# Análise química e genômica para a identificação de três espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus.*

**Regianne Ingrid C. Guedes.[1] (PG)[*], Artur Silva[2] (PQ), Maria Paula C. SCHNEIDER[2] (PQ), José Roberto V de Souza (PG), Mara S. P. Arruda (PQ), Maria Inês M. SARQUIS[3] (PQ), Alberdan S. SANTOS[1] (PQ). *E-mail: icascaes@yahoo.com.br***

[1]*Programa de Pós-Graduação em Química –DQ - CCEN - Universidade Federal do Pará; CEP: 66970-110*
[2] *Laboratório de Polimorfismo de DNA - CCB - Universidade Federal do Pará;*
[3] *Laboratório de Coleção de Fungos – FIOCRUZ – Rio de Janeiro*

Palavras Chave: *Aspergillus, Biologia molecular, Metabólitos.*

## Introdução

Fungos filamentosos apresentam grande potencial de produção de metabólitos de interesse farmacológico e biotecnológico. Em muitos casos, os taxonomistas têm dificuldades para determinar quais são as características que realmente definem uma espécie ou um gênero[1]. Nesse aspecto, técnicas moleculares (PCR-RFLPs, RAPD ou sequenciamento de genes) de classificação e identificação estão contribuindo para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos. Devido a mudança morfológica durante o cultivo da espécie *A. flavus* (IOC 3974), gerando uma nova espécie CFAB 078, optou-se por fazer uma identificação através da biologia molecular com o seqüenciamento de um fragmento nucleotídico do gene 18S e a análise das relações filogenéticas com outras unidades taxonômicas operacionais OTUs, *A. tamarii* (IOC 187) e *A. terreus* (IOC 217).Também foi quantificado a produção do metabólito secundário (5-hidroxi-2-hidrometil-?-pirona) produzido pelas espécies e dosagem de açúcares redutores totais, visando a identificação quimiotaxonômica.

## Resultados e Discussão

As amostras foram cultivadas em meio líquido CZAPECK (pH 5,5), a 29°C e 120 RPM por 4 dias. O DNA dos fungos foram isolados segundo Sambrook *et al.,* 1998[2]. A amplificação de 580 pb do espaçador da região 18S ribossomal foi feita via PCR em termociclador programado. O amplicon foi purificado com auxílio do kit GFX. Análises filogenéticas foram realizadas com auxílio do pacote PAUP. As árvores filogenéticas geradas através do método de máxima parcimônia e agrupamento de vizinhos apresentaram estrita concordância nos arranjos envolvendo todos os OTUs, gerando cladogramas com topologias iguais. Análise de bootstrap foi realizada no banco de dados com 2000 replicas, com o clado composto por *A. flavus* CFAB-078 e IOC-3974 permanecido unido em 98% das vezes na máxima verossimilhança e 100% das vezes na parcimônia. Alíquotas de 1mL foram retiradas a cada 24h por 15 dias, para análises quantitativas do metabólito por espectrofotometria UV/Vis (?=269nm), e açúcares redutores totais através do método do DNS, segundo Miller (1959)[3]. Os gráficos mostraram que a linhagem 3974 foi a que produziu maior quantidade da substância ?-pirona, sendo esta mais evidente a partir de 216 horas de cultivo (9º dia), quando uma boa porcentagem da sacarose já havia sido consumida. Há evidências de que no período decorrido até o início de produção do metabólito, o microrganismo direciona o seu mecanismo enzimático para produção de hidrolases e seqüencialmente de invertases para poder metabolizar os monossacarídeos presentes na sacarose[4].

Figura 1. Análise de parcimônia e máxima verossimilhança.

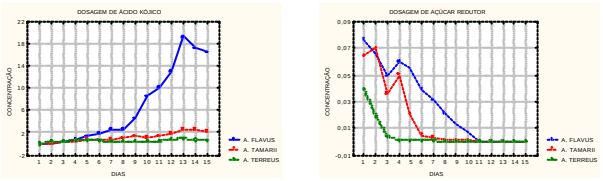


Figura 2: Parâmetros da produção do metabólito e consumo de açúcares redutores totais.

## Conclusões

Este estudo quimio-genético-taxonômico viabiliza uma identificação segura de fungos filamentosos utilizados na busca de metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Desta forma, este procedimento de identificação poderá nos assegurar a correta identificação da espécie estudada, evitando duvidas devido ao pleomorfismos de microorganismos pertencentes a este grupo.

## Agradecimentos

MCT, CNPq, CAPES, FINEP, pelo apoio financeiro.

[1]Guarro, J.; Gene'J.; Stchigel, A.M. Microbiology Reviews. 1999, 12:454-500.
[2] Santos, M.S. *2005*, Tese de Doutorado PA, UFPA. 210p.
[3]Miller, G. L. Anal. Chem. 1959, v. 11, p. 426-428.
[4] Ferreira, N. R. (2006). Dissertação de mestrado PA, UFPA, 102p.