

## Identificação de espécies do gênero *Aspergillus* por PCR-RAPD e caracterização do metabólito produzido.

Regianne I. C. Guedes.<sup>1</sup> (PG)\*, Rosemary M. P. Coutinho.<sup>1</sup> (PG), Savyo C. Souza<sup>1</sup> (PG), Fábio R. R. dos Santos<sup>1</sup> (PG), Kleber S. e Silva<sup>1</sup> (PG) Artur Silva<sup>2</sup> (PQ), Maria Paula C. SCHNEIDER<sup>2</sup> (PQ), Maria Inês M. SARQUIS<sup>3</sup> (PQ), Alberdan S. SANTOS, A<sup>1</sup> (PQ). E-mail: [icascaes@yahoo.com.br](mailto:icascaes@yahoo.com.br)

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Química –DQ - CCEN - Universidade Federal do Pará; CEP: 66970-110

<sup>2</sup>Laboratório de Polimorfismo de DNA - CCB - Universidade Federal do Pará;

<sup>3</sup>Laboratório de Coleção de Fungos – FIOCRUZ – Rio de Janeiro

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

### Introdução

Os fungos filamentosos são morfologicamente microrganismos complexos, podendo apresentar grande potencial de produção de metabólitos de interesse farmacológico e biotecnológico, além de ampla variedade fenotípica, causada por diversos fatores ambientais, dificultando a distinção de espécies intimamente relacionadas, bem como a identificação de raças dentro de cada espécie. 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 sequenciamento de um fragmento nucleotídico do gene 18S e a análise das relações filogenéticas com outras unidades taxonômicas operacionais OTUs. Também foi quantificado a produção do metabólito secundário (5-hidroxi-2-hidroximetil-?-pirona) produzido pelas duas espécies, bem como a identificação deste metabólito por RMN, visando a identificação quimiotaxonômica das espécies.

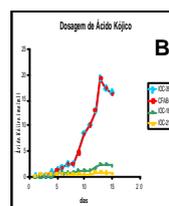
### Resultados e Discussão

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<sup>1</sup>. A amplificação de 580 pb do espaçador da região 18S ribossomal foi feita via PCR em termociclador programado. Análises filogenéticas foram realizadas com auxílio do pacote PAUP, gerando árvores filogenéticas que apresentaram estrita concordância nos arranjos envolvendo todos os OTUs, e cladogramas com topologias iguais, apresentando o clado composto por *A. flavus* CFAB-078 e IOC-3974 permanecendo unido em 98% das vezes na máxima verossimilhança. A análise do sequenciamento do DNA da região ITS e do gene ribossomal 18S revelou semelhanças que possibilitaram classificar as duas cepas de *A. flavus* como sendo da mesma espécie. Análise por espectrofotometria UV/Vis

(?=269nm) mostrou que ambas as linhagens 3974 e 078 produziram a 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<sup>2</sup>. A figura mostra os deslocamentos químicos do metabólito isolado comparado com o padrão, sendo, portanto a substância 5-hidroxi-2-hidroximetil-?-pirona.



RMN <sup>13</sup> C	Padrão (ppm)	Amostra IOC-3974 (ppm)	Amostra CFAB-078 (ppm)
2a	59,56	59,588	59,583
2	139,34	139,401	141,719
3	144,34	145,851	144,375
4	174,19	174,080	176,398
5	109,92	109,95	110,243
6	168,14	168,221	168,202



RMN <sup>1</sup> H	Padrão (ppm)	Amostra IOC-3974 (ppm)	Amostra CFAB-078 (ppm)
2H <sub>a</sub> e	4,292 e 4,279	4,288 e *	4,390 e *
2H <sub>b</sub>			
3H	6,336	6,336	6,451
6H	8,006	8,026	7,963

Fig. 1: A: aspecto morfológico; B: Produção do metabólito; e deslocamentos químicos

### Conclusões

Este estudo viabiliza uma identificação segura de fungos filamentosos utilizados na busca de metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Desta forma, este estudo quimio-genético-taxonômico assegura um procedimento de identificação correta da espécie estudada.

### Agradecimentos

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

<sup>1</sup> Santos, M.S. 2005. Tese de Doutorado PA, UFPA. 210p.

<sup>2</sup> Ferreira, N. R. (2006). Dissertação de mestrado PA, UFPA, 102p.