

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Nathalia de Castro Rollemberg

**Identificação de fungos em linhaça ( *Linum usitatissimum* ) utilizando as regiões  
ITS1 e ITS2 do gene ITS**

Florianópolis

2021

Nathalia de Castro Rollemberg

**Identificação de fungos em linhaça ( *Linum usitatissimum* ) utilizando as regiões  
ITS1 e ITS2 do gene ITS**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvani Verruck

Florianópolis

2021



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

ROLLEMBERG, NATHALIA

Identificação de fungos em linhaça (*Linum usitatissimum*)  
utilizando as regiões ITS1 e ITS2 do gene ITS / NATHALIA  
ROLLEMBERG ; orientadora, Silvani Verruck, 2021.

47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2. Metagenômica.  
3. Linhaça. 4. Fungos. 5. Sequenciamento Genético de Alto  
Desempenho . I. Verruck, Silvani. II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. III. Título.

Nathalia de Castro Rollemberg

**Identificação de fungos em linhaça ( *Linum usitatissimum* ) utilizando as regiões  
ITS1 e ITS2 do gene ITS**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Florianópolis, 4 de maio de 2021.

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Carolina de Oliveira Costa  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvani Verruck  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia Rezzadori  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília Miotto  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais, que não apenas possibilitaram que esta etapa da minha vida se concretizasse, como também me apoiaram durante toda a trajetória

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao nosso Criador pela vida cheia de saúde e pela determinação para a elaboração deste projeto.

Agradeço à minha família pela compreensão e ajuda em todos os momentos para que eu pudesse realizar este sonho.

Um agradecimento em especial à professora Silvani Verruck, por me orientar com muita dedicação, paciência, empatia e leveza, não me permitindo desistir perante os obstáculos surgidos no meio do caminho.

Agradeço carinhosamente às minhas amigas Andriéli e Bruna, por terem sido meu incentivo desde o início.

Aos professores que contribuíram para o meu crescimento dentro da Universidade.

Agradeço também a todos os envolvidos direta ou indiretamente que colaboraram de alguma forma.

E, por fim, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina pela excelente qualidade de ensino.

## RESUMO

A semente de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é conhecida por suas propriedades funcionais e presença de ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3). Contém ainda fibra solúvel e insolúvel, lignanas, ácidos fenólicos, flavonoides, ácido fítico, vitaminas e minerais. Todavia, a microbiota deste alimento pode ser foco de contaminação fúngica, interferindo na qualidade final. O objetivo deste trabalho foi identificar os fungos presentes em linhaça a granel através do gene ITS em uma abordagem metagenômica. A identificação fúngica foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho da região ITS1 usando os primers ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) com 300 ciclos e sequenciamento single-end no equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). Foram encontrados seis gêneros e oito espécies de fungos na amostra de linhaça dourada analisada. O gênero *Aspergillus* se destacou com três espécies xerofílicas encontradas, *A. cibarius*, *A. Appendiculatus* e *A. amstelodami*. *Aspergillus cibarius* foi a mais abundante, porém não produz toxinas. O segundo gênero mais abundante foi *Wallemia*, com a espécie *W. muriae*. Este é um dos táxons de fungos com grande potencial xerofílico, sendo que algumas cepas podem produzir toxinas. A metagenômica revelou ser um método completo, rápido e eficiente, principalmente quando comparado a outros métodos como por exemplo, o de cultivo tradicional exercido em laboratório. O sequenciamento genético de alto desempenho é um importante aliado nas pesquisas, com o avanço tecnológico relacionado a segurança dos alimentos.

**Palavras-chave:** Metagenômica, Genômica, Linhaça, Fungos, Sequenciamento Genético De Alto Desempenho.

## ABSTRACT

Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) is known for its functional properties and presence of  $\alpha$ -linolenic acid (omega-3). It also contains soluble and insoluble fiber, lignans, phenolic acids, flavonoids, phytic acid, vitamins and minerals. However, the microbiota of this food can be the focus of fungal contamination, interfering with the final quality. The objective of this work was to identify the fungi present in bulk flaxseed through the ITS1 gene by using a metagenomics approach. Fungal identification was performed using the high performance sequencing of the ITS1 region using the ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA) and ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) primers with 300 cycles and single-end sequencing in the MiSeq Sequencing System equipment (Illumina Inc., USA). Six genera and eight species of fungi were found in the golden linseed sample. The genus *Aspergillus* stood out with three xerophilic species found, *A. cibarius*, *A. Appendiculatus* and *A. amstelodami*. *Aspergillus cibarius* was the most abundant, but it does not produce toxins. The second most abundant genus was *Wallemia*, with the species *W. muriae*. This is one of the fungi taxa with great xerophilic potential, and some strains can produce toxins (Walleminol and Walleminon). Metagenomics has proved to be a complete, fast and efficient method, especially when compared to other methods, such as traditional cultivation performed in the laboratory. High-performance genetic sequencing is an important ally in research, with technological advances related to food safety.

**Keywords:** Metagenomics. Genomics. Flaxseed. Fungi. Genetic Sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Semente de linhaça ( <i>L. usitatissimum</i> ) cortadas horizontalmente apresentando suas estruturas anatômicas externas (A) e internas (B). O lado da linhaça (A). O lado da linhaça (B).....	18
Figura 2 – Classificação dos grupos de fungos em diferentes estágios entre pré-colheita e pós-colheita A escala superior classifica os grãos quanto à $a_w$ relacionada com crescimento de fungos.....	20
Figura 3 - Técnicas recentes em estudos de microbiomas associados às plantas.....	22
Figura 4 – Abundância relativa (%) das espécies fúngicas identificadas em linhaça dourada via sequenciamento de alto desempenho do gene ITS.....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados taxonômicos dos fungos encontrados em linhaça dourada via sequenciamento de alto desempenho do gene ITS.....	30
Tabela 2 – Espécies fúngicas identificadas e quantificadas ( <i>reads</i> ) em linhaça dourada via sequenciamento de alto desempenho do gene ITS.....	32

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
3.1	LINHAÇA .....	16
3.2	FUNGOS E ARMAZENAGEM .....	19
3.3	IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS USANDO FERRAMENTAS GENÔMICAS .....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.1	AMOSTRAS .....	28
4.2	ANÁLISE METAGENÔMICA .....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
	REFERÊNCIAS.....	37

## 1 INTRODUÇÃO

Biodegradadores naturais, os fungos são de suma importância para a humanidade já que eles contribuem há muitos anos com a indústria alimentícia, auxiliando na produção de alimentos tais como queijos e pães e na indústria farmacêutica, principalmente na produção de antibióticos. No entanto, os fungos podem causar perdas econômicas no que diz respeito a deterioração e contaminação dos alimentos (SIDRIM; ROCHA, 2004; PUTZKE; PUTZEK, 2002). A contaminação de alimentos por fungos se dá de diversas formas, no entanto, a forma mais preocupante se deve ao fato de que alguns gêneros de fungos possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários, os quais apresentam características tóxicas (MIDIO; MARTINS, 2000). Estes metabólitos são chamados de micotoxinas e, quando presentes nos alimentos são causadores de efeitos adversos aos consumidores, chamados de micotoxicoses (MIDIO; MARTINS, 2000). Neste contexto, segundo a Organização para a Agricultura e a Alimentação (FAO), estima-se que cerca de 25% das culturas alimentares do mundo estejam contaminadas com micotoxinas, constituindo um problema de saúde pública (FAO, 2019).

O desenvolvimento dos fungos depende de vários fatores como composição do substrato, temperatura, teor de umidade, atividade de água, umidade relativa do ar, potencial redox e pH (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010). Além disso, práticas inadequadas de colheita e pós-colheita, ataque de insetos, períodos de seca, pouca fertilização e competição com outras culturas também podem favorecer o crescimento de fungos produtores de micotoxinas (MANU et al., 2019). Os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, que podem contaminar as mais diversas variedades de cereais. Estes fungos podem contaminar os cereais através do solo, ou ainda durante o plantio, colheita, secagem, transporte e armazenamento dos produtos (ISMAIEL; PAPENBROCK, 2015). Os fungos se desenvolvem melhor e se proliferam em substratos nutritivos como amendoim, milho, cevada, arroz, sorgo, trigo e linhaça. Seu crescimento e produção de toxinas pode ocorrer em todas as fases desde o campo até o armazenamento (GIORDANO, 2009).

A linhaça é considerada um alimento funcional devido a sua alta concentração de ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), fibras e lignanas, além de gerar um óleo rico em ômega-3. Utilizada para fins industriais como alimentos, rações e fibras, a linhaça é comercializada diretamente ou após processamento (BECHLIN et al., 2019; SINGH et al., 2011). Existem duas variações de

linhaça: a linhaça marrom e a linhaça dourada. A primeira é cultivada em regiões de clima quente, como o Brasil, enquanto a dourada prevalece em clima frio, como o norte dos Estados Unidos e Canadá. No entanto, ainda são poucos os estudos que identificam as espécies de fungos presentes em amostras de linhaça (NOVELLO; POLLONIO, 2012).

Muitas espécies de fungos são difíceis de cultivar em laboratório, uma vez que requerem necessidades específicas de crescimento. Torna-se cada vez mais evidente a inserção de técnicas sofisticadas para o entendimento dos microrganismos. Neste sentido, as amostras amplificadas sem a cultura dos microrganismos, através da abordagem metagenômica ou não, revelam uma diversidade extraordinária. Essa abordagem através da extração direta do DNA genômico, revelou novas espécies nunca antes encontrados pelos meios tradicionais de cultivo (LORENZ; SCHLEPER, 2002). Para identificar fungos através do seu genoma, iniciadores específicos são aplicados em determinadas regiões garantindo uma identificação extremamente confiável. As regiões ITS (Espaçador Transcrito Interno) do RNA ribossomal são regiões continuadas do DNA que auxiliam na organização filogenética e distinção de espécies fúngicas, sendo o mais utilizado para tal (ANDRADE, 2015). Com o avanço nas pesquisas sobre a comunidade microbiana, constatou-se a necessidade de uma resolução mais alta nas ferramentas utilizadas. A clonagem por PCR, o método de cultivo tradicional e o sequenciamento pelo método de Sanger foram substituídos pela tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS). NICOLAISEN *et al.* (2014) utilizaram a plataforma de pirosequenciamento 454 onde amplicons foram sequenciados pelo gene ITS1 dos fungos. Este foi o primeiro estudo onde NGS foi aplicado para descobrir fungos em grãos de cereais. Pesquisadores supõem que haveria uma comunidade microbiana muito mais diversificada através do NGS do que com outros exemplos de cultivo (NICOLAISEN *et al.*, 2014). Durante a elaboração deste projeto, cujo objetivo é identificar fungos presentes em linhaça a granel através do gene ITS em uma abordagem metagenômica, constatou-se que poucos estudos com este tema foram realizados. Desta forma, torna-se necessária uma investigação minuciosa para o conhecimento da microbiota fúngica de linhaça dourada através do sequenciamento de alto desempenho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os fungos presentes em linhaça dourada vendida a granel através do gene ITS e metagenômica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar o microbioma fúngico presente em amostra de linhaça comercializada à granel utilizando como base a região ITS1;
- Sequenciar geneticamente as amostras utilizando o sistema Diagnóstico Microbiológico Digital;
- Analisar o metagenoma através da plataforma Miseq da Illumina;
- Determinar os fungos prevalentes na amostra;
- Propor, com base nos resultados, formas de prevenção de desenvolvimento fúngico em amostras de linhaça à granel.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LINHAÇA

A linhaça (*Linum usitatissimum*) é uma planta herbácea com altura variando entre 30 a 130 cm, apresentando talos verticais, folhas estreitas e flores azuis, vermelhas ou brancas. Sua semente é brilhante e plana onde se encontra no interior de uma cápsula esférica (NOVELLO; POLLONIO, 2011). Utilizada para fins industriais como alimentos, rações e fibras, a linhaça é comercializada diretamente ou após o processamento. A planta pode ser usada quase que integralmente, pois fornece do caule uma fibra de alta qualidade com boa resistência e durabilidade. A sua semente tem coloração marrom ou amarelo-dourada, o que gera um óleo rico em ômega-3 além de conter níveis significativos de proteínas digeríveis. Contém ainda fibra alimentar solúvel e insolúvel, óleo de ácido  $\alpha$ -linolênico, lignanas, mucilagem ou goma, ácidos fenólicos, flavonoides, ácido fítico, vitaminas e minerais. A linhaça é considerada um alimento funcional devido a sua alta concentração de ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), fibras e lignanas. Todos esses compostos são valiosos no que se refere à melhoria da saúde dos consumidores e pelos efeitos positivos observados (BECHLIN *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2011).

O ácido  $\alpha$ -linolênico é fundamental para função celular natural e atua como precursor na síntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFAs). Em razão de não serem sintetizados pelo organismo humano, os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, necessitam ser obtidos através da dieta (YOU DIM; MARTIN; JOSEPH, 2000). Contudo, o ácido  $\alpha$ -linolênico presente no óleo de linhaça além de ser o mais abundante, também confere instabilidade oxidativa. Pesquisadores encontraram uma alternativa para a redução desta instabilidade com desenvolvimento de linhagens de baixo teor de ácido  $\alpha$ -linolênico. Com isso a linhaça torna-se menos sujeita à oxidação rápida, expandindo o potencial de mercado para o óleo de linhaça (VRINTEN *et al.*, 2005).

Fibras e sementes são os produtos primordiais do linho. Durante muito tempo essa planta de dupla utilidade foi usada pela sociedade humana. A fibra originada da haste possui grande durabilidade e resistência. Das sementes é extraído um óleo rico em ácidos graxos (ômega-3), lignanas e proteínas digeríveis. A linhaça, além do mais, é fonte de proteínas e fibras

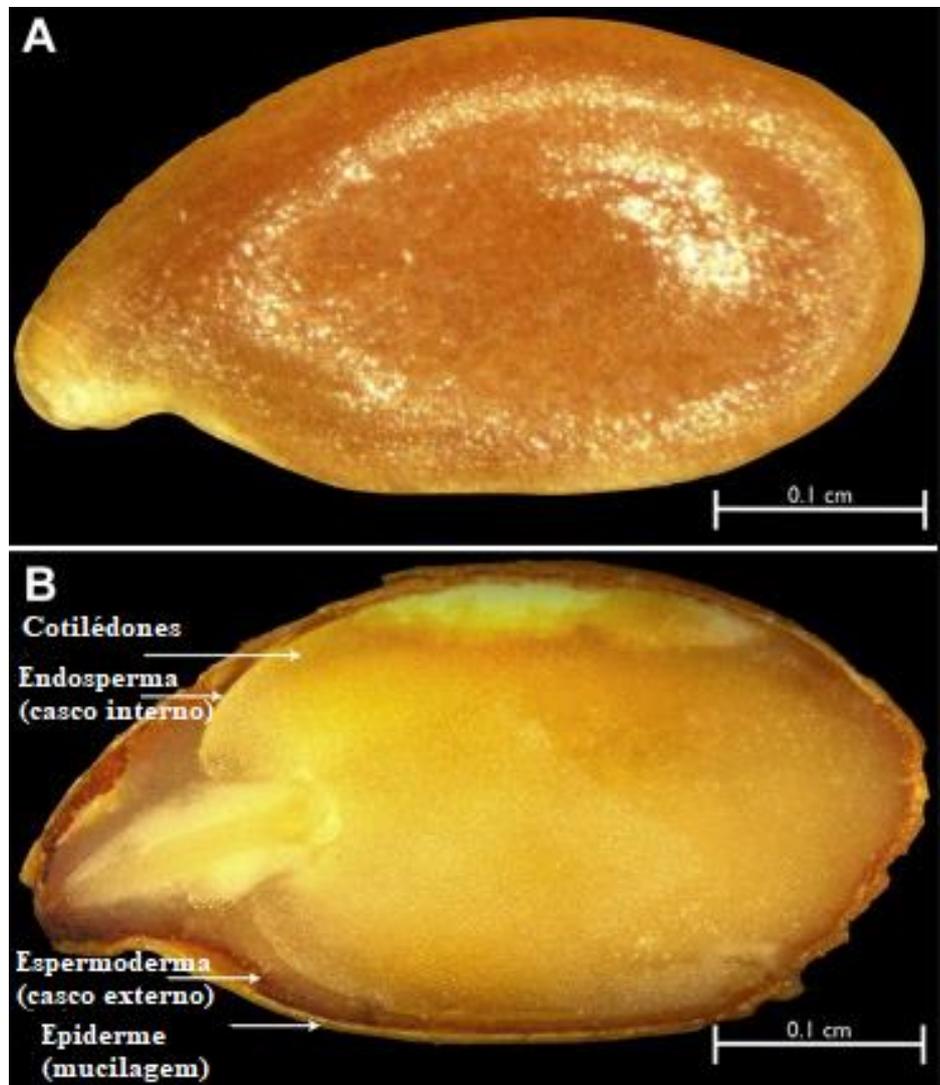
solúveis de qualidade superior e dispõe de um potencial significativo de compostos fenólicos. Deste modo, a linhaça se tornou uma das culturas oleaginosas mais relevantes para fins industriais (SINGH *et al.*, 2011).

Contudo, as adversidades relacionadas ao processo e cultivo do linho, as fibras de algodão mais resistentes e mais acessíveis financeiramente, qualidade incerta, a oxidação do óleo da linhaça e a inserção do óleo de canola no mercado, contribuíram para o decréscimo do linho no mercado global. Dados de pesquisa, porém, constataram que o linho disponibiliza benefícios múltiplos à saúde e no ramo industrial (ZUK *et al.*; 2015).

As formas de consumo são variadas, dentre elas: semente de linhaça integral ou triturada, óleo de linhaça, farinha de linhaça desengordurada moderadamente (usualmente por prensagem do expeller), farinha de linhaça desengordurada completamente (extração a partir de solventes), extratos de mucilagem de linhaça, casca de linhaça, oleossomos e extratos de álcool. Dentre essas formas, cada uma apresenta benefícios específicos à saúde. Os componentes bioativos estão presentes nesses produtos, porém existem relatórios desconsiderando a presença de uma diversidade de compostos bioativos nos segmentos de linhaça ou atribuem um efeito a um único componente da linhaça (SHIM, *et al.*, 2014).

Os efeitos ambientais e genotípicos (adaptação das culturas às estações regionais) interferem na proporção de rendimento do óleo de linhaça, que pode variar de 38 a 44% (OOMAH, MAZZA, 1997; UDEN *et al.*, 1994). O endosperma e a camada externa do revestimento compreende 1/5 do óleo total da semente, ou seja, 21,6%. O restante se divide entre cotilédones e eixo embrionário, como mostra na Figura 1, sendo presente em maior parte (75%) nos cotilédones (DORRELL, 1970).

**Figura 1** - Semente de linhaça (*L. usitatissimum*) cortadas horizontalmente apresentando suas estruturas anatômicas externas (A) e internas (B). O lado da linhaça (A). O lado da linhaça (B).



Fonte: Adaptado de SHIM *et al.* (1994).

O Canadá lidera no cultivo de linhaça visto que se encontra em área considerável ocupando 412.000 ha. Em segundo lugar está a Rússia com área de cultivo de 410.000 ha, seguida pelo Cazaquistão, com área de cultivo de 384.300 ha. O constante aumento na produção de linhaça também foi observado por dois países, Índia e China (ZUK *et al.*, 2015). A inserção do linho no Brasil iniciou no século VXII na cidade de Florianópolis e expandiu-se para São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. A região do Rio Grande do Sul é a maior produtora de

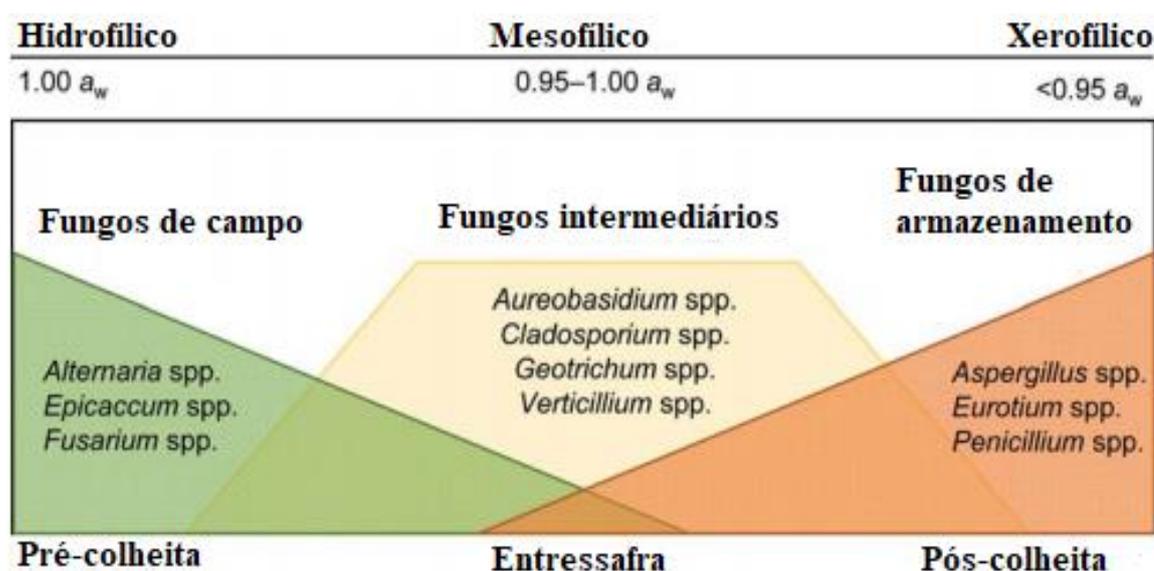
linhaça do país. A produção total do Brasil é de apenas 21 toneladas/ano. No entanto, na América do Sul, o cultivo da linhaça em maior escala está na Argentina, com 80 toneladas/ano (LIMA, 2007). Além disso, apenas 2% dos brasileiros reconhecem a linhaça como auxiliar na manutenção da saúde. Todavia, acredita-se que o consumo da semente de linhaça cresça em média 10% ao ano. Supõe-se que os EUA e Canadá tenham uma demanda de dez à vinte vezes maior que o Brasil (NOVELLO; POLLONIO, 2011).

### 3.2 FUNGOS E ARMAZENAGEM

Os fungos que invadem sementes e grãos são divididos em dois grupos: aqueles que produzem toxina antes da colheita, também conhecido como “fungos de campo” e aqueles que se desenvolvem durante o armazenamento que são os “fungos de armazenagem”. Entretanto, sabe-se que a origem exata de ambos é o campo. Contaminação fúngica antes da colheita é regida, sobretudo pelos fungos hospedeiros das plantas e outras interações biológicas, enquanto o surgimento dos fungos na pós-colheita se deve aos fatores físicos (umidade e temperatura) e bióticos (insetos) (MILLER, 1995). Manna e Kim (2017) dividiram em três grupos, conforme pode ser observado na Figura 2: os fungos de campo onde estão inclusas as espécies do gênero *Alternaria* e *Fusarium*; o segundo grupo, compreendido pelos fungos de armazenamento, estão as espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*; e o terceiro grupo fúngico intermediário, composto pelas espécies do gênero *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma* as quais se desenvolvem durante o armazenamento em elevada  $a_w$ .

Grãos e sementes armazenados enfrentam alguns problemas, como o crescimento fúngico e a consequente produção de toxinas. Há perda do poder germinativo e de matéria seca, além de alteração do valor nutricional (LIMA, 2000). A deterioração do grão se inicia com o aumento da umidade devido à condensação da água pelo efeito de “contato de parede fria”, principalmente com estruturas metálicas, e pelo surgimento de um “ponto quente” por uma carga de grão com teor de umidade com nível superior ao limite para um armazenamento seguro (FLEURAT-LESSARD, 2017).

**Figura 2** – Classificação dos grupos de fungos em diferentes estágios entre pré-colheita e pós-colheita. A escala superior classifica os grãos quanto à  $a_w$  relacionada com crescimento de fungos.



Fonte: Adaptado de MANNAA e KIM (2017)

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, que podem infectar grãos através de fungos filamentosos, presentes tanto na colheita quanto no armazenamento. Estudos apontam a possibilidade do método de cultivo influenciar diretamente na produção de micotoxinas, além da umidade, temperatura, danos causados por insetos e condições inadequadas de armazenamento (KIRINCIC, *et al.*; 2015).

Gruzdeviene *et al.* (2006) analisaram a contaminação da semente de linhaça na colheita e durante o armazenamento. Foram encontrados fungos do gênero *Alternaria* e *Fusarium*, sendo estes os predominantes. Os autores observaram o desenvolvimento fúngico durante oito meses no local de armazenamento. Houve um aumento da contaminação interna e externa por propágulos fúngicos. Via de regra, a quantidade de micotoxinas constatadas na

semente de linhaça de algumas cultivares foram muito baixas, contudo um grande aumento de micotoxinas foi observado durante o armazenamento. Na etapa de armazenamento o nível de contaminação pelos fungos pode variar principalmente pelos fatores como umidade, variações de temperatura, etc. Sendo que a temperatura de estocagem não exceda 15 °C e tenha umidade do ar próximo a 40%. Paul *et al.* (1991) complementa os fatores que implicam no crescimento de fungos na semente de linhaça; o genótipo da planta hospedeira, o cultivar, a época da semeadura, sua densidade e a safra anterior.

A RDC nº 487, de 26 de março de 2021, através da IN nº 88 de 26 de março de 2021, estabelece limites máximos de micotoxinas (metabólitos fúngicos) entre categorias de alimentos, bebidas e matéria-prima para aflatoxinas, ocratoxina, desoxinivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona (BRASIL, 2021a; BRASIL, 2021b). A multiplicação de fungos toxigênicos especialmente do gênero *Aspergillus* sp. se intensifica devido às características químicas da linhaça, pois é um alimento rico em ácidos graxos poliinsaturados. Estes fungos são produtores de esporos que se propagam pelo ambiente/alimento (MARQUES *et al.*, 2011). Além disso, fatores como temperatura e umidade influenciam na produção de micotoxina, através do desenvolvimento de espécies de fungos toxigênicos. Em um alimento contaminado por fungos toxigênicos, não necessariamente significa que há a presença de toxinas, contudo existe um potencial risco de uma possível contaminação através das micotoxinas (ALMEIDA *et al.*, 2005).

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS USANDO FERRAMENTAS GENÔMICAS

Alguns microrganismos podem ter dificuldade de serem cultivados em laboratório. A metagenômica avalia os materiais genéticos diretamente de amostras do ambiente, com a intenção de aprimorar o conhecimento microbiano global direcionando pesquisas para a área biotecnológica. No solo existe uma ampla biodiversidade de espécies, ainda desconhecidas. Em razão disso, a utilização da metagenômica tem se caracterizado de forma a despertar o entendimento a partir do sinergismo entre as espécies do microbioma. Nas análises de genes como os RNAs ribossômicos 16S rRNA, 18S rRNA e da região ITS os microrganismos são comparados e classificados taxonomicamente. O processo é rápido contrapondo com métodos

tradicionais de cultivo e é considerado um importante aliado nos estudos com avanço tecnológico (GOULART; OMORI; SOUZA, 2013)

Para a melhor compreensão da biodiversidade estrutural, ecológica e funcional, o estudo do genoma em amostras ambientais tem se mostrado uma ferramenta muito importante. A junção da análise de dados de sequenciamento de próxima geração com uma ferramenta computacional apropriada é essencial para a investigação metagenômica. Amostras de DNA são estudadas diretamente do ambiente, contudo foi relatado dificuldades na separação microrganismos/DNA da planta. Como o DNA da planta predomina, seu isolamento diante do microrganismo endofítico faz-se dificultoso (FADIJI; BABALOLA, 2020).

Os fungos foram mantidos em segundo plano em estudos envolvendo metagenômica devido às dificuldades envolvidas nesta análise. Pesquisadores com a intenção de solucionar este obstáculo, adotaram o sequenciamento de DNA utilizando um marcador do cistron do rRNA na região ITS1. Com essa descoberta pode-se identificar diversas espécies fúngicas em amostras através da abordagem metagenômica (SCHOCH *et al.*, 2012). A Figura 3 retrata os métodos ômicos e moleculares para o entendimento da diversidade de microbiomas de grãos e cereais.

**Figura 3** - Técnicas recentes em estudos de microbiomas associados às plantas.



Fonte: Adaptada de Fadiji e Babalola (2020).

Dentre os cereais mais cultivados em regiões temperadas, estão o trigo (*Triticum aestivum*), a cevada (*Hordeum vulgare*), a aveia (*Avena sativa*), o centeio (*Secale cereale*) e o triticale (*Triticum x Secale*). Existe a necessidade de um controle rígido sobre os patógenos fúngicos vez que causam infecção nas plantas através das folhas resultando na perda de produção. O tratamento utilizado para que referida perda não ocorra, é através do uso de fungicida como acontece nas safras de trigo e cevada no norte da Europa. Nas espécies de cereais citadas anteriormente foram encontradas comunidades microbianas influenciadas pelo genótipo do hospedeiro e por fatores ambientais (SAPKOTA *et al.*, 2015).

Algumas espécies de fungos são de grande importância na área de alimentos e para produção de antibióticos. Eles representam um dos principais reinos eucarióticos. Estima-se que existam milhões de espécies desconhecidas de fungos, sendo apenas uma pequena parte caracterizada. O uso de sequenciamento de ácido nucléico a partir de uma amostra em que não há conhecimento prévio das espécies, teve grande valor para o estudo de espécies isoladas e suas interações em um microbioma (DONOVAN *et al.*, 2018).

Em razão de certas dificuldades encontradas no cultivo de fungos, pesquisadores estão retomando seus estudos na utilização de sequenciamento de DNA, contribuindo ainda para os estudos de metagenômica. A região ITS é um marcador de DNA utilizado para identificação da variedade de espécies de fungos através de sequenciamento de amplo espectro (FADIJI; BABALOLA, 2020). Pesquisadores têm empregado o sequenciamento 454 da região ITS1 de fungos presentes em cereais (SAPKOTA *et al.*, 2015). As espécies microbianas das plantas formam uma rede complexa, todavia o papel de cada componente se distingue da funcionalidade do microbioma total (KHAN *et al.*, 2019). Além disso, o genótipo de uma planta é considerado o fator principal tratando-se de abundância do microbioma. Os tipos de solo influenciam diretamente na estrutura da comunidade bacteriana e na sua diversidade (BABALOLA *et al.*, 2020).

Em um estudo sobre identidade de fungos em grão de trigo, foram encontrados 10 gêneros através das sequências no conjunto de dados (NICOLAISEN *et al.*, 2014). As OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) foram classificadas pelos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Pyrenophora*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Microdochium*, *Phoma*, *Sphaeosphaeria* e *Stemphyllium*. Para alcançar uma identificação mais desenvolvida a nível de

espécie, foi preciso seguir um direcionamento a partir de sequências ITS1 com diferentes espécies de gêneros iguais do NCBI GenBank (banco de dados). Foram classificadas 204.421 sequências sendo 98,4% Ascomycetes e 1,5% Basidiomycetes. Entre as OTUs mais abundantes neste trabalho estavam *Fusarium* spp., *Didymella exitialis*, *Microdochium nivale*, *Pyrenospora tritici-repens*, *M. graminicola* e *P. nodorum* classificadas como patógenos do trigo. Poucos grupos do gênero *Fusarium* puderam ser caracterizados devido a uma homogenia entre as sequências da região ITS. No grupo identificado como OTU 1, as mais relevantes foram *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* e *F. cerealis* sendo classificado como o grupo mais abundante de todos os conjuntos de dados com 23,3% do total de sequências (NICOLAISEN *et al.*, 2014).

Através de fungos entomopatogênicos, pesquisadores isolaram cepas e analisaram cinco tipos de grãos de cereais, ou seja, milho, arroz branco, trigo, centeio e sorgo (MAR *et al.*, 2012). As regiões ITS do rDNA nuclear foram amplificadas por PCR com iniciadores (*primers*) ITS4 e ITS5. Encontrou-se 2 isolados de *Beauveria bassiana* e 1 isolado de cada uma das espécies a seguir *Metarhizium flavoviride*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus* e *Isaria tenuipes*. Entre todos os grãos avaliados, o milho teve o maior índice de crescimento do fungo e centeio foi o mais baixo com exceção de *P. lilacinus*, que obteve maior virulência contra *Bactrocera* spp. (MAR *et al.*, 2012).

Em outro estudo utilizando cinquenta amostras de grãos de cereais e seus derivados (trigo, arroz, farinha de trigo e milho, amido), foram coletadas na região do Cairo e El-Gharbia, no Egito (EL-RABBAT *et al.*, 2018). Os iniciadores que amplificaram a região do espaçador transcrito interno foram ITS1: 5'- TCTGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3. Realizou-se diluições após a inoculação das amostras e relatou-se certas espécies de fungos pertencentes a *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* e *Trichoderma*. As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* foram mais abundantes que *Trichoderma* e *Fusarium*. Foram identificadas morfologicamente 18 espécies de *Fusarium*, com exceção de duas cepas de *F. solani*. Para estas, métodos moleculares contribuiriam para uma correta identificação. O marcador genético ITS de fungos é utilizado por muitos pesquisadores quando se trata de identificação de cepas, filogenia e identificação de espécies. Em um estudo posterior, a partir das ampliações das regiões ITS rDNA foi isolado *Fusarium*

*sp* de grãos de trigo. *F. sporotrichioides* foi identificado utilizando a região ITS rDNA, ao passo que outras técnicas como, microscópicas e morfológicas não foram capazes de distinguir as cepas (EL-RABBAT *et al.*, 2018).

Seis gêneros de fungos foram detectados em grãos de trigo na região de Riade - Arábia Saudita, com trinta e um isolados (MAHMOUD e SHEHATA, 2017). O gênero predominante foi *Fusarium* com treze isolados, *F. verticillioides* (4), *F. culmorum* (3), *F. proliferatum* (2), *F. gramineaum* (2), *F. chlamydosporum* (1), *F. oxysporum* (1). Na região de Dammam, a predominância fúngica foi igualmente do gênero *Fusarium* (33,3%) contrapondo com *Aspergillus* 14,3% e *Penicillium* 9,5%. Sete espécies de *Fusarium* foram encontradas *F. proliferatum* (2) *F. oxysporum* (2), *F. verticillioides* (1) *F. chlamydosporum* (1) e *F. culmorum* (1). Os gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* dominaram os grãos de trigo com 21,7% de frequência em Abba, contrastando com *Aspergillus* 14,3% e *Penicillium* 9,5%. As seis espécies de fungos foram sequenciadas a partir das regiões ITS-rDNA e amplificadas por PCR com os iniciadores ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG3 ') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 ') (MAHMOUD e SHEHATA, 2017).

A próxima investigação foi sobre detecção de micotoxinas e microbiota toxigênica em cereais utilizados como ração animal no mercado do Catar - Ásia continental (HASSAN *et al.*, 2018). Os cereais mistos (20 e 14%) e o milho (29 e 50%) ultrapassaram o limite permitido para Aflatoxinas (AFs) e Ocratoxina A (OTA) na União Européia. Foram identificadas OTA e AFs respectivamente em milho 40 e 70%, em mostras de trigo e farelo de trigo 60 e 40% e em cereais mistos 44 e 94%. As amostras misturadas de cereais, milho e cevada obtiveram uma co-contaminação (44, 40 e 50%) com AFs e OTA. O gênero *Aspergillus* foi dominante em diversas amostras. Utilizando os iniciadores de PCR, constatou-se que as espécies de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkia* foram as mais prevalentes em cereais mistos com carga fúngica de  $3 \times 10^3$  unidades formadoras de colônia/g. As espécies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius* e *A. niger* isolados, não produziram AFs ou OTA mesmo dispondo de genes micotoxigênicos. A detecção de genes micotoxigênicos não necessariamente resulta na produção de micotoxinas por todas as cepas. Isto ocorre devido à produção de micotoxinas requerer condições específicas, entre elas de aw, umidade relativa e temperatura. Não se torna possível distinguir isolados toxigênicos do

complexo de espécies contaminantes. A contaminação através de fungos micotoxigênicos e das próprias micotoxinas obteve níveis altos nas amostras de milho e cereais mistos quando usados na ração animal (HASSAN *et al.*, 2018). Em um trabalho seguinte Hassan *et al.* (2019) investigaram micotoxinas e a presença de fungos *Fusarium* em rações comercializadas na região de Catar. A maior contaminação com *Fusarium* ocorreu em cereais mistos, depois em milho e trigo, respectivamente. De acordo com os resultados de PCR, a espécie *F. verticillioides* apresentou a mais alta distribuição de frequência, com 34%, seguida por *F. graminearum* com 16%, *F. oxysporum* 15%, *F. proliferatum* 13%, *F. culmorum* 8%, *F. solani* 7%, *F. subglutinans* 4% e *F. avenaceum* com 3%. O resultado dos isolados de *F. graminearum* e *F. culmorum* mostrou acúmulo de deoxinevalenol (DON) por meio de arroz. O segundo, ainda produziu zearalenona (ZEN) em meio de cultura contaminado de forma artificial. Também foi constatada a produção de micotoxinas (fumonisinas) *in vitro* em todos os isolados de *F. verticillioides*. Assim sendo, o estudo comprova a existência de fungos toxigênicos e suas micotoxinas na em cereais usados na alimentação humana e animal (HASSAN *et al.*, 2019).

Jedidi *et al.* (2018) avaliaram a micoflora da cevada, do trigo e do milho, com ênfase nas espécies micotoxigênicas *Fusarium* e *Aspergillus*. Os cereais mencionados obtiveram amostras recém-colhidas e amostras armazenadas que foram coletadas na Tunísia (país em que estes cereais são altamente consumidos) e cultivadas para identificação de fungos. As espécies de *Fusarium* e *Aspergillus* foram caracterizadas por ensaios de PCR específicos para espécies e complementados com o sequenciamento de DNA. Os fungos isolados mais encontrados no trigo foram *Alternaria*, com 70,83%, *Eurotium* com 62,50%, *Aspergillus* 54,17% e *Penicillium* 41,67%. Os gêneros mais recuperados da cevada foram *Penicillium* com 75%, *Aspergillus* 70%, *Eurotium* 65% e *Alternaria* 65%. Os gêneros prevalentes no milho foram *Aspergillus* com 76,19%, *Eurotium* 42,86% e *Penicillium* 38,09%. Amostras de grãos armazenados e colhidos recentemente mostraram a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*. Foi constatado que a contaminação com *Aspergillus*, *Fusarium* e *Alternaria* foi maior nas amostras recém-colhidas, enquanto a contaminação das espécies de *Penicillium* foi maior nas amostras armazenadas. As principais espécies de *Aspergillus* encontradas foram *A. niger* e *A. flavus*. As espécies de *Fusarium* encontradas foram *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. nygamai* e *F. oxysporum*. Esta pesquisa mostra que existe o risco potencial para as aflatoxinas e, em menor escala, para a ocratoxina A em cereais (JEDIDI *et al.*, 2018).

Haarith *et al.* (2019) extraíram o DNA da microbiota de soja e amplificaram a região ITS por PCR com os primers ITS1 e ITS4. Os fungos mais abundantes totalizaram em 79% com 14 gêneros encontrados. Esses gêneros eram pertencentes à classe Sordariomycetes (*Clonostachys*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Ilyonectria*, *Mariannaea*, *Neonectria* e *Pochonia*), Dothideomycetes (*Alternaria*, *Phoma*, *Paraphoma*, *Setophoma* e *Leptosphaeria*), Exotiomycete (*Exotiomycete*), Eurotiomycete (*Exotiomycete*), Mortierelomicotina (*Mortierella*) (HAARITH *et al.*, 2019).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA

Uma amostra de linhaça dourada (500g) comercializada a granel foi obtida no comércio local de Florianópolis, SC, Brasil (27° 35' 49" S 48° 32' 56" O). A amostra foi mantida em sua embalagem de veiculação até o momento da análise, em temperatura ambiente.

### 4.2 ANÁLISE METAGENÔMICA

A identificação de fungos foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho da região ITS1. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada amplificação com primers para a região ITS1, primer, ITS1 (GAACCGCGGGARGGATCA) (SCHMIDT *et al.*, 2013) e primer, ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (WHITE *et al.*, 1990). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento single-end. As sequências foram analisadas por meio do pipeline Sentinel.

No pipeline Sentinel os arquivos fastq foram avaliados quanto a qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). A seguir, os arquivos fastq foram submetidos à triagem de primers e sequências com baixa qualidade (Phred < 20). O software proprietário utilizado para tal finalidade foi construído em Python v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto BioPython (COCK *et al.* 2009).

Clusters com abundância menor do que 2, foram removidos das análises, pois tais estruturas normalmente são relacionadas a sequências quimeras (SMYTH *et al.*, 2010). As identificações taxonômicas foram realizadas com blastn v.2.6.0+ (ALTSCHUL *et al.*, 1990), usando como referência um banco de dados proprietário. Quanto a definição de uma espécie, dentre os 20 hits retornados para cada cluster, uma instrução em Python avalia se um dos três quesitos foram atendidos pelos hits: 1) maior bit-score; 2) menor e-value; e 3) taxonomias com maior representação.

Os hits que atenderam um dos itens anteriores, foram escolhidos como espécie representante, essas análises foram realizadas na plataforma computacional da Amazon, onde

a estrutura de bioinformática da Neoprosecta está hospedada. As análises de DMD Fungos, foram realizadas contra bancos de dados de referência para o gene ITS no banco de dados proprietário. O banco de sequências para os genes ITS, conta com sequências de genes completos (em sua maioria), os quais contém sequências recuperadas de genomas, não ambíguas e filtradas para sequências quimeras.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os dados taxonômicos dos fungos encontrados em linhaça dourada via sequenciamento de alto desempenho do gene ITS. Todas as espécies encontradas pertenciam ao reino Fungi, sendo que sete destas eram do Filo Ascomycota e uma do Filo Basidiomycota. Mamede (2012) relata que o primeiro apresenta uma vasta quantidade de fungos, como os leveduriformes, indispensáveis na indústria de alimentos. Já o segundo é composto por fungos mais evoluídos incluindo os cogumelos (cerca de 20% do total), além de produzirem esporos sexuados classificados como basidiósporos. Pesquisas recentes despontam que existem entre 17.500 e 20.000 espécies de fungos formadores de líquens, sendo 40% deste do filo Ascomycota. Os líquens são conhecidos por seus compostos secundários, muito utilizados em antivirais e antibacterianos (WANG *et al.*, 2014). Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos atribuem a eles vantagens de sobrevivência apresentando algumas propriedades antiproliferativas, catabólicas e antibióticas. Além disso, inúmeros *Ascomycetes* produzem metabólitos secundários em que se destacam as micotoxinas, fitotoxinas e alguns grupamentos que acentuam a virulência e a patogênese (HAGEE *et al.*, 2020).

O sequenciamento na plataforma *Illumina* gerou um total de 355 sequências (*reads*). Segundo Souza, (2015) *reads* são milhares de pequenos intervalos onde devem exibir homologia entre a transcrição do DNA em RNA. Os *short reads* são destinados à remoção dos adaptadores e das sequências de baixa qualidade. Já os *long reads* tem maior rapidez e lidam com grandes volumes de dados de sequenciamento e alta disponibilidade de informações espaciais de longo alcance (DILTHEY *et al.*, 2019). Com esta abordagem, a metagenômica permite o acesso a um amplo reservatório de diversidade genética e metabólica ainda inexplorado (DEMAIN, 2016).

Os fungos encontrados foram categorizados em quatro classes: Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Saccharomycetes e Wallemiomycetes. A classe Eurotiomycetes apresentou maior abundância na amostra analisada (54,37%), contemplando a ordem Eurotiales, da família Aspergillaceae e o gênero *Aspergillus* neste estudo. A classe dos Eurotiomycetes é considerada uma das mais numerosas da atmosfera, sendo conhecida também como produtora de enzimas e metabólitos secundários essenciais (SRIVASTAVA *et al.*, 2014). Steenwyk *et al* (2018) informa que a evolução dos membros da Aspergillaceae requer uma estrutura filogenética mais

desenvolvida pois existem mais espécies de outro gênero, como *Penicillium*, além do *Aspergillus* presentes nesta família.

A segunda classe com maior abundância foi Wallemiomycetes (11,83%), com a presença da ordem Wallemiales e do gênero *Wallemia*. Em seguida a classe Dothideomycetes (6,48%) foi representada pela ordem Pleosporales, família Pleosporaceae e gênero *Alternaria*, e também pela ordem Cladosporiales família Cladosporiaceae e gênero *Cladosporium*. Por fim a classe Saccharomycetes (1,41%) foi representada pela ordem Saccharomycetales, família Saccharomycodaceae e dois gêneros fúngicos distintos, ou seja, *Hanseniaspora* e *Zygosaccharomyces*. Além disso, através do sequenciamento da região ITS1 e ITS2 não foi possível identificar 25,92% das sequências encontradas. Sendo assim, é possível inferir que outras regiões, como ITS3, ITS4 ou ITS5 devam ser sequenciadas em conjunto, em uma abordagem *multilocus*, para que se consiga identificar as demais espécies encontradas.

**Tabela 1** – Dados taxonômicos dos fungos encontrados em linhaça dourada via sequenciamento de alto desempenho do gene ITS.

<b>Reino</b>	<b>Filo</b>	<b>Classe</b>	<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Gênero</b>
Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>
Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Cladosporiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium</i>
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora</i>
Fungi	Basidiomycota	Wallemiomycetes	Wallemiales	undentified	<i>Wallemia</i>
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	<i>Zygosaccharomyces</i>

Fonte: A autora.

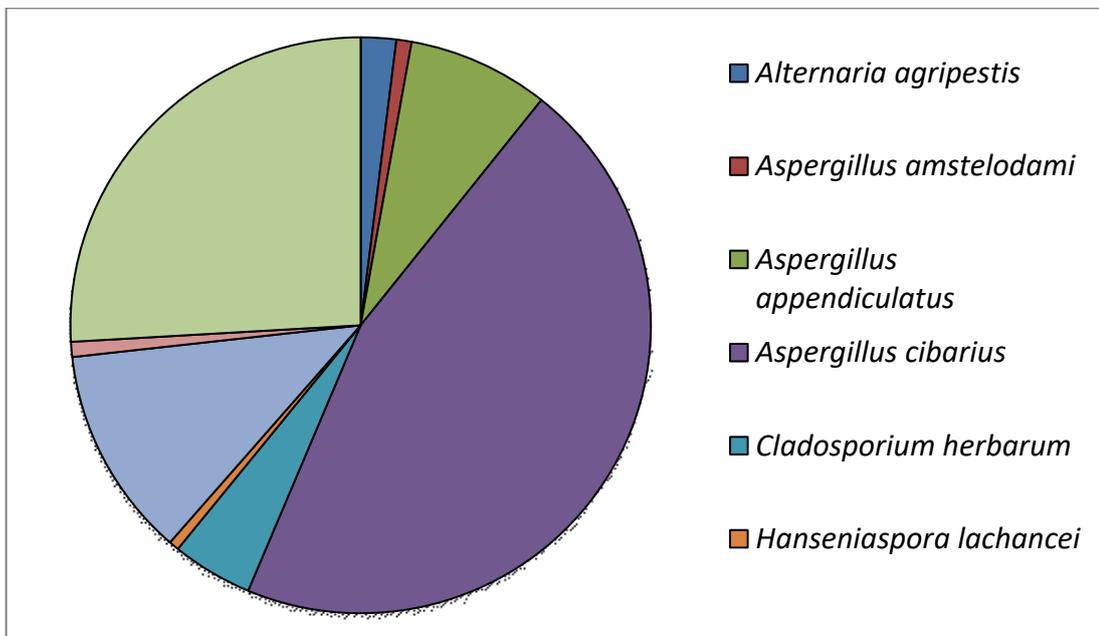
O total de sequências identificadas para espécies de fungos em linhaça dourada então apresentadas na Tabela 2. A identificação de espécies em linhaça dourada indicou a presença de *Aspergillus cibarius* como predominante, tendo a mais alta abundância relativa (45,63%) entre as oito espécies (Figura 4). Bal *et al.* (2016) encontraram 33.157 sequências do gene ITS em trigo Nuruk A sendo este dominado pelos gêneros *Aspergillus* e *Mucorales*. Durante um longo processo de fermentação de 30 dias em trigo Nuruk A, a espécie *A. cibarius* aumentou 10 vezes mais a partir do dia 10, comparando com o dia 6, sendo uma das espécies mais favoráveis para essa fermentação. *Aspergillus* são conhecidos pela capacidade de se desenvolver em substratos com baixa atividade de água. Eles produzem um amplo espectro de metabólitos secundários, porém quando se trata de aflatoxinas, ocratoxinas, esterigmatocistina e gliotoxina, há controvérsias. Faltam estudos mais aprofundados das espécies isoladas taxonomicamente. Em outro estudo, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus cibarius*, *Gibberella fujikuroi*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Rhizopus arrhizus* foram as espécies dominantes encontradas em massa fermentada à base de sorgo (kisra) (ELTAYEB; ELTIGANI; TANIGUCHI, 2020). *A. flavus* e *A. parasiticus* são reconhecidamente produtores de metabólitos secundários (micotoxinas), ou seja, produzem aflatoxinas que são hepatotóxicas e carcinogênicas. No entanto, os autores identificaram na amostra de sorgo com abóbora, *A. cibarius* como não produtores de micotoxinas não apresentando então, toxicidade aos seres vivos (FORWOOD *et al.*, 2021). A quantificação em *reads* da linhaça dourada para essa espécie foi a mais alta entre as oito encontradas. Diante disso, é possível inferir que não há presença de metabólitos secundários tóxicos aos seres humanos produzidos por esta espécie específica. Por outro lado, também foram identificadas as espécies *Aspergillus amstelodami* e *Aspergillus appendiculatus*. A espécie *A. appendiculatus* foi registrada a primeira vez em esterco de ovelha, linguiça defumada e grãos armazenados, estes por sua vez, geram impacto economicamente a partir da deterioração durante a armazenagem (HUBKA *et al.*, 2013). Até o momento, estas espécies também não foram relacionadas a produção de micotoxinas, porém é preciso mais investigações na área (Klich *et al.*, 1984; Midio e Martins, 2000; Pitt, 2006; Pitt e Hocking, 2009; Pitt *et al.*, 2012).

**Tabela 2** – Espécies fúngicas identificadas e quantificadas (*reads*) em linhaça dourada via sequenciamento de alto desempenho do gene ITS.

<b>Espécie identificadas</b>	<b>Número de <i>reads</i></b>
<i>Alternaria agripestis</i>	7
<i>Aspergillus amstelodami</i>	3
<i>Aspergillus appendiculatus</i>	28
<i>Aspergillus cibarius</i>	162
<i>Cladosporium herbarum</i>	16
<i>Hanseniaspora lachancei</i>	2
<i>Wallemia muriae</i>	42
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3
uncultured fungus	92

Fonte: A autora.

**Figura 4** – Abundância relativa (%) das espécies fúngicas identificadas em linhaça dourada via sequenciamento de alto desempenho do gene ITS.



Fonte: A autora.

A espécie que apresentou a segunda maior abundância relativa na amostra foi *Wallemia muriae*, representando 11,83% do total. A tolerância pelo substrato de baixa atividade de água é rara no filo Basidiomycota, ao qual *W. muriae* pertence, porém testes indicaram *Wallemia* como um dos táxons de fungos com características xerofílicas. Para caracterizar sua morfologia e xerotolerância, criou-se a proposta de uma nova classe, a Wallemiomycetes (ZALAR, *et al.* 2005). Segundo Zajc e Gunde-Cimerman (2018) o gênero fúngico *Wallemia* compreende as espécies mais xerotolerantes, xerofílicas e também halofílicas do mundo. *Wallemia* spp. são encontrados em vários ambientes osmoticamente desafiados, como alimentos salgados ou muito açucarados, alimentos secos (como sementes), águas hipersalinas, cristais de sal, ar interno e externo e aerossóis agrícolas. *W. muriae* foi recentemente reconhecidas para o gênero *Wallemia*, e está comumente associada a alimento (ZAJC; GUNDE-CIMERMAN, 2018). Algumas cepas de *Wallemia*, incluindo *W. muriae*, produzem as toxinas walleminol e walleminon que podem causar infecções subcutâneas e problemas alérgicos em humanos (ZALAR, *et al.* 2005). No entanto, é a primeira vez que a presença dessa espécie em sementes de linhaça dourada foi descrita. Zajc e Gunde-Cimerman (2018) relatam que esta espécie é difícil de ser isoladas por meios tradicionais de cultivo uma vez que tem a demanda obrigatória de aw reduzida em seus habitats, pois crescem apenas em meios suplementados com solutos adicionais como sais e açúcares. Sendo assim, a identificação molecular pode ser um avanço no estudo deste gênero em alimentos. Através do sequenciamento de alto desempenho em linhaça dourada também foi constatada a presença de *Alternaria agripestis* (1,97%) e *Cladosporium herbarum* (4,51%), das famílias Pleosporaceae e Cladosporiaceae, respectivamente. Pitt (2009) afirma que *Cladosporium herbarum* provoca a deterioração de frutas e vegetais frescos, maçãs armazenadas, amendoim, nozes, cereais, soja e maracujá. Espécies de *Cladosporium* foram encontradas por estes autores durante análise realizada durante dois anos quanto à micoflora na cevada, aveia e trigo, sendo o fungo predominante em 85% na cevada, 95% na aveia e 77% no trigo. Enquanto isso, Gruzdeviene *et al.* (2006) analisaram a infecção da semente de linhaça na colheita e durante o armazenamento, sendo que foram encontrados predominantemente fungos do gênero *Alternaria* e *Fusarium*, geralmente relacionados com a contaminação ainda no campo. Por fim as duas espécies da família Saccharomycodaceae foram encontradas na amostra de linhaça, ou seja, *Hanseniaspora opuntiae* (0,56%) e *Zygosaccharomyces rouxii* (0,85%). A presença de leveduras em sementes

como a de linhaça geralmente não são reportadas, visto que estas espécies predominam em processos fermentativos. Por exemplo, *Hanseniaspora* é o gênero mais abundante em uva, estando *H. opuntiae* presente em grande quantidade no início da fermentação do mosto (BOVO *et al.*, 2009). Enquanto isso, isolou-se cepas de *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Debaryomyces hansenii* e *Pichia burtonii* de amostras de massa Selroti (alimento de arroz fermentado). A fermentação de leveduras produz um gás que causa crescimento da massa (YONZAN, 2010). Geralmente *Z. rouxii* tem origem em compotas, concentrados de frutas, ameixas e tâmaras secas. Essa espécie se desenvolve melhor em baixa  $a_w$  e alto teor de açúcar (PITT, 2009). Yonzan (2010) ainda comenta que o restabelecimento dessa levedura em massas Selroti, seria devido ao acréscimo de açúcares e mel adicionados durante a preparação.

Destaca-se a importância da identificação e controle da contaminação fúngica nas amostras de linhaça e conseqüentemente na prevenção de ocorrência de metabólitos tóxicos como as micotoxinas. Neste contexto, para Hermann e Trigo-Stockli (2008) os fatores que mais influenciam na produção destas toxinas estão relacionados com as condições de armazenamento, sendo a umidade e a temperatura os fatores mais importantes, pois afetam tanto o crescimento fúngico quanto a produção de toxinas. Assim, as exigências de umidade podem variar entre as espécies de fungos, tanto no limite inferior de umidade de crescimento, quanto no intervalo sobre o qual irão predominar (DIAS, 2012). A temperatura é outro fator que afeta a armazenagem de grãos, sendo crucial a interação de fatores bióticos e abióticos que promovem a deterioração de grãos. Como o grão é comumente colhido seco ou pode ter seu teor de umidade reduzido a um nível de segurança, este passa a ter um papel menos importante do que a temperatura (D'ARCE, 2009). Desta forma, o conhecimento e entendimento do controle destas duas variáveis durante o armazenamento é de extrema importância, pois através do controle rígido dessas condições após a colheita reflete diretamente na segurança dos alimentos mais comumente comprometidos pelo desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas.

Vários autores estudando a influência da temperatura e da  $a_w$  no crescimento fúngico e na produção de micotoxinas chegaram à conclusão de que esses dois fatores são dependentes entre si (TSAI; YU, 1999). Além disso, através destes dois fatores é possível garantir um maior tempo de armazenamento de grãos com menor incidência de fungos e da presença de

micotoxinas (TSAI; YU, 1999; PITT, 2006). Dependendo da espécie fúngica em questão, a temperatura ou a quantidade de água presente vai ser um fator de maior influência e, diversos trabalhos vêm sendo conduzidos com o objetivo de garantir cada vez mais a sanidade de produtos tais como grãos, cereais e oleaginosas ao ponto de vista de presença de micotoxinas (TSAI; YU, 1999; GARCIA, 2004; PITT, 2006). Em geral, sabe-se que quanto maior for a temperatura e maior o conteúdo de umidade dos grãos, menor é o tempo útil dos grãos em relação a proliferação fúngica (PITT, 2006; Sibamoto; Bjeldanes, 2011). Em contrapartida, quando se utilizam temperaturas intermediárias com teor de umidade também reduzido, o tempo de vida útil dos produtos aumentam consideravelmente (MIDIO; Martins, 2000).

De acordo com Midio e Martins (2000), grãos, cereais e oleaginosas quando armazenado a temperaturas próximas a 25 °C e umidade relativa do ar de 26% são adequados ao consumo por até uma semana. Em contrapartida, quando essa umidade, por exemplo, é reduzida para 18% e a temperatura para cerca de 5 °C, o tempo de armazenagem cresce chegando até 50 semanas, mostrando a elevada correlação entre esses dois fatores (MIDIO; MARTINS, 2000; PITT, 2006).

As micotoxinas já foram detectadas em vários cereais, oleaginosas e produtos processados tanto de origem vegetal como animal. Muitos desses alimentos podem ser monitorados quanto à contaminação fúngica, porém em alimentos termo-processados o monitoramento deve ser na etapa da matéria-prima. Matérias-primas de alto risco como o amendoim e o milho devem ser sempre avaliadas quanto à contaminação fúngica e presença de toxinas. Estudos demonstram um moderado risco de contaminação por micotoxinas em cereais matinais à base de milho por aflatoxinas e em cereais matinais à base de trigo por tricotecenos (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

Sendo assim, o controle do crescimento fúngico é de extrema importância para a obtenção de produtos adequados ao consumo humano. Conforme os estudos conduzidos nos últimos anos fica evidente que esse controle deve ser feito durante todas as etapas, desde o plantio, colheita, transporte e armazenamento. Sendo este último, uma das principais etapas onde o desenvolvimento fúngico pode ser controlado em semente de linhaça. Neste sentido, o controle de alguns fatores, tais como a temperatura e a  $a_w$  é de fundamental importância, buscando com isso constantemente uma adequada segurança dos alimentos que são consumidos pela população.

## 6 CONCLUSÃO

Dentre as espécies fúngicas encontradas, destacam-se três xerofílicas do gênero *Aspergillus* (*A. cibarius*, *A. amstelodami* e *A. appendiculatus*), sendo *A. cibarius* mais abundante. *Wallemia sp.* apresenta a segunda maior abundância na amostra, com a espécie *W. muriae*. Algumas cepas deste gênero podem ser potenciais produtoras de micotoxinas. A identificação destes fungos reflete diretamente na segurança dos alimentos, uma vez que muitos são produtores de micotoxinas prejudiciais à saúde humana/animal. A prevenção da contaminação de sementes (linhaça) se dá principalmente pelo controle de alguns fatores como temperatura e  $a_w$  durante o período de armazenamento. Além disso, o monitoramento das condições de todas as etapas, desde a colheita até o armazenamento é fundamental. A metagenômica se mostrou um método completo, rápido e eficiente, principalmente quando comparado aos métodos de cultivo fúngico tradicionalmente empregados nos laboratórios, sendo um importante aliado nos estudos com o avanço tecnológico relacionado a segurança dos alimentos que são consumidos pela população.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.P.; SABINO, M.; FONSECA, H.; CORREA, B. Potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* isolados de grãos de milho, da semeadura à colheita, provenientes das regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.1, p.79-84, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410,1990.

ANDRADE, H.F. **Caracterização molecular de fungos da micoteca/UFPE e screening da produção de taxol**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 56 p., 2015.

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

BABALOLA, O.O.; FADIJI, A.E.; ENAGBONMA, B.J.; ALORI, E.T.; AYILARA, M.S.; AYANGBENRO, A.S. The Nexus Between Plant and Plant Microbiome: Revelation of Networking Strategies. **Frontiers in Microbiology**, v.11, 2020.

BAL, J.; YUN, S.H.; YEO, S.H.; KIM, J.M.; KIM, D.H. Metagenomic analysis of fungal diversity in Korean traditional wheat-based fermentation starter nuruk. **Food Microbiology**. v. 60, p.73-83, 2016.

BECHLIN, T.R.; GRANELLA, S.J.; CHRIST, D.; COELHO, S.R.M.; VIECELLI, C.A. Evaluation of grain and oil quality of packaged and ozonized flaxseed. **Journal of stored products research**, v.83, p.311-316, 2019.

BOVO, B.; ANDRIGHETTO, C.; CARLOT, M.; CORICH, V.; LOMBARDI, A.; GIACOMINI, A. Yeast population dynamics during pilot-scale storage of grape marcs for the production of Grappa, a traditional Italian alcoholic beverage. **International Journal of Food Microbiology**. v. 129, 3th ed., p. 221-228, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 487, de 26 de março de 2021. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 mar. 2021a. Disponível em : <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-487-de-26-de-marco-de-2021-311593455> Acesso em: 18 abril 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa – IN nº88, de 26 de março de 2021. Estabelece limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 mar. 2021b. Disponível em : <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598> Acesso em: 18 abril 2021.

BULGARELLI, D.; GARRIDO-OTER, R.; MUNCH, P.C.; WEIMAN, A.; DROGE, J.; PAN, Y.; MCHARDY, A.C.; SCHULZE-LEFERT, P. Estructure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. **Cell host microbe**, v.17, 3th ed., p. 392-403, 2015.

CAMPOS, M.D.; PATANITA, M.; CAMPOS, C.; MATERATSKI, P.; VARANDA, C.M.R.; BRITO, I.; FÉLIX, M.R. **Detection and Qualification of *Fusarium* spp. (*F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*) and *Magnaportheopsis maydis* in Mayze Using Real-Time PCR Targeting the ITS region.** Agronomy. 2019.

COCK, P. J. A.; ANTAO, T.; CHANG, J.T.; CHAPMAN, B.A.; COX, C.J.; DALKE, A.; FRIEDBERG, I.; HAMELRYCK, T.; KAUFF, F.; WILCZYNSKI, B.; HOON, M.J.L. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009.

D`ARCE, M. A. B. R. **Pós-colheita e armazenamento de grãos.** Material Didático. Departamento de Agroindústria, Alimentos e nutrição, ESALQ/USP, 2009. Disponível em:< <http://sinueloagropecuaria.com.br/wp-content/uploads/2016/09/armazenamento-de-graos-1.pdf>> Acesso em: 18 de abril de 2020.

DEMAIN, A.L.; MARTENS, E. Production of valuable compounds by molds and yeasts. **The journal of antibiotics**. P. 347-360, 2016.

DIAS, IARA EULETÉRIA. **Crescimento micelar e produção de toxinas por fungos de armazenamento associados a grãos de milho sob diferentes níveis de restrição hídrica/** Iara Euletéria Dias – Lavras: UFLA, 58p., 2012.

DILTHEY, A.T.; JAIN, C.; KOREN, S.; PHILLIPPY, A.M. Strain-level metagenomic assignment and compositional estimation for long reads with MetaMaps. **Nature Communications**, n.3066, 2019.

DONOVAN, P.D.; GONZALEZ, G.; HIGGINS, D.G.; BUTLER, G.; ITO, K. Identification of fungi um shotgun metagenomics datasets. **Pols One**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192898> Acesso em: 12 fev. 2021.

DORRELL, D.G. Distribution of fatty acids within seed of flax. **Canadian Journal of Plant Science**, v.50, p.71-75, 1970.

ELTAYEB, M.M.; ELTIGANI, S.A.; TANIGUCHI, T. Pyrosequencing scrutiny of bacterial and fungal communities in two Sudanese sorghum-based fermented foods. **Annals of Microbiology**. v. 70, n. 53, 2020.

EL-RABBAT, S.; EL-MAGHRABY, O.; EL-DEBAIKY, S.; HAIDER, A. Isolation and molecular identification of *Fusarium* species from some cereal grains and their products in Egypt. **International Journal of Innovative Science**. v.5, ed.2, 2018.

FADIJI, A.E.; BABALOLA, O.O. Metagenomic methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. **Journal of microbiological methods**, v.170, p.105860, 2020.

FAO. **Mycotoxins. Food Safety and Quality**, 2019. Acesso em: 10 de abril. de 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/en/>>.

FLEURAT-LESSARD, F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins: an update. **Journal of Stored Products Research**, v.71, p. 22-40, 2017.

FORWOOD, D.L.; CARO, E.; HOLMAN, D.B.; MEALE, S.J.; CHAVES, A.V. Ensiling sorghum with unsalable pumpkin improves feed digestibility with minimal influence on the rumen microbial population using the rumen simulation technique. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2021.

GARCIA, D. M. **Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola**. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande, Porto Alegre. 50 p., 2004.

GIORDANO, B.N.E. **Efeito do ozônio sobre a micoflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-brasil com casca (*Bertholettia excelsa* H.B.K.)** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 193 p., 2009.

GOULART, K.C.S.; OMORI, W.P.; SOUZA, J.A.M. **Metagenômica aplicada à biotecnologia**. Ciência e Tecnologia. v.5, n.1, 2013.

GRUZDEVIENE, E.; MANKEVICIENE, A.; LUGAUSKAS, A.; REPECKIENE, J. **The effect of environmental conditions on the variation of fungi and mycotoxin contents in oil flax seed**. Ekologija, v.3, p.64-70, 2006.

HAARITH, D.; HU, W.; KIM, D.G.; SHOWALTER, D.N.; CHEN, S.; BUSHLEY, K.E. Culturable mycobiome of soya bean cyst nematode (*Heterodera glycines*) cysts from a long-term soya bean-corn rotation system is dominated by *Fusarium*. **Fungal Ecology**. v. 42, 2019.

HAGEE, D.; HARDAN, A.A.; BOTERO, J.; ARNONE, J.T. Genomic clustering within functionally related gene families in *Ascomycota* fungi. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. v.18, p. 3267-3277, 2020.

HASSAN, Z.U.; AL-THANI, R.F.; MIGHELI, Q.; JAOUA, S. Detection of toxigenic mycobiota and mycotoxins in cereal feed market. **Food Control**. v.84, p. 389-394, 2018.

HASSAN, Z.U.; THANI, R.A.; BALMAS, V.; MIGHELI, Q.; JAOUA, S. Prevalence of *Fusarium* fungi and their toxins in marketed feed. **Food Control**. v.104, 224-230, 2019.

HERMAN, T.; TRIGO-STOCKLI D. “**Mycotoxins in feed grain and ingredients**”. Mycotoxins technical Articles, Ergomix. Com, 12, 2008. Disponível em: <<https://en.engormix.com/mycotoxins/articles/mycotoxins-feed-grains-ingredients-t34194.htm>> Acesso em: 5 de fev. de 2021.

HONG, S.B.; LEE, M.; KIM, D.H.; MEIJER, M.; MAJOUR, E.; VANKUYK, P.A.; SAMSON, R.A. *Aspergillus cibarius* sp. nov., from Traditional Meju in Korea. **The Journal of Microbiology**. v. 50, n. 4, p.712-714, 2012.

HUBKA, V.; KOLARÍK, M.; KUBÁTOVÁ, A.; PETERSON, S.W. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. v. 105, ed. 4, 2013.

KHAN, M.A.W.; BOHANNAN, B.J.M.; NUSSLEIN, K.; TIEDJE, J.M.; TRINGE, S.G.; PARLADE, E.; BARBERAN, A.; RODRIGUES, J.L.M. Deforestation impacts network co-occurrence patterns of microbial communities on Amazon soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.95, 2nd ed., 2019.

KIRINCIC, S.; SKRJANC, B.; KOS, N.; KOZOLC, B.; PIRNAT, N.; TAVCAR-KALCHER, G. Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia – Official control of foods in the years 2008-2012. **Food Control**. v.50, p. 157-165.

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. **Micotoxinas em alimentos**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, v. 7, p. 138-161, 2010.

ISMAIEL, A.; PAPENBROCK, J. Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. **Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 492-537, 2015.

KLICH, M. A.; THOMAS, S. H.; MELLON, J. E. **Field Studies on the Mode of Entry of Aspergillus flavus into Cotton Seeds**. **Mycologia**, v. 76, n. 4, p. 665-669, 1984. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3793223>>. Acesso em: 19/04/2021.

JEDIDI, I.; SOLDEVILLA, C.; LAHOUAR, A.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; SAID, S. Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 25, p. 868-874, 2018.

LIMA, C. C. **Aplicação das Farinhas de Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e Maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) no Processamento de Pães com Propriedades Funcionais**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p.148. 2007

LIMA, M.I.P.M.; PORTELLA, J.A.; ARIAS, G. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Comunicado Técnico Embrapa Trigo nº 56**. Passo Fundo, 2000.

LORENZ, P.; SCHLEPER, C. Metagenome – a challenging source of enzyme discovery. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 19-20, p. 13-19, 2002.

MAHMOUD, M.A.; SHEHATA, S.M. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with wheat grains. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**. V.4, ed. 4, p. 77-87, 2017.

MAMEDE, A.C.P.B. **Avaliação da atividade antibacteriana de fungos do filo Ascomycota e Basidiomycota sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia Coli***. 2012. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MANNAA, M.; KIM, K.D. Influence of Temperature and Water Activity on Deleterious Fungi and Mycotoxin Production during Grain Storage. **Mycobiology**, v.45, 4th ed., p.240-254, 2017.

MANU, N.; OPIT, G.P.; OSEKRE, E.A.; ARTHUR, F.H.; MBATA, G.; ARMSTRONG, P.; DANSO, J.K.; MCNEILL, S.G.; CAMPBELL, J.F. Moisture content, insect pest infestation and mycotoxin levels of maize in markets in the northern region of Ghana. **Journal of stored products research**, v. 80, p. 10-20, 2019.

MAR, T.T.; SUWANNARACH, N.; LUMYONG, S. Isolation of entomopathogenic fungi from Northern Thailand and their production in cereal grains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. V.28, p. 3281-3291, 2012.

MARQUES, A.; HAUTRIVE, T.; CALLEGARO, M.; HECKTHEUER, L. Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) sob diferentes formas de preparo na resposta biológica em ratos. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 24, n.1, p.131-141, jan./fev. 2011.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 295 p. 2000.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v.31, ed.1, p.1-16, 1995.

NICOLAISEN, M.; JUSTESEN, A.F.; KNORR, K.; WANG, J.; PINNSCHMIDT, H.O. Fungal communities in wheat grain show significant co-existence patterns among species. **Fungal Ecology**. v.11, p. 145-153, 2014.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M.A.R. Caracterização e propriedades da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e subprodutos. **Digital library of journals**, v.29, n.2, p.317-330, 2011.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M.A.R. Caracterização físico-química e microbiológica da linhaça dourada e marrom (*Linum Usitatissimum* L.) **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 71, n. 2, 2012.

OOMAH, B.D.; MAZZA G. Effect of dehulling on chemical composition and physical properties of flaxseed. **LWT – Food Science and Technology**. v.30, ed.2, p.135-140, 1997

PAUL, V.H., SULTANA, C., JOUAN, B., FITT B.D.L. Strategies for control of diseases on linseed and fibre flax in Germany, France and England. **Aspects of Applied Biology**. n.28, p. 65-70, 1991.

PITT, J. I. Fungal ecology and the occurrence of mycotoxins. In: NJAPAU, H. e TRUJILLO, S. (Ed.). *Mycotoxins and Phycotoxins: Advances in Determination, Toxicology and Exposure Management*. **The Netherlands: Wageningen Academic Publishers**. p.33-41, 2006.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3th ed., 2009. 524 p.

PITT, J. I.; WILD, C. P.; GELDERBLUM, W.; MILLER, J.; RILEY, R. T.; WU, F.; BANN, R. A. **Improving public health through mycotoxin control**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 162 p., 2012.

POLI, A.; VIZZINI, A.; PRIGIONE, V.; VARESE, G.C. Basidiomycota isolated from the Mediterranean Sea – Phylogeny and putative ecological roles. **Fungal Ecology**. v.36, p.51-62, 2018.

Putzke, J.; Putzek, M.T.L. **Os Reinos dos Fungos**. 2ª edição. Ed. Edunisc. Santa Cruz do Sul. 2002.

SAPKOTA, R.; KNORR, K.; JORGENSEN, L.N.; O' HANLON, K.A.; NICOLAISEN, M. Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. **New Phytologist**. v.207, ed.4, p.1134-1144, 2015.

SCHMIDT, P. A.; BÁLINT, M.; GRESHAKE, B.; BANDOW, C.; RÖMBKE, J.; SCHMITT, I. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 128–132, 1 out. 2013.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W.; Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.109, 2012.

SOUZA, R.F. **Análise de expressão diferencial em transcriptomas**. Curso de introdução à Bioinformática aplicada a genômica. 2015. Disponível em : [http://www.uel.br/laboratorios/lbi/pages/arquivos/curso/01\\_curso\\_transcriptoma.pdf](http://www.uel.br/laboratorios/lbi/pages/arquivos/curso/01_curso_transcriptoma.pdf). Acesso em : 07 de março de 2021.

SHIM, Y.Y.; GUI, B.; ARNISON, P.G.; WANG, Y.; REANEY, M.M.T. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. **Trends in Food Science & Technology**. v.38, ed.1, p.5-20, 2014.

SIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F. **Introduction to Food Toxicology 2**. California, USA: Elsevier, 309 p., 2011.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2004.

SINGH, K.K.; MRIDULA, D.; BARNWAL, P.; REHAL, J. Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. **Food Science and Nutrition**. v.51, p,210-222, 2011.

SMYTH, R.P.; SCHLUB, T.E.; GRIMM, A.; VENTURI, V.; CHOPRA, A.; MALLAL, S.; DAVENPORT, M.P.; MAK, J. Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. *Gene*, v. 469, p. 45–51, 2010.

SOUZA, R.F. **Análise de expressão diferencial em transcriptomas**. Curso de introdução à Bioinformática aplicada a genômica. 2015. Disponível em : [http://www.uel.br/laboratorios/lbi/pages/arquivos/curso/01\\_curso\\_transcriptoma.pdf](http://www.uel.br/laboratorios/lbi/pages/arquivos/curso/01_curso_transcriptoma.pdf). Acesso em : 07 de março de 2021.

SRIVASTAVA, N.; RAWAT, R.; SHARMA, R.; OBEROI, H.S.; SRIVASTAVA, M.; SINGH, J. Effect of Nickel-Cobaltite Nanoparticles on Production and Thermostability of Cellulases from Newly Isolated Thermotolerant *Aspergillus fumigatus* NS (Class: Eurotiomycetes). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 174, p. 1092-1103, 2014.

STEENWYK, J.L.; SHEN, X.X.; LIND, A.L.; GOLDMAN, G.H.; ROKAS, A. **A robust phylogenomic timetree by biotechnologically and medically important fungi from Aspergillaceae (Eurotiomycetes, Ascomycota)**. BioRxiv. doi: <https://doi.org/10.1101/370429>

TSAI, G.-J.; YU, S.-C. Detecting *Aspergillus parasiticus* in cereals by an enzyme-linked immunosorbent assay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 181-189, 1999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160599000847> >.

UDEN, W.; PRAS N.; WOERDENBAG H.J. Woerdenbag *Linum* species (Flax): *in vivo* and *in vitro* accumulation of lignans and other metabolites BAJAJ, Y.P.S. (ed.), **Biotechnology in agriculture and forestry, Medicinal and aromatic plants VI**, v.26, 1994 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

VRINTEN, P.; HU, A.; MUNCHINSKY, M.A.; ROWLAND, G.; QIU, X. Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. **Plant Physiology**. v.139, p. 79–87, 2005.

WANG, Y.Y.; LIU, B.; ZHANG, X.Y.; ZHOU, Q.M.; ZHANG, T.; LI, H.; YU, Y.F.; ZHANG, X.L.; HAO, X.Y.; WANG, M.; WANG, L.; WEI, J.C. Genome characteristics reveal the impact of lichenization on lichen-forming fungus *Endocarpon pusillum* Hedwig (Verrucariales, Ascomycota). **Springer Link**. n.34, 2014.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols*. [s.l.] Elsevier, 1990. p. 315–322. doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

YOUDIM, K.A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v.18, ed.4-5, p.383-399, 2000.

YONZAN, H.; TAMANG, J.P. Microbiology and Nutritional Value of *Selroti*, an Ethnic Fermented Cereal Food of the Himalayas. **Food Biotechnology**. v.24, 3th ed., 2010.

ZAJC, J.; GUNDE-CIMERMAN, N. The genus *Wallemia* – from contamination of food to health threat. **Microorganisms**. v. 6, 2<sup>nd</sup> ed., 2018.

ZALAR, P.; HOOG, G.S.; SCHROERS H.J.; FRANK, J.M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.) **Journal of microbiology**. v. 87, p. 311-328, 2005.

ZUK, M.; RICHTER, D.; MATULA, J.; SZOPA, JAN. Linseed, the multipurpose plant. **Industrial Crops and Products**. v.75, p.165-177, 2015.