Bradford (1976), utilizando o *Coomassie Brilliant Blue G-250* como reagente de coloração e albumina de soro bovino (BSA) como solução padronizada, na concentração de 1,0 mg/mL-1, para a produção da curva padrão. Para o branco foi utilizado 5µL do tampão de solubilização (uréia 7M, tiouréia 2M) e 2 mL do reagente de coloração. E para a quantificação das amostras, foram utilizados 5 µL dos extratos proteicos e adicionado 2 mL do reagente de coloração. Os padrões e as amostras foram analisados em espectrofotômetro de luz visível (*Biowave DNA – Biochrom, Cambridge*) a 595 nm. Aceitando como procedimento adequado, dados que geram função com correlação maior ou igual a 0,90 ($y = a.x \pm b$, $R^2 \geq 0,95$).

3.8 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)

A eletroforese unidimensional foi realizada no Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), na Universidade Federal de Pernambuco. Após a quantificação foi feito um gel SDS-PAGE, para verificação da eficiência do método de extração e integridade das amostras. Foi realizado com cuba de eletroforese vertical e suporte do gel de poliacrilamida a 12 % com 1,0 mm de espessura e dimensões 20x20. Foi realizada o cálculo concentração das amostras com base na leitura pelo método de Bradford, para garantir que a corrida fosse igual para todas as amostras, foi verificada a quantidade de amostra necessária para 50 µg (equivalente a capacidade do poço do gel). Às amostras foram adicionados iguais volumes de tampão de amostra-SDS e posteriormente, carregadas no gel. As condições de corrida foram de amperagem variada de 17 mA a 300 V por 15 minutos e mudando para 34 mA por 2 h e 30 min e após esse tempo a corrida foi sendo observada até o final. Utilizou-se marcador de baixo peso molecular (*LMW Calibration, GE Life Sciences*).

3.9 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

3.9.1 Focalização Isoelétrica (IEF) - 1ª dimensão

A eletroforese bidimensional foi realizada no Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), na Universidade Federal de Pernambuco. A IEF foi realizada em fitas *DryStrip (GE Life Sciences)* de 13 cm e pH imobilizado de 4-7 não linear, para cada uma das três réplicas biológicas, as quais foram hidratadas com volume correspondente a 400 µg de proteínas dissolvidas em solução de ureia 7 M e tiouréia 2 M, CHAPS 2% (m/v), 19,4mM de DTT, IPG buffer – pH 4-7 não linear 0,5 % (v/v) (*GE Life Sciences*) e azul de bromofenol 0,002% (m/v). Para hidratação completa as fitas foram incubas em *IPG-Box (GE Life Sciences)* por cerca de 16h a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). A focalização foi realizada no aparelho *EttanTM IPGphor 3 (GE Life Sciences)* e conduzida a em quatro etapas nas seguintes condições: i) 500 V, 1 h; ii) 800 V, 1 h; iii) 7.000 V; 1 h (gradiente); e iv) 2.200 V (constante).

Após a focalização as fitas passaram por um processo de redução e alquilação, patra isto as fitas foram imersas em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 75 mM (pH 8,8), solução de uréia – 6 M, glicerol 29,3 % (v/v), SDS 2 % (m/v) e azul de bromofenol 1%), em duas etapas. Na primeira etapa, adicionou-se 0,1g de ditioneitol (DTT) em 5,0 mL da solução, sendo submetido à leve agitação por 30 minutos. Na segunda etapa, foi removida a solução de DTT e adicionada uma nova solução contendo 0,25g de iodoacetamida (IAA), adicionado em 5,0 mL de nova

Solução de Equilíbrio. E armazenadas em freezer -20 °C até a corrida do gel 2-DE.

3.9.2 2D-PAGE - 2ª dimensão

Foram feitos géis 2D em cuba de eletroforese vertical e suporte do gel de poliacrilamida 12,5 %, com dimensões 20x20. A Strip foi hidratada, equilibrada e colocada na parte superior do gel de poliacrilamida e selada com uma camada de gel de agarose. A primeira etapa da foi realizada com uma corrente constante de 300 V, 10 mA por 15 minutos, seguido de uma segunda fase de 40 mA por 30 minutos e a terceira e última fase de 50 mA até o final da corrida.

3.10 VISUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Após a eletroforese 1D e 2D e coloração, as proteínas foram visualizadas através do método de Candiano et al. (2004) modificado. Os géis foram mergulhados em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%) por 1 hora sob agitação constante. Após o descarte da solução fixadora, adicionou-se a solução corante azul de *Coomassie blue* (G-250), os géis foram deixados overnight na solução corante e descorado com 3 lavagens sucessivas em água destilada para retirada do excesso de corante e posteriormente mergulhado em solução aquosa de ácido acético a 5% (solução descorante) até ser alcançado um gel translúcido e com visualização das bandas proteicas. Posteriormente foi digitalizado em scanner de transparência *ImageScanner III* (GE Life Sciences).

3.11 DIGITALIZAÇÃO E OBTENÇÃO DAS IMAGENS

Após descoloração, os géis foram digitalizados no *ImageScanner III* (GE Life Sciences) com uso do programa *LabScan 6.0* (GE Life Sciences). Para a digitalização foram utilizados os seguintes parâmetros: modo de transparência, resolução de 300 dpi e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com *Coomassie blue*. Precedente a captura da imagem, foi realizada a calibração do scanner, para qual foi utilizada fita de calibração Kodak 3, que apresenta valores de densidade ótica ou difusa definidos, seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante.

3.12 ANÁLISE DE IMAGENS

As imagens dos géis 1 D foram analisadas como auxílio do *software Gel analyzer*, foram abertas, selecionadas as colunas do marcador e das amostras, e detectadas as bandas. As bandas do marcador receberam seus valores de peso molecular para calibração das amostras. As tabelas geradas pelo software foram editadas no *Excel*, para a realização da etapa de comparação das

amostras, entre controle e estresse, levando em consideração os valores de peso molecular e o *Raw*, para obtenção do *Ratio* e visualização das bandas comuns significativas.

As imagens obtidas dos géis 2 D foram analisadas com o auxílio do software *Image Master 2D Platinum v7.0 (GE Life Sciences)* e processadas no próprio programa, após realização de ajustes quanto ao tamanho e redução de interferências de contrastes. As bandas foram selecionadas ao de acordo com a escaneamento dos géis e análise pelo *software Gel analyser*, de acordo com a visualização e levando em conta a comparação entre os tratamentos e a intensidade das bandas no gel.

3.13 DIGESTÃO COM TRIPSINA

As bandas 36 bandas, diferenciais ou exclusivas entre tratamentos, foram escolhidas para serem cortadas do gel, digeridas e identificadas. A digestão foi realizada segundo Shevchenko et al. (2007).

As bandas foram lavadas por 3x com com solução de descoloração (25 mM bicarbonato de amônio em 50% de acetonitrila, pH 8) e lavadas com água *Milli-Q*. Logo após as bandas sofreram redução e alquilação. Inicialmente, os fragmentos foram reduzidos com 10 mM DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio, agitados em vórtex e incubados por 1 hora a 56°C. O excesso do líquido foi removido e substituído por solução 10 mM IAA em 55 mM de bicarbonato de amônio e agitados em vórtex. Em seguida, os fragmentos foram mantidos no escuro por 45 min, à temperatura ambiente. O líquido excedente foi então removido, os fragmentos lavados por 3 vezes com 25 mM bicarbonato de amônio em 50% de acetonitrila, pH 8) e por último com água *Milli-Q*. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados com acetonitrila 100% e deixada por pelo menos 5 min, o excesso foi removido e as amostras foram secas à vácuo (*Speed-vac, Eppendorf*), por 20 min.

Logo após a essas etapas foram adicionados 10 µL de solução de tripsina (com 10-15 µg/mL bicarbonato de amônio) para digestão das proteínas e incubadas a 4 °C por 10 min. Depois da reidratação, foi adicionada solução de bicarbonato de amônio 25 mM cobrindo todo os fragmentos de gel, e a digestão mantida a 37 °C por 16 h. Após este período, foram acrescentados à solução anterior 30-50 µL (até cobrir o fragmento de gel) de solução de extração (5% de ácido trifluoroacético (TFA) em 50% de acetonitrila), e agitados levemente por 30 min a 37 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. A extração das proteínas foi realizada duas vezes. O sobrenadante de cada *spot* foi concentrado em concentrador à vácuo (*Speed-vac, Eppendorf*) e armazenado a -20°C até a realização das análises por espectrometria de massas.

2.14 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros MS foram obtidos em espectrômetro *Autoflex III* MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) disponibilizado pela Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE, Recife-PE. Foram aplicados 2 µl de solução matiz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico - Sigma/C8982) e 1 µl de amostra em uma placa de MALDI. Os peptídeos foram selecionados na faixa de massa de 800 a 3.500 Da.

2.15 BIOINFORMÁTICA

Para a análise de PMF, os espectros obtidos tiveram seus arquivos peaklist.xml analisados no *software Mascot (Matrix Science)* usando o método PMF contra os bancos de dados que estão disponíveis na versão online do software (<http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros permitidos para as comparações foram estabelecidos da seguinte forma: 1) base de dados: NCBIprot e SwissProt; 2) taxonomia: todos para fungos; 3) modificação fixa: carbamidometil (C); 4) modificação variável: oxidação (M); e 5) tolerância de: 0,1 - 1,2 Da ou 50, 100, 150, 200 ppm, *Uniprot* para ontologia genica. O *software Panther* foi utilizado para separar as proteínas identificadas com base no seu processo biológico.

3.16 TESTE DE MICOTOXINAS

As cepas de *Aspergillus niger* e *A. oryzae* foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 25 g de arroz branco esterilizado. Foi adicionado 10 mL de água destilada esterilizada e deixado por 15 min para humedecer o arroz. Cada frasco foi inoculado com 3 discos de 5 mm crescidas em meio ágar extrato de malte (MEA) e incubados a 25 °C no escuro por 30 dias. A cada semana os frascos foram agitados à mão. Para extração das micotoxinas, cada amostra foi colocada em cadinhos e macerados com 20 mL de acetonitrila/água (84:16), após a maceração foi adicionado mais 80 mL da solução completando 100 mL. Em seguida os frascos foram colocados em agitador orbital por duas horas e posteriormente os extratos foram filtrados através de filtros de seringa de PTFE com poros de 0,45 µm (Merck) e colocado em frascos âmbar de 1 mL de vidro de borosilicato (BARROS et al., 2012), identificados e encaminhado para o CETENE, para análise de Fumonisina B1, Ocratoxina A e Aflatoxina B1, por LC MS.

4 RESULTADOS

4.1 LIOFILIZAÇÃO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O processo de liofilização utilizado foi bastante eficiente, porém foi observado que alguns liofilizados apresentaram uma camada brilhante na superfície e a presença de bolha foi observada em três ampolas - o que pode ter ocorrido pelo descongelamento do conteúdo da ampola um pouco antes do processo de liofilização ser iniciado pelo equipamento, sendo assim descartadas da análise. Isso pode ter ocorrido devido ao tempo de congelamento insuficiente ou ao tempo levado para o equipamento alcançar o vácuo necessário, fazendo com o conteúdo destas ampolas tenha iniciado um processo de descongelamento e por isso houve o surgimento de bolhas. Duas ampolas de cada cultura e tratamento (envelhecida e não envelhecida) liofilizadas foram reativadas e cultivadas em meio ágar extrato de malte (MEA), apresentaram um bom crescimento dentro dos 5 dias de cultivo.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA

As culturas foram observadas quanto a produção de biomassa em 24, 48 e 72 horas. Após 24 horas a quantidade de biomassa produzida para ambas culturas foi baixa, muitas vezes a produção foi inferior a 500 mg (mínimo necessário para realização das demais etapas do processo). Já com 48 e 72 horas a produção foi suficiente e superior a quantidade mínima necessária, não houve grande diferença na quantidade de biomassa produzida nesses tempos.

4.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA EXTRACELULAR E INTRACELULAR DE PROTEÍNAS TOTAIS

Os Protocolos usados para a prospecção das proteínas intra- e extracelulares foi considerado satisfatório por conseguir captá-las no meio de cultura e na biomassa. Além disso, foi observado um maior acúmulo de proteínas no meio contendo 2% de Tween 80 possivelmente pela presença do dispersante ajudar na liberação delas. O meio foi escolhido por ser muito utilizado no crescimento de culturas de *Aspergillus* e o Tween 80 foi adicionado com o intuito de auxiliar na liberação das proteínas.

4.4 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)

Os géis obtidos e escaneados, permitiram a visualização de bandas correspondentes a grupos proteicos, comprovando assim, a eficiência do protocolo escolhido. As bandas presentes nos géis de cada corrida exibiram contrastes, apresentando a ocorrência de bandas exclusivas

e/ou diferencialmente expressas, mostrando também que os ensaios microbiológicos foram satisfatórios quanto a produção, liberação de proteínas e adaptação ao meio.

Em todos os géis, das proteínas intra- e extracelulares, de *Aspergillus niger* (fig. 1 e fig. 2) e *Aspergillus oryzae* (fig. 3 e fig. 4), apresentam diferenças visíveis entre as amostras do controle (sem envelhecimento acelerado de vida útil) e estresse (com envelhecimento acelerado de vida útil), de todos os tratamentos. É nítida a presença de bandas comuns, exclusivas e/ou diferencialmente expressas, podendo representar alteração fenotípica entre as amostras liofilizadas as quais foram submetidas a um longo período de armazenamento (envelhecimento acelerado de vida útil).

Figura 1- Gel unidimensional SDS-PAGE das amostras de proteínas intracelulares de *Aspergillus niger*, controle (sem envelhecimento acelerado de vida útil) e estresse (envelhecidas as 40 °C por 15 dias), crescidas nos meios Extrato de Malte (EM) e Extrato de Malte com 2% de Tween 80 (EM + T80)

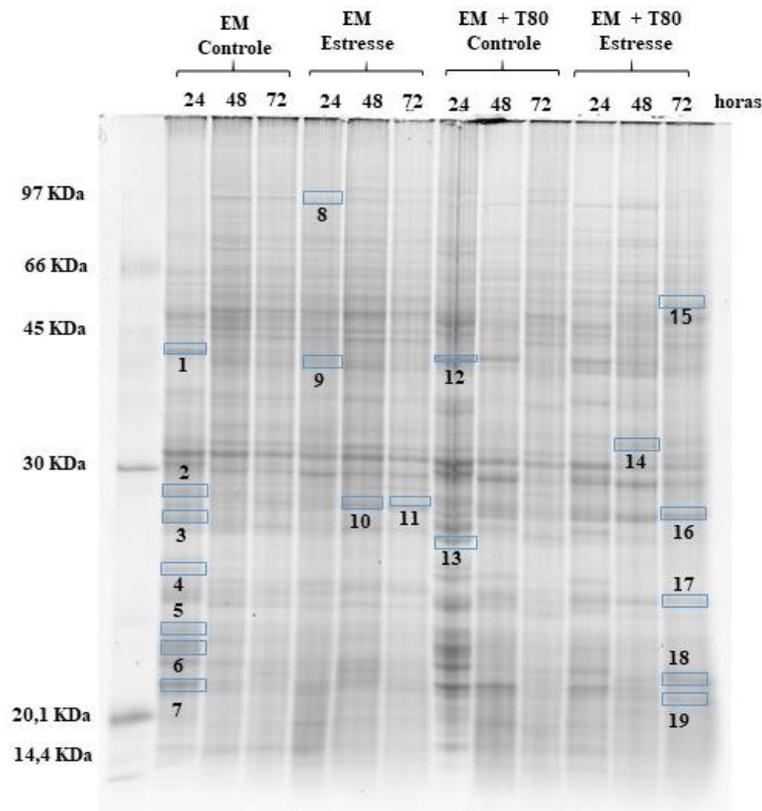


Figura 2- Gel unidimensional SDS-PAGE das amostras de proteínas extracelulares de *Aspergillus niger*, controle (sem envelhecimento acelerado de vida útil) e estresse (envelhecidas as 40 °C por 15 dias), crescidas nos meios Extrato de Malte (EM) e Extrato de Malte com 2% de Tween 80 (EM + T80)

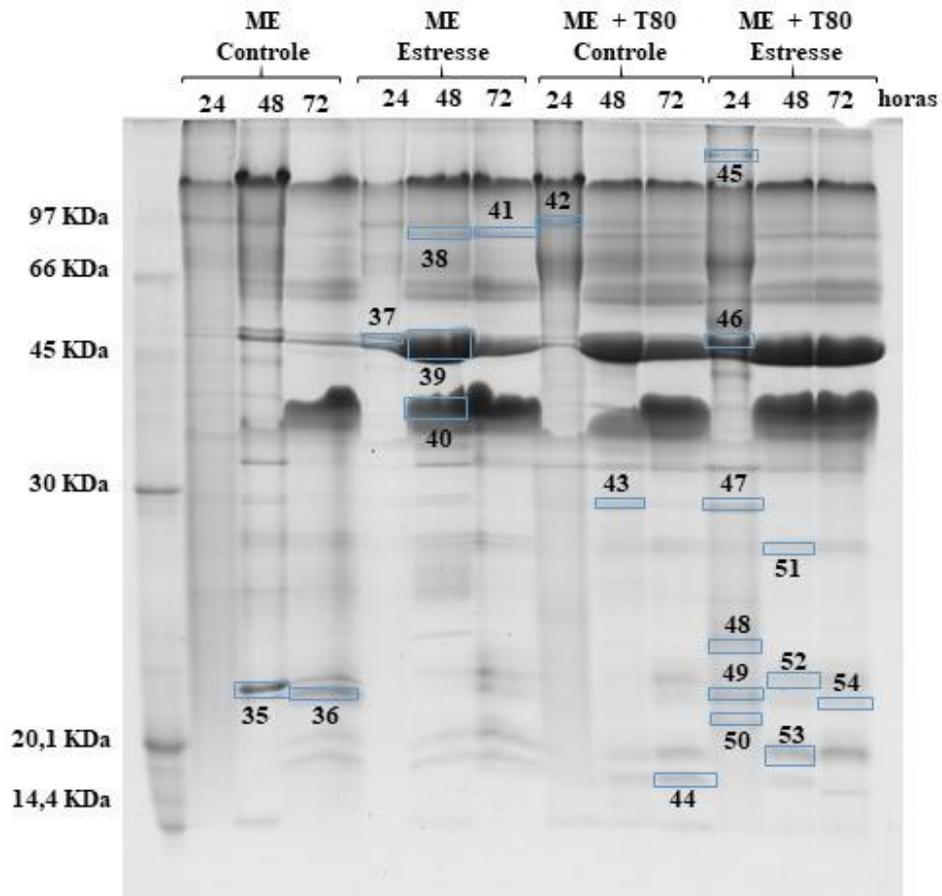


Figura 3- Gel unidimensional SDS-PAGE das amostras das proteínas intracelulares de *Aspergillus oryzae*, controle (sem envelhecimento acelerado de vida útil) e estresse (envelhecidas as 40 °C por 15 dias), crescidas nos meios Extrato de Malte (EM) e Extrato de Malte com 2% de Tween 80 (EM + T80)

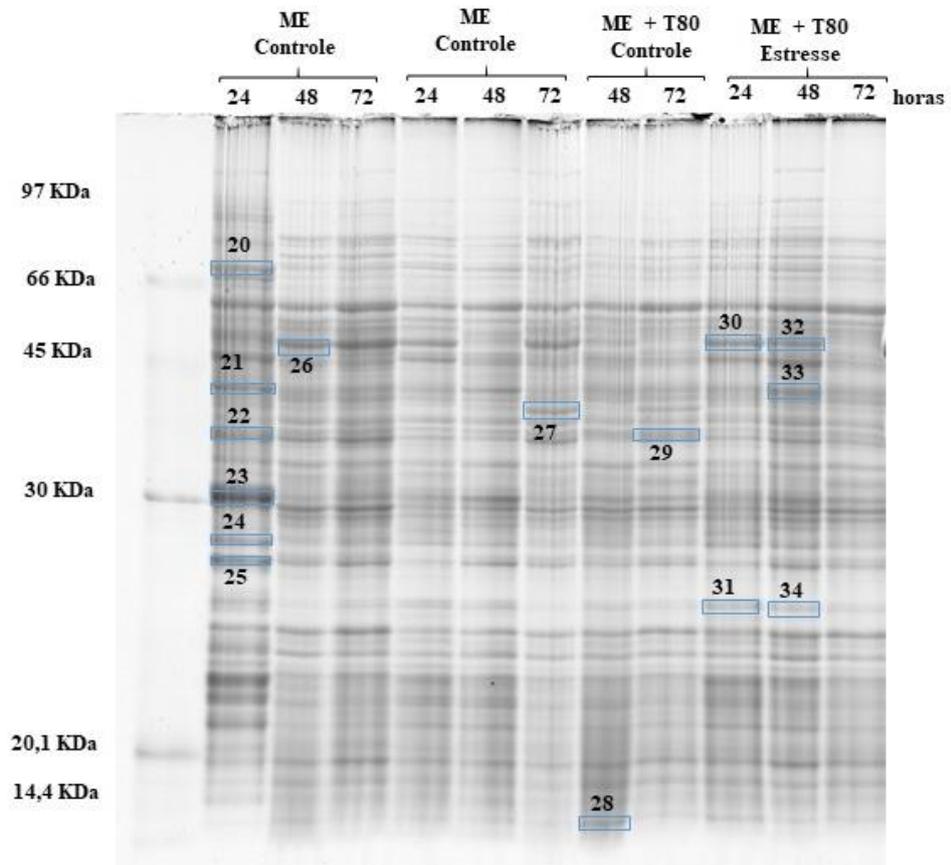
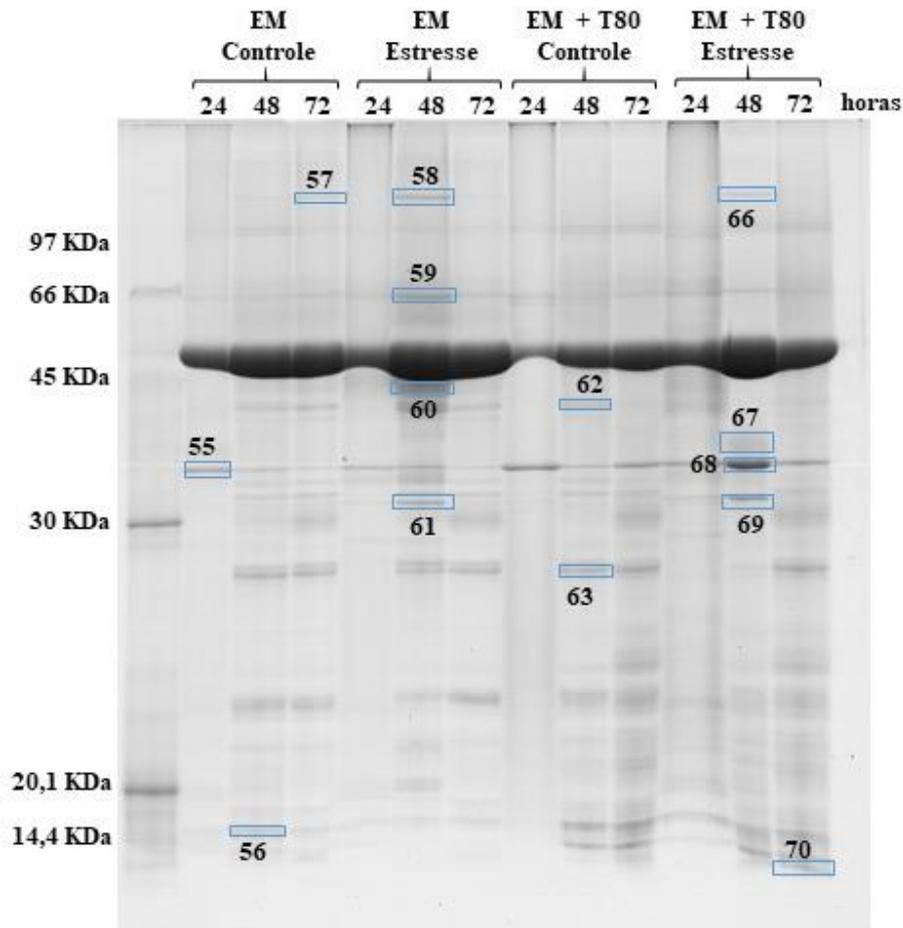


Figura 4- Gel unidimensional SDS-PAGE das amostras de proteínas extracelulares de *Aspergillus oryzae*, controle (sem envelhecimento acelerado de vida útil) e estresse (envelhecidas as 40 °C por 15 dias), crescidas nos meios Extrato de Malte (EM) e Extrato de Malte com 2% de Tween 80 (EM + T80)



4.5 ANÁLISE DE IMAGENS

4.5.1 Análises das imagens dos géis 1-D (SDS)

Quando verificadas todas as comparações feitas entre o controle e estresse nos diferentes tempos de crescimento fúngico, de ambos os fungos, pode-se observar diferenças na ausência de algumas bandas e acúmulo de outras, evidenciado nas figuras 1, 2, 3 e 4.

Ao analisar as imagens dos géis pelo software *Gel Analyser*, foram observadas estas diferenças entre os tratamentos. Ao compararmos os tempos (24, 48 e 72 horas) para as amostras das proteínas intracelulares de *Aspergillus niger* em meio Malte, podemos observar que em 24 horas a diferença entre o controle e o estresse, foi pouca quanto a quantidade de bandas

detectadas no gel, sendo 35 para o controle e 36 para o estresse. No tempo de 48 horas do mesmo tratamento, foi observado um aumento no número de bandas para 45 no controle e 49 no estresse. E as 72 horas foi observada ainda um aumento do número de bandas do controle, para 49 e a diminuição no estresse para 35.

Já para as proteínas extracelulares de *A. niger* do tratamento com meio Extrato de Malte as 24 horas apresentou um total de 15 bandas para o controle e 11 para o estresse. As 48 horas houve um aumento no número de bandas para 25 do controle e 19 do estresse. As 72 horas o número de bandas do controle caiu para 21 e o estresse permaneceu 19.

Para as amostras do tratamento das proteínas intracelulares de *A. niger* com meio Malte acrescido de 2% de Tween 80, podemos observar no tempo de 24 horas um valor próximo entre o controle e o estresse, 42 e 40 respectivamente. As 48 horas o número de bandas diminuiu para 35 do controle e 32 do estresse. As 72 horas houve mais decréscimo no número de bandas para 34 do controle e 26 para o estresse.

Para as amostras das proteínas intracelulares de *A. niger*, no tratamento com meio Extrato de Malte com 2% de Tween 80 as 24 horas foi obtido um total de 22 bandas para o controle e 26 bandas para o estresse. As 48 horas apresentou 24 bandas do controle e 18 para o estresse. As 72 horas houve um decréscimo para obteve 21 bandas para o controle e o estresse continuou com 18.

A mesma análise foi realizada para as das proteínas intracelulares de *Aspergillus oryzae*, no tratamento com meio Extrato de Malte as 24 horas foi observado 44 bandas para o controle e 52 para o estresse. As 48 horas o número de bandas diminuiu para 40 do controle e aumentou para 57 no estresse. As 72 horas o número de bandas aumentou novamente para 48 do controle e diminuiu para 45 do estresse.

Para as amostras das proteínas extracelulares de *A. oryzae* do tratamento com meio Extrato de Malte, as 24 horas apresentou 9 bandas para o controle e 12 para o estresse. As 48 horas apresentou um aumento no número de bandas para 16 do controle e 21 do estresse. As 72 horas apresentou um aumento no número de bandas do controle para 21 e uma diminuição das bandas do estresse para 19.

Para as amostras das proteínas intracelulares de *A. oryzae* com meio Extrato de Malte acrescido de 2% de Tween 80. As 24 horas não foi feita a análise, pois uma das amostras não teve uma quantificação suficiente para ser colocada no gel, porém no estresse apresentou um total de 46 bandas. As 48 horas apresentou um valor de 46 bandas para o controle e 56 para o estresse. As 72 horas apresentou um número de 48 bandas para o controle e 41 para o estresse.

Para as amostras das proteínas extracelulares de *A. oryzae* do tratamento com meio Extrato de Malte com 2% de Tween 80. As 24 horas apresentou 7 bandas para o controle e 16 para o estresse. As 48 horas houve um aumento do número de bandas para 21 do controle e 17 do estresse. As 72 horas apresentou um aumento na quantidade de bandas do controle para 24 e 23 no estresse.

Dentre estas bandas, foram escolhidas 70 com base na presença/ausência e no acúmulo que estas apresentavam entre os tratamentos controle e estresse (24, 48 e 72 horas para ambos os fungos). Estas 70 proteínas foram digeridas, contudo, apenas 36 foram levadas para serem identificadas por espectrometria de massas e apenas 11 apresentaram score acima de 51 (mínimo necessário para a estimativa ser significativa na identificação das proteínas segundo o *Mascot*).

Em especial para os tratamentos contendo Tween 80 foi observado, principalmente para as amostras de proteínas extracelulares, um aumento na quantidade de proteínas extraídas. Indicando que este auxiliou na liberação destas proteínas para o meio.

4.5.2 Análises das imagens dos géis 2D

O 2D das amostras de *Aspergillus oryzae* em meio Extrato de Malte com 2% de Tween 80 crescidas por 48 horas mostrou uma diferença na expressão da proteína entre as amostras com e sem envelhecimento acelerado (Figuras 5 e 6). Após as análises, foi observado que as réplicas dos géis do mesmo tratamento apresentaram similaridade significativa de com média de coeficiente de correlação de 0,9135 entre as réplicas 41 e 40 controles; 0,9157 entre as réplicas 41 e 42. Nas réplicas do estresse a correlação foi de 0,9511 entre 45 e 43; e entre 45 e 44 foi de 0,9456. Esta correlação entre réplicas permitiu as análises dos *spots*.

A eletroforese 2D permitiu a detecção total de 1.412 *spots* nas amostras de réplicas técnicas das duas comparações realizadas, com peso molecular entre 14, e 97 KDa e um pI variando de 4 a 7. No entanto os pontos muito fracos foram ignorados, assim como também machas com formas indefinidas e áreas onde a eletroforese causou irregularidade no local.

Na amostra induzida pelo envelhecimento acelerado, foram encontrados um valor médio entre a triplicata dos géis de 279 *spots* de proteína totais, enquanto na amostra sem envelhecimento acelerado, foi detectado um número menor, 191 *spots* de proteínas foram detectados.

Figura 5- Imagem do gel 2D com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais intracelulares do isolado de *A. oryzae*, amostra controle. Em vermelho estão evidenciados os *spots* totais decotados pelo programa e em verde são destacados os *spots* significativos de acordo com a análise do programa.

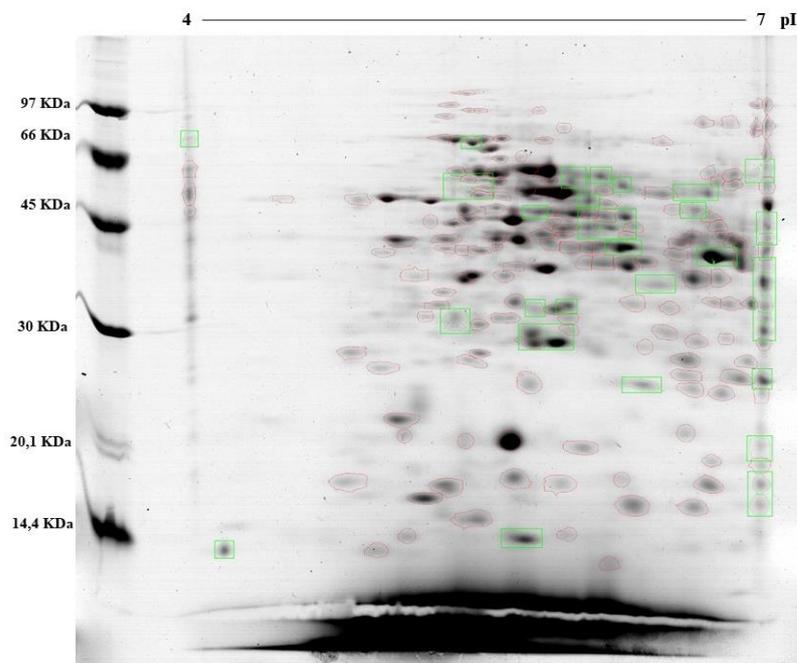
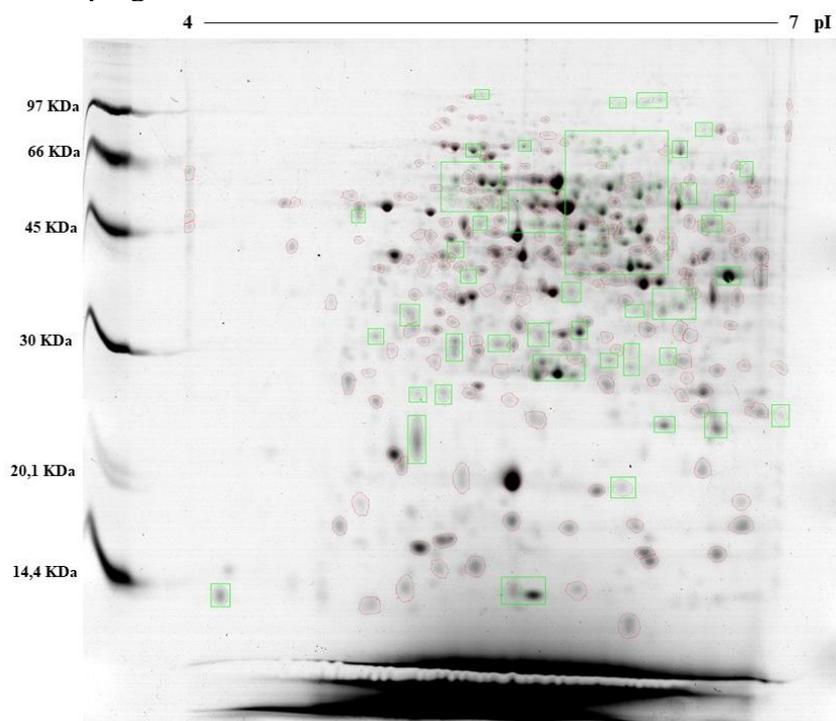


Figura 6- Imagem do gel 2D com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais intracelulares do isolado de *A. oryzae*, amostra estresse. Em vermelho estão evidenciados os *spots* totais decotados pelo programa e em verde são destacados os *spots* significativos de acordo com a análise do programa.



4.6 EXCISÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS

Das bandas que foram selecionadas e excisadas de cada tratamento submetido o *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, total de 11 bandas, foram identificadas pela espectrometria de massa (tabela 7). Para elucidação das possíveis mudanças geradas pelo estresse ao qual os fungos foram submetidos.

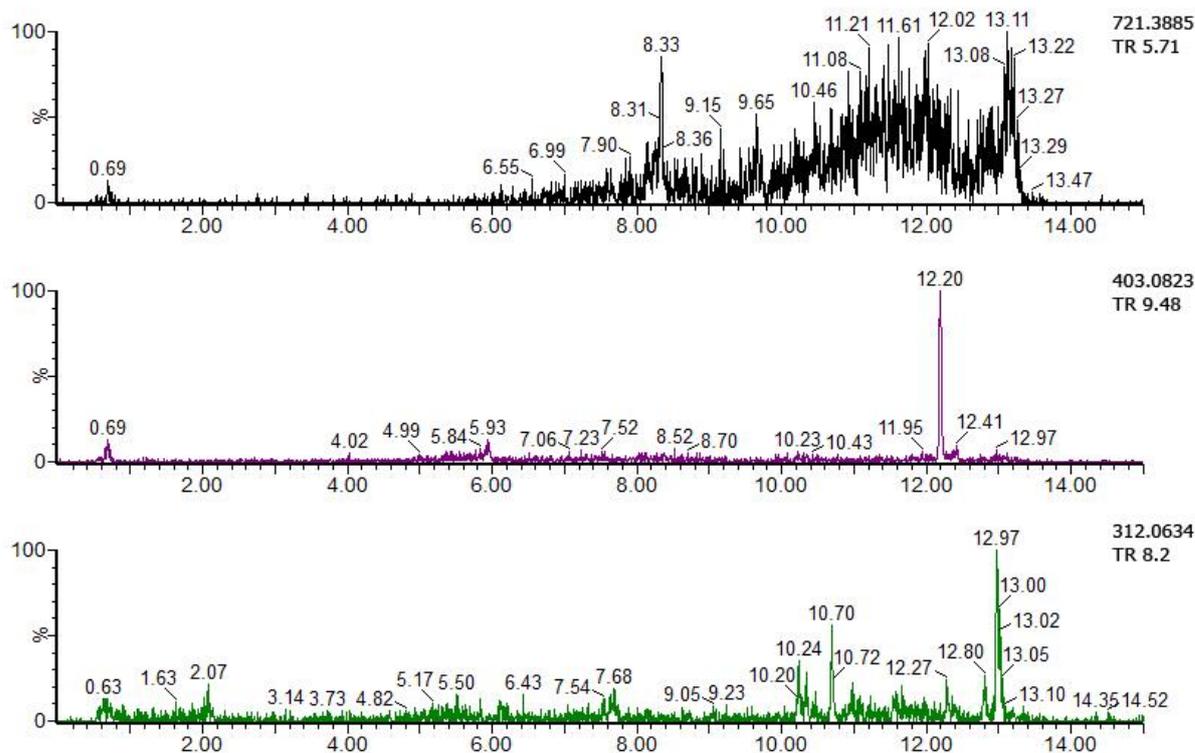
Tabela 7- Resumo das principais características das proteínas identificadas pelo Mascot e anotadas através do UniprotKB

Banda ID	Tratamento	Acesso	Score	Nome	Função	Processo Biológico	Localização Celular
2	Extrato de Malte Controle 24h <i>A. niger</i>	RRF2M_VANPO	52	Fator liberador de ribossomo 2	Atividade do GTPase	Biossíntese de Proteínas	Mitocôndria
4	Extrato de Malte Controle 24h <i>A. niger</i>	UBP16_SCHPO	58	Ubiquitina hidrolase carboxi-terminal 16	Atividade Catalítica	Via de conjugação Ubl	Núcleo ou Nucléolo
5	Extrato de Malte Controle 24h <i>A. niger</i>	RPIA_LODEL	53	Ribose-5-fosfato isomerase	Atividade Catalítica	Processo biosintético de piridoxina	Citoplasma
7	Extrato de Malte Controle 24h <i>A. niger</i>	SPS1_YEAST	53	Proteína específica para esporulação 1	Desenvolvimento da Parede do Esporo	Esporulação, formação dos ascósporos	Núcleo ou citoplasma
8	Extrato de Malte Estresse 24h <i>A. niger</i>	UBP16_SCHPO	73	Ubiquitina hidrolase carboxi-terminal 16	Atividade Catalítica	Via de conjugação Ubl	Núcleo ou Nucléolo
9	Extrato de Malte Estresse 24h <i>A. niger</i>	BOA8_BOTFB	51	Monoxigenase dependente de FAD BOA8	Ligação de FAD	Virulência	Membrana
14	Extrato de Malte + Tween 80 Estresse 48 h <i>A. niger</i>	UBP16_SCHPO	55	Ubiquitina hidrolase carboxi-terminal 16	Atividade Catalítica	Via de conjugação Ubl	Núcleo ou Nucléolo
24	Extrato de Malte Controle 24h <i>A. oryzae</i>	EDE1_YEAST	51	Endocitose e domínio EH 1	Ligação de íons de cálcio	Endocitose	Citoplasma
28	Extrato de Malte + Tween 80 Controle 48h <i>A. oryzae</i>	EIF3G_ASPCL	54	Subunidade 3 do fator de iniciação de tradução eucariótica G	Atividade do fator de iniciação	Biossíntese de Proteínas	Citoplasma
29	Extrato de Malte + Tween 80 Controle 72h <i>A. oryzae</i>	UBP16_SCHPO	53	Ubiquitina hidrolase carboxi-terminal 16	Atividade Catalítica	Via de conjugação Ubl	Núcleo ou Nucléolo
30	Extrato de Malte + Tween 80 Estresse 24h <i>A. oryzae</i>	UBP16_SCHPO	57	Ubiquitina hidrolase carboxi-terminal 16	Atividade Catalítica	Via de conjugação Ubl	Núcleo ou Nucléolo

4.7 TESTE DE MICOTOXINAS

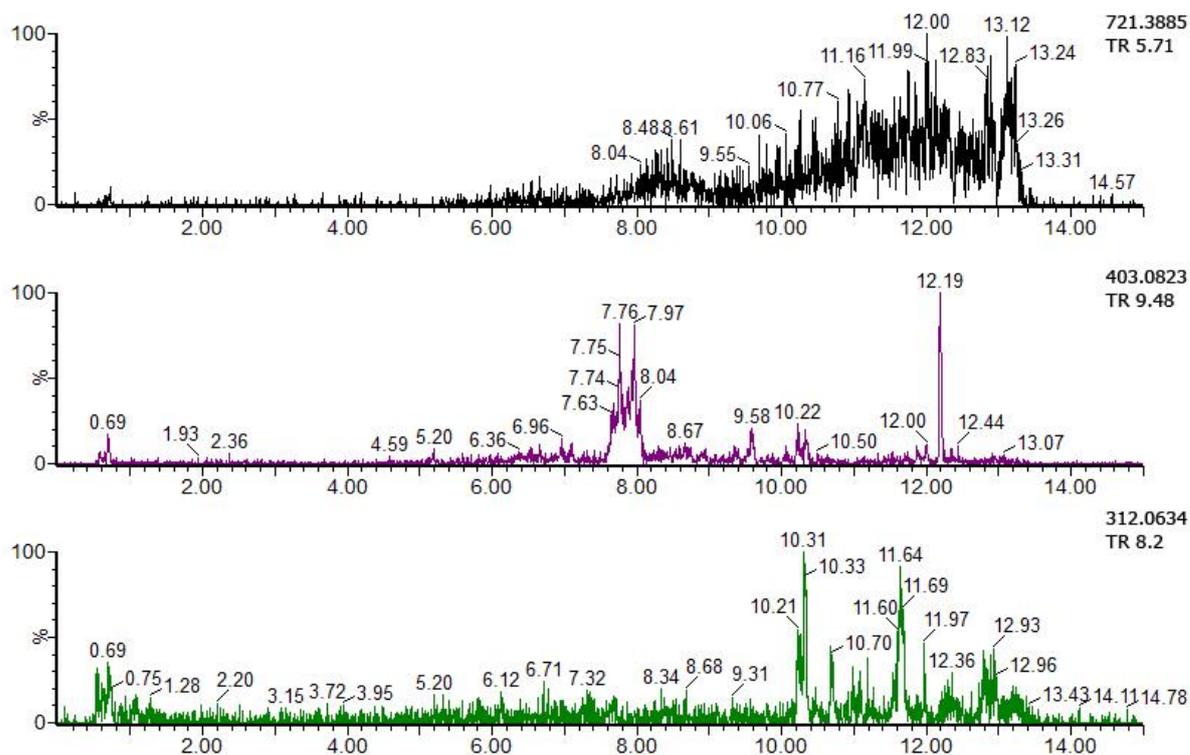
Para as micotoxinas avaliadas o resultado foi negativo, as cepas utilizadas não produzem Fumonisina B1, Ocratoxina A ou Aflatoxina B1.

Figura 7- Cromatograma da análise de micotoxina de *Aspergillus niger*



O espectro preto indica a Fumonisina B1 que tem como peso molecular 721.3885 Da e Tempe de Retenção (TR) em 5.71; o espectro roxo indica a Ocratoxina A que tem como peso molecular 403.0823 Da e RT em 9.48; e o espectro verde indica a Aflatoxina B1 que tem como peso molecular 312.0634 Da e RT em 8.2

Figura 8- Cromatograma da análise de micotoxina de *Aspergillus oryzae*



O espectro preto indica a Fumonisina B1 que tem como peso molecular 721.3885 Da e Tempe de Retenção (TR) em 5.71; o espectro roxo indica a Ocratoxina A que tem como peso molecular 403.0823 Da e RT em 9.48; e o espectro verde indica a Aflatoxina B1 que tem como peso molecular 312.0634 Da e RT em 8.2

5 DISCUSSÃO

A preservação destas espécies de *Aspergillus* é de grande relevância devido a este gênero de fungos representa uma fonte importante para várias aplicações biotecnológicas (por exemplo, na produção de enzimas e ácidos orgânicos), que requer a manutenção de suas propriedades fisiológicas e genéticas, necessitando para isto de métodos de preservação que garantam tais características. Contudo, sabe-se que nenhum método de preservação garante a estabilidade fisiológica e genética total de um indivíduo (SIMÕES et al., 2013). No caso da liofilização, exige agentes de proteção para prevenir ou reduzir efeitos adversos que possam ser causados durante processo e no armazenamento a longo prazo.

Quanto ao processo de liofilização foi observado que os fungos se mantiveram viáveis após processo e durante todos os períodos de estocagem, tanto as ampolas que ficaram armazenadas a 4 °C quanto as que foram submetidas ao envelhecimento acelerado as 40 °C graus por 15 dias, comprovando assim que fungos sobreviveram tanto em baixas como em temperaturas ambientes por mais 90 dias. Tal resultado se assemelha ao obtido por Garcia (2007), a qual avaliou a sobrevivência e manutenção da atividade nematofágica do fungo *Arthrobotrys musiformis* submetido à liofilização.

Avaliação da expressão de proteínas intra- e extracelulares de *Aspergillus niger* e *A. oryzae* pós-preservação mostrou que a liofilização, o meio de cultura, o tempo e a temperatura induzem a mudanças no acúmulo proteico, o que está evidenciado nas imagens dos géis SDS-PAGE e que foi confirmado para *A. oryzae* com a análise do gel 2D. Poucos estudos foram realizados no que diz respeito a avaliação do efeito da liofilização em função do tempo sobre a estabilidade genética e fenotípica dos fungos utilizando ferramentas de análises proteômicas (SIMÕES et al., 2013, RODRIGUEZ et al., 2019) e a maioria deles se concentra em caracteres morfológicos, fisiológicos e de viabilidade (ASHCAR, 1973; BERNY; HENNERBERT, 1991; SANTOS et al., 2002; VOYRON et al., 2009; SOTO et al., 2017; RODRIGUEZ et al., 2019). Berny; Hennerbert (1991) que avaliaram a viabilidade e estabilidade de leveduras e fungos filamentosos após a liofilização de acordo com a produção de conídios (contar o número de conídios germinando e não germinando ou o número de células brotando e não brotando antes e depois tratamento).

No trabalho de Rodriguez et al. (2019), com doze cepas de *Aspergillus* seção *Nigri*, foi evidenciado que as cepas analisadas não perderam seu potencial biotecnológico na produção enzimática após o armazenamento acelerado. Além disso, também verificaram que não houve diferenças substanciais nas características morfológicas (macro e micro), apresentando

setorização, em poucas, a qual foi relacionada ao estresse induzido pela preservação, assemelhando-se aos dados obtidos por Soto et al. (2017). Entretanto, as análises de impressão digital (*fingerprint*) foram diferentes, de acordo com Rodriguez et al. (2019), foram constatadas diferenças nos dados espectrais dos fungos após a preservação e envelhecimento evidenciando o baixo impacto que a preservação e o armazenamento a longo prazo podem ter nessas proteínas alvo, eles observaram também um aumento na atividade enzimática das culturas, principalmente quando comparadas as recém liofilizadas com as submetidas ao armazenamento acelerado.

Contudo, Soto et al. (2017) observaram diferentes impressões digitais de DNA, indicando a preservação de cepas fúngicas por liofilização, em um longo período, pode afetar o desempenho biotecnológico dos fungos. Tais resultados se assemelham aos obtidos no presente estudo, pois evidenciam diferenças a nível proteico das cepas analisada, apesar de muitas vezes estas diferenças não serem substanciais, mostrando a necessidade de posterior complementação dos resultados obtidos, como a identificação das proteínas dos géis 2D, para confirmação e verificação das alterações observadas nas análises 1 e 2D da presente pesquisa. Estes resultados enfatizam também a importância do presente estudo para o entendimento da relação da liofilização em função do tempo nas características dos fungos filamentosos.

Tal resultado pode ser considerado como semelhante ao obtido no presente estudo, pois foram evidenciadas diferenças na expressão de proteínas apresentadas no gel 1D, tanto para as intracelulares quanto para as extracelulares. Ashcar (1973), avaliou o fungo *Microsporium canis* preservado por liofilização por 20 anos, e não observou diferenças quanto as estruturas morfológicas deste microrganismo, antes e pós preservação por 20 anos, o que apesar de ter sido avaliado por caracteres morfológicos é oposto aos resultados obtidos no presente estudo, pois foram observadas diferenças significativas, de expressão proteica, nas cepas estudadas.

Algumas proteínas dos géis 1D puderam ser identificadas, dentre elas: a SPS1_YEAST, a qual está diretamente relacionada ao metabolismo basal dos fungos, associada a formação da parede dos esporos. Foram identificadas mais proteínas UBP16_SCHPO nas amostras submetidas ao armazenamento acelerado que nas do controle, a qual está diretamente relacionada a atividade catalítica, podendo assim está associada ao estresse ao qual as cepas foram submetidas.

Quanto a produção de micotoxinas avaliadas para as duas espécies estudadas, como esperado o fungo *Aspergillus oryzae* não produziu nenhuma das micotoxinas avaliadas, por ser considerada como não micotoxigênica, como relatado em inúmeros estudos Barbesgaard et al. (1991); Udatha et al. (2015); Frisvad et al. (2019).

De acordo com a metodologia utilizada para extração de micotoxinas, a cepa de *Aspergillus niger* também não produziu nenhuma das micotoxinas avaliadas, o que já havia sido confirmado no trabalho de Maciel et al. (2013), em que foi avaliada a produção de Ocratoxina A e Fumonisina B2, para a cepa URM 5162. Porém, alguns estudos com outras cepas destas mesmas espécies têm sido relatados como produtoras ou potenciais produtoras de micotoxinas como a Octatoxina A (ABARCA et al., 1994; SAMSON et al. 2007; FRISVAD et al., 2007;2011; HONG et al. 2013; VARGA et al., 2015; GIL-SERNA et al., 2019).

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que os protocolos utilizados foram efetivos na extração de proteínas totais do proteoma e do secretoma dos fungos estudados; o meio de cultura adicionado de 2% de Tween 80 foi mais efetivo na extração das proteínas presentes no meio de cultura utilizado para o crescimento fúngico; houve diferença entre os liofilizados submetidos ao envelhecimento acelerado com relação àqueles que não foram submetidos, tanto na análise 1D quanto na análise 2D. Contudo, apenas com os resultados obtidos de identificação das proteínas dos géis 1D, não foi possível concluir se a liofilização pode ou não ser considerada uma técnica de excelência para ser utilizada na manutenção das características fenotípicas e genotípicas de fungos filamentosos por um longo período.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L. et al. Ochratoxin A Production by Strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994.
- ABREU, J.A.S. DE; ROVIDA, A.F. DAS.; PAMPHILE, J.A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 55-59, 2018.
- ABREU, M.M.V; TUTUNJI, V.L. Implementação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 236-251, 2008.
- ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C. Efeito da Trealose na Manutenção da Viabilidade de Células de Leveduras Desidratadas por Liofilização. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 3, p. 189-194, 1997.
- ARRHENIUS, S. Immunochemie. **Ergebnisse Physiologie**, v. 7, n. 1, p. 480–551, 1908.
- ARZANLOU, M. et al. Two novel *Aspergillus* species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran. **Mycological Progress**, v. 15, n. 10-11, p. 1081-1092, 2016.
- ASHCAR, H. Manutenção de culturas de *Microsporum canis* por liofilização (observação após 20 anos)*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 33, p. 7-11, 1973.
- BARBESGAARD, P.; HELDT-HANSEN, H.P.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 569-572, 1992.
- BARBOSA, E. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.
- BARROS, G. et al. *Trichothecenes* and *zearalenone* production by *Fusarium equiseti* and *Fusarium semitectum* species isolated from Argentinean soybean. **Food Additives & Contaminants**, v. 29, n. 9, p. 1436–1442, 2012.
- BASTOS, C. N. Método para preservação da viabilidade e atividade antagônica de *Trichoderma stromaticum*, agente de biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 265-266, 2008.
- BATTAGLIA, E. et al. Analysis of regulation of pentose utilisation in *Aspergillus niger* reveals evolutionary adaptations in *Eurotiales*. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 1, p 31-38, 2011.
- BERNY, J.F.; HENNEBERT, J.A. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. **Mycologia**, v. 83, n. 6, p. 805-815, 1991.
- BEZERRA, J.D.P. et al. Micoteca URM da UFPE: uma fonte de recursos biológicos do Brasil*. Recife. **Anais [...]**. Pernambuco, v. 13/14, p. 47-56. 2017.
- BLATNIK, J., GUNDE-CIMERMAN, N., CIMERMAN, A. Preservation of rennet producing *Rhizomucor miehei* strain. **Biotechnology Techniques**, v. 8. n. 7, p. 487-490, 1994.

BRAAKSMA, M. et al. An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining *in silico* predictions with shotgun proteomics data. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 584, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRANDI, J.; ANDERSEN, M.R. *Aspergilli*: Models for systems biology in filamentous fungi. **Current Opinion in Systemns Biology**, v. 6, p. 67-73, 2017.

CANHOS, V. P., VAZOLLER, R. F. 2004. A importância das coleções biológicas: Falta ao Brasil uma política adequada para os centros de recursos de microrganismos e tecidos. **Scientific American Brasil**. Disponível em: <http://www.cria.org.br/cgee/documentos/fronteiras.pdf>. Acesso em: 10 dezembro 2017.

CARNEVALE, J.F. et al. Implementação de métodos de preservação de longo prazo no acervo da coleção de culturas de fungos filamentosos/IOC/Fiocruz. In: VIII Congresso Brasileiro de Micologia, 1:274. Florianópolis. **Anais [...]**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Micologia/UFSC, 2016. 08.007.

COSTA, J. et al. Overview of Fungi and Mycotoxin Contamination in *Capsicum* Pepper and in Its Derivatives. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 27, 2019.

CUZZI, C. et al. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Global Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 47-57, 2011.

DI COLOGNA, N.M. et al. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, p. 1-10, 2017.

EMIDIO, N.B. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3, p. 101-111, 2015.

FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, v. 63, n. 1, p. 73- 82, 2001.

FORTI, T. et al. Evaluation of a fungal collection as certified reference material producer and as a biological resource center. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 403-409, 2016.

FRISVAD, J.C. et al. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9727-9732, 2007.

FRISVAD, J.C. et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 1-63, 2019.

GALDO-REVERSOS, A.C. et al. Proteômica: Novas Fronteiras na pesquisa Clínica. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 6, n.11, p. 1-24, 2010.

GANESAN, B. *Aspergillus* Secretome. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, v. 5, p. 69-77, 2016.

GARCIA, A. M. Survival and predatory activity of *Arthrobotrys musiformis* submitted to lyophilization. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1203-1206, 2007.

GHAZALA, I. et al. Screening and Molecular Identification of New Microbial Strains for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, e16150152, 2016.

GIL-SERNA, J. et al. Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins. **Food Microbiology**, v. 82, p. 240-248, 2019.

GODOY, I. et al. Expressão diferencial de proteínas do fungo *Conidiobolus lamprauges* cultivado em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 473-478, 2014.

HERNÁNDEZ-MACEDO, M. L. et al. Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: Differential analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles. **Electrophoresis**, v. 23, n. 4, p. 655-661, 2002.

HIBBETT, D.S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HOMOLKA, L. Methods of Cryopreservation in Fungi. *In*: GUPTA, V.K. et al. (Eds.). **Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology**, República Tcheca: Fungal Biology, 2013, p. 9-16.

HONG, S.B. et al. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. **PLoS One**, v. 8, e63769, 2013.

HONÓRIO, M.C.; PASIN L.A.P. Diversidade de fungos macroscópicos na floresta ombrófila mista do pico da bandeira em maria da fé. *In*: XIII congresso nacional de meio ambiente de Poços de Caldas, 8. Poços de Caldas. **Anais [...]. Poços de Caldas**, 2016.

HOSSAIN, A.H. et al. Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in *Aspergillus niger*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 130-145, 2016.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, v. 81, n. 3, p. 802-806, 1986.

JONES, M.D.M. et al. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. **Nature**, v. 474, p. 200-203, 2011.

KATAYAMA, T. et al. Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 4, p. 637-42, 2015.

KIM, Y.; NANDAKUMAR, M.P.; MARTEN, M.R. The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. *Brief Funct. Genomics Proteomic*, v. 7, n. 2, p. 87-94, 2008.

KJÆRBØLLING, I. et al. Linking secondary metabolites to gene clusters through genome sequencing of six diverse *Aspergillus* species. **PNAS Plus**, v. 115, n. 4, p. 753-761, 2018.

KNIEMEYER, O. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3232-43, 2011.

KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, n. 1, p. 1-29, 2013.

LIMA-NETO, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collectio. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.

MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1157-1161, 2005.

MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. **DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes**, v. 15, n. 4, p. 173-183, 2008.

MACIEL, M. et al. Production of Polygalacturonases by *Aspergillus* section *Nigri* Strains in a Fixed Bed Reactor. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1660-1671, 2013.

MAIA, L.C.; CARVALHO-JUNIOR, A.A. Introdução: Fungos do Brasil. In: FORZZA, RC., org., et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, vol.1. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, p. 43-48.

MAIA, T.F.; FRAGA, M.E. 2017. Bioprospecting *Aspergillus* section *Nigri* in Atlantic Forest soil and plant litter. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, 2017.

MCCLUSKEY, K. A Review of Living Collections with Special Emphasis on Sustainability and Its Impact on Research Across Multiple Disciplines. **Biopreservation Biobank**, v. 15, n. 1, p. 20-30, 2017.

MÉCHIN, V.; DAMERVAL, C.; ZIVY, M. Total protein extraction with TCA-acetone. In: THIELLEMENT H., ZIVY M., DAMERVAL C., MÉCHIN V. (Ed.). **Plant Proteomics: methods in molecular biology**. Humana Pressplant Proteomics, p. 1-8.

MEDINA, M. L.; KIERNAN, U. A.; FRANCISCO, W. A. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 3, p. 327-335, 2004.

MEIJER, M. et al. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. **Studies in Mycology**, v. 69, p.19-30, 2011.

- MENDOZA, D. P. G. Proteômica aplicada à caracterização do secretoma de *Trichoderma harzianum*. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília. Brasília, p. 117. 2013.
- MENOZZI, C.A. et al. Otimização da Síntese do Fluconazol: um Importante Fármaco Antifúngico da Classe dos Azóis. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 3, p. 1216-1234, 2017.
- MICOTECA URM. 2018. Disponível em:
<http://sblink.cria.org.br/manager/detail?resource=URM-Micoteca>. Acesso em: 07 agosto 2018.
- MONEY, N.P. Fungal Cell Biology and Development. In: WATKINSON, S.; BODDY, L.; MONEY, N.P. **The Fungi**. Estados Unidos: Academic Press, 2016, p. 37-66.
- MONTE, D.B.P.; FONSECA, S.S.S.; MELO, R.F. 2016. Coleção didática do Herbário URM. In: VIII Congresso Brasileiro de Micologia, 1:272. Florianópolis. **Anais [...]**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Micologia/UFSC, 2016.
- MORAES, A.M.L. et al. 2016. Caracterização taxonômica e perfil de susceptibilidade à antifúngicos de *Aspergillus fumigatus fresenius* 1863 preservados em coleções biológicas. In: VIII Congresso Brasileiro de Micologia, 1:276. Florianópolis. **Anais [...]**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Micologia/UFSC, 2016.
- NASSER, P.P. et al. Implicações do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdati* e produção de Ocratoxina a. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1172-1175, 2003.
- ODA, K. et al. Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3448-3457, 2006.
- ODONI, D.I. et al. *Aspergillus niger* Secretes Citrate to Increase Iron Bioavailability. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1424, 2017.
- PALACIOS-CABRERA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 24-28, 2005.
- PARVEEN, S. et al. Variability in production of extracellular enzymes by different fungi isolated from rotten pear, peach and grapefruits. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 8, p. 259-264, 2017.
- PERRONE, G. et al. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 11, p. 1138-1150, 2011.
- PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y.S. Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 339, p. 1-9, 2013.

PUNT, I. et al. Submicron sized ultra-high molecular weight polyethylene wear particle analysis from revised SB Charité III total disc replacements. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 9, p. 3404-11, 2011.

RAMIREZ-GARCIA, A. et al. Proteomics as a Tool to Identify New Targets Against *Aspergillus* and *Scedosporium* in the Context of Cystic Fibrosis. **Mycopathologia**, v. 183, n. 1, p. 273-289, 2016.

RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 877-892.

RODRIGUEZ, R. et al. Polyphasic, Including MALDI-TOF MS, Evaluation of Freeze-Drying Long-Term Preservation on *Aspergillus* (Section *Nigri*) Strains. **Microorganisms**, v. 7, n. 291, p. 1-17, 2019.

ROJAS-TAPIAS, D. et al. Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. **Universitas Scientiarum**, v. 18, n. 2, p. 129-139, 2013.

SAKANE, T.; KOROSHIMA, K-I. Viabilities of dried cultures of various bacteria after preservation for over 20 years and their prediction by the accelerated storage test. **Microbiology and Culture Collections**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 1997.

SAMSON, R. A. et al. Food and indoor fungi. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. **CBS Laboratory Manual Series**, v. 2, 2010.

SAMSON, R. et al. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 129-145, 2007.

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

SANTOS, C. et al. The Chilean Network of Microbial Culture Collections: Establishment and Operation. **Boletín Micológico**, v. 31, n. 2, p. 44-50, 2016.

SANTOS, I.M. et al. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n.4, p. 272-275, 2002.

SBM. **Coleções de Culturas e Taxonomia**. 2018. Disponível em: <http://sbmicrobiologia.org.br/areas/colecoes-de-culturas/>. Acesso em: 23 Jan. 2018.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 426-435, 2002.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2007.

SHI, C. et al. Physicochemical Properties Analysis and Secretome of *Aspergillus niger* in Fermented Rapeseed Meal. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. 1-16, 2016.

SHINOHARA, Y. et al. An overproduction of astellolides induced by genetic disruption of chromatin-remodeling factors in *Aspergillus oryzae*. **The Journal of Antibiotics**, v. 69, n. 1, p. 4-8, 2015.

SILVA, E.P. et al. Seleção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de tanase para inclusão em ração animal. *Pubvet*, **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 12, n. 2, p. 1-7, 2018.

SIMÕES, M.F. et al. Polyphasic Identification and Preservation of Fungal Diversity: Concepts and Applications. A. Malik et al. (eds.), Management of Microbial Resources in the Environment. **Springer**, v. 5, p. 91-117, 2013. SMITH, D. Culture Collections. **Advances in Applied Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 73-118, 2012.

SOLA, M.C. et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.

SOTO, I. et al. Will fungal strains preserved in culture collections maintain the same biotechnological performance after years of preservation? *In: 6 TH INTERNATIONAL WORKSHOP. ADVANCES IN SCIENCE AND TECHNOLOGY OF BIORESOURCES*, 11, 2017, Chile. **Anais [...]**. Chile: Universidad de La Frontera, 2017. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/49020>. Acesso em: 12 de ago. 2019.

STAJICH, J.E. Fungal genomes and insights into the evolution of the kingdom. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, p. 619-633, 2017.

TAKAHASHI, J.A. et al. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TAN, K-C. et al. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 5, p. 703-715, 2009.

TJALSMA, H. et al. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 515-547.

UDATHA, G. et al. Deciphering the signaling mechanisms of the plant cell wall degradation machinery in *Aspergillus oryzae*. **BMC Systems Biology**, v. 9, n. 77, p. 1-20, 2015.

VARGA, J. et al. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 59, n. 2, p. 151-167, 2015.

VIVEK-ANANTH, R.P. et al. Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6617-6632, 2018.

VOYRON, S. et al. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. **Mycological Research**, v. 113, n. 10, p. 1027-1038, 2009.

WFCC. **Culture Collections Information Worldwide**. 2019. Disponível em: <http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/>. Acesso em: 20 Mar. 2019.

WU, L. et al. World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide. **Nucleic Acids Research** v. 45, p. 611-618, 2017.

YORDANOVA, A.; STOIMENOVA, E.; DONEV, T. Application of accelerated storage test to lyophilized plant viruses. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n. 12, 977-982, 1996.

ZHANG, M. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 160, p. 1407-1414, 2010.