

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

NIGELLA MENDES DE PAULA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS DE ECOSSISTEMA
MANGUEZAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CURITIBA
2019**

NIGELLA MENDES DE PAULA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS DE ECOSSISTEMA MANGUEZAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental - PPGCTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Giselle Maria Maciel.

Coorientadora: Dra. Krisle Silva.

**CURITIBA
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P324p Paula, Nigella Mendes de
2019 Potencial biotecnológico de fungos de ecossistema
manguezal / Nigella Mendes de Paula.-- 2019.
1 arquivo de texto : PDF ; 2,32 MB

Disponível via World Wide Web

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência
e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2019

Bibliografia: p. 86-103

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Mangues
florestais. 3. Fungos. 4. Enzimas. 5. Lacase. 6.
Biodegradação. I. Maciel, Giselle Maria, orient. II.
Silva, Krisle, coorient. III. Universidade Tecnológica
Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência
e Tecnologia Ambiental, inst. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 118

A Dissertação de Mestrado intitulada: Potencial Biotecnológico de fungos de ecossistema manguezal, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Nigella Mendes de Paula**, no dia 27 de fevereiro de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Giselle Maria Maciel – Presidente – UTFPR

Profa. Dra. Marlene Soares – UTFPR

Profa. Dra. Cristine Rodrigues – UFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 27 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar e iluminar o meu caminho, pelas benções concedidas.

Aos amores da minha vida. Pai, mãe e meninas, obrigada por todo amor, cuidado, compreensão, apoio, dedicação e incentivo, eu amo muito vocês.

À minha segunda família, Cassi, Rafa, Dona Flora e meninos, sou grata por todo carinho, incentivo e ajuda, vocês têm um lugar especial em meu coração.

À Prof^a. Dr^a. Danyelle Stringari, por todo carinho e incentivo, e Prof^a. Dr^a. Renata Rodrigues Gomes, pelo cuidado, apoio e atenção, por acreditar em meu potencial e me auxiliar em todo processo de seletivo, sou eternamente grata.

As meninas: Camis, Raquel, Halanna, Aline, Tamara, Tatiane, pelo auxílio, incentivo e ensinamento, serão sempre lembradas com muito carinho. Aos demais membros do laboratório Jéssica, Maria, Dayane, Débora, Isabela, Avany, Eduardo e Bruno vocês são muito queridos e atenciosos, sou muito grata por fazer parte deste grupo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA), por transmitirem seus conhecimentos, ajudando na formação acadêmica e nas pesquisas que desenvolvi durante o mestrado.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), que possuía toda a infraestrutura, bem como os materiais e equipamentos necessários para a realização deste estudo.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, Brasil, por toda a infraestrutura cedida para realização das análises moleculares. A Prof^a. Dr^a. Daiane Rigone membro da empresa, por todo carinho, ensinamento e ajuda.

À Prof^a. Dr^a. Krisle Silva, por todo ensinamento, paciência, incentivo e carinho, que honra poder tê-la como co-orientadora.

À Charlex Indústria Têxtil Ltda, por ceder amostras de efluente têxtil para realização das análises de biodegradação. Ao membro da empresa Moacir pela atenção, prestatividade e ensinamentos.

À Ketinny Camargo membro do Laboratório de Tratamentos de Águas Residuais (LATAR), por toda prestatividade e ensinamento durante as análises de caracterização físico-química do efluente têxtil.

O meu agradecimento especial à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Giselle Maria Maciel. Obrigada pela confiança, por estar sempre presente, me dando toda a assistência necessária para o desenvolvimento da pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação, atenção, incentivo, cuidado e carinho. Fico muito feliz por ter tido a oportunidade de tê-la como professora e orientadora.

Aos membros que compuseram as bancas de defesa de projeto, qualificação e, por fim, de dissertação, pela atenção e contribuições enriquecedoras que possibilitaram a melhoria deste trabalho.

A todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, do desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada!

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças”

- **Charles Darwin**

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao
seu tamanho original”

- **Albert Einstein**

RESUMO

DE PAULA, Nigella Mendes. **Potencial Biotecnológico de Fungos de Ecossistema Manguezal**. 115 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

O manguezal é um ecossistema estuarino delimitado pela linha da maior maré de sizígia que ocorre em regiões tropicais e subtropicais. Neste ambiente microrganismos estão envolvidos em uma série de transformações e ciclagem de nutrientes. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de fungos de ecossistema manguezal. A coleta foi realizada no Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) em dois pontos equidistantes a uma linha paralela. A partir dos procedimentos de amostragem e isolamento foram obtidos 40 isolados fúngicos, os quais foram analisados por meio de uma seleção qualitativa de produção enzimática hidrolítica e ligninolítica. Os resultados obtidos nesta análise evidenciaram predominância da atividade de enzimas hidrolíticas. Além disso, os isolados fúngicos obtidos apresentaram tolerância à concentração $\leq 5\%$ de cloreto de sódio (NaCl), indicando halofilia adaptativa. Por meio de análises morfológicas e moleculares os isolados selecionados foram identificados como: *Trichoderma atroveride*, *Trichoderma harzianum*, *Microsphaeropsis arudinis*, *Epicoccum* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., *Geotrichum* sp. e *Cryphonectria* sp. Estes fungos foram avaliados quanto ao seu potencial enzimático ligninolítico, a partir do cultivo líquido estático na presença e ausência de água do mar. Os resultados apresentaram atividade principal da enzima lacase, destacando-se a espécie *Microsphaeropsis arudinis* (LB07), a qual apresentou 1.037 U/L de lacase, resultado inédito neste âmbito. Quando expostos ao cultivo na presença de água do mar, os fungos analisados apresentaram valores mais elevados de enzima lacase. A fim de avaliar a biodegradação de efluente têxtil, a enzima lacase proveniente dos fungos *Microsphaeropsis arudinis* (LB07) e *Trametes villosa* foi aplicada na presença e ausência de mediadores químicos. Os resultados obtidos nesta análise indicaram maior atividade de descoloração na ausência de mediador químico. O fungo *Microsphaeropsis arudinis* (LB07) apresentou maior percentual de descoloração na concentração 100 U/L de enzima lacase, resultado inédito nesta área. Quanto ao fungo *Trametes villosa*, seu melhor percentual de descoloração foi evidenciado na concentração de 500 U/L de enzima lacase. Considerando que os fungos de manguezal são pouco explorados, os resultados obtidos em sua maioria apresentam-se inéditos. Os dados derivados do presente estudo, ressaltam a importância dos microrganismos de manguezal, sua diversidade, adaptação a condições salinas, potencial enzimático (hidrolítico e ligninolítico), e capacidade de biodegradar poluentes, o que os tornam promissores em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Manguezal; Fungos; Enzimas; Lacase; Biodegradação.

ABSTRACT

DE PAULA, Nigella Mendes. **Biotechnological Potential of Fungi from Mangrove Ecosystem**. 115 f. Masters Dissertation. Post graduation Program of Environmental Science and Technology. Federal University of Technology – Paraná. Curitiba, 2019.

The mangrove is an estuarine ecosystem delimited by the line of the greater tide of syzygy that occurs in tropical and subtropical regions. In this environment microorganisms are involved in a series of transformations and nutrient cycling. Thus, the object of the present study was to evaluate the biotechnological potential of fungi isolated from mangrove ecosystem. Samples were collected at Paranaguá Estuary Complex (CEP) in two points equidistant from a parallel line. From sampling and isolation procedures, 40 fungal isolates were obtained, which were qualitatively evaluated for hydrolytic and ligninolytic enzymatic activity. Screening results showed a predominance of hydrolytic enzyme activity among isolates. In addition, the fungi presented tolerance towards the concentration $\leq 5\%$ of sodium chloride (NaCl) in culture medium, indicating adaptive halofilia. By means of morphological and molecular analyzes the selected isolates were identified as: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Microsphaeropsis arudinis*, *Epicoccum* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., *Geotrichum* sp. and *Cryphonectria* sp. These fungi were evaluated for their ligninolytic enzyme production by static liquid cultivation in the presence and absence of sea water. The results demonstrated a main production of laccases by the isolates, with *Microsphaeropsis arudinis* (LB07) presenting 1,037 U/L of enzyme activity, which is a data that has not been reported so far in scientific literature. When fungi were cultured in the presence of sea water, higher values of laccase enzyme were observed. In order to evaluate the biodegradation of a real textile effluent, the enzyme crude extracts containing laccase from the fungi *Microsphaeropsis arudinis* (LB07) and *Trametes villosa*, was applied in the presence and absence of chemical mediators. The highest rate of discoloration was achieved by the application of 100 U/L of laccase in the crude extract from *Microsphaeropsis arudinis* (LB07), which is also new in the literature. As for the *Trametes villosa* the best percentage of discoloration was observed with 500 U/L of laccase enzyme. Considering that the fungi from mangrove are practically unexplored, most of the results obtained in this work are novel. The data obtained in the present study emphasize the importance of microorganisms in the mangrove, their diversity, adaptation to saline conditions, enzymatic potential (hydrolytic and ligninolytic), and the ability to biodegrade pollutants, which make them promising in biotechnological processes.

Keywords: Mangrove; Fungi; Enzymes; Laccase; Biodegradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP; Paraná, Brasil)	23
Figura 2 - Mecanismos de ação da enzima celulase no processo de degradação da celulose	26
Figura 3 - Reação enzimática de uma lipase catalisando a hidrólise de um triacilglicerol	27
Figura 4 - Estrutura molecular da pectina	28
Figura 5 - Estrutura da xilana, e as enzimas xilanolíticas envolvidas na sua degradação	30
Figura 6 - Ciclo catalítico da lacase	33
Figura 7 - Ciclo catalítico da manganês peroxidase (MnP)	35
Figura 8 - Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP)	36
Figura 9 - Esquema representativo do operon ribossomal fúngico	41
Figura 10 - Fluxograma com as principais etapas desenvolvidas durante a pesquisa	42
Figura 11 - Representação do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), com indicação dos pontos de amostragem	43
Figura 12 - Fotografia do armazenamento das amostras de raiz aérea	44
Figura 13 - Esquema das etapas desenvolvidas para isolamento fúngico	45
Figura 14 - Esquema da técnica de cultura em lâmina descrita por Riddell (1950)	51
Figura 15 - Representação das etapas de produção de extratos enzimáticos. A: Meio de cultura nutritivo; B: Transferência dos “ <i>plugs</i> ”; C: Crescimento fúngico; D: Filtração do cultivo; E: Centrifugação do filtrado; F: Armazenamento do extrato enzimático	54
Figura 16 - Fotografia dos frascos de Winkler após adição de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	58
Figura 17 - Representação do processo de biodegradação de efluente têxtil real. Análise desenvolvida através da ausência e presença de mediadores químicos.	

AHB: Ácido 4-hidroxibenzóico; HBT 1-hidroxibenzotriazol; Controle: Enzima desnaturada; Tratamento: Extrato enzimático contendo atividade da enzima lacase	61
Figura 18 - Fotografia das placas de Petri contendo meio de cultura suplementado com substratos específicos. Observação de reações de hidrólise ou oxidação do substrato. A e D: Peroxidases; B e F: Lacases; C: Celulases; E: Pectinases	64
Figura 19 - Representação do crescimento fúngico em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose - BDA, com adições de diferentes concentrações (0,85%, 1,5%, 3,5%, 5%) de cloreto de sódio (NaCl), incubadas a 28°C durante 7 a 10 dias	67
Figura 20 - Fotografia dos aspectos morfológicos macro e microscópicos. Colônias fúngicas cultivadas em placas de Petri (94 mm), contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose – BDA, incubadas a 28°C por 7 dias. Lamínulas coradas com azul de algodão, retiradas em intervalos de 7 a 28 dias, observadas em microscópio óptico no aumento de 400x. LB01; LB03; LB04; LB06: <i>Trichoderma</i> sp.; LB02; LB09: Ausência de Gênero; LB05: <i>Gliocladium</i> sp.; LB07: <i>Microsphaeropsis</i> sp.; LB08: <i>Geotrichum</i> sp.....	69
Figura 21 - Árvore filogenética da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos fungos isolados de manguezal. Árvore construída pelo método de “ <i>Neighbor-joining</i> ” e cálculo da distância utilizando o modelo de <i>Kimura 2-parameter</i> . Somente valores acima de 50% (1000 repetições) são apresentados. Árvore construída com 500 bases	72
Figura 22 - Espectrograma do efluente têxtil, nos comprimentos de onda de 400-700 nm. Bandas de maior intensidade do efluente têxtil	79
Figura 23 - Espectroscopia da descoloração do efluente têxtil real, nas bandas de maior intensidade do efluente (534-570 nm). Fungo <i>Microsphaeropsis arundinis</i> a partir da concentração de 100 U/L de enzima lacase, na ausência de mediador químico	82
Figura 24 - Espectroscopia da descoloração do efluente têxtil real, nas bandas de maior intensidade do efluente (534-570 nm). Fungo <i>Trametes villosa</i> a partir da concentração de 500 U/L de enzima lacase, na ausência de mediador químico	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Enzimas celulolíticas e seus principais mecanismos de degradação	25
Quadro 2 - Fungos isolados de manguezal com capacidade de produção de enzimas hidrolíticas	31
Quadro 3 - Enzimas ligninolítica e seus principais mecanismos de degradação	32
Quadro 4 - Fungos isolados de manguezal com capacidade de produção de enzimas ligninolítica	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de isolados fúngicos de raízes aéreas de manguezal, produtores de enzimas hidrolíticas e ligninolíticas	65
Tabela 2 - Dados referente à produção enzimática dos isolados fúngicos selecionados	65
Tabela 3 - Similaridade genotípica dos isolados fúngicos de manguezal, a partir do sequenciamento da região ITS1-58-ITS2, com as sequências de fungos obtidos no Centro Nacional de Informações em Biotecnologia - NCBI	71
Tabela 4 - Atividade de enzima lacase por isolados fúngico de manguezal, sob cultivo líquido estático na ausência e presença de água do mar.....	75
Tabela 5 - Caracterização físico-química do efluente têxtil real	78
Tabela 6 - Porcentagem de descoloração das duas bandas de maior intensidade do efluente têxtil, a partir de concentrações distintas (100 U/L e 500 U/L) de enzima lacase, proveniente dos extratos enzimáticos produzidos pelos fungos <i>Microsphaeropsis arundinis</i> e <i>Trametes villosa</i> , na ausência ou presença de mediador químico	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 ECOSSISTEMA MANGUEZAL	19
3.1.1 Fungos em Ecossistema Manguezal	20
3.1.2 Potencial Biotecnológico de Fungos Associados a Manguezal	21
3.2 COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ (CEP)	22
3.3 ENZIMAS	24
3.3.1 Enzimas Hidrolíticas	25
3.3.1.1 Celulases	25
3.3.1.2 Lipases	27
3.3.1.3 Pectinases	28
3.3.1.4 Xilanases	29
3.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FUNGOS DE MANGUEZAL	30
3.5 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	32
3.5.1 Lacases	32
3.5.2 Manganês Peroxidase	34
3.5.2 Lignina Peroxidase	36
3.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS POR FUNGOS DE MANGUEZAL	37
3.7 BIORREMEDIAÇÃO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS	38
3.7.1 Biorremediação de Efluente Têxtil por Fungos de Manguezal	39
3.8 TAXONOMIA DE FUNGOS	40
4. METODOLOGIA	42
4.1 PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO FÚNGICO	43
4.2 AMOSTRAGEM E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	45
4.3 SELEÇÃO QUALITATIVA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	46
4.3.1 Enzimas Hidrolíticas	46
4.3.1.1 Celulases	46

4.3.1.2 Lipases	47
4.3.1.3 Pectinases	47
4.3.1.4 Xilanases	48
4.3.2 Enzimas Ligninolíticas	48
4.3.2.1 Atividade da Lacase	48
4.3.2.1.1 Ágar Ácido Tânico e ABTS.....	48
4.3.2.2 Atividade das Peroxidases (Lip; MnP)	49
4.3.2.2.1 Ágar Vermelho de Fenol e Ágar Azure B	49
4.4 TOLERÂNCIA A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE CLORETO DE SÓDIO (NaCl)	50
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	50
4.5.1 Identificação Macroscópica e Microscópica	50
4.5.2 Identificação Molecular	51
4.6 PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE ÁGUA DO MAR.....	53
4.6.1 Determinação da Atividade Enzimática	54
4.6.1.1 Enzimas Ligninolíticas	55
4.6.1.1.1 Atividade da Lacase	55
4.6.1.1.2 Atividade da Manganês Peroxidase (MnP)	55
4.6.1.1.3 Atividade da Lignina Peroxidase (LiP).....	55
4.7 EFLUENTE TÊXTIL REAL: COLETA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	56
4.7.1 Análise de pH	56
4.7.2 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)	56
4.7.3 Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO ₅)	57
4.7.4 Quantificação de Compostos Fenólicos	59
4.7.5 Análise de Varredura Espectral do Efluente Têxtil Real.....	59
4.8 ADAPTAÇÃO FÚNGICA E ATIVIDADE DE ENZIMA LACASE EM EFLUENTE TÊXTIL REAL.....	59
4.9 BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL REAL A PARTIR DE LACASES FÚNGICAS.....	60
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR	63

5.2 SELEÇÃO QUALITATIVA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	63
5.3 AVALIAÇÃO DE HALOFILIA ADAPTATIVA FÚNGICA	66
5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	68
5.4.1 Taxonomia Macro e Micromorfológica	68
5.4.2 Taxonomia Molecular	70
5.5 EFEITO DA ÁGUA DO MAR NA ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	74
5.5.1 Enzimas Ligninolíticas	74
5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE TÊXTIL REAL	77
5.7 AVALIAÇÃO DA ADAPTAÇÃO FÚNGICA E ATIVIDADE DE ENZIMA LACASE EM EFLUENTE TÊXTIL REAL	79
5.8 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL REAL A PARTIR DE LACASES FÚNGICAS	80
6. CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE A	104
APÊNDICE B	106
APÊNDICE C	108
ANEXO A	111

1 INTRODUÇÃO

O ecossistema manguezal representa um ecótono entre ambientes terrestre e marinho ao longo de regiões tropicais e subtropicais. São comumente caracterizados pelo intenso processamento de carbono e pela capacidade de suportar condições ambientais adversas (e.g. salinidade, temperatura, variação da maré, alto conteúdo de matéria orgânica, deficiência de micro-nutrientes e condição anóxica).

Os fungos presentes em ecossistema manguezal são capazes de colonizar compartimentos imersos e emergidos, são comumente identificados em sedimentos, folhas, raízes e troncos das árvores (SARMA; VITTAL, 2000; JONES et al., 2009). São categorizados como saprofíticos, patogênicos ou endofíticos. Os endofíticos, em especial, são conhecidos por habitarem os tecidos internos das plantas sem causar efeitos negativos, são considerados fontes em potencial de novos metabólitos bioativos, utilizando industrialmente (DEZAM et al., 2017).

Em ecossistema manguezal, células microbianas estão envolvidas na fotossíntese, solubilidade de fosfato, produção de substâncias como antibióticos e enzimas (TAKETANI et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2011; DIAS et al., 2012; VARON-LOPEZ et al., 2014). A cadeia microbiana neste ambiente constitui a maior rota de ciclagem de nutrientes, atuando através da decomposição de compostos lignocelulósicos e da produção de enzimas com atividades pectinolíticas, celulolíticas, amilolíticas e proteolíticas (DIAS et al., 2009; SÁ et al., 2014).

As propriedades físico-químicas únicas do ecossistema manguezal proporcionam aos microrganismos presente neste ambiente, adaptações fisiológicas específicas, como halofilia e termoestabilidade. Estas características contribuem para a diferenciação entre enzimas geradas por fungos de ambiente marinho, e suas contrapartes terrestres. Devido à sua imensa diversidade genética e bioquímica, estes microrganismos são vistos como fonte promissora de enzimas com potencial aplicação biotecnológica (BONUGLI-SANTOS et al., 2015).

Dentre as enzimas extracelulares produzidas o sistema ligninolítico é de grande importância para biorremediação ambiental, processo no qual os sistemas biológicos são usados para degradar ou neutralizar os poluentes (LOPEZ et al., 2007; ARUN et al., 2008). Enzimas oxidoredutoras desempenham papel importante

na degradação e transformação de substâncias poliméricas. Os produtos parcialmente degradados ou oxidados podem ser facilmente absorvidos por células microbianas, onde são completamente mineralizados (HUSAIN, 2006).

Levando em consideração que pouco se conhece sobre fungos associados ao ecossistema manguezal, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de fungos provenientes de raízes aéreas de árvores de manguezal, através de análises de produção enzimática (hidrolíticas e ligninolítica) e biodegradação de efluente têxtil. Dentro deste contexto, também foi possível avaliar o processo de adaptação a salinidade, a diversidade genética presente, a tolerância fúngica e produção de enzima lacase em efluente têxtil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico de fungos isolados da raiz aérea de árvores de manguezal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e isolar fungos de raízes aéreas de árvores de manguezal;
- Selecionar qualitativamente os isolados fúngicos obtidos, através de análises de produção de enzimas hidrolíticas e ligninolíticas;
- Avaliar a halofilia adaptativa dos isolados fúngicos obtidos;
- Identificar os isolados fúngicos selecionados, a partir de análises morfológicas e genéticas;
- Analisar a atividade de enzimas ligninolíticas por meio de cultivos na presença e ausência de água do mar;
- Coletar e caracterizar amostra de efluente têxtil real;
- Avaliar a adaptação fúngica e atividade de enzima lacase em efluente têxtil real;
- Avaliar a biodegradação de efluente têxtil real a partir de lacases fúngicas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ECOSSISTEMA MANGUEZAL

O manguezal é um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de regiões tropicais e subtropicais, sujeito ao regime das marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). As florestas de mangue são arquitetonicamente simples em comparação com florestas tropicais. Características morfológicas e adaptações das árvores incluem raízes aéreas, dispersão de propágulos pelas correntes controladas pelas marés, rápido crescimento de copa, ausência de anéis de crescimento, eficiente mecanismo de retenção de nutrientes, resistência a ambientes salinos, retenção de água e importante contribuição no balanço de carbono (ALONGI, 2002).

No Brasil, sua área de cobertura é estimada em mais de 1,1 milhões de hectares (ha) (MAGRIS; BARRETO, 2010). As taxas de produção primária se expressam em uma grande disponibilidade de biomassa aérea e subterrânea, com valores comparáveis às de outras florestas tropicais. Além de importantes como tamponadores de processos de erosão costeira, são considerados sítios naturais para refúgio, alimentação e reprodução de diversas espécies de peixes, aves, mamíferos e crustáceos de importância ecológica e econômica (ALONGI, 2011).

Além da flora e da fauna, a diversidade microbiana caracteriza uma das comunidades essenciais a este ecossistema (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013). A biomassa microbiana total encontrada nos manguezais é de 1,2%, composta por 91% de bactérias e fungos, 7% de algas e 2% de protozoários (GHIZELINI; MENDONÇA-HAGLER; MACRAE, 2012). A diversidade funcional e estrutural das comunidades microbianas em áreas de manguezais é amplamente moldada por variáveis ambientais, e cada habitat abriga comunidades funcionais microbianas únicas (BAI et al., 2012).

Embora o manguezal seja o principal repositório de microflora, esse habitat apresenta alta vulnerabilidade a ações antrópicas, as quais afetam diretamente a diversidade e composição nutricional deste ecossistema. No âmbito da Lei 12.651 (25 de maio de 2012) do Código Florestal Brasileiro, os manguezais

são considerados Áreas de Preservação Permanente (APP). Esta normativa determina que as APPs devem ser protegidas, com a função ambiental de preservar os recursos hídricos, a paisagem e a biodiversidade (SANTOS, 2013).

3.1.1 Fungos em Ecossistema Manguezal

As florestas de mangue são consideradas “*hotspots*” de biodiversidade para fungos marinhos (SHEARER et al., 2007). Estes fungos desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes em manguezais, onde geralmente ocorrem como saprófitas na decomposição de matéria orgânica, como simbiontes de plantas e animais, e como parasitas de plantas (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013).

Os fungos são capazes de colonizar compartimentos imersos e emergidos do manguezal e são identificados em sedimentos, raízes, troncos e vegetação (SARMA; VITTAL, 2000; JONES et al., 2009). Embora os troncos de mangue e as raízes aéreas estejam submersos, permanentemente ou intermitentemente, as partes superiores das raízes e troncos são raramente ou nunca molhadas pela água salgada. Assim, fungos terrestres e líquens ocupam a parte superior das árvores e espécies marinhas ocupam a parte inferior, na interface há uma sobreposição entre fungos marinhos e terrestres (SARMA; HYDE, 2001).

Os fungos de manguezal incluem fungos inferiores (oomicetos e thraustochytrids) e fungos superiores (ascomicetos e basidiomicetos). Os fungos de mangue associados aos manguezais são também conhecidos como fungos “*Manglicolous*”, que incluem fungos marinhos e um pequeno grupo de fungos terrestres. Vários fatores contribuem para a diversidade de fungos em manguezais, por exemplo: diversidade de substrato, salinidade, inundação intermitente e mudanças diárias no nível da água devido a marés, estes fornecem diferenciação de nicho (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013).

A variabilidade do ecossistema de manguezal tem atraído a atenção de vários pesquisadores, os quais contribuíram extensivamente para a conhecimento sobre morfologia e taxonomia de fungos associados a árvores de mangue (STEINKE, 2000; OKANE; NAKAGIRI; ITO, 2001; JONES; ABDEL-, 2005;

PILANTANAPAK; JONES; EATON, 2005; LIU et al., 2006; TARIQ; DAWAR; MEHDI, 2006; ALIAS; ZAINUDDIN; GARETH, 2010; XING; GUO, 2010; SIVAKUMAR, 2016).

Na Índia, fungos associados a manguezais têm sido bem documentados. Nambiar, Raveendran, 2008, 2009a, 2009b, por exemplo, relataram mais de 150 espécies de fungos isolados de manguezais em Kerala, sul da Índia nos últimos 5 anos. Além deste, relatos anteriores onde a diversidade e a frequência de fungos “*Manglicolous*” foram estudados (KUMARESAN; SURYANARAYANAN, 2001; SARMA; HYDE; VITTAL, 2001; ANANDA; SRIDHAR, 2004; MANOHARACHARY et al., 2005; VITTAL; SARMA, 2006; RANI; PANNEERSELVAM, 2009).

Um grande número de estudos foi realizado em Leste e Sudeste da Ásia (HO et al., 1990; VRIJMOED; HYDE; JONES, 1994; NAKAGIRI; ITO, 2001; SARMA; HYDE, 2001; BESITULO; MOSLEM; HYDE, 2010; XING; GUO, 2010; WANG et al., 2010), especialmente de áreas como a China (JONES et al., 1999; TSUI; HYDE, 2004; XING; GUO, 2010) e Tailândia (HYDE, 1990; PILANTANAPAK.; JONES; EATON, 2005). Além dos estudos realizados na Ásia, estudos focados na taxonomia de fungos em manguezais, também tem sido conduzida em Américas.

No Brasil, dados de diversos estudos consideraram a diversidade de basidiomicetos associado a árvores de manguezal (BALTAZAR; TRIERVEILER-PEREIRA; LOGUERCIO-LEITE, 2009; TRIERVEILER-PEREIRA; BALTAZAR; LOGUERCIO-LEITE, 2009) e a identificação de fungos endofíticos com base em dados moleculares, revelando mais de 4.000 fungos associados a árvores de manguezal (*Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa*) (DE SOUZA SEBASTIANES et al., 2013).

3.1.2 Potencial Biotecnológico de Fungos Associados a Manguezais

Uma ampla gama de atividades tem sido identificada a partir do ambiente marinho, incluindo atividades antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoárias, anti-inflamatórias, antivirais e citotóxicas, muitas das quais podem ser atribuídas a enzimas específicas (MAYER et al., 2013). Embora alguns relatos relacionados à produção de enzimas por fungos marinhos tenham surgido na

década de 1980, estudos sobre esse assunto começaram a ser publicados mais frequentemente após 1999-2000 (JONES; PANK, 2012).

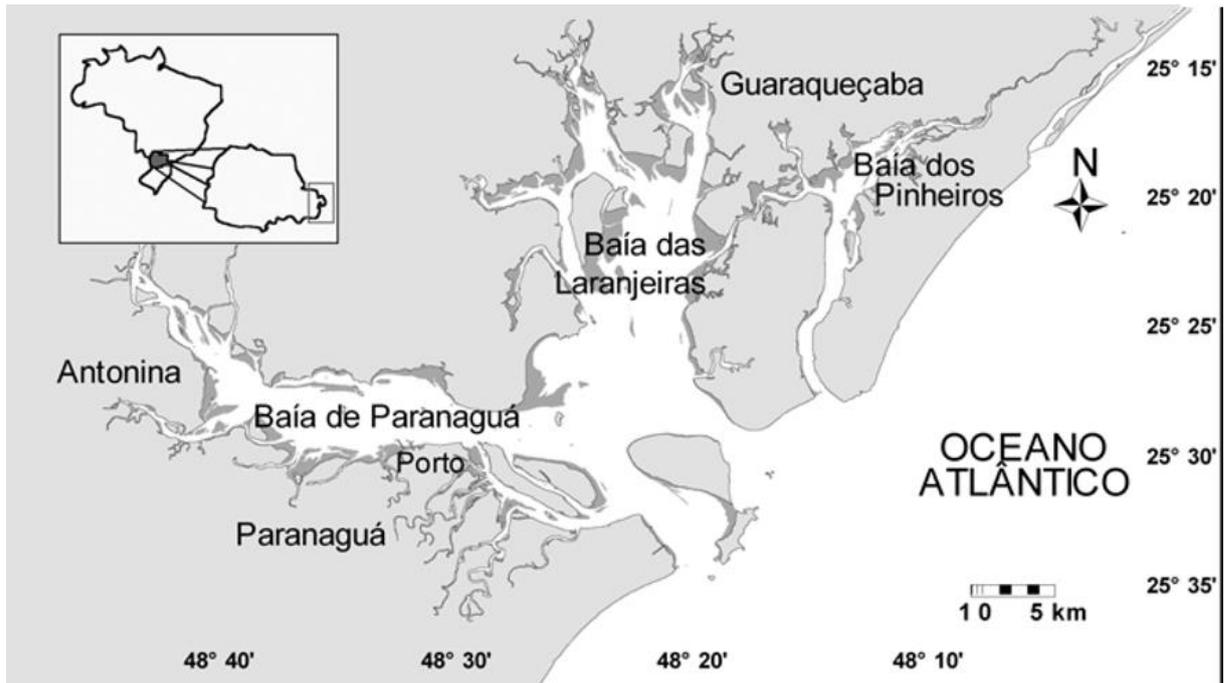
Estudos demonstraram que as principais atividades de fungos marinhos estão de fato associadas à decomposição da matéria orgânica. Dentro deste contexto, uma grande diversidade de enzimas hidrolíticas e oxidativas, que podem ser usadas em processos biotecnológicos, tem sido relatada por diferentes espécies fúngicas neste habitat (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). De acordo com Velmurugan, Lee, 2012, os fungos de origem marinha são capazes de produzir enzimas com características fisiológicas (halotolerantes e termoestabilidade).

Condições ambientais severas como: salinidade, alta pressão, baixa temperatura, condições oligotróficas, pH extremos, ampla variação mineral e condições especiais de iluminação contribuem para a diferenciação entre enzimas geradas por fungos marinhos e enzimas homólogas de fungos terrestres (JONES, 2000; MADHU; BEENA; CHANDRASEKARAN, 2009; PANG et al., 2011; INTRIAGO, 2012; PASSARINI et al., 2013; RAMA et al., 2014).

Devido à sua imensa diversidade genética e bioquímica, os fungos marinhos são vistos como uma nova fonte promissora de enzimas com potenciais aplicações tecnológicas (DEBASHISH et al., 2005; ZHANG; KIM, 2012). O mercado de enzimas fúngicas marinhas é dividido em quatro segmentos: enzimas técnicas, principalmente destinadas às indústrias de limpeza, têxteis, couro, biocombustíveis, celulose e papel; enzimas para alimentos e bebidas; enzimas relacionadas a aplicações ambientais; enzimas relacionadas a aplicações farmacêuticas (BONUGLI-SANTOS et al., 2015).

3.2 COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ (CEP)

O Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) (48°25' O, 25°30' S) está localizado na planície litorânea paranaense, englobando as Baías de Paranaguá e Antonina no eixo Leste-Oeste, e as Baías de Laranjeiras e Pinheiros no eixo Norte-Sul (Figura 1).



**Figura 1- Representação do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP; Paraná, Brasil).
 FONTE: KRUG; NOERNBERG, 2007.**

A hidrodinâmica estuarina é condicionada pelas correntes de marés e pelo escoamento dos rios (NOERNBERG et al., 2006). As marés são semi-diurnas, com amplitudes médias de 1,5 m na desembocadura, aumentando para o interior da baía, onde podem atingir 2,2 m, a propagação ocorre de forma mista. Variações de salinidade são pronunciadas, com valores de 0 a 34 ppm, com marcados gradientes ao longo dos dois eixos principais do complexo, por sua vez afetados pelo maior ou menor aporte de água doce, dependendo da estação (SANTOS, 2013).

Os manguezais e demais formações vegetais inundáveis localizados na margem do CEP ocupam aproximadamente 295,5 km² (NOERNBERG et al., 2016). O desenvolvimento da vegetação é favorecido nas regiões mais lodosas em processos de sedimentação, como as margens convexas dos rios, podendo ocorrer retração de manguezais em locais com processos erosivos. Os impactos antrópicos sobre os manguezais regionais não são diferentes dos relatados em outras regiões da costa brasileira. O desmatamento para expansão urbana, portuária e industrial é o principal processo de perda da vegetação (LANA, 2004).

3.3 ENZIMAS

Enzimas são proteínas catalisadoras, ou seja, aumentam a velocidade de uma determinada reação química. A catálise enzimática usualmente ocorre na presença de co-fatores no sítio ativo das enzimas, como íons metálicos ou moléculas orgânicas, e em determinadas condições de pH e temperatura. Cada enzima possui uma organização estrutural específica, que geralmente combina com um único substrato (MARZZOCO; TORRES, 1999; VOET et al., 2008).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) a fim de evitar a ocorrência de homônimos caracteriza as enzimas em seis classes, sendo elas: oxidoreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Além das classes, as enzimas ainda são classificadas de acordo com a subclasse, subsubclasse e número de série, sempre precedidas da sigla “EC” (*Enzyme Commission*) (VOET et al., 2008).

As enzimas podem ser produzidas por vários organismos (animais, vegetais e microrganismos), sendo que, as enzimas produzidas por microrganismos provam ser a melhor e mais confiável fonte, tal fato é atribuído à sua diversidade bioquímica, facilidade de cultura para produção em grande escala, suas aplicações comerciais, manipulação genética e qualidade superior com notável estabilidade (PARTE; SIRISHA; SOUZA, 2016).

A produção de enzimas por fungos de origem marinha tem sido relatada na literatura e estão relacionadas à produção industrial de: lipases, para o desenvolvimento de cosméticos, composição de medicamentos e reagentes clínicos (MURRAY et al., 2013); proteases, para a produção de fármacos e anti-inflamatórios (ZHANG; KIM, 2010); ligninases, com aplicações biotecnológicas nos setores químico, alimentício, agrícola, combustível, papel, têxtil e cosméticos (RAGHUKUMAR et al., 1994; SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013).

3.3.1 Enzimas Hidrolíticas

3.3.1.1 Celulases

A celulose é um biopolímero linear e homogêneo, composto por unidades de D-glicose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas (na ordem de polimerização de 10.000 ou mais unidades) (PIRES, 2015). Sua forma linear permite o arranjo de ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, que agrupam as cadeias celulósicas em fibrilas elementares com grau de cristalinidade elevado. Assim, a celulose possui muita resistência à tensão e insolubilidade a uma ampla variedade de solventes (FERRAZ, 2010).

O complexo enzimático celulolítico possui três enzimas principais (Quadro 1) que atuam sinergicamente e sequencialmente a fim de degradar a matriz celulose, classificadas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006) (Figura 2).

ENZIMA	MECANISMO DE DEGRADAÇÃO
β-1,4-Endoglucanases (EC 3.2.1.4)	Atacam regiões amorfas e clivam aleatoriamente ligações internas das cadeias de glicano, proporcionando assim extremidades redutoras ou não redutoras de oligossacarídeos para celobiohidrolases.
Exoglucanases/Celobiohidrolases (EC 3.2.1.91)	Hidrolisam as extremidades da cadeia de maneira processual, produzindo celobiose como o principal produto.
β-Glucosidase (EC 3.2.1.21)	Hidrolisam adicionalmente a celobiose à glicose, e também liberam glicose das extremidades não-redutoras dos oligossacarídeos solúveis.

**Quadro 1- Enzimas celulolíticas e seus principais mecanismos de degradação.
FONTE: BEHERA et al., 2017.**

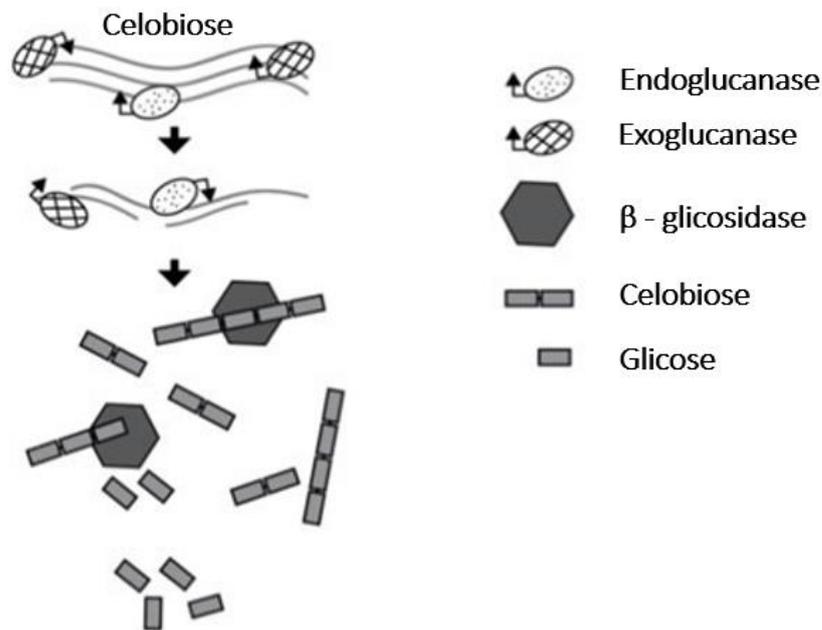


Figura 2- Mecanismo de ação da enzima celulase no processo de degradação da celulose.
FONTE: ALSHEIKH-HUSSAIN; ALTENAIJI; YOUSEF, 2014.

Essas enzimas podem ser produzidas por um amplo grupo de fungos filamentosos e bactérias, aeróbicas e anaeróbicas (LYND et al., 2002; PALOMER et al., 2004). Apesar das celulases serem produzidas por bactérias os fungos são os organismos mais estudados, devido a sua maior capacidade de produzir complexos celulolíticos completos em larga escala (LYND et al., 2002). A maioria das celulases utilizadas comercialmente são enzimas produzidas por fungos filamentosos, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (PANAGIOTOU et al., 2003; KANG et al., 2004; JØRGENSEN et al., 2005; AHAMED; VERMETTE, 2008).

O complexo das celulases é atualmente o terceiro maior complexo enzimático industrial (ZAMPIERE, 2015). Possuem potencial biotecnológico em várias indústrias, incluindo setores alimentício (clarificação de sucos e vinho), ração animal (melhoramento da digestibilidade), têxtil e lavanderia (biopolimento de fibras têxteis), papel e celulose (remoção de tintas), agricultura (melhoramento da qualidade do solo e germinação de sementes), bem como em pesquisa e desenvolvimento de proteína unicelular (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011).

3.3.2 Lipases

A enzima lipase atua na interface orgânica-aquosa catalisando a hidrólise de ésteres, particularmente triglicerídeos de cadeia longa, produzindo ácidos graxos livres, diglicerídios, monoglicerídeos e glicerol (Figura 3), na presença de baixas concentrações de água atuam em reações de esterificação e interesterificação. Estas enzimas possuem amplas aplicações, dentre elas o pré-tratamento hidrolítico de efluentes oleosos e etanolise enzimática de óleos e graxas residuais, para a produção de biodiesel (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; NAGARAJAN, 2012; AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015).

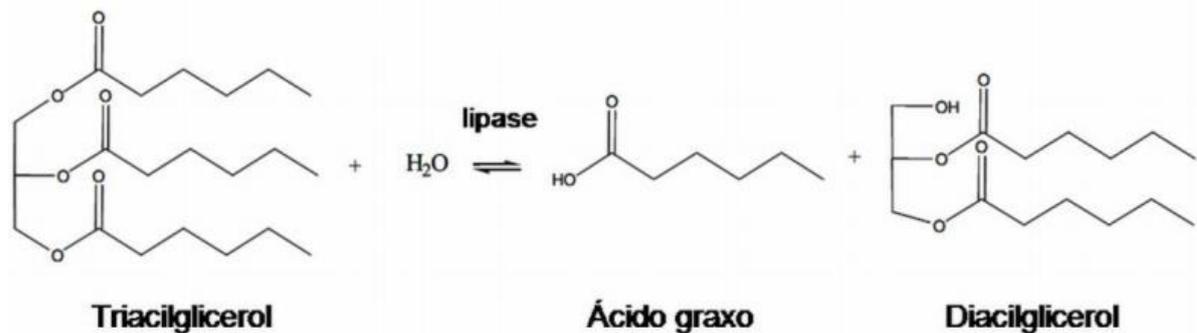


Figura 3- Reação enzimática de uma lipase catalisando a hidrólise de um triacilglicerol.
FONTE: COUTO, 2009.

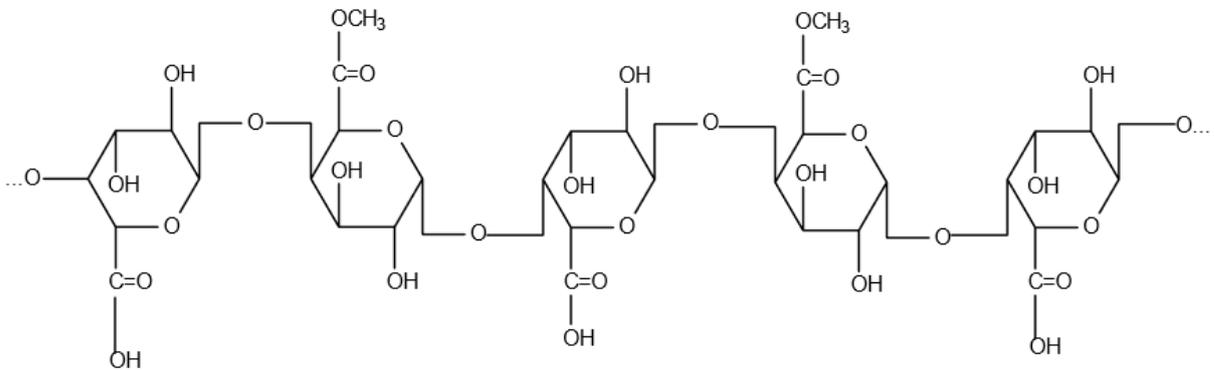
Os fungos, dentre os microrganismos, são fontes preferenciais de lipases, pois essas são geralmente extracelulares, facilitando a sua extração do meio fermentado, além da expectativa crescente do seu emprego como biocatalizadores na forma de células integrais lipásicas, imobilizadas ou não, simplificando e reduzindo o custo dos processos reacionais nos quais são utilizados (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; ANDRADE et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

Lipases constituem o grupo mais notável de catalisadores biológicos que possuem aplicações para biotecnologia, destacando-se também os lucros oriundos de sua produção e comercialização (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009). Na indústria de alimentos as lipases são empregadas na hidrólise da gordura do leite,

ganham destaque na mudança de características sensoriais nos alimentos, conferindo sabores e aromas diferenciados, sendo esses efeitos provocados pela síntese de ésteres, ácidos graxos e álcoois de cadeias curtas (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; VAZ; CHOUPINA, 2012).

3.3.3 Pectinases

Pectinas são polissacarídeos de alto peso molecular, constituída por ácidos D-galacturônicos unidos através de ligações glicosídicas α -1,4, que podem apresentar alguns açúcares neutros em sua estrutura, tais como: ramnose, arabinose e a xilose, por exemplo (COELHO, 2008; UENOJO; PASTORE, 2007; WANG et al., 2015) (Figura 4).



**Figura 4- Estrutura molecular da pectina.
FONTE: COELHO, 2008.**

As enzimas que degradam a pectina são denominadas enzimas pectinolíticas e compreendem três grupos: despolimerantes, protopectinases e desmetoxilantes. Estas enzimas degradam a pectina em diversas áreas dos seus sítios ativos (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; LI; COFFMAN; JU, 2015). As ações destas enzimas variam de acordo com a diversidade das substâncias pécicas presentes na célula a ser degradada. Esta diversidade dita qual será o tipo de

substrato, mecanismo de ação e onde ocorrerá a quebra da ligação na molécula de pectina (FELLOWS, 2006; SANDRI, 2010).

As enzimas pectinolíticas podem ser produzidas por plantas e microrganismos, sendo os microrganismos os mais utilizados para produção industrial. Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium* são considerados os principais produtores de enzimas pectinolíticas (MALLER, 2008), a nível de espécie a cepa *Aspergillus niger* (PERRONE et al., 2007; RANGARAJAN et al., 2010; SAMSON et al., 2007).

As pectinases são utilizadas nas indústrias de alimentos e bebidas onde a principal aplicação dessas enzimas está na indústria de processamento de sucos e vinhos, na maceração de frutos e vegetais, sendo usadas nas etapas de extração, clarificação e concentração. Estão também presentes nas indústrias de papel e celulose, onde são utilizadas no tratamento dos efluentes dos moinhos de papel, além do grande destaque na indústria têxtil, especialmente no tratamento de fibras como o linho (MALVESSI; DA SILVEIRA, 2004; UENOJO; PASTORE, 2007).

3.3.4 Xilanases

A xilana, principal componente da hemicelulose, é um polímero linear com a cadeia principal composta por resíduos de β -xilopiranosose unidos através de ligação glicosídica do tipo β -1,4. Na natureza a cadeia principal pode ter a adição de unidades de ramificações como 4-Ometil- α -D-glucuronopiranosil, acetil, α -L-arabinofuranosil, em várias proporções dependendo da fonte (POLIZELI et al., 2005; DHIMAN; SHARMA; BATTAN, 2008; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013) (Figura 5).

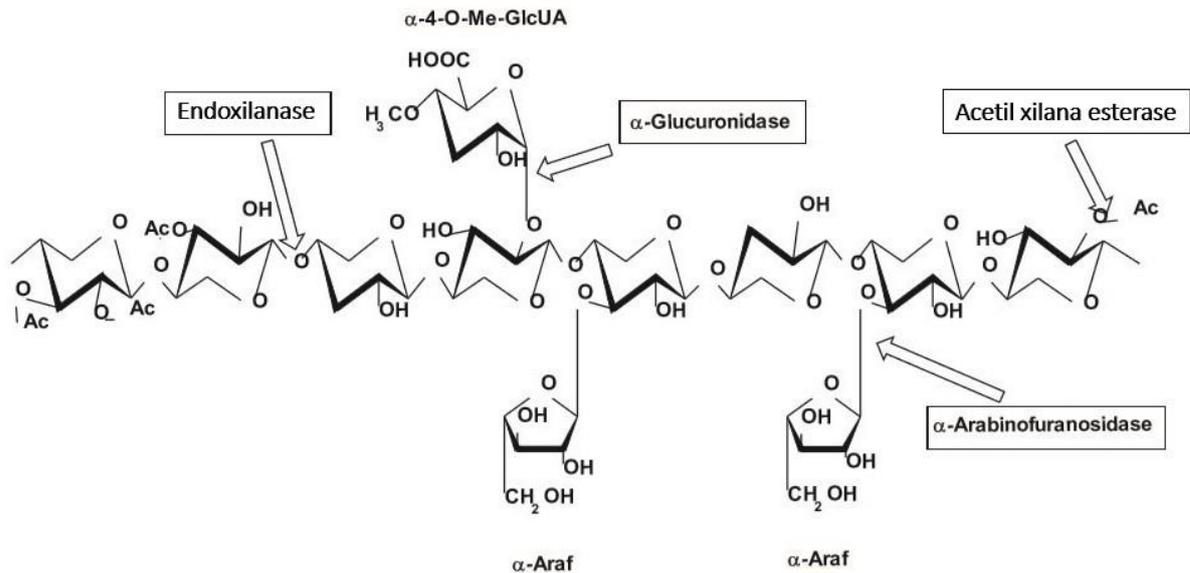


Figura 5- Estrutura da xilana, e as enzimas xilanólíticas envolvidas na sua degradação.

FONTE: MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013.

NOTA: Ac: grupo acetil; α-Araf: α-arabinofuranose; α-4-O-Me-GlcA: ácido α-4-O-metil-glucurônico.

Fungos filamentosos secretam a enzima xilanase em níveis superiores aos de leveduras e bactérias. Além das xilanases, os fungos produzem diversas enzimas auxiliares necessárias para a degradação da xilana (POLIZELI et al., 2005). Fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Pichia* são considerados grandes produtores de xilanase (ADSUL et al., 2005).

Xilanases microbianas são utilizadas em diversas indústrias, incluindo as de alimentos (panificação e clareamento de suco), cerveja, rações, têxteis, processamento de papel e na bioconversão de açúcares derivados de lignocelulose em combustível (AHMAD; SADIQ BUTT; RIAZ, 2013). Em processos industriais, as enzimas que combinam um maior número de características extremofílicas tendem a ter um maior uso (KANWAR; DEVI, 2012; MIELENZ, 2001).

3.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FUNGOS DE MANGUEZAL

Enzimas hidrolíticas (e.g. celulase, lipase, pectinase, xilanase) referem-se a um grupo de enzimas que atuam de forma sincronizada e sinérgica por meio da hidrólise no processo de degradação da biomassa vegetal, estas enzimas são

produzidas por uma ampla gama de microrganismos, principalmente fungos. As enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas em processos industriais, sendo aplicadas na obtenção de muitos produtos comerciais (NASCIMENTO DE OLIVEIRA et al., 2006; NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006).

Fungos de ecossistema manguezal produtores de enzimas hidrolíticas vão sendo constantemente relatados por pesquisadores. Estudos concentram-se em isolar fungos e investigar a produção de enzimas hidrolíticas em ambientes de manguezais ao redor do mundo e de diferentes reservatórios, por exemplo, folhas, raízes e madeira (Quadro 2).

ENZIMA	GÊNERO/ESPÉCIE	REFERÊNCIA
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Thichoderma viride</i> .	KUMAR et al., 2017; SENGUPTA; CHOWDHURY; CHAUDHURI, 2018.
Lipase	<i>Acremonium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Curvularia</i> sp.	MARIA; SRIDHAR; RAVIRAJA, 2005; NEEMA; MANOMI; ROSAMMA, 2015.
Pectinase	<i>Aspergillus oryzae</i> RR103, <i>Pestalotiopsis</i> sp.	MARIA; SRIDHAR; RAVIRAJA, 2005; KETIPALLY; RAM, 2018.
Xilanase	<i>Fusarium</i> sp., <i>Aureobasidium</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Guignardia</i> sp. <i>Thichoderma viride</i> .	TORRES; DELA CRUZ, 2013; KUMAR; RAJAM; RANI, 2017.

Quadro 2- Fungos isolados de manguezal com capacidade de produção de enzimas hidrolíticas.

3.5 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

As enzimas envolvidas na degradação do material vegetal, responsável pela degradação da lignina, são chamadas de ligninolíticas (TAVARES, 2006). As principais enzimas ligninolíticas são citadas a seguir no Quadro 3.

ENZIMA	MECANISMO DE DEGRADAÇÃO
Lacases – Lac (EC 1.10.3.2)	Oxidam compostos fenólicos e reduzem o oxigênio molecular à água
Manganês Peroxidase - MnP (EC 1.11.1.13)	Reagem por oxidação de fenóis monoaromáticos e outros derivados aromáticos, que dependem de peróxido de hidrogênio e de manganês divalente
Lignina Peroxidase - LiP (EC 1.11.1.14)	Reagem na presença de peróxido de hidrogênio

**Quadro 3- Enzimas ligninolíticas e seus principais mecanismos de degradação.
FONTE: DURÁN; ESPOSITO, 2000; GILL; ARORA, 2003; ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005.**

3.5.1 Lacases

A lacase (EC 1.10.3.2) é uma glicoproteína que contém cobre no seu sítio ativo, é classificada como fenol oxidase e catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos (particularmente fenóis) com concomitante redução de oxigênio a água. Entre os substratos oxidados por essa enzima encontram-se: corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, alguns difenilmetanos e benzopirenos (DURÁN; ESPOSITO, 2000).

A eficiência da oxidação por uma determinada lacase é influenciada pela natureza e posição dos substituintes no anel fenólico, onde o substrato é oxidado com formação simultânea de radicais que podem então rearranjar espontaneamente para clivar os anéis aromáticos ou promover sua polimerização

(BRIJWANI; RIGDON; VADLANI, 2010). As lacases têm um potencial redox mais baixo (450-800 mV) do que as peroxidases ligninolíticas ($> 1 \text{ V}$) (BALDRIAN, 2006).

O ciclo catalítico das lacases (Figura 6) inicia-se com a ligação de um substrato redutor em T1, no sítio ativo da enzima. O cobre ligado à T1 remove elétrons do substrato e os transfere para o domínio trinuclear T2/T3, que reduz o O_2 a H_2O , ao mesmo tempo em que libera o substrato oxidado. Os radicais formados deflagram reações não enzimáticas que envolvem quebras alquil-arílicas, polimerização de compostos fenólicos e anilinas, oxidações nos $\text{C}\alpha$ e desmetilações. O mecanismo de catálise está fundamentado na redução tetraeletrônica do oxigênio molecular formando água, às custas de sucessivas oxidações monoeletrônicas do substrato (MOUGIN et al., 2003; BALDRIAN, 2006).

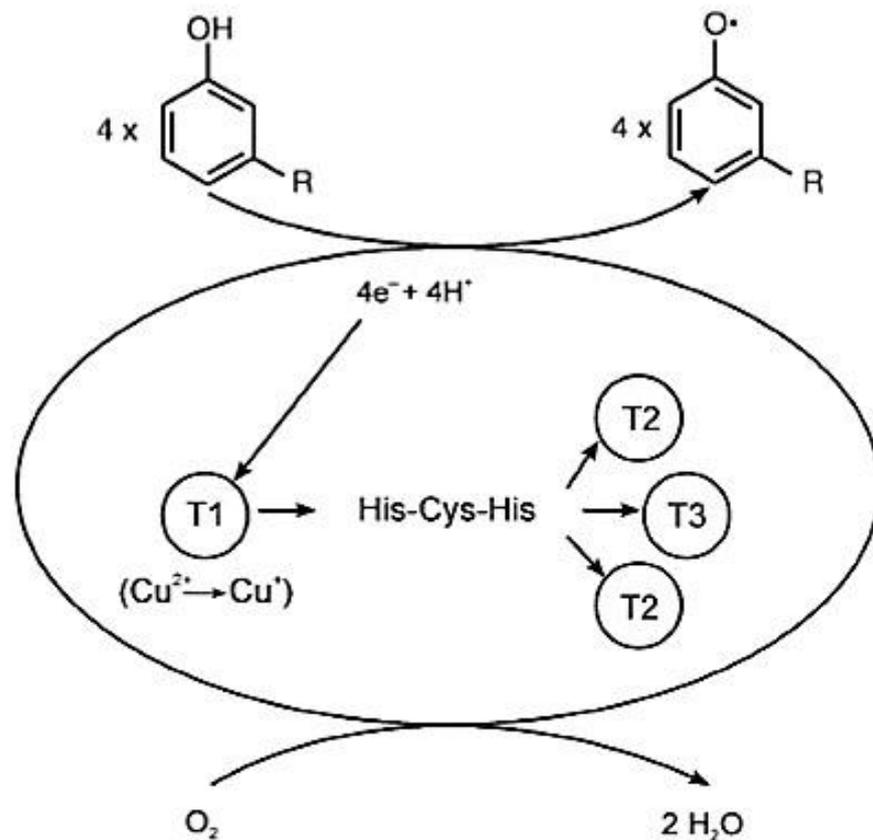


Figura 6- Ciclo catalítico da lacase.
Fonte: BALDRIAN, 2006.

Lacases mostram uma ocorrência generalizada em fungos terrestres, especialmente em fungos da podridão branca (LI et al., 2014). No entanto, os fungos marinhos são também uma fonte interessante de lacase e novos metabólitos bioativos que não são encontrados em cepas terrestres da mesma espécie, devido à sua adaptação à baixa temperatura, alta salinidade, alta pressão e natureza oligotrófica do ambiente marinho (CHEN et al., 2011; SUBRAMANI et al., 2013).

Os fungos que crescem em ambiente marinho adaptaram-se para crescer sob condições altamente salinas (15-34 ppt) e alcalinas, características que potencialmente tornam suas lacases de interesse na biorremediação de efluentes das indústrias de celulose e papel, curtumes, destilarias à base de melão e indústrias têxteis, uma vez que geralmente têm um elevado teor de sal e alcalino (RAGHUKUMAR; SOUZA-TICLO; VERMA, 2008).

A aplicação potencial de lacases abrange vários campos, incluindo descoloração e desintoxicação de corantes industriais, bio-branqueamento de indústrias de polpa e papel, pré-tratamento de águas residuais de fábricas de óleo de palma, remediação de produtos químicos desreguladores endócrinos, produção de etanol, fabricação de biossensores, síntese orgânica e síntese de drogas (VALLECILLOS et al., 2017; ZENG; QIN; XIA, 2017).

3.5.2 Manganês Peroxidase

A manganês peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13) é uma peroxidase extracelular que contém um grupo heme, esta enzima tem como substrato redutor o Mn^{2+} que é oxidado a Mn^{3+} , o qual por sua vez oxida estruturas fenólicas a radicais fenoxi. O oxalato e outros compostos dicarboxílicos formam quelatos com o Mn^{2+} e Mn^{3+} tendo papel importante na oxidação dos compostos aromáticos (HOFRICHTER, 2002).

O ciclo catalítico da MnP é iniciado pela junção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou de um peróxido orgânico à enzima férrica originária formando o composto I. Um íon Mn^{+2} age como doador de elétron para este composto, resultando na formação do composto II, o qual abstrai um elétron de outro íon Mn^{+2} e retorna à forma original (Figura 7). Os íons Mn^{+3} formados durante o processo são

estabilizados por ácidos orgânicos como o lactato, malonato, oxalato ou tartarato e atuam como mediadores difusíveis de massa molecular baixa, atacando moléculas orgânicas inespecíficas pela abstração de elétrons (COELHO, 2007).

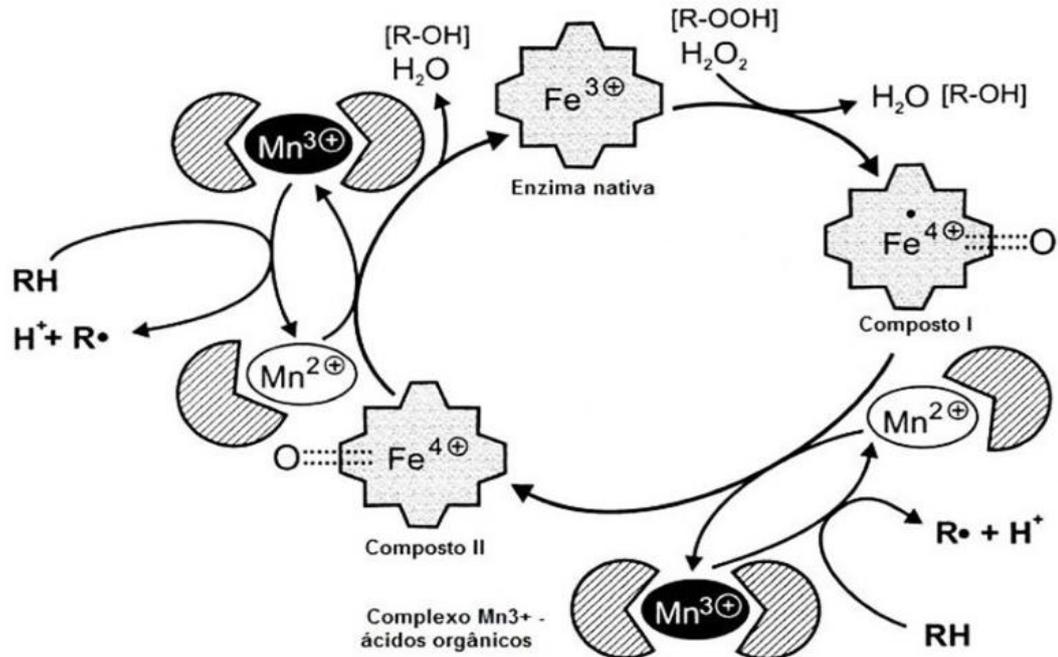


Figura 7- Ciclo catalítico da manganês peroxidase (MnP).
Fonte: HOFRICHTER, 2002.

A enzima MnP vêm sendo aplicada em uma ampla gama de estudos referente a biodegradação da lignina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ácidos húmicos, corantes sintéticos e poluentes clorados (HAAS et al., 2004). Seu potencial degradativo faz desta enzima uma importante aplicação para o setor biotecnológico, como o branqueamento de polpa kraft e celulose, a remoção de resíduos poluentes, por exemplo, a degradação de corantes sintéticos utilizados em indústrias têxteis (RABONATO, 2013).

3.5.3 Lignina Peroxidase

A enzima lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14) contém um grupo prostético heme e sua ação depende da presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esta enzima possui potencial redox alto e caracteriza-se por uma baixa especificidade em relação aos substratos, preferencialmente, anéis aromáticos metoxilados, sem grupo fenólico livre, como por exemplo, o dimetoxibenzeno (PINTO, 2010).

O ciclo catalítico da LiP (Figura 8) é iniciado pela oxidação do sítio ativo da enzima e do ferro contido nele de Fe^{3+} para Fe^{4+} , pelo H_2O_2 , gerando água e um intermediário com dois elétrons oxidados, denominado Composto I. Este composto oxida o álcool veratrílico ou outro substrato, gerando um substrato radical livre e o Composto II, no qual o ferro ainda está presente como Fe^{4+} . O Composto II oxida um segundo substrato, originando outro substrato radical livre, e a enzima retorna à sua conformação original. O excesso de peróxido de hidrogênio, coligado à falta de um substrato redutor, acarreta a oxidação do composto II a composto III, estado inativado da enzima (GONÇALVES, 2010).

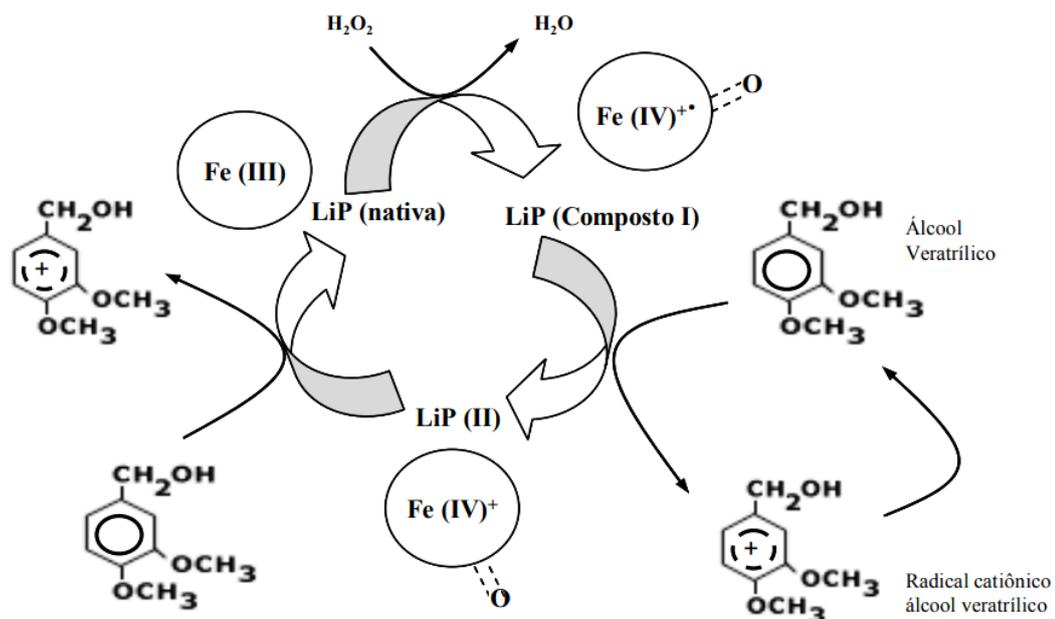


Figura 8- Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP).
Fonte: NETO, 2006.

A enzima LiP geralmente é produzida na fase exponencial do crescimento fúngico, subsequentemente a ação das enzimas celulolíticas. No entanto, nem todos os fungos ligninolíticos são capazes de produzir esta enzima, tal fato sugere que a expressão da enzima LiP, está possivelmente relacionada com o método de cultivo ou com a presença de indutores específicos (BONUGLI-SANTOS et al., 2010). A ação das enzimas ligninolíticas extracelulares na degradação de materiais lignocelulósicos tem sido relatada em estudos relacionados a degradação de compostos poluentes como fenóis, pesticidas, descoloração de efluente têxtil, papelero e subprodutos resultantes da produção de álcool (FERNANDO et al., 2010).

3.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS POR FUNGOS DE MANGUEZAL

Atualmente a procura por novas moléculas, principalmente em ambientes ainda pouco explorados como o ecossistema manguezal, vem despertando grande interesse biotecnológico, tal fato está relacionado à descoberta de novos compostos, incluindo enzimas com potencial aplicação industrial. Visto como nincho estratégico para obtenção de fungos produtores de enzimas ligninolíticas, os manguezais possuem o segundo maior grupo ecológico de fungos marinhos, e são considerados os principais contribuintes de substrato lignocelulósico em ambiente marinho costeiro (PASSARINI et al., 2013).

Estudos relacionados à produção de enzimas ligninolíticas de fungos oriundos de ecossistema manguezal são pouco relatados na literatura. No entanto, os que discutem este assunto relatam a importância biotecnológica deste microrganismo, e seu potencial enzimático na degradação de uma grande variedade de substratos, estes, em condições ambientais adversas. No Quadro 4 estão relatados alguns fungos isolados de ecossistema manguezal, os quais apresentam capacidade de produção de enzimas ligninolíticas (lacase e peroxidases), envolvidas no processo de degradação de material lignocelulolítico.

ENZIMA	GÊNERO/ESPÉCIE	REFERÊNCIA
Lacase	<i>Diaporthe</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Corioloopsis byrsina</i> , <i>Cerrena unicolor</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Hypocrea lixiand</i> , <i>Trichoderma viride</i> .	VERMA et al., 2010; SARAVANAKUMAR; KATHIRESAN, 2014; KUMAR; RAJAM; RANI, 2017.
Peroxidases	<i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i> , <i>Eupenicillium hirayama</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> .	MTUI; MASALU, 2008; AMEEN et al., 2016.

Quadro 4- Fungos isolados de manguezal com capacidade de produção de enzimas ligninolíticas.

3.7 BIORREMEDIAÇÃO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS

A biorremediação é baseada na exploração de populações microbianas que podem modificar ou decompor certos poluentes (PEIXOTO et al., 2008). Os microrganismos utilizados podem ser considerados como uma fonte alternativa biotecnológica atraente, para a realização de possível mineralização dos poluentes e a sua transformação em produtos menos tóxicos, com uma maior solubilidade em água (CERNIGLIA, 1997; CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001).

Enzimas oxidoredutoras desempenham papel importante na degradação e transformação de substâncias poliméricas. Os produtos parcialmente degradados ou oxidados podem ser facilmente absorvidos por células microbianas, onde são completamente mineralizados. As enzimas que degradam a lignina são consideradas grupo alvo de enzimas oxidoredutoras, as quais possuem aplicação prática na biorremediação de ambientes poluídos (HUSAIN, 2008).

Fungos de ambientes extremos são muito importantes do ponto de vista industrial devido às suas enzimas extremofílicas, que possuem várias características especiais tais como: termotolerância, tolerância a salinidade e ao pH (NEIFAR et al., 2015). A tolerância de microrganismos a condições ambientais severas tornam-os candidatos ideais para processamento econômico e

ambientalmente amigável e bioconversões de matéria-prima, como nas indústrias de alimentos, processamento de couro, fabricação de têxteis, preparação de ração animal e remediação biológica (NIGAM, 2013).

3.7.1 Biorremediação de Efluente Têxtil por Fungos de Manguezal

Corantes sintéticos são utilizados em sua maioria em indústrias têxteis, alimentícia, fabricação de papel e cosmética. Estes corantes pertencem a classes de compostos com estruturas poliméricas azo, antraquinona, trifenilmetano e heterocíclicas (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Sendo os azocorantes a maior e mais versátil classe de corantes, respondendo por mais da metade dos corantes produzidos anualmente (DIWANIYAN et al., 2010). Muitos desses corantes, em especial os corantes têxteis, são considerados perigosos devido sua toxicidade e por apresentarem baixa taxa de degradabilidade (GUPTA et al., 2015).

Efluentes têxteis podem apresentar em sua composição, corantes reativos hidrolisados, grande quantidade de álcalis, alta concentração de sulfato de zinco e cloreto de sódio, bem como, níveis elevados de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), cor e pH (SAHA et al., 2016). A indústria têxtil utiliza vários processos de tingimento os quais produzem grandes quantidades de efluentes coloridos. Durante o processo de tingimento parte da concentração original dos corantes não se ligam ao tecido e são liberados no esgoto (TAHA et al., 2015).

Os processos de tratamento de efluente têxtil são considerados uma das principais condições para o desenvolvimento, o crescimento da economia e manutenção da saúde. Sendo fundamental o desenvolvimento de implementações tecnológicas inovadoras, que apresentem baixo consumo de energia e alta eficiência (SAHA et al., 2016). O método de tratamento biológico é tecnicamente atraente, ecológico e proporciona uma alternativa rentável em relação aos outros métodos. Uma ampla variedade de microrganismos tem sido relatada pelo seu potencial para descolorir e degradar estes corantes tóxicos (HUANG; FU; LIU, 2014).

Dentre os microrganismos os fungos são conhecidos por serem capazes de degradar poluentes resistentes (HARITASH; KAUSHIK, 2009), incluindo

corantes têxteis. Diversos trabalhos apresentaram resultados significativos na descoloração de efluentes têxtil e corantes sintéticos (vermelho congo, verde brilhante e azul brilhante de remazol R (RBBR), onde foram totalmente ou parcialmente descoloridos por fungos marinhos (Raghukumar et al., 1996; 2004; Raghukumar; Souza-Ticlo; Verma, 2008 e D'Souza et al., 2006).

Em ecossistema manguezal uma linhagem de *Phlebia* (MG-60), apresentou capacidade de degradação de lignina e descoloração de Poly R-478 na presença de diferentes concentrações de sais (LI; KONDO; SAKAI, 2003). Saravanakumar; Kathiresan, 2014 observaram o acúmulo de corante na superfície dos fungos marinho *Trichoderma harzianum* e *Hypocrea lixii* TSK8 por microscopia eletrônica de varredura, estes foram isolados de manguezais e alcançaram degradação de 89% do corante verde malaquita. O fungo *Cerrena unicolor* MTCC 5159 (NIOCC #2a), isolado de manguezais, produziu lacase como a principal enzima, e apresentou alta capacidade de degradação dos corantes: vermelho congo; azul de tripano; azul de metileno e azul de anilina (D'SOUZA-TICLO; SHARMA; RAGHUKUMAR, 2009).

3.8 TAXANOMIA DE FUNGOS

A identificação taxonômica dos microrganismos geralmente é baseada por métodos tradicionais, realizados a partir da caracterização morfológica de colônias e observação das estruturas de reprodução. Contudo, muitas limitações são encontradas, uma vez que, em alguns casos estas estruturas não são formadas (SETTE et al., 2006).

Embora os dados morfológicos apresentem grande importância para identificação fúngica, o uso adicional de dados moleculares torna-se necessário, pois as informações provenientes desta análise apresentam alta sensibilidade e especificidade, podendo ser empregadas na classificação de linhagens em diversos níveis hierárquicos (PASSARINI et al., 2013).

Um dos marcadores moleculares mais utilizados na identificação e diferenciação de espécies é o DNA ribossomal (rDNA). O rDNA são sequências de DNA que codificam o RNA ribossomal, estas sequências ocorrem em múltiplas cópias

no genoma e são agrupadas em repetições tandem. Em eucariotos são formados por genes 18S, 5.8S e 28S, e duas regiões espaçadoras intergênicas variáveis, denominadas espaçador interno transcrito (ITS) (RAMOS, 2016) (Figura 9).

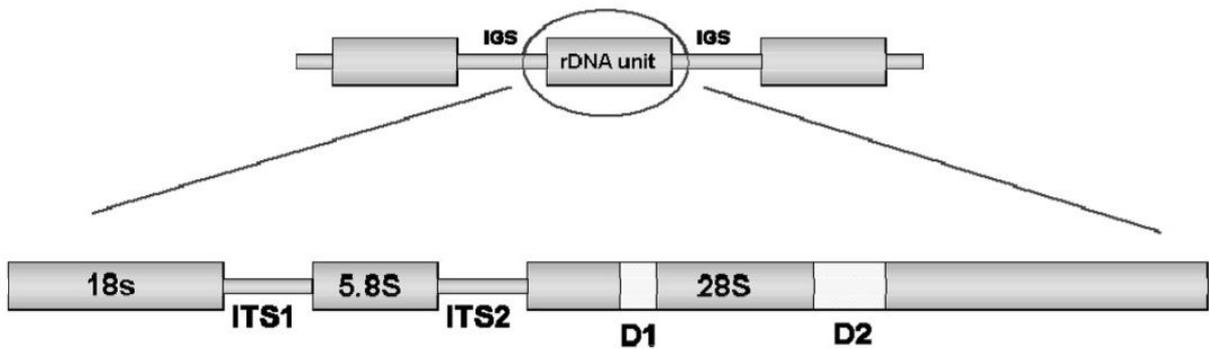


Figura 9- Esquema representativo do operon ribossomal fúngico.
Fonte: BONUGLI-SANTOS, 2010.

A região intergênica transcrita apresenta cerca de 650 pb (pares de bases) que são separadas em subregiões designadas ITS, estas cercam o gene 5.8S ribossomal, e podem ser amplificadas usando oligonucleotídeos iniciadores universais (DAS et al., 2014). O método de amplificação das regiões do ITS tem sido muito utilizado para identificação fúngica a nível de espécie, o sequenciamento baseado nestas regiões demonstram eficiência em estudos de variabilidade genética, localização geográfica e taxonomia de fungos (VELÁSQUEZ et al., 2007; PORTER; GOLDING, 2011).

4 METODOLOGIA

As etapas pertinentes para desenvolvimento desta pesquisa estão apresentadas na Figura 10.

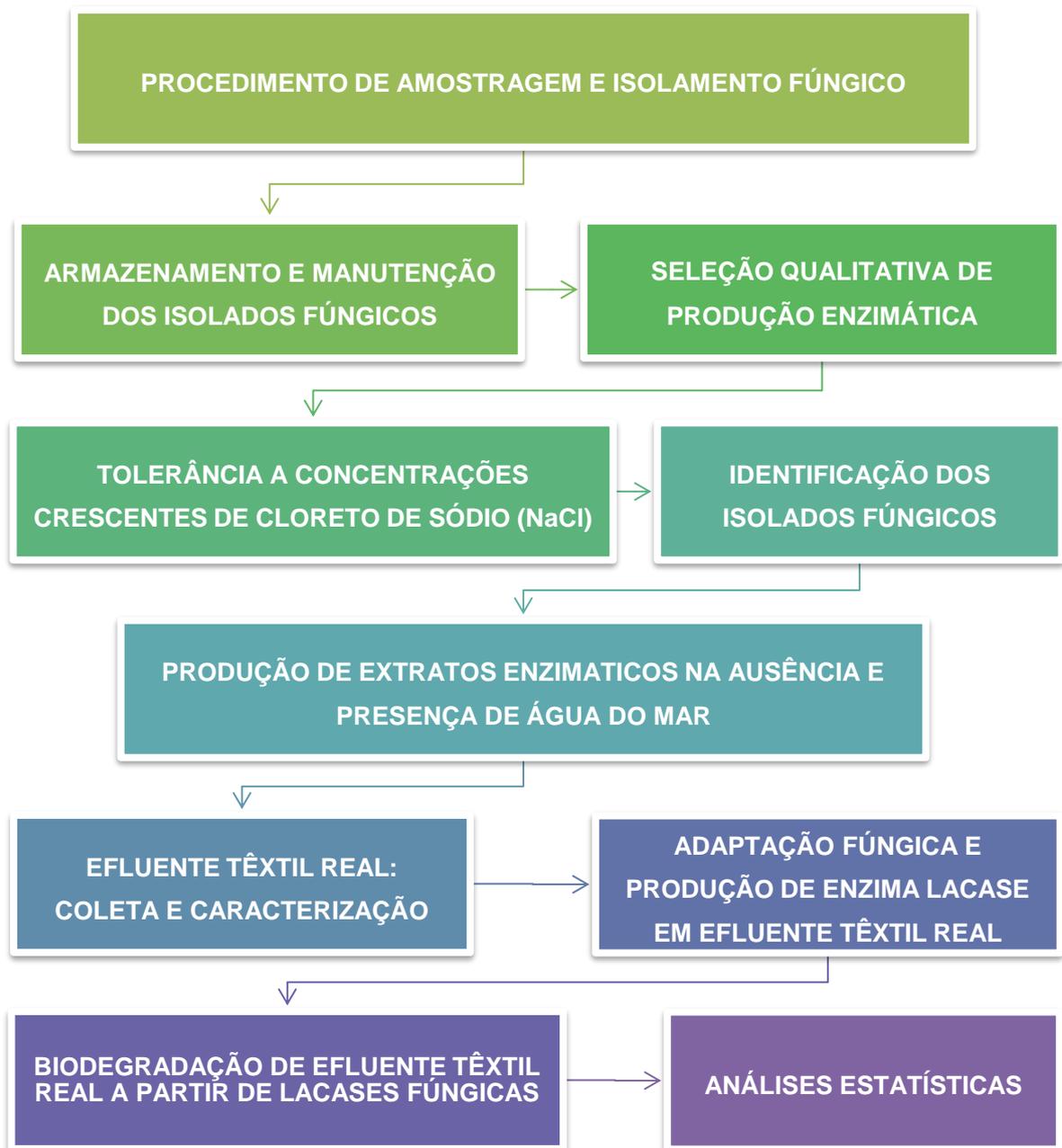


Figura 10- Fluxograma com as principais etapas desenvolvidas durante a pesquisa.

4.1 PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO FÚNGICO

As amostras foram coletadas no Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), em maio de 2017 em dois pontos equidistantes a uma linha paralela. Os pontos foram nomeados como ponto 01 ($25^{\circ}31'17.82''\text{S}$ - $48^{\circ}30'9.21''\text{W}$) e ponto 02 ($25^{\circ}31'10.45''\text{S}$ - $48^{\circ}30'5.48''\text{W}$) (Figura 11), para cada ponto foram coletadas amostras de raízes aéreas em estágio de decomposição de quatro arvores distintas, com o auxílio de uma espátula, a nível máximo do mar. Posteriormente, dados abióticos referentes à água do estuário foram mensurados, *in situ*, com o auxílio de um refratômetro óptico (salinidade) e pHmetro portátil (pH).

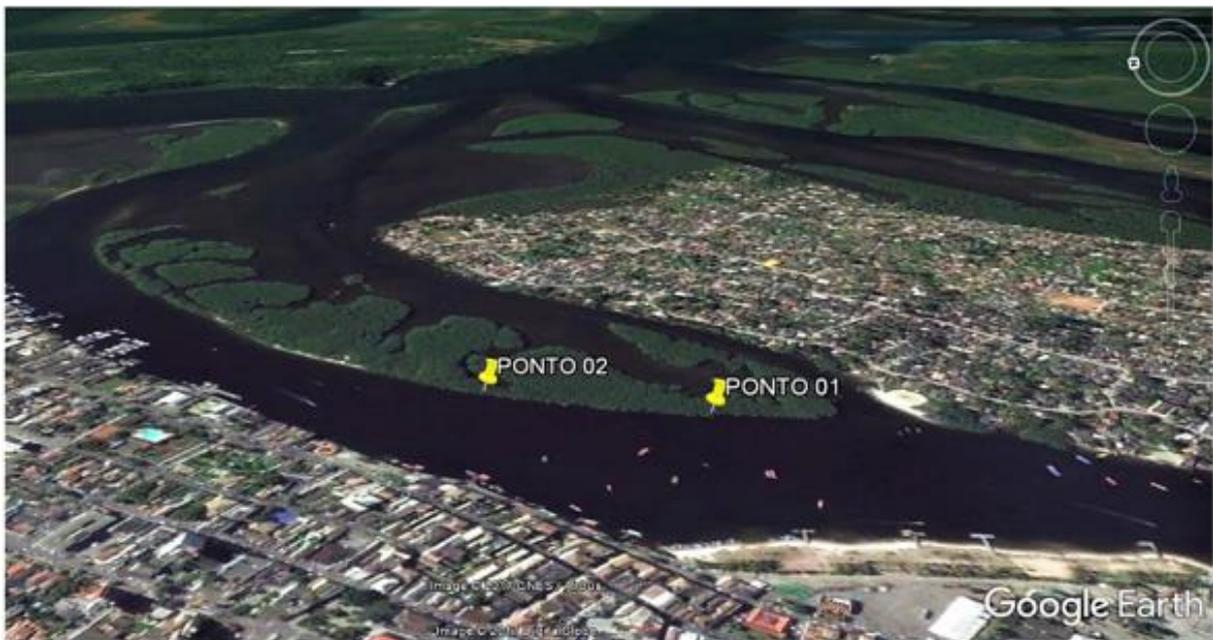


Figura 11- Representação do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), com indicação dos pontos de amostragem.

As amostras armazenadas em sacos plásticos zipados brevemente esterilizados em cabine de luz ultravioleta (UV), devidamente identificados e acondicionados em caixa isotérmica, a qual foi transportada ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - Campus Curitiba (Figura 12).



Figura 12- Fotografia do armazenamento das amostras de raízes aéreas.

Após a coleta, 10 g de cada amostra foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 90 mL de solução estéril (solução salina 0,9% + 1 mL de Tween 80), em seguida, estes foram inseridos em incubadora *Shaker* durante uma hora a 28°C, 120 rpm. A partir da técnica de diluição seriada, realizada segundo a otimização dos fatores entre 10^{-1} e 10^{-4} , alíquotas de 100 μ L da maior e menor diluição foram plaqueadas pelo método de *spread plate* em meio de cultura Agar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC AGAR) pH 6,5, procedimento realizado em duplicata (Figura 13).

As placas de Petri foram incubadas a 28°C, observadas dia a dia durante 15 dias, as colônias fúngicas obtidas durante este período foram repicadas e purificadas pela técnica de diluição seriada, a fim de se obter a cultura monospórica. Os isolados fúngicos purificados foram mantidos em meio de cultura DRBC AGAR, para realização das análises posteriores (Adaptado de PEPPER et al., 2011).

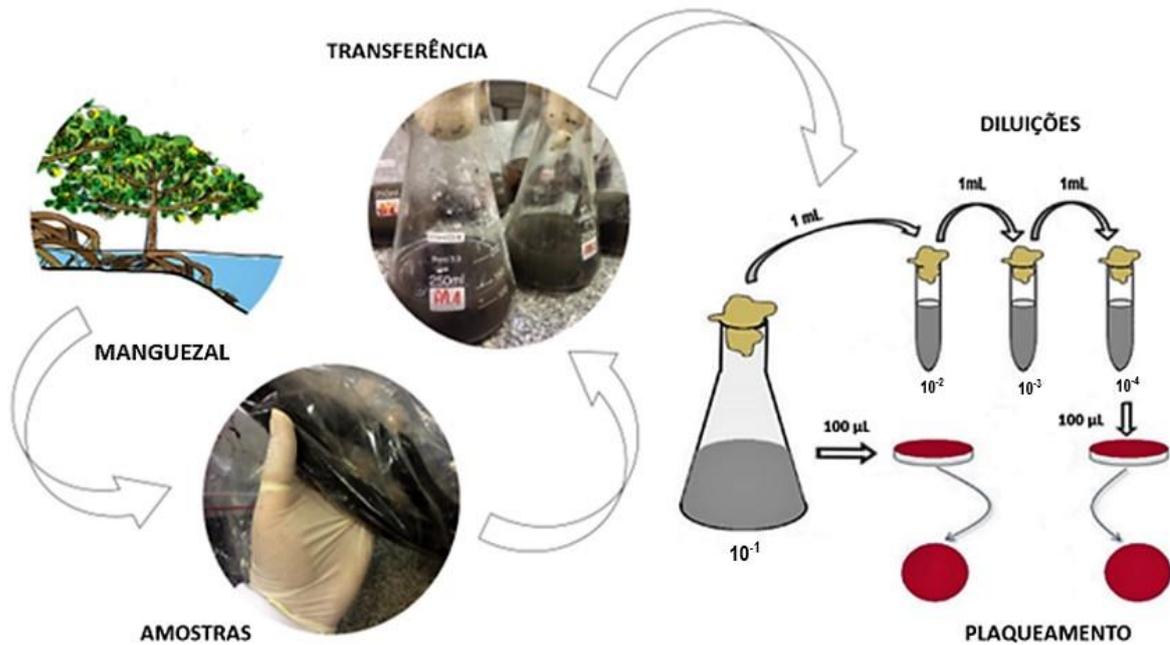


Figura 13- Esquema das etapas desenvolvidas para isolamento fúngico.

4.2 ARMAZENAMENTO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os isolados fúngicos obtidos foram armazenados pelo método de *Castelani*, o qual consiste no cultivo do microrganismo em meio de cultura sólido Ágar Batata Dextrose - BDA, incubados a 28°C durante 7 dias, posteriormente foram retirados discos (plugs) contendo fragmentos da colônia, sendo os mesmos inseridos em microtubos com água destilada, autoclavada a 121°C (1,1 atm) durante 20 minutos. Após este processo os mesmos foram armazenados em refrigeração a 4°C, podendo ser mantidos pelo período de 1 a 4 anos (CASTELLANI, 1967).

A manutenção dos isolados fúngicos foi realizada através de repiques quinzenais em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose - BDA, incubados a 28°C durante 7 dias, com o crescimento visível das colônias os mesmos foram armazenados em refrigeração a 4°C.

4.3 SELEÇÃO QUALITATIVA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A seleção qualitativa foi realizada a partir da produção de enzimas hidrolíticas (celulases, lipases, pectinases e xilanases) e ligninolíticas (lacases e peroxidases). Os isolados obtidos foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose - BDA, autoclavado a 121°C (1,1 atm) durante 20 minutos. Após este procedimento as placas de Petri foram incubadas a 28°C durante sete dias. Com o crescimento evidente das colônias, discos “*plugs*” de 11 mm foram retirados e adicionados em duplicata em repiques pontuais no centro das placas de Petri (94 mm), contendo meio de cultura autoclavado a 121°C (1,1 atm) durante 20 minutos, suplementado com substratos específicos para cada enzima, descritos nos itens 4.4.1 e 4.4.2.

Os resultados foram caracterizados em positivo, para produção de atividade enzimática e negativo para ausência do mesmo. Para realização desta análise cepas dos fungos *Trametes villosa* e *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, foram utilizadas como controle positivo, sendo estas cedidas pelo banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia (BIOTEC), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR.

4.3.1 Enzimas Hidrolíticas

4.3.1.1 Celulases

A análise de produção enzimática da celulase foi realizada através de um meio de cultura, composto por carboximetilcelulose (CMC) 0,2%, ágar 1,8% e sais minerais (NaNO₂ 0,2%, K₂HPO₄ 0,1%, MgSO₄ 0,05%). As placas foram incubadas a 28°C, retiradas com 48 e 72 horas, tempo estabelecido de acordo com o crescimento da colônia (KASANA et al., 2008).

A atividade enzimática da celulase foi avaliada pela degradação da CMC, presente no meio de cultivo como única fonte de carbono. Quando o fungo é

capaz de degradar a CMC um halo incolor é formado ao redor da colônia, após a adição de 5 mL do Lugol de Gram durante 5 minutos. Esta reação indica a hidrólise da celulose, sendo considerada como resultado positivo, a ausência do mesmo é caracterizada como negativo.

4.3.1.2 Lipases

A análise de produção enzimática da lipase foi realizada através do meio de cultura Ágar Batata Dextrose - BDA, com adição de 1% de azeite de oliva (Gallo®), 0,01% de Tween 80 e 0,001% de rodamina B. As placas foram incubadas a 28°C, avaliadas em 48 e 72 horas, tempo estabelecido de acordo com o crescimento da colônia (KOUKER; JAEGER, 1987).

A avaliação desta atividade é realizada a partir da irradiação das placas de Petri em câmara de luz ultravioleta, a formação de halos fluorescentes amarelo-alaranjado ao redor da colônia é caracterizada como resultado positivo, sua ausência é determinada como negativo. Esta metodologia envolve a medida de fluorescência causada pela interação da rodamina B com os ácidos graxos liberados pela hidrólise enzimática do azeite de oliva.

4.3.1.3 Pectinases

A análise de produção da enzima pectinase foi realizada através de um meio de cultivo composto por ácido cítrico 0,774%, pectina cítrica 0,25%, fosfato dissódico 1,793%, ágar 1,8%. As placas foram incubadas a 28°C, retiradas com 48 e 72 horas, tempo estabelecido de acordo com o crescimento da colônia (COSTA et al., 2014).

A atividade enzimática da pectinase foi avaliada pela degradação da pectina cítrica, presente no meio de cultivo. A capacidade do fungo em degradar esta substância é analisada através de um halo incolor formado ao redor da colônia, após a adição de 5 mL do Lugol de Gram durante 5 minutos. Esta reação indica a

hidrólise de ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica, este resultado é considerado positivo, a ausência do mesmo é caracterizada como negativo.

4.3.1.4 Xilanases

As xilanases hidrolisam ligações glicosídicas entre unidades de xilose que compõem a xilana. A análise de produção enzimática da xilanase foi realizada através do meio de cultura Ágar Extrato de Malte - AEM, com adição de azul brilhante de remazol R-D-Xilano (RBB-xylan) 0,02%. As placas foram incubadas a 28°C, durante 7 a 10 dias, tempo estabelecido de acordo com o crescimento da colônia (POINTING, 1999).

A atividade enzimática da xilanase é evidenciada a partir da degradação do substrato RBB-xylan, esta sendo observada a partir de um halo incolor de descoloração do substrato ao redor da colônia. Esta reação indica a hidrólise de ligações glicosídicas entre unidades de xilose que compõem a xilana, este resultado é considerado positivo, a ausência do mesmo é caracterizada como negativo.

4.3.2 Enzimas Ligninolíticas

4.3.2.1 Atividade da Lacase

4.3.2.1.1 Ágar Ácido Tânico e ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid))

A análise de produção da enzima lacase foi realizada através de duas técnicas: (A) Ágar ácido tânico - meio de cultura composto por Ágar Batata Dextrose - BDA, com adição de solução de ácido tânico 1%. Para cada placa de Petri foram

inseridos 18 mL de BDA e 2 mL de solução de ácido tânico. (B) ABTS - meio de cultura composto por ABTS 0,01%, peptona 0,01%, extrato de levedura 0,001%, glicose 2% e ágar 1,8%. As placas em ambas as técnicas foram incubadas a 28°C, durante 7 dias (POINTING, 1999).

A atividade enzimática da lacase foi avaliada através oxidação do substrato ácido tânico e ABTS, está sendo observada através de um halo de cor marrom ao redor da colônia na técnica (A), e halo de cor verde na técnica (B), estes resultados são considerados positivo, a ausência dos mesmos é caracterizada como negativo.

4.3.2.2 Atividade das Peroxidases

4.3.2.2.1 *Ágar Vermelho de Fenol e Ágar Azure B*

A análise de produção das enzimas peroxidases foram realizadas através de duas técnicas: (A) *Ágar Vermelho de Fenol* - meio de cultura composto por *Ágar Batata Dextrose - BDA*, com adição de *Vermelho de Fenol* 0,05%. (B) *Ágar Azure B* - meio de cultura composto por *Azure B* 0,01%, peptona 0,01%, extrato de levedura 0,001%, glicose 2% e ágar 1,8%. As placas em ambas as técnicas foram incubadas a 28°C, durante 7 dias (KUWAHARA et al., 1984; MOHAMED et al., 2012); (POINTING, 1999).

A atividade enzimática das peroxidases foram avaliadas através oxidação do substrato vermelho de fenol e azure B, está sendo observada através de um halo de cor vermelho na técnica (A), e halo incolor de descoloração do substrato na técnica (B), estes resultados são considerados positivo, a ausência dos mesmos é caracterizada como negativo.

4.4 TOLERÂNCIA A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE CLORETO DE SÓDIO (NaCl)

Este procedimento foi realizado através do meio de cultura base Ágar Batata Dextrose - BDA, com adições de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (0,85%, 1,5%, 3,5%, 5%), autoclavado a 121°C (1,1 atm) durante 20 minutos. Discos “*plugs*” de 11 mm contendo micélio fúngico foram repicados em ponto único central nas placas de Petri (94 mm), incubadas a 28°C durante 7 a 10 dias. A avaliação desta atividade foi realizada a partir da observação do crescimento das colônias fúngicas, o qual indica tolerância ou intolerância à salinidade.

As variáveis de salinidade determinadas propõem não só a avaliação do desempenho dos isolados em condições similares ao seu habitat (3%), como também em ambientes que apresentem níveis mais altos de salinidade. Caracterizados como halotolerantes estes fungos são considerados promissores em processos que apresentam alto teor de salinidade, como a biorremediação de ambientes marinhos impactados e tratamento de efluentes têxteis.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

4.5.1 Identificação Macroscópica e Microscópica

Os isolados selecionados segundo o item 4.3 foram identificados macroscopicamente, através de características morfológicas e microscopicamente a partir da caracterização da estrutura de reprodução (hifas, esporos e conídios). A identificação microscópica foi realizada a partir da técnica de cultura em lâmina, descrita por Riddell, (1950) (Figura 14). A avaliação desta técnica consiste na observação em microscópio óptico das estruturas fúngicas, através da coloração por azul de algodão das lamínulas, retiradas em intervalos de 7, 14, 21 e 28 dias. Para auxiliar na identificação dos isolados fúngicos o banco de dados online Mycobank foi utilizado.

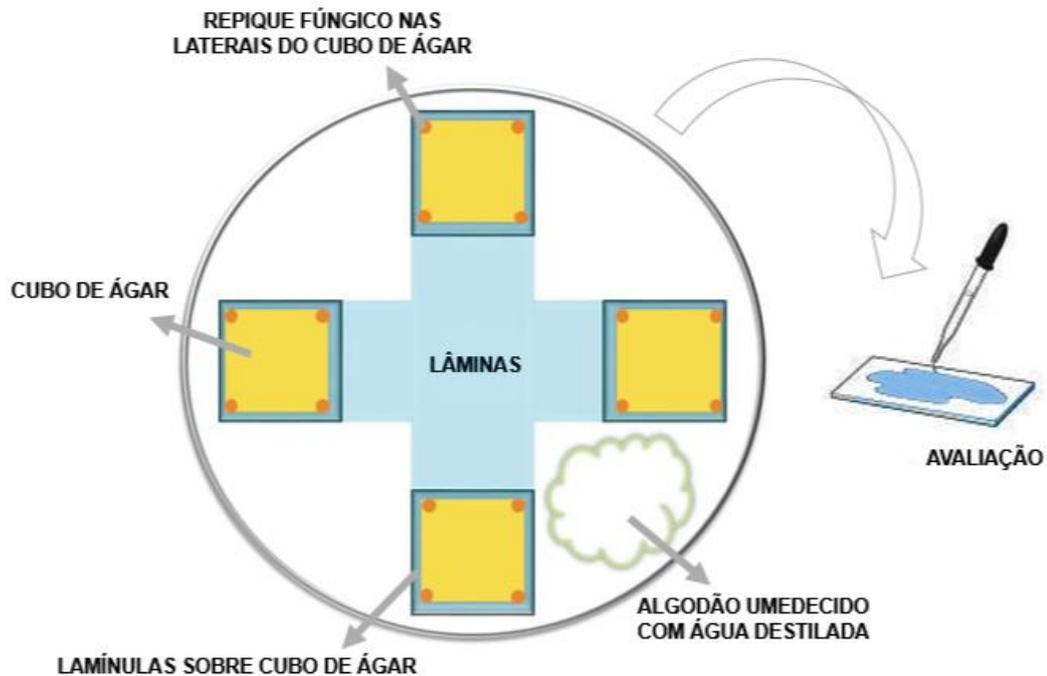


Figura 14- Esquema da técnica de cultura em lâmina descrita por Riddell (1950).

4.5.2 Identificação Molecular

Este procedimento foi realizado em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, Brasil. Inicialmente, os isolados fúngicos selecionados a partir do item 4.3 foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose - BDA, autoclavado a 121°C (1,1 atm) durante 20 minutos, as placas foram incubadas a 28°C durante quatro dias. Posteriormente, foram submetidos à extração e purificação de DNA, utilizando o *Norgen's Plant/Fungi DNA Isolation Kit*.

O método de extração e purificação foi realizado a partir da trituração do micélio fúngico (cerca de 100 mg) com auxílio de pistilo e nitrogênio líquido em tubos tipo eppendorf. Após esta etapa foram adicionados 500 µL de tampão de lise L e 1 µL RNase A, seguido de homogeneização e incubação a 65°C, durante 10 minutos. Com a finalização do processo de incubação, 100 µL de tampão de ligação

I foram adicionados ao lisado, seguido de homogeneização e incubação em gelo por 5 minutos.

O lisado foi pipetado na coluna de filtro e centrifugado a 14.000 rpm durante 2 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf, onde foram adicionados volume de etanol 70% igual ao obtido de sobrenadante. O lisado clarificado com etanol foi aplicado na coluna de rotação, seguido de centrifugação 10.000 rpm durante 1 minuto, em seguida o sobrenadante foi descartado. Nesta etapa a resina de matriz de separação *Norgen* liga os ácidos nucleicos através de concentrações iônicas, assim somente o DNA permanece na coluna de rotação.

O DNA presente na coluna foi “lavado” a partir de 500 µL de solução WN, e 500 µL de solução de lavagem A, entre as etapas de lavagem foi realizada a centrifugação por 1 minuto e descarte do sobrenadante. O DNA total purificado foi eluído através da adição na coluna de 100 µL de tampão de eluição B, seguido de incubação em temperatura ambiente e centrifugação a 10.000 rpm, ambas durante 1 minuto. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) conforme descrito por Sambrook et al. (1989) para confirmar a presença do DNA extraído.

As amostras de DNA obtidas foram desidratadas e enviadas para amplificação, purificação e sequenciamento das regiões espaçadoras internas 1 e 2 e gene 5.8S do rDNA na empresa coreana MACROGEN, Inc. (Seul, Coreia do Sul). Foram utilizados os iniciadores, ITS 1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990).

O sequenciamento parcial dos fragmentos amplificados foi realizado diretamente a partir do produto de PCR utilizando o iniciador ITS1 e ITS4, sendo a corrida realizada em sequenciador 3730xl. As sequências obtidas foram submetidas ao “*Basic Local Alignment Search Tool*” - BLAST. Posteriormente, realizou-se a comparação com as sequências depositadas banco de dados no Centro Nacional de Informações em Biotecnologia – NCBI. O alinhamento das sequências e análise filogenética foram realizados através do método “*Neighbor-joining*” com cálculo da distância pelo modelo “*Kimura's 2 -parameter*” com 1000 repetições utilizando o programa MEGA version X (KUMAR et al., 2018).

4.6 PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE ÁGUA DO MAR

Os extratos enzimáticos foram obtidos através de cultivo líquido estático, realizado a partir de duas técnicas: (1) Presença de água do mar, realizada através do cultivo em água do mar, utilizando as condições ambientais apresentadas pelo ecossistema (pH 8,0 e salinidade 3%) e (2) Ausência de água do mar, realizada a partir do cultivo em água deionizada, pH 6,0.

As amostras de água do mar utilizadas para desenvolvimento desta análise foram coletadas próximas aos pontos de amostragem, com o auxílio de garrafas pet, os procedimentos utilizados para transporte estão mencionados no item 4.1. Posteriormente, as amostras passaram pelos processos de filtração em papel filtro qualitativo, centrifugação a 5.000 rpm durante 5 minutos e filtração por membrana millipore 0,22 µm, técnicas utilizadas para remoção de impurezas.

Erlenmeyers de 250 mL foram utilizados como recipiente para produção de 50 mL de meio de cultura nutritivo, composto por glicose (10 g/L), fosfato de potássio monobásico (K_2HPO_4) (3 g/L), peptona bacteriológica (5 g/L), (GALHAUP et al., 2002; HOU et al., 2004), solução de sulfato de cobre ($CuSO_4$) (1 mM) e solução de sulfato de manganês ($MnSO_4$) (1 mM). Com adição de 0,5% (m/v) de bagaço de uva bordô seco e 1% (m/v) de material lignocelulósico seco (bagaço de cana) (LORENZO et al., 2002), autoclavado a 121°C (1,1 atm) durante 20 minutos (Figura 15-A). Nesta etapa a água do mar foi transferida separadamente, ou seja, não sendo exposta ao processo de esterilização por autoclavagem.

O cultivo dos isolados fúngicos foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose - BDA, autoclavado a 121°C (1,1 atm) durante 20 minutos. As placas foram incubadas a 28°C durante 7 dias. O inóculo constituiu-se de três discos “*plugs*” de 11 mm de micélio fúngico, os quais foram recortados com o auxílio de tubos de ensaio estéreis. A transferência dos “*plugs*” para os Erlenmeyers contendo meio de cultura nutritivo foi realizada com o auxílio de palitos de madeira estéreis (Figura 15-B), seu crescimento foi realizado através da incubação a 28°C, durante 7 dias (Figura 15-C) (LORENZO et al., 2002).

Após o período de crescimento fúngico, o cultivo foi separado gravitacionalmente por filtração (Figura 15-D). O filtrado foi centrifugado a 5000 rpm

por 15 minutos (Figura 15-E) (CABANA et al., 2007). Este foi então aplicado como extrato enzimático nos ensaios de atividade de enzimas ligninolíticas. O armazenamento dos extratos foi realizado a partir de alíquotas inseridas em microtubos, estes contidos em refrigeração a -20°C (Figura 15-F).

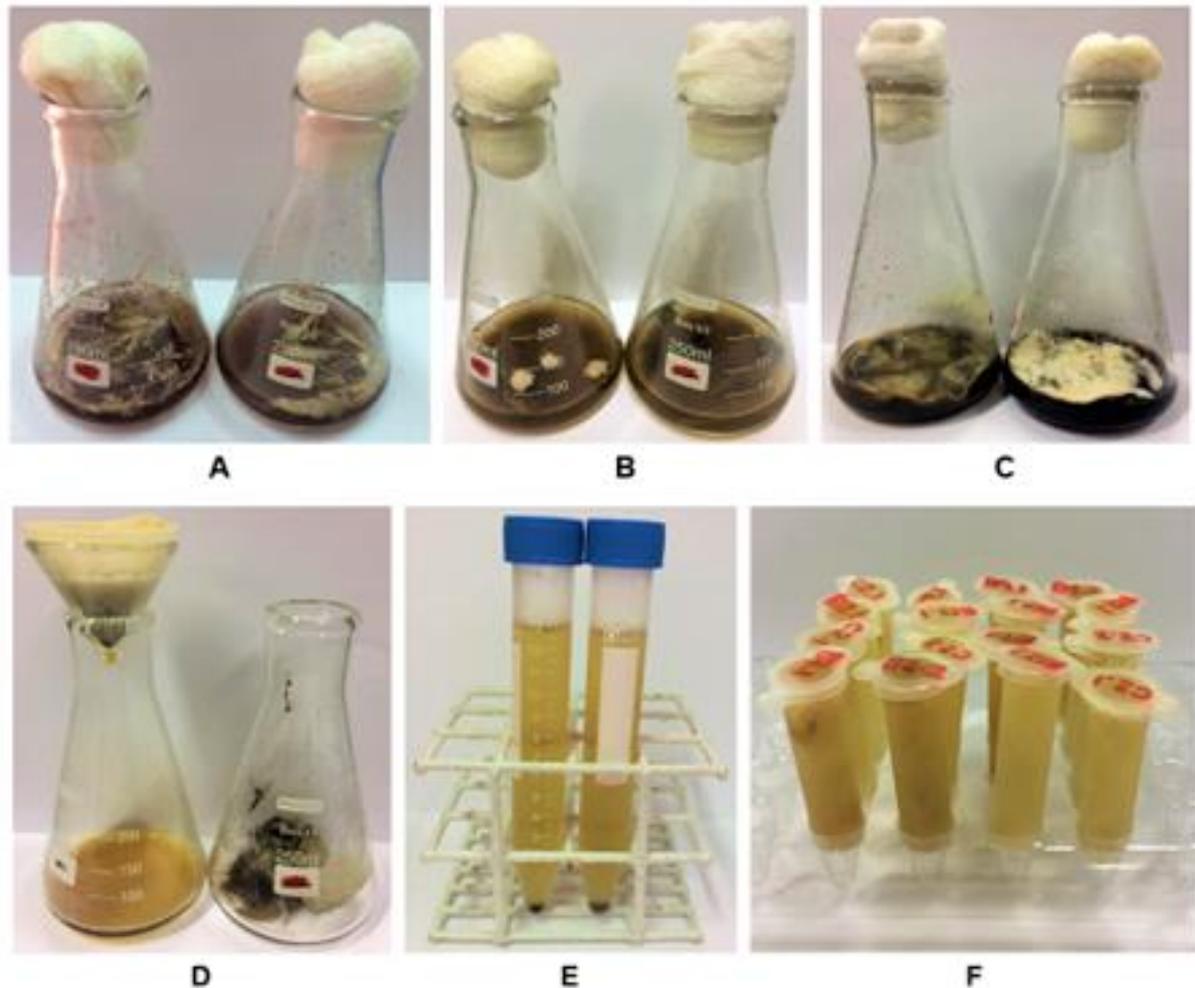


Figura 15- Representação das etapas de produção de extratos enzimáticos. A: Meio de cultura nutritivo; B: Transferência dos "plugs"; C: Crescimento fúngico; D: Filtração do cultivo; E: Centrifugação do filtrado; F: Armazenamento do extrato enzimático.

4.6.1 Determinação da Atividade Enzimática

Para realização desta atividade foi utilizado como controle positivo a cepa do fungo *Trametes villosa*, cedida pelo banco de cepas do Laboratório de

Biotecnologia (BIOTEC), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR. As condições para obtenção do extrato enzimático deste, foram as mesmas mencionadas no item 4.6.

4.6.1.1 Enzimas Ligninolíticas

4.6.1.1.1 Atividade da Lacase

Avaliada pela medição da absorvância em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51), no comprimento de onda de 420 nm. Monitorada através da oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis(3-etiltiazolina-6-sulfonato)) (HOU et al., 2004).

4.6.1.1.2 Atividade da Manganês Peroxidase

Avaliada pela medição da absorvância em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51), no comprimento de onda de 270 nm. Monitorada através da oxidação do sulfato de manganês ($MnSO_4$) 1 mM em solução tamponada (pH 4,5) usando o tampão malonato de sódio 0,05 M, na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,1 mM (WARIISHI; VALLI; GOLD, 1992).

4.6.1.1.3 Atividade da Lignina Peroxidase

Avaliada pela medição da absorvância em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51), no comprimento de onda de 310 nm. Monitorada através da oxidação do álcool veratrílico em tampão tartarato 1 mM (pH 3,0), na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,2 mM (KIRK; TIEN; FAISON, 1984).

4.7 EFLUENTE TÊXTIL REAL: COLETA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A amostra de efluente têxtil real foi cedida por uma Indústria Têxtil, coletada diretamente de uma máquina industrial em seu estágio de tingimento. O efluente coletado apresenta três corantes distintos, sendo eles: LANASET® Amarelo PA-4G, LANASET® Laranja PA-2R e ERIONYL® Vermelho. O armazenamento deste foi realizado sob refrigeração a 4°C, visando a preservação de suas propriedades físico-químicas durante as análises.

Após o procedimento de coleta, o efluente foi transportado a Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, onde juntamente com o Laboratório de Tratamentos de Águas Residuais - LATAR foram realizadas análises para caracterização físico-química do efluente, descritas dos itens 4.7.1 a 4.7.5.

4.7.1 Análise de pH

A leitura do potencial hidrogeniônico (pH) foi realizada através de um pHmetro de bancada calibrado com soluções de pH 4,0 e 7,0 (APHA, 2012).

4.7.2 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) é o método que consiste na avaliação da quantidade de matéria orgânica suscetível à oxidação por meios químicos. Este procedimento é realizado empregando dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio ácido, como agente oxidante em amostras líquidas, sendo o resultado expresso em miligramas (mg) de oxigênio por litro (L).

Em frascos de Winkler foram adicionados 2 mL do efluente diluído (1:10), 2 mL de solução digestora (composta por 10,216 g de $K_2Cr_2O_7$; 33,3 g $HgSO_4$;

168 mL de H₂SO₄ e 1 L de água deionizada) e 2 mL de solução catalítica (composta por 10,7 g de AgSO₄ e 1 L de H₂SO₄), os frascos foram completados com água deionizada. Este procedimento foi realizado em duplicata, para o controle utilizou-se água deionizada ao invés do efluente diluído.

Após este processo os frascos foram colocados em bloco digestor e mantidos a temperatura de 150°C por 2 horas. A leitura das análises foi realizada em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51), no comprimento de onda de 600 nm. A concentração da demanda de O₂ da amostra, em mg/L, foi obtida pela interpolação dos dados obtidos em curva de calibração (Apêndice A) utilizando biftalato de potássio como padrão (APHA, 2012).

4.7.3 Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅)

A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅) é o parâmetro que corresponde à quantidade de oxigênio consumido na degradação da matéria orgânica em meio aquático por processos biológicos, sendo o resultado expresso em miligramas (mg) de oxigênio por litro (L). A quantidade de matéria orgânica biodegradável na amostra é determinada através da concentração de oxigênio dissolvido, antes (OD - Inicial) e após a incubação (OD - Final) (APHA, 2012).

Esta análise foi realizada inicialmente a partir da correção do pH do efluente para neutro. Com a determinação da DQO conforme o item 4.8.2, foi verificada a concentração do volume de efluente a ser trabalhada (2 mL e 5 mL). Em frascos de Winkler além das concentrações de efluente, também foram adicionados 300 µL de solução tampão fosfato 300 µL de MgSO₄, 300 µL de CaCl₂ e 300 µL de FeCl₃, completados com água aerada e levados a incubadora do tipo B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio), ao abrigo da luz durante 5 dias a 20°C. Este procedimento foi realizado em duplicata, para o controle utilizou-se água deionizada ao invés do efluente.

A leitura desta análise foi realizada através da titulação das amostras utilizando solução padrão de tiosulfato de sódio (25 mM). Nos frascos antes de cada titulação foram adicionados 1 mL de solução de manganês, 1 mL de iodeto-azida alcalina (repouso por 15 minutos), 1 mL de ácido sulfúrico e três gotas de

solução de amido, entre cada adição foi realizada a homogeneização dos frascos (Figura 16). Os resultados das titulações foram anotados e determinados conforme a equação 1 (APHA, 2012):

$$\text{OD - Inicial} = \frac{(0,025 \times 8000 \times 300 \times F_c \times V_G)}{100 \times V_F} \quad (1)$$

Onde:

F_c = Fator de Correção da Solução Padrão de Tioissulfato

V_G = Volume Gasto na Titulação

V_F = Volume do Efluente



Figura 16- Fotografia dos frascos de Winkler após adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

NOTA: Neste processo ocorre uma intensa floculação da amostra e conseqüentemente precipitação do material floculado. Após a adição de H_2SO_4 , os flocos são rompidos, sendo possível observar o desenvolvimento de uma coloração alaranjada, cuja intensidade é proporcional à concentração de oxigênio dissolvido presente inicialmente na amostra.

4.7.4 Quantificação de Compostos Fenólicos

Este procedimento foi realizado em balões volumétricos de 10 mL, onde foram inseridos 5 mL de água deionizada, 100 µL de efluente têxtil real e 500 µL de reagente de FolinCiocalteu. Deixou-se repousar por 3 minutos e adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de cálcio a 15 %. Posteriormente, os mesmos foram homogeneizados, avolumados com água deionizada e mantidos ao abrigo da luz durante 2 horas. Este procedimento foi realizado em duplicata, para o controle utilizou-se água deionizada ao invés do efluente padrão.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51), no comprimento de onda de 765 nm. A concentração de fenólicos na amostra, em mg/L, foi obtida pela interpolação dos dados obtidos em curva de calibração (Apêndice B) utilizando ácido gálico como padrão (AMERINE; OUGH, 1976).

4.7.5 Análise de Varredura Espectral do Efluente Têxtil Real

A varredura espectral do efluente foi realizada em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51) no comprimento de onda de 400 a 700 nm, esta análise tem como finalidade determinar as bandas de maior intensidade do efluente têxtil.

4.8 ADAPTAÇÃO FÚNGICA E PRODUÇÃO DE ENZIMA LACASE EM EFLUENTE TÊXTIL REAL

Os fungos *Microsphaeropsis arundinis* (LB07) e *Trametes villosa* foram submetidos ao cultivo em efluente têxtil real, este substituído pela água do mar ou deionizada. O critério de seleção destes fungos ocorreu a partir dos resultados de produção de enzima lacase, descritos no item 5.5.2. Após a obtenção dos extratos enzimáticos, a produção de lacase foi quantificada. Os métodos utilizados para realização destes procedimentos estão descritos nos itens 4.6 e 4.6.1.1.1.

4.9 BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL REAL A PARTIR DE LACASES FÚNGICAS

A biodegradação do efluente têxtil real foi realizada através da aplicação da enzima lacase obtida de extratos enzimáticos, produzidos pelos fungos *Microsphaeropsis arundinis* (LB07) e *Trametes villosa*, cultivados em suas melhores condições (presença ou ausência de água do mar). A escolha destes fungos é decorrente de seus resultados de produção de lacase, descritos no item 5.5.2. Além da aplicação da lacase, também foram inseridas as técnicas de ausência e presença de mediadores químicos. Os mediadores utilizados neste procedimento foram o Ácido 4-hidroxibenzóico (AHB) e 1-hidroxibenzotriazol (HBT), empregados a fim de avaliar a atividade da enzima lacase sob ação destes compostos.

Em Erlenmeyes de 100 mL com volume final de reação de 10 mL foram inseridos: efluente têxtil real e extrato enzimático contendo atividade pré-determinada de 100 U/L e 500 U/L da enzima lacase. A quantificação da enzima lacase foi realizada através do método descrito no item 4.6.2.1.1. Para as análises referente a presença de mediador químico, além dos componentes citados, foram adicionados individualmente os mediadores AHB e HBT na concentração de 1 mM. Estes procedimentos foram realizados em duplicata, para o controle utilizou-se enzima desnaturada ao invés de extrato enzimático (Figura 17).

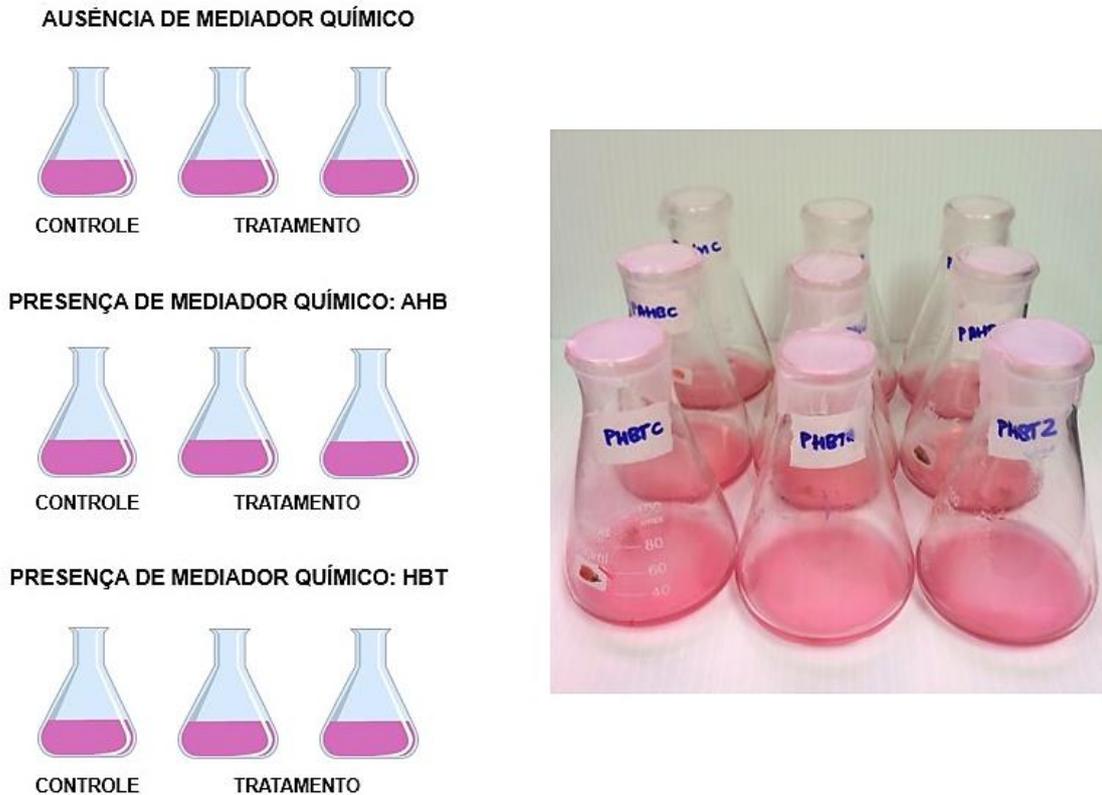


Figura 17- Representação do processo de biodegradação de efluente têxtil real. Análise desenvolvida através da ausência e presença de mediadores químicos. AHB: Ácido 4-hidroxibenzóico; HBT 1-hidroxibenzotriazol; Controle: Enzima desnaturada; Tratamento: Extrato enzimático contendo atividade da enzima lacase.

Os Erlenmeyes foram então inseridos em incubadora Shaker durante 24 horas a 28°C, 120 rpm. Após este período as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm (força gravitacional = 1680) por 5 minutos. A leitura foi realizada através da análise de varredura em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51), no comprimento de onda de 400 a 700 nm. Os picos de maior intensidade do efluente foram analisados e calculados através da equação 2 (WANG et al., 2011), onde pode-se evidenciar a porcentagem de descoloração do efluente têxtil.

$$D (\%) = \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

D (%) = Porcentagem de Descoloração da Amostra

Abs_{amostra} = Valor da Absorbância após o Tratamento

Abs_{controle} = Valor da Absorbância da Solução Referência.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram realizados testes estatísticos para avaliação das interações entre a presença e ausência de água do mar, assim como para analisar a significância das possíveis diferenças entre as técnicas. Os testes utilizados foram: análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (comparações múltiplas), estes calculados com confiança de 95% ($\alpha=0,05$) através do softwar Origin Pro 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR

Os resultados obtidos nesta análise indicam salidade de 30 ppm (partes por milhão), ou seja, para cada litro de água do estuário há 0,03 g de sais dissolvidos, sendo a maior parte cloreto de sódio (NaCl), e pH alcalino de 8,0. Estudando duas áreas do Canal da Cotinga, Baía de Paranaguá Spach et al. (2012), obtiveram em suas análises abióticas variação de 23-33 ppm de salidade e pH entre 8,0-8,4, estes resultados corroboram com o presente estudo.

5.2 SELEÇÃO QUALITATIVA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A partir das amostras de raízes aéreas de árvores do manguezal, foram obtidos 40 isolados fúngicos (Apêndice C), estes analisados qualitativamente quanto à sua produção enzimática (hidrolíticas e ligninolíticas). Do ponto de vista prático, existem várias propostas para determinação da atividade enzimática por difusão radial em meio sólido. Os fatores principais que viabilizam esta seleção incluem, a correlação direta entre o tamanho do halo observado e a capacidade degradativa dos microrganismos (CESKA, 1971; LIN et al., 1991). Os resultados foram avaliados quanto à produção ou não de halos de degradação dos substratos utilizados e/ou alteração da coloração do meio de cultura (Figura 18).

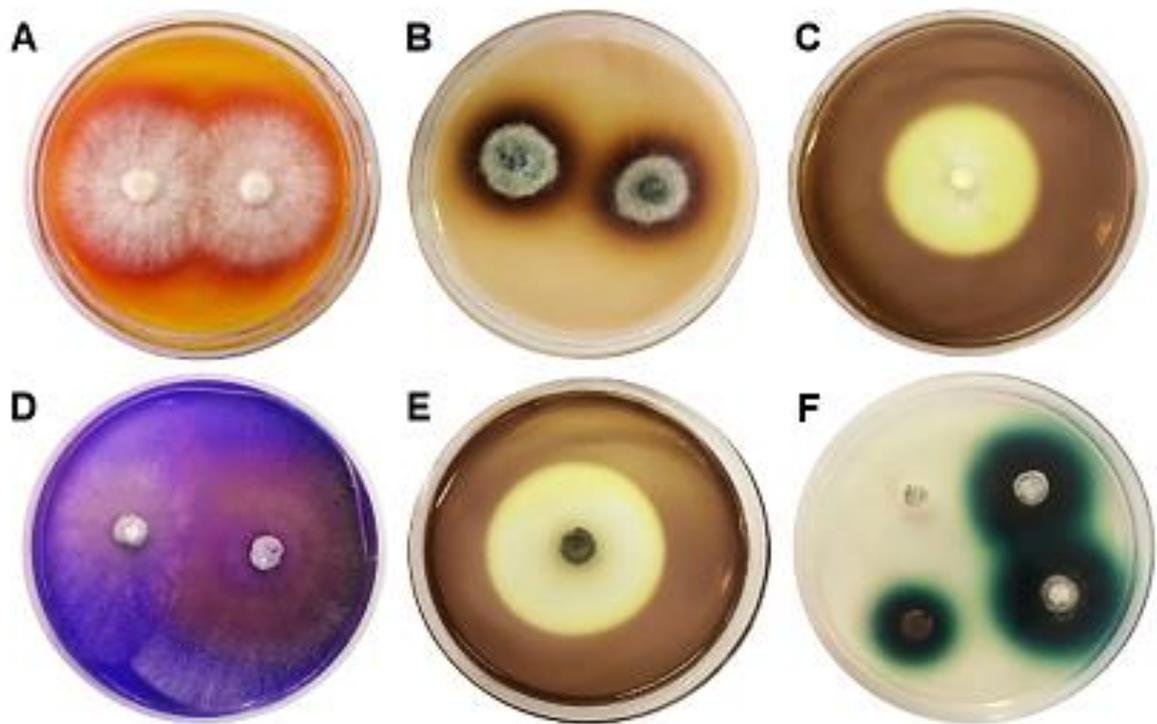


Figura 18- Fotografia das placas de Petri contendo meio de cultura suplementado com substratos específicos. Observação de reações de hidrólise ou oxidação do substrato. A e D: Peroxidases; B e F: Lacases; C: Celulases; E: Pectinases.

Todos os isolados fúngicos obtidos apresentaram alguma atividade enzimática. Na Tabela 1 pode-se observar que 85% dos isolados fúngicos obtidos produziram celulases. Tal fato deve-se ao ecossistema manguezal, ambiente considerado adequado para exploração de microrganismos degradadores de celulose, devido à entrada contínua de carbono celulósico (BEHERA et al., 2016). Seguindo das celulases, as pectinases foram detectadas em 78% dos isolados. As pectinases microbianas estão presentes no processo de compostagem, facilitando a degradação de matéria orgânica e contribuindo para o ciclo natural do carbono (PEDROLI et al., 2009).

Tabela 1- Quantidade de isolados fúngicos de raízes aéreas de manguezal, produtores de enzimas hidrolíticas e ligninolíticas.

	ENZIMA	FUNGOS
	ENZIMAS HIDROLÍTICAS	CELULASES
LIPASES		10
PECTINASES		32
XILANASES		8
ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	LACASES	
	Ágar Ácido Tânico	10
	ABTS	18
	PEROXIDASES	
	Ágar Azure B	7
	Ágar Vermelho de Fenol	12

Após o processo de seleção qualitativa de produção enzimática, nove isolados fúngicos foram selecionados para posteriores análises (Tabela 2). O critério de seleção destes isolados ocorreu através da sua produção por um número maior de enzimas, sendo priorizadas as enzimas ligninolíticas (lacases e peroxidases).

Tabela 2- Dados referentes à produção enzimática dos isolados fúngicos selecionados.

ENZIMA	IDENTIFICAÇÃO								
	LB01	LB02	LB03	LB04	LB05	LB06	LB07	LB08	LB09
CELULASES	1	1	1	1	1	1	1	0	0
LIPASES	0	0	1	1	0	1	0	0	0
PECTINASES	1	1	1	1	1	1	1	0	1
XILANASES	0	0	0	1	0	0	1	0	1
LACASES									
A	1	1	1	0	1	0	1	0	0
B	1	1	1	1	1	0	1	0	1
PEROXIDASES									
C	0	1	0	1	1	1	0	0	0
D	0	1	0	1	0	1	1	1	0

Nota: A = Ágar Ácido Tânico; B = ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)); C = Ágar Vermelho de Fenol; D = Ágar Azure B; (1) = Presença de produção enzimática; (0) = Ausência de produção enzimática.

Observa-se na Tabela 2 a diversidade de produção enzimática entre os isolados fúngicos selecionados. Das enzimas avaliadas, os isolados LB02, LB04 e LB07, apresentaram até 85% de resultado positivo, tal fato os tornam isolados em potencial. A produção de enzimas hidrolíticas por fungos de ecossistema manguezal vem sendo amplamente relatada, o mesmo não se pode afirmar quando se trata de enzimas ligninolíticas.

Na costa do Mar Vermelho, Egito, El-Morsy (2000) utilizando raízes de *Avicennia marina*, constatou a produção das enzimas celulase, pectinase e xilanase, pelos fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Stachybotrys chartarum*, *Verticillium cyclosporum* e *Chaetomium hamadae*. A partir de folhas e segmentos de caule de *Avicennia officinalis* Neema, Manomi, Philip (2015), isolaram fungos do gênero *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp. e *Curvularia* sp., os quais apresentaram produção das enzimas celulase e lipase.

Estudos relacionados à produção de enzimas ligninolíticas por fungos de manguezal são escassos. No entanto, Verma et al. (2010) isolaram 40 cepas fúngicas de árvores de manguezais em decomposição na Índia, e identificaram os gêneros *Diaporthe* sp., *Pestalotiopsis* sp., e as espécies *Corioliopsis byrsina*, *Cerrena unicolor*, evidenciados pelos autores como produtores de lacase. A partir de sedimento de manguezal da costa do mar vermelho da Arábia Saudita, Ameen et al. (2016) isolaram fungos das espécies *Alternaria alternata*, *Aspergillus terreus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Eupenicillium hirayamae* e *Paecilomyces variotii*, os quais foram apontados pelos autores como produtores de enzimas peroxidases.

5.3 AVALIAÇÃO DA HALOFILIA ADAPTATIVA FÚNGICA

O pressuposto para esta análise foi de que, conforme o aumento da concentração de NaCl no meio de cultura, maior seria o estresse osmótico e, portanto, menor o desenvolvimento dos isolados fúngicos. Os resultados obtidos estão de acordo com esse pressuposto, sendo possível observar diante a Figura 19 um processo decrescente de desenvolvimento micelial com o aumento da concentração de NaCl no meio de cultura em Placa de Petri. Contudo, mesmo na

maior concentração utilizada neste estudo (5%), os isolados apresentaram crescimento, ou seja, não foram completamente inibidos, evidenciando a resistência destes em concentrações $\leq 5\%$ de salinidade.



Figura 19- Representação do crescimento fúngico em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose - BDA, com adições de diferentes concentrações (0,85%, 1,5%, 3,5%, 5%) de cloreto de sódio (NaCl), incubadas a 28°C durante 7 a 10 dias.

Levando em consideração o fato de que os fungos marinhos estão adaptados às condições de salinidade do mar, pressupõe-se que, o ambiente pode influenciar na ativação de diferentes vias metabólicas dos microrganismos, estas podendo ser utilizadas na sintetização de enzimas vitais para sua adaptação (PASSARINI et al., 2013).

Arfi et al. (2013) observaram o efeito da salinidade no crescimento do fungo *Pestalotiopsis* sp, o qual foi isolado de amostras de raízes de árvores de manguezal da Baía de São Vicente, Província do Sul, Nova Caledônia. O fungo em questão apresentou tolerância a concentrações $\leq 6\%$ de sal marinho em meio de cultura. Este resultado demonstra que o fungo *Pestalotiopsis* sp., assim como os isolados fúngicos obtidos no presente estudo apresentam halofilia adaptativa.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

5.4.1 Taxonomia Macro e Micromorfológica

Os resultados obtidos indicam a presença predominante do gênero *Trichoderma* sp. (LB01, LB03, LB04 e LB06), caracterizados pelo seu rápido crescimento em cultura, rede micelial aérea ramificada, hifas hialinas septadas e produção de pústulas conidiógenicas na cor branca ou verde. Os conídios apareceram em abundância acumulados no ápice das fiálides, formando uma estrutura globosa. *Gliocladium* sp. (LB05), apresentou colônias verdes de crescimento e esporulação rápidos, hifas hialinas septadas e conídios compactados eretos em tufo, produzidos em abundância (Figura 20).

Além dos gêneros *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp., também foi possível evidenciar os gêneros: *Microsphaeropsis* sp. (LB07), caracterizado por sua coloração micelial preto acinzentada e crescimento moderado em cultura, apresentando hifas septadas e conídios pequenos cilíndricos com paredes lisas, e *Geotrichum* sp. (LB08) isolado de colônias cor branca e textura cremosa. Microscopicamente foi possível observar suas hifas septadas com artroconídios, formados pela fragmentação das hifas em segmentos retangulares (Figura 20).

Os isolados fúngicos LB02 e LB09 apresentaram estruturas de reprodução complexas, o que impossibilitou sua classificação taxonômica a nível de gênero. Contudo, a morfologia das colônias e algumas estruturas microscópicas puderam ser analisadas. O isolado LB02 apresentou colônia de bordo branco e centro marrom, e durante sua esporulação pústulas conidiogênicas de cor salmão e gotículas exsudadas de cor marrom/caramelo foram observadas. Microscopicamente foi possível notar hifas septadas e macroconídios na forma em clava presos na hifa. Caracterizado por sua colônia de cor marrom claro o isolado LB09 apresenta hifas septadas em algumas áreas dispostas em círculos (Figura 20).

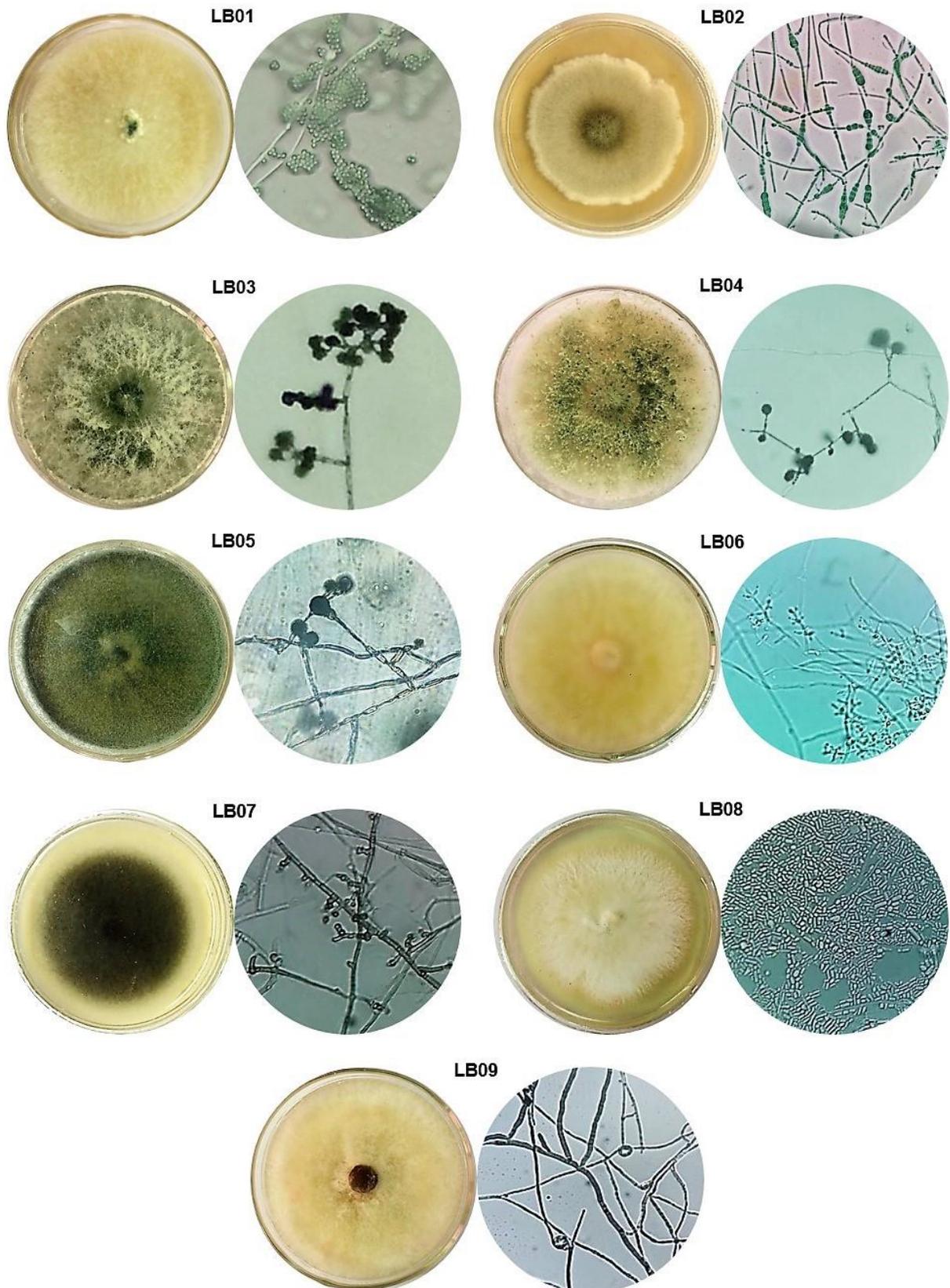


Figura 20- Fotografia dos aspectos morfológicos macro e microscópicos. Colônias fúngicas cultivadas em placas de Petri (94 mm), contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose – BDA, incubadas a 28°C por 7 dias. Laminulas coradas com azul de algodão, retiradas em intervalos de 7 a 28 dias, observadas em microscópio óptico no aumento de 400x. LB01; LB03; LB04; LB06: *Trichoderma* sp.; LB02; LB09: Ausência de Gênero; LB05: *Gliocladium* sp.; LB07: *Microsphaeropsis* sp.; LB08: *Geotrichum* sp.

Através de amostras de água, sedimento e folhas de manguezal os autores Gomes et al. (2011); Costa; Maia; Cavalcanti, (2012); Arfi et al. (2012); Zhang et al. (2018); Pratiw et al. (2018), relataram a incidência de fungos dos gêneros *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., *Microsphaeropsis* sp. e *Geotrichum* sp., assim como o presente estudo. Estes gêneros são classificados como fungos endofíticos, ou seja, fungos que habitam os tecidos internos das plantas sem causar efeitos negativos, sendo considerados fonte em potencial de novos compostos bioquímicos, com aplicações em diversos setores biotecnológicos (DEZAM et al., 2017).

5.4.2 Taxonomia Molecular

Através da análise de sequências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 submetidas ao “*Basic Local Alignment Search Tool*” - BLAST, pode-se observar similaridade entre os isolados fúngicos avaliados com fungos já descritos no Centro Nacional de Informações em Biotecnologia - NCBI (Tabela 3). A partir do resultado do BLAST foi construída a árvore filogenética (Figura 21).

Na Tabela 3 pode-se observar a similaridade genotípica de 100% entre os isolados fúngicos LB01 a *Trichoderma atroviride* e LB04 e LB06 a *Trichoderma harzianum*, respectivamente, estas informações podem ser evidenciadas através da observação das relações filogenéticas entre os isolados fúngicos e as estirpes de *Trichoderma* (Figura 21). Caracterizado com fungo endofítico, decompositor de madeira e material herbáceo, o gênero *Trichoderma* é relatado como componente frequente na microflora de diversos ecossistemas.

A similaridade genotípica a 100% também foi evidenciada pelos isolados LB02 a *Epicoccum sorghinum* e *Epicoccum latusicollum*, e LB07 a *Microsphaeropsis arundinis* (Tabela 3). Ambas espécies apresentaram próximas filogeneticamente aos seus respectivos isolados fúngicos, além disso, ramos consistentes de 100 *bootstrap* foram observados entre o isolado LB07 e a espécie *Microsphaeropsis arundinis* (Figura 21). Os gêneros *Epicoccum* e *Microsphaeropsis*,

pertencem a classe Dothideomycetes, a maior e mais diversa classe de fungos ascomicetos, frequentemente encontrados como endófitos.

Tabela 3- Similaridade genotípica dos isolados fúngicos de manguezal a partir do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, com as sequências de fungos obtidos no Centro Nacional de Informações em Biotecnologia - NCBI.

FUNGO	NCBI	ID %	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
LB01	MK322695	100%	<i>Trichoderma atroviride</i>	Crouch, J.A. 2018*
	MH059534	100%	<i>Trichoderma atroviride</i>	Qu, Q. 2018*
LB02	MH824378	100%	<i>Epicoccum sorghinum</i>	Xue, L. 2018*
	MK020690	100%	<i>Epicoccum sorghinum</i>	Olopade, B.K. et al., 2018*
	MH824373	100%	<i>Epicoccum latusicollum</i>	Xue, L. 2018*
	MG787261	100%	<i>Epicoccum latusicollum</i>	Han, S. 2018*
LB03			Não foi possível realizar amplificação**	
LB04	MK182420	100%	<i>Trichoderma harzianum</i>	Khonglah D.; Kayang H. 2018*
	MH153626	100%	<i>Trichoderma harzianum</i>	Fan H.; Pan X. 2018*
	KX008635	100%	<i>Trichoderma</i> sp.	Wang Y.; Han C.; Shao H. 2016*
	MH284224	100%	<i>Trichoderma</i> sp.	Zhou Y.; Li J. 2018*
LB05			Não foi possível realizar amplificação**	
LB06	KX379186	100%	<i>Trichoderma harzianum</i>	Van der Linde, E.J. 2016*
	MF671947	100%	<i>Trichoderma harzianum</i>	Bandara, R. et al., 2017*
LB07	HQ607976	100%	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Rodrigues, A. et al., 2011
	KU212359	100%	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Garcia-Lavina, C.X. et al., 2015*
LB08	MF373438	100%	<i>Geotrichum</i> sp.	Khattab, A.A.; Ziedan, E.H. 2017*
	GQ290654	100%	<i>Cryphonectria nitschkei</i>	Kim, J.M. et al., 2009
	KF220299	100%	<i>Cryphonectria parasítica</i>	Bascon, J. et al., 2014
LB09	NR_159875	100%	<i>Cryphonectria naterciae</i>	Vu, D. et al., 2019

Nota: NCBI: Acesso ao Centro Nacional de Informações em Biotecnologia; ID: Identificação do Fungo; **: Possível interferência de impurezas no DNA; *: Artigo submetido.

Após o sequenciamento, o isolado LB08 apresentou apenas 243 bases de qualidade boa para análise, este valor é considerado muito baixo, fato que impede a sua inclusão na árvore filogenética. Para solucionar este problema, será

necessário realizar um novo sequenciamento, e com isso obter um número maior de bases. No entanto, segundo o resultado do BLAST, foi possível avaliar similaridade a 100% entre o isolado LB08 e gênero *Geotrichum*, grupo constituído por fungos leveduriformes (Tabela 3).

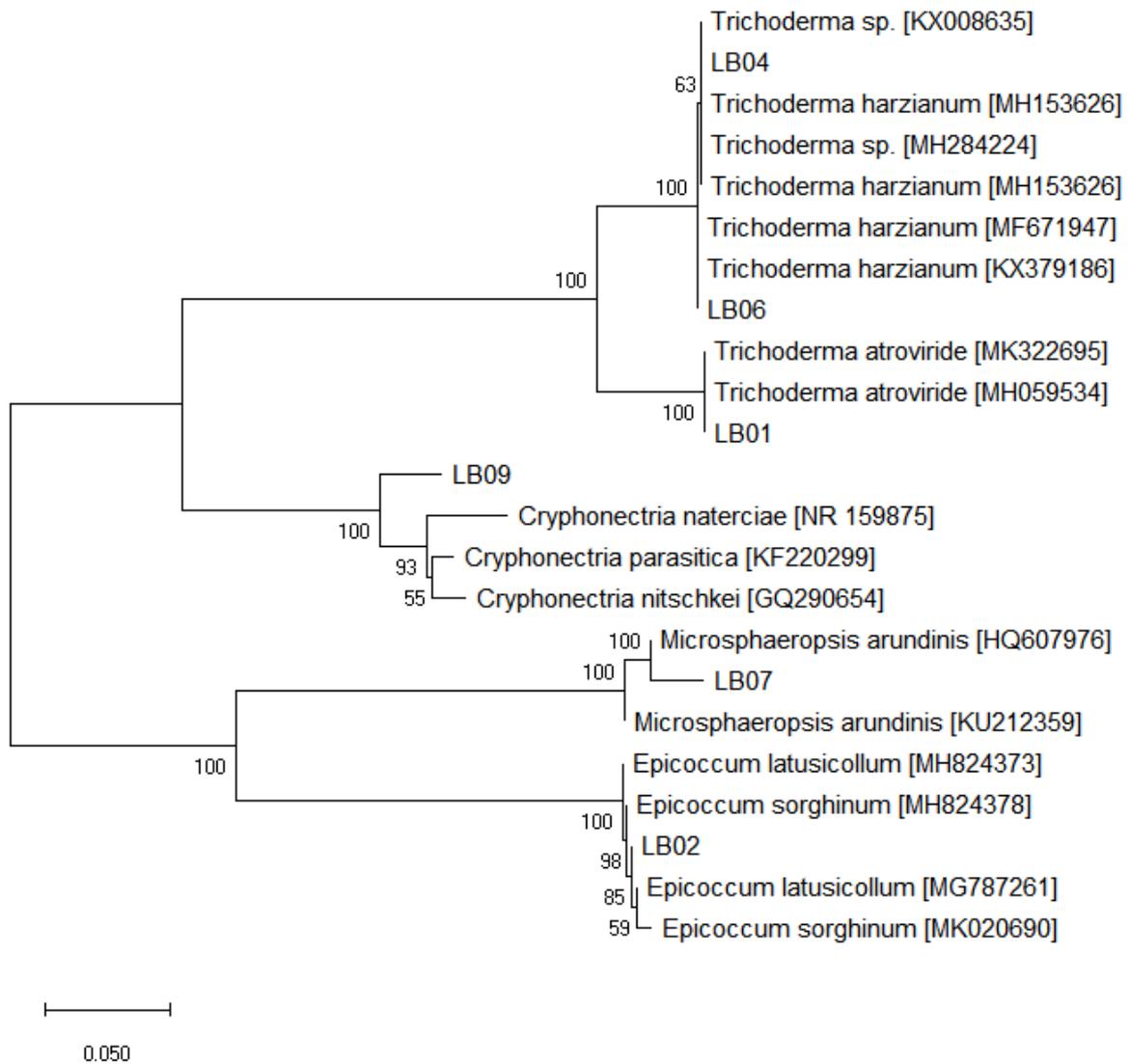


Figura 21- Árvore filogenética da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos fungos isolados de manguezal. Árvore construída pelo método “Neighbor-joining” e cálculo da distância utilizando o modelo Kimura 2 -parameter. Somente valores acima de 50% (1000 repetições) são apresentados. Árvore construída com 500 bases.

Além destes resultados, também foi possível observar similaridade genotípica a 100% entre o isolado LB09 e as espécies *Cryphonectria nitschkei*,

Cryphonectria parasítica e *Cryphonectria naterciae* (Tabela 3), a confirmação da relação filogenética entre estas estirpes é evidenciada através da Figura 21. Classificado pela classe Sordariomycetes, o gênero *Cryphonectria* é caracterizado por apresentar fitopatógenos, sendo a mais notória a espécie *Cryphonectria parasítica*, responsável pela doença do cancro castanheiro.

Houve falha no processo de amplificação do DNA de dois isolados fúngicos (LB03; LB05), tal fato pode estar associado a impurezas no DNA ou variações na sequência alvo do iniciador. Embora este fato tenha ocorrido, com a realização das análises morfológicas e microscópicas foi possível classificar estes isolados a nível de gênero, sendo eles *Trichoderma* sp. e *Gliocadium* sp., respectivamente.

A análise molecular é um bom indicativo das prováveis espécies às quais os isolados fúngicos pertencem, embora com a ressalva de que não deve ser utilizada isoladamente. Partindo deste pressuposto, buscou-se através dos resultados obtidos nas análises morfológicas e microscópicas, realizar uma avaliação mais expressiva dos fungos que apresentaram similaridade em suas sequências de DNA. Desta forma foi possível evidenciar resultados análogos em ambas as análises.

Após a construção da árvore filogenética (Figura 21), foi possível verificar que os alguns isolados obtidos neste trabalho puderam ser identificados como: *Trichoderma atroviride* - LB01; *Epicoccum* sp. - LB02; *Trichoderma harzianum* - LB04 e LB06; *Microsphaeropsis arundinis* - LB07; *Geotrichum* sp. – LB08 e *Cryphonectria* sp. - LB09.

Relatados como endofíticos, cosmopolitas e integrantes da diversidade fúngica de ecossistema manguezal, as espécies *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* e *Microsphaeropsis arundinis* e os gêneros *Trichoderma* sp., *Epicoccum* sp. e *Geotrichum* sp., *Cryphonectria* sp., foram isolados por diversos autores em sedimento, folhas e raízes de árvores de manguezal em decomposição (COSTA; MAIA; CAVALCANTI, 2012; FASANELLA, 2012; ARFI et al., 2012; GIARLETTI, 2014; GHIZELINI et al., 2019; SENGUPTA; CHOWDHURY; CHAUDHURI, 2018).

5.5 EFEITO DA ÁGUA DO MAR NA ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

5.5.1 Enzimas Ligninolíticas

A lacase foi a principal enzima ligninolítica detectada nos extratos enzimáticos. A predominância da enzima lacase nos extratos enzimáticos pode estar relacionada à composição do meio de cultivo utilizado, uma vez que, estudos comprovam que a presença do sulfato de cobre induz a atividade da enzima lacase (SILVA et al., 2012; DING et al., 2014). O cobre tem sua influência sobre a enzima decorrente de elementos sensíveis ao metal, que estão localizados na região promotora de genes de lacase nos fungos. Sendo assim, esta expressão gênica pode ser afetada indiretamente pela presença de cobre no meio de cultivo (FARACO; GIARDINA; SANNIA, 2003).

Na Tabela 4 é possível observar uma ampla variação na atividade de enzima lacase entre os isolados fúngicos, e suas respectivas diferenças resultantes da presença ou ausência de água do mar no meio de cultivo. Quanto ao resultado de atividade enzimática entre os isolados fúngicos, destaca-se a espécie *Microsphaeropsis arundinis* (LB07), o qual produziu 1037,11 U/L na presença de água do mar e 434,23 U/L em sua ausência. Em literatura não existem estudos sobre a produção de enzima lacase envolvendo a espécie *Microsphaeropsis arundinis* de ecossistema manguezal, nas condições apresentadas pelo presente estudo. Contudo, Sun, Guo, Hyde, (2011) evidenciaram produção da enzima lacase pela espécie *Microsphaeropsis arundinis*, obtida de folhas de uma árvore comum no norte da China (*Acer truncatum*), o processo utilizado para detecção da lacase foi o método qualitativo em placas de Petri, utilizando como substrato o 1-Naftol.

Tabela 4- Produção da enzima lacase por isolados fúngicos de manguezal, sob cultivo líquido estático na ausência e presença de água do mar.

ID.	FUNGO	PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE (U/L)	
		PRESENÇA DE ÁGUA DO MAR	AUSÊNCIA DE ÁGUA DO MAR
LB01	<i>Trichoderma atroviride</i>	283,10±21,34	12,88±2,60*
LB02	<i>Epicoccum sp.</i>	28,78±7,57	14,06±1,18**
LB03	<i>Trichoderma sp.</i>	272,89±16,56	63,46±8,76*
LB04	<i>Trichoderma harzianum</i>	13,45±4,86	2,88±1,05**
LB05	<i>Gliocladium sp.</i>	15,55±1,35	1,55±0,05*
LB06	<i>Trichoderma harzianum</i>	16,39±0,45	4,78±1,1*
LB07	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	1037,11±16,57	434,23±33,27*
LB08	<i>Geotrichum sp.</i>	13,33±2,79	0±0*
LB09	<i>Cryphonectria sp.</i>	14,60±4,30	1,64±0,13**
CONT.	<i>Trametes villosa</i>	11997,99±9,42	15869,11±11,77*

Nota: ID.: Identificação; CONT.: Cepa Controle; *: Houve diferença estatística significativa; **: Não houve diferença estatística significativa.

O fungo *Trametes villosa*, utilizado no presente estudo como cepa controle, apresentou valores superiores de enzima lacase quando cultivado na ausência da água do mar, constatando que sua melhor condição de cultivo é em pH 6,0 sem adição de sal. Baseado em estudos prévios e análises em literatura Yang et al. (2019) evidenciaram pH 6,0 como ótimo para atividade de enzima lacase, a partir de fungos da podridão branca. Quanto à salinidade, a mesma possivelmente inibiu a produção enzimática desta espécie, tal fato pode estar relacionado a origem desta cepa, a qual é derivada de meio terrestre e não apresenta adaptações a salinidade.

Diante a Tabela 4, também foi possível observar através dos isolados referentes ao gênero *Trichoderma* (LB01; LB03; LB04; LB06), atividade de ≤283,10 U/L de enzima lacase na presença de água do mar e ≤63,46 U/L em sua ausência. Chakroun et al. (2010) relataram através de cultivo agitado a 30°C, suplementado com 300 mM de cobre, atividade de 661 U/L de lacase pelo fungo *Trichoderma atroviride* no 7º dia de incubação. A partir da oxidação do substrato guaiacol (2 mM) Ranimol et al. (2018) evidenciaram atividade máxima de 971 U/L no 12º dia de

incubação pelo fungo *Trichoderma harzianum*. Estes valores mostram-se superiores aos obtidos no presente estudo, tal fato pode estar relacionado às condições de cultivo impostas pelos autores (agitação, temperatura, aumento da concentração de cobre no meio de cultivo, tempo de incubação).

A produção de lacase pelo gênero *Epicoccum* sp. (LB02) através de cultivo na ausência de água do mar foi de 14,06 U/L, e o dobro deste valor na presença de água do mar. Os autores Mabrouk et al. (2010) através de madeira em decomposição de ambiente marinho, evidenciaram atividade de 10,85 U/L de enzima lacase pela espécie *Epicoccum purpurascens*, valor inferior aos obtidos no presente estudo. Quanto ao gênero *Gliocladium* sp. (LB05), os valores de atividade foram de 15,55 U/L de enzima lacase na presença de água do mar e 1,55 U/L em sua ausência. O estudo desenvolvido por Ghoshal (2018) relata a produção de lacase pelo gênero *Gliocladium* sp., no entanto, o método utilizado para afirmação desta informação não é relatado. Estudos envolvendo a produção de lacases pelo gênero *Gliocladium* sp. são raros, o que torna os resultados obtidos únicos.

A atividade da enzima lacase pela espécie *Geotrichum* sp. (LB08) foi observada somente em cultivos na presença de água do mar, o valor obtido foi de 13,33 U/L. Os autores Bodke, Senthilarasu, Raghukumar, (2012), obtiveram a partir da espécie em questão atividade de 1.723 U/L de lacase, sob condição estática por 7 dias, pH de 4,5 e temperatura de 30 a 45°C. Estes resultados são superiores ao obtido no presente estudo, tal fato pode estar associado às condições de cultivo aplicadas, distintas das aplicadas no presente estudo.

Além destes resultados, também foi possível evidenciar segundo o gênero *Cryphonectria* sp. (LB09) atividade de 14,60 U/L de enzima lacase em cultivo na presença de água do mar, valores inferiores a este foram obtidos na ausência de água do mar. Em literatura relatos sobre a produção de enzima lacase pelo gênero *Cryphonectria* sp. é limitado, ou seja, para algumas espécies esta informação é inexistente. A partir do método qualitativo utilizando placas de Petri, utilizando como substrato o ácido tânico, os autores Xiong et al. (2018) evidenciaram produção da enzima lacase pela espécie *Cryphonectria parasítica*. Além disso, os autores também relataram níveis de expressão de três genes diferentes (*lac1*, *lac2* e *lac3*), intimamente associados a esta espécie.

Quanto às análises de produção enzimática de peroxidases, os resultados em ambas as técnicas de cultivo (ausência e presença de água do mar),

apresentaram índices muito baixos da enzima manganês peroxidase (MnP) e não detectáveis para enzima lignina peroxidase (LiP). Em literatura existem poucos estudos sobre a produção de peroxidases por fungos de origem marinha, em específico isolados fúngicos de ecossistema manguezal. Alguns estudos relatam baixa produção ou ausência das mesmas (D'SOUZA et al., 2006; BONUGLI-SANTOS et al., 2010). Similar ao presente estudo, D'Souza et al. (2006) através de um fungo basidiomiceto não identificado isolado de madeira de manguezal, relataram ausência da enzima LiP e índices baixos de enzima MnP.

Em geral, os resultados obtidos indicam produção superior de enzima lacase quando os fungos isolados de manguezal são expostos na presença de água do mar, ou seja, cultivados nas condições ambientais presente em seu habitat natural. Este resultado pode estar associado ao fato de que a salinidade imposta no cultivo possa ter aumentado a atividade da enzima lacase, ao envolver o dobramento da enzima e a perturbação de locais específicos. Por exemplo, o Cl^- pode se ligar em locais ao redor dos centros de cobre T1 e T2/T3, o que facilita a redução de oxigênio e leva ao aumento da produção enzimática (LI et al., 2017).

5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE TÊXTIL REAL

Os parâmetros de caracterização físico-química do efluente têxtil real estão apresentados na Tabela 5, assim como os limites legais de lançamento de efluentes líquidos industriais, segundo art. 34 da Resolução 357/2005 - Resolução CEMA 070/2009 (BRASIL, 2006; PARANÁ, 2009). Os resultados obtidos demonstram que os valores dos parâmetros avaliados estão acima dos índices permitidos pela legislação brasileira, revelando o potencial poluente do efluente estudado.

Tabela 5- Caracterização físico-química do efluente têxtil real.

PARÂMETRO	RESULTADO	LEGISLAÇÃO*
pH	5,0	5,0 a 9,0
DQO	2.055 ± 143,77 mgO ₂ /L	50 mgO ₂ /L
DBO₅	763.20 ± 325,83 mgO ₂ /L	200 mgO ₂ /L
COMPOSTOS FENÓLICOS	2,0 mg/L	0,5 mg/L

Nota: *Art. 34 da Resolução 357/2005 e Anexo 7 - Resolução CEMA 070/2009; DQO = Demanda Química de Oxigênio; DBO₅ = Demanda Bioquímica de Oxigênio; ND = Não Detectado.

Como reportado na Tabela 5, o efluente apresentou pH ácido 5,0. Semelhante a este resultado, Ntuli et al. (2009) observaram valores de pH entre 5,2 e 11,8. Apesar do pH do efluente estar situado dentro da faixa de lançamento previsto na legislação, recomenda-se a correção de sua acidez a valores próximos a neutralidade (BRASIL, 2006).

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) encontrada no efluente coletado diretamente do estágio de tingimento foi de 2.055 mgO₂/L, e a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅) de 763.2 mgO₂/L. Através de amostra de efluente têxtil coletados da caixa de entrada de tratamento Pizato et al. (2017) evidenciaram DQO 629 mgO₂/L e DBO₅ 328 mgO₂/L, valores inferiores aos obtidos no presente estudo. Tal fato pode estar relacionado a origem de coleta do efluente, sendo o efluente têxtil utilizado no presente estudo mais concentrado do que o utilizado por Pizato et al. (2017).

Quanto ao teor de compostos fenólicos, o efluente apresentou 2,0 mg/L, valor considerado acima do padrão exigido pela legislação. Contudo, entende-se que estes compostos, caracterizados pela presença de hidroxila (OH⁻) ligada a um anel benzênico, compõem a formação de diversos efluentes industriais têxteis (PIZATO et al., 2017)

A varredura espectral do efluente (Figura 22) demonstra que as bandas de maior intensidade ocorreram nos comprimentos de onda de 534 e 570 nm, com valores de absorvância de 0,7065 e 0,7149, respectivamente.

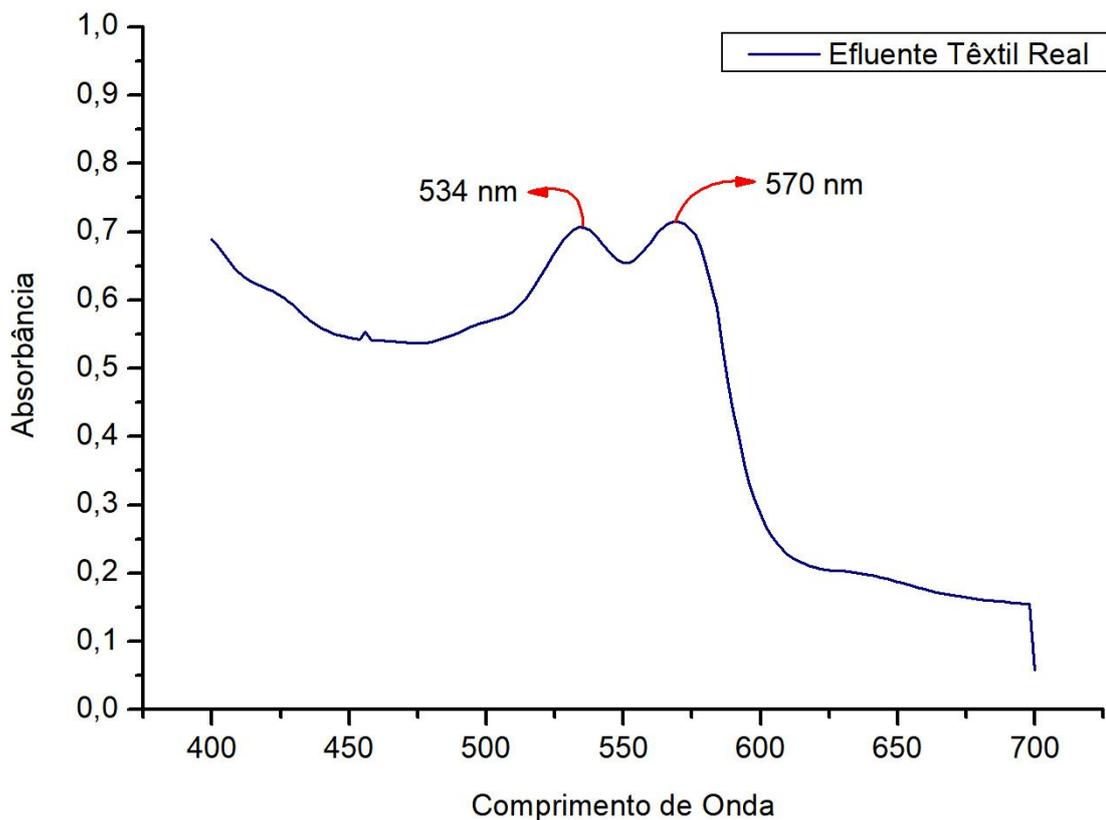


Figura 22- Espectrometria do efluente têxtil, nos comprimentos de onda de 400-700 nm. Bandas de maior intensidade do efluente têxtil: 534 - 570 nm.

5.7 AVALIAÇÃO DA ADAPTAÇÃO FÚNGICA E PRODUÇÃO DE ENZIMA LACASE EM EFLUENTE TÊXTIL REAL

Os resultados obtidos indicam adaptação dos fungos *Microsphaeropsis arundinis* (LB07) e *Trametes villosa* expostos ao efluente têxtil real. Embora tenham apresentado crescimento lento e reduzido o seu desenvolvimento foi evidenciado. Os corantes têxteis, especialmente em altas concentrações, inibem o crescimento fúngico. Logo, o principal problema da descoloração fúngica é a adaptação em meios contendo grandes quantidades de corantes têxteis (APOHAN; YESILADA 2005). Tal fato tornam os fungos analisados possivelmente capazes de realizar a degradação de efluente têxtil.

Quanto aos resultados obtidos através da quantificação da enzima lacase, os valores obtidos foram de 40,08 U/L pelo fungo *Microsphaeropsis arundinis* (LB07) e 3.050 U/L pelo fungo *Trametes villosa*. Estudos envolvendo a produção de lacase em efluente têxtil real, pelos fungos *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes*

villosa não são relatados em literatura, o que tornam estes resultados inédito neste âmbito. No entanto, os autores Verma et al. 2010 através de fungos de manguezal (*Diaporthe* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Corioloopsis byrsina* e *Cerrena unicolor*) obtiveram atividade $\leq 47,8$ U/L de lacase sob concentração final de 90% de efluente têxtil.

5.8 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL REAL A PARTIR DE LACASES FÚNGICAS

Os resultados obtidos indicam que em ambas aplicações, a biodegradação do efluente foi melhor na ausência de mediador químico (Tabela 6). Tal fato pode estar associado à sua natureza dificilmente degradável, além disso, mediadores químicos podem inativar a enzima no processo de descoloração (RORIZ et al., 2009).

Alguns autores relatam atividade de descoloração na ausência de mediadores químicos. Como o estudo realizado por Erkurt, Unyayar, Kumbur, (2007), os quais evidenciaram a partir da enzima lacase proveniente de fungos da podridão branca, a descoloração de azul brilhante de remazol R (RBBR) e drimaren azul CL-BR (DB), na ausência de mediador químico. Por meio da enzima lacase proveniente da espécie *Trametes trogii*, os autores Yesilada et al. (2014) também evidenciaram a descoloração dos corantes preto reativo 5 e azul reativo 171 na ausência de mediador químico.

Na Tabela 6 também pode-se observar os percentuais de descoloração do efluente têxtil. Quando comparados a concentração de 100 U/L de enzima lacase, os valores obtidos a partir do extrato enzimático produzido pelo fungo de manguezal *Microsphaeropsis arundinis* (LB07), apresentaram superiores aos obtidos pelo *Tametes villosa*. A similaridade dos percentuais de descoloração só foi evidenciada quando o valor de U/L de lacase, referente ao fungo da podridão branca (FPB) *Trametes villosa*, foi aumentado para 500 U/L.

Embora tenha sido aplicada em menor quantidade, a enzima lacase proveniente do fungo *Microsphaeropsis arundinis* (LB07) apresentou maior eficiência na descoloração do efluente têxtil. Pressupondo que, a lacase produzida pelo fungo *Microsphaeropsis arundinis* (LB07), pode apresentar maior resistência aos sais e ao

pH ácido presente no efluente, em comparação com a lacase produzida pelo fungo *Trametes villosa*.

Tabela 6- Porcentagem de descoloração das duas bandas de maior intensidade do efluente têxtil, a partir de distintas concentrações (100 U/L e 500 U/L) de enzima lacase, proveniente dos extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa*, na ausência ou presença de mediador químico.

FUNGO	U/L	AMOSTRAS	COMPRIMENTO DE ONDA	
			534 nm	570 nm
<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	100	AUSÊNCIA	15%	14%
	100	AHB	10%	8%
	100	HBT	13%	10%
<i>Trametes villosa</i>	100	AUSÊNCIA	5%	5%
	100	AHB	0%	0%
	100	HBT	0%	0%
	500	AUSÊNCIA	13%	13%
	500	AHB	5%	5%
	500	HBT	7%	7%

Nota: U/L: Concentração de enzima lacase; Ausência: Ausência de mediador químico; AHB: Ácido 4-hidroxibenzóico; HBT: 1-hidroxibenzotriazol.

Na Figura 23 e 24, é possível observar a redução da banda de maior intensidade do efluente, a partir da enzima lacase produzida pelos fungos *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa*, em suas melhores condições de aplicação: ausência de mediador químico e concentração de 100 U/L e 500 U/L, respectivamente de enzima lacase.

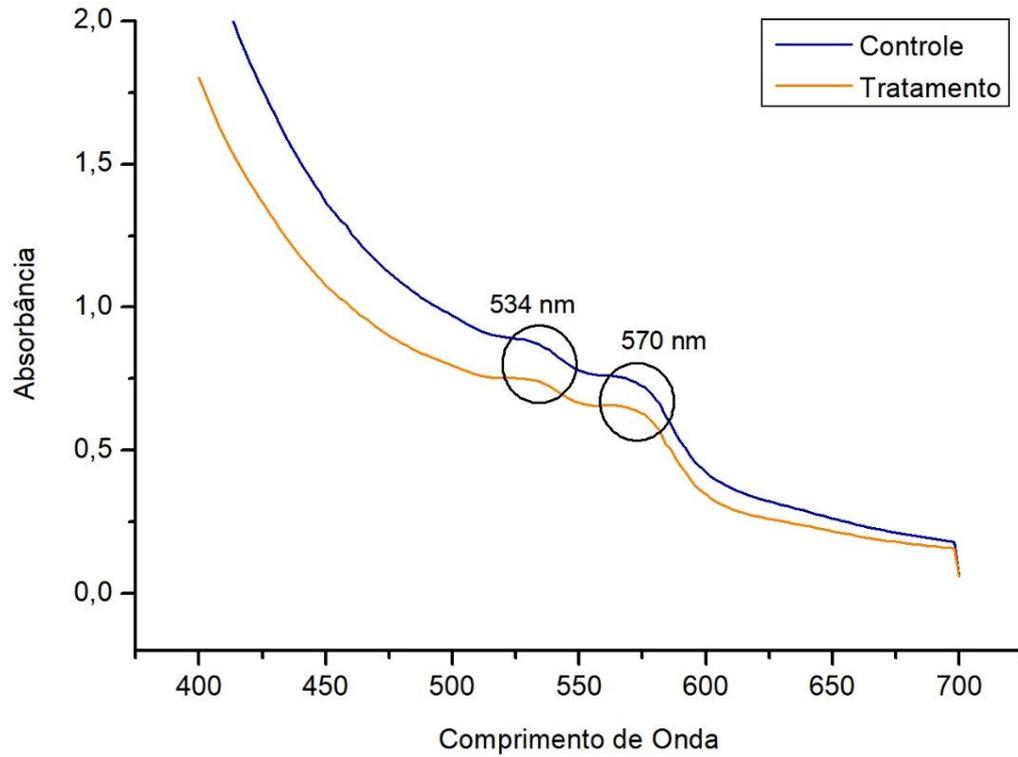


Figura 23- Espectroscopia da descoloração do efluente têxtil real, nas bandas de maior intensidade do efluente (534-570 nm). Fungo *Microsphaeropsis arundinis* a partir da concentração de 100 U/L de enzima lacase, na ausência de mediador químico.

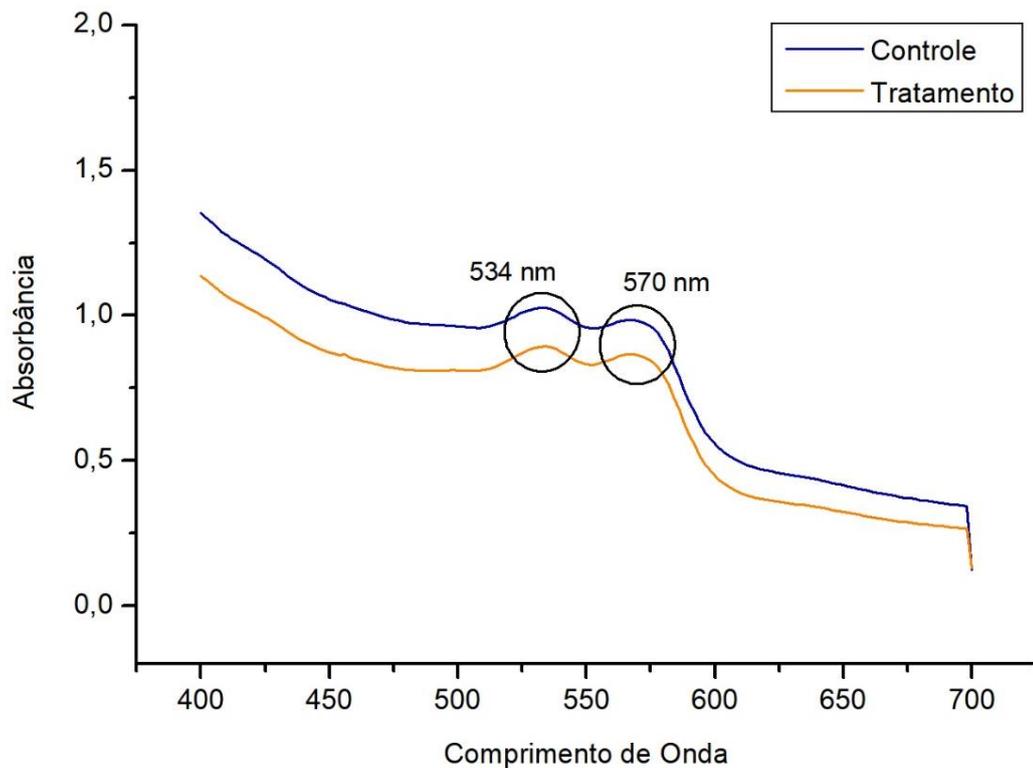


Figura 24- Espectroscopia da descoloração do efluente têxtil real nas bandas de maior intensidade do efluente (534-570 nm). Fungo *Trametes villosa* a partir da concentração de 500 U/L de enzima lacase, na ausência de mediador químico.

Os fungos da podridão branca (FPB) são conhecidos por serem capazes de descolorir efluentes têxteis e corantes, devido ao elevado potencial oxidativo de suas enzimas. Neste sentido, a enzima lacase é considerada a principal responsável por atividades de descoloração de efluentes têxteis e/ou corantes (BIRHANLI; YESILADA, 2006; ERKURT; UNYAYAR; KUMBUR, 2007). Estudos envolvendo o processo de descoloração por FPB, são descritos de forma ampla em literatura, muitos abordam a degradação de corantes sintéticos (LEVIN; MELIGNANI; RAMOS, 2010; KIRAN et al., 2010; LI et al., 2014; LU et al., 2016). Entretanto, quando relacionados a efluentes têxteis reais os estudos acabam sendo reduzidos (OTTONI, 2012; BALASARASWATHY; RAMAMURTHY; SIVASAKTHIVELAN, 2018).

Os manguezais são considerados uma fonte em potencial para novos biocatalizadores de interesse industrial. Entre esses biocatalizadores, se destacam as lacases, enzimas capazes de oxidar uma ampla gama de substratos, utilizadas em processos de biorremediação e biodegradação de poluentes ambientais. A capacidade de biodegradar poluentes varia de acordo com o microrganismo, tipo de efluente, mediadores e condições utilizadas. Relatos de microrganismos que apresentam atividade oxidorreductase em condições salinas são limitados, enquanto efluentes industriais, especialmente, efluentes têxteis contêm um alto nível de salinidade, carbonatos, cloretos e sulfatos.

6 CONCLUSÃO

Os fungos de manguezal relatados no presente estudo possuem elevada atividade de enzima lacase sob condições salinas, fato que os tornam fungos em potencial para processos de biorremediação e/ou biodegradação. Através das análises desenvolvidas foi possível chegar as seguintes conclusões:

- A partir de amostras de raízes aérea de manguezais foram obtidos 40 isolados fúngicos, os quais apresentaram ampla diversidade de produção de enzimas hidrolíticas e ligninolíticas. Nesta análise destacaram-se as enzimas celulase e pectinase, presentes em 85-78% dos isolados.
- Os isolados fúngicos obtidos apresentaram tolerância a concentração $\leq 5\%$ de cloreto de sódio (NaCl) em meio de cultura, indicando halofilia adaptativa.
- Fungos da espécie *Trichoderma atroveride*, *Trichoderma harzianum*, *Microsphaeropsis arudinis* e gêneros *Epicoccum* sp., *Trichoderma* sp., *Geotrichum* sp., *Gliocladium* sp. e *Cryphonectria* sp., foram evidenciados segundo as análises morfológicas e moleculares.
- Dentre as enzimas ligninolíticas a lacase expressou produção principal, as peroxidases apresentaram índices baixos e em alguns casos não detectáveis, estes resultados foram obtidos em ambas as técnicas (presença ou ausência de água do mar).
- A produção da enzima lacase pelos isolados fúngicos apresentou ampla variação, destacando-se a espécie *Microsphaeropsis arudinis* (LB07), a qual apresenta resultados inéditos neste âmbito.
- A produção de enzima lacase foi superior quando os isolados foram expostos ao cultivo na presença de água do mar, este resultado pode estar associado ao fato de que, a presença da salinidade possa ter aumentado a produção da enzima em questão.
- O efluente têxtil real utilizado apresentou pH ácido, concentrações altíssimas de DQO e DBO, e teores de compostos fenólicos acima do padrão exigido pela legislação brasileira. Também foram observados através de varredura em espectrofotômetro as bandas de maior intensidade do efluente, que ocorreram nos comprimentos de onda de 534 nm e 570 nm.

- Os fungos *Microsphaeropsis arudinis* (LB07) e *Trametes villosa* apresentaram crescimento considerável e produção de enzima lacase, por meio de cultivos direto em efluente têxtil.
- As maiores atividades de descoloração do efluente têxtil foram observadas a partir do extrato enzimático, na ausência de mediador químico.
- Dentre os fungos analisados, a espécie *Microsphaeropsis arudinis* (LB07) apresentou maior percentual de descoloração do efluente têxtil, quando comparada a espécie *Trametes villosa* na concentração de 100 U/L de enzima lacase.
- O fungo da podridão branca *Trametes villosa* apresentou melhor percentual de descoloração do efluente têxtil, quando utilizada na reação a concentração de 500 U/L de enzima lacase.

Considerando que o ecossistema manguezal é um ambiente pouco explorado, os resultados obtidos em sua maioria apresentam-se inéditos nesta área. Como perspectiva de continuação do trabalho, verifica-se a necessidade de estudos mais detalhados relacionados as condições de cultivo (e.g. temperatura, tempo de incubação, substrato, método estático ou agitado), de cada microrganismo, com intuito de-se obter índices mais elevados de atividade enzimática. Com isto, empregá-las em maior escala na biorremediação de diversos efluentes poluídos.

REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. G., et al. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 67-72, 2004.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, 2015.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. v. 40, p. 399–407, 2008.
- AHMAD, Z.; SADIQ BUTT, M.; RIAZ, M. Partial purification and characterization of xylanase produced from *Aspergillus niger* using wheat bran. **Pak. J. Agri. Sci.**, v. 50, n. 3, p. 433–437, 2013.
- ALIAS, S. A.; ZAINUDDIN, N.; JONES, E. G. Biodiversity of marine fungi in Malaysian mangroves. **Botanica Marina**, v. 53, n. 6, p. 545-554, 2010.
- ALONGI, D. M. Patterns of mangrove wood and litter production within a beach ridgefringing reef embayment, northern Great Barrier Reef Coast. **Estuaries and Coasts**, v.34, p. 32-44, 2011.
- ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 3, p. 331-349, 2002.
- ALSHEIKH-HUSSAIN, A.; ALTENAIJI, E. M.; YOUSEF, L. F. Fungal cellulases from mangrove forests - a short review. *Journal of biochemical technology*, v. 5, n. 3, p. 765–774, 2014.
- AMEEN, F. et al. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 211-218, 2016.
- American Public Health Association; American Water Works Association. Standard methods for the examination of water and wastewater 22 nd Edition. **American public health association**, 2012.
- AMERINE, M. A.; OUGH C. S. Análisis de Vinos y Mostos. **Zaragoza: Acribia**, 1976.
- ANANDA, K.; SRIDHAR, K. R. Diversity of filamentous fungi on decomposing leaf and woody litter of mangrove forests in the southwest coast of India. v. 87, n. 10, p. 1431–1437, 2004.
- ANDRADE, G. S. S, et al. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n.12, p. 2539-2548, 2014.

APOHAN, E.; YESILADA, O. Role of white rot fungus *Funalia trogii* in detoxification of textile dyes. ***Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry***, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms, v. 45, n. 2, p. 99-105, 2005.

ARFI, Y. et al. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. ***Nature Communications***, v. 4, p. 1810–1819, 2013.

ARFI, Y. et al. Fungal diversity in anoxic-sulfidic sediments in a mangrove soil. ***Fungal Ecology***, v. 5, n. 2, p. 282–285, 2012.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. v. 29, p. 719–739, 2005.

ARUN, A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, pseudomonas isolate, and their cocultures: Comparative in vivo and in silico approach. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 151, n.2–3, p. 132-142, 2008.

BAI, S. et al. GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of soil microbial communities of mangroves. ***Applied microbiology and biotechnology***, v.97, n.15, p. 7035-7048, 2013.

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. ***FEMS Microbiology Reviews***, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.

BALASARASWATHY, S.; RAMAMURTHY, N.; SIVASAKTHIVELAN, P. Decolorization and biodegradation studies of the textile effluent treated by *Trametes versicolor*, 2018.

BALTAZAR, J. M.; TRIERVEILER-PEREIRA, L.; LOGUERCIO-LEITE, C. A checklist of xylophilous basidiomycetes (Basidiomycota) in mangroves. ***Mycotaxon***, v. 107, n.1, p. 221-224, 2009.

BEHERA, B. C. et al. Cellulase from *Bacillus licheniformis* and *Brucella* sp. isolated from mangrove soils of Mahanadi river delta, Odisha, India. ***Biocatalysis and Biotransformation***, v. 34, n. 1, p. 44–53, 2016.

BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment : A review. ***Journal of Genetic Engineering and Biotechnology***, v. 15, n. 1, p. 197-210, 2017.

BESITULO, A.; MOSLEM, M. A.; HYDE, K. D. Occurrence and distribution of fungi in a mangrove forest on Siargao Island, Philippines. ***Botanica Marina***, v. 53, n. 6, p. 535-543, 2010.

BIRHANLI, E.; YESILADA, O. Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 39, n. 6, p. 1286-1296, 2006.

BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 269, 2015.

BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n.1, p. 32-37, 2010.

BRASIL CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resoluções do Conama: resoluções vigentes publicadas entre julho de 1984 e maio de 2006. Brasília, 2006.

BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research*, 2010.

CABANA, H. et al. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere*, v. 67, p. 770-778, 2007.

CARVALHO, A. K. F. et al. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. *Industrial Crops & Products*, v. 67, p. 287–294, 2015.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further Researches. *Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v. 32, p. 181-184, 1967.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. p. 324–333, 1997.

CERNIGLIA, CARL E.; SUTHERLAND, JOHN B. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. *In: British Mycological Society Symposium Series*. 2001. p. 136-187.

CESKA, M. Enzymatic Catalysis in Solidified Media. *European Journal of Biochemistry*, v. 22, n. 2, p. 186-192, 1971.

CHAIJAK, P.; LERTWORAPREECHA, M.; SUKKASEM, C. Phenol removal from palm oil mill effluent using *Galactomyces reessii* termite-associated yeast. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 27, n. 1, p. 39-44, 2018.

CHAKROUN, H. et al. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 4, p. 507-513, 2010.

CHEN, H. et al. Screening and production of ligninolytic enzyme by a marine-derived fungal *Pestalotiopsis* sp. J63. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 165, n. 7-8, p. 1754-1769, 2011.

COELHO, G. D. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo, p. 101, 2007.

COELHO, M. T. Pectina : Características e Aplicações em Alimentos. p. 33, 2008.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n.2, p. 1-14, 2012.

COSTA, G.; SANTOS, A.; LEE, M.; SOUZA, M. Química: e Sociedade: Motores da Sustentabilidade. **In: 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA**, 2014, Rio Grande do Norte. Seleção de fungos filamentosos com atividade pectinolítica de isolados de sementes de andiroba (*Carapa guianensis*) e mandioca (*Manihot suculenta*). Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2014/trabalhos/11/502517838.html>>.

COSTA, I. P. M; MAIA, L. C.; CAVALCANTI, M. A. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 2012.

D'SOUZA-TICLO, D.; SHARMA, D.; RAGHUKUMAR, C. A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine-derived fungus. **Marine biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 725-737, 2009.

DA SILVA, G. B. P. G. et al. Antimicrobial activity of *Phoma* sp. URM 7221: An endophyte from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2017.

DA SILVA, J. J. et al. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 2013.

DAS, S. et al. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of microbiological methods**, v. 103, p. 80-100, 2014.

DE SOUZA SEBASTIANES, F. L. et al. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current genetics**, v. 59, n. 3, p. 153-166, 2013.

DEBASHISH, G. et al. Marine enzymes. In: *Marine Biotechnology I*. **Springer, Berlin, Heidelberg**, p. 189-218, 2005.

DEZAM, A. P. G., et al. Microbial production of organic acids by endophytic fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 282-287, 2017.

DHIMAN, S. S.; SHARMA, J.; BATTAN, B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: A review. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1377-1402, 2008.

DIAS, A. C. F. et al. Abundance and genetic diversity of nifH gene sequences in anthropogenically affected Brazilian Mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 22, p. 7960-7967, 2012.

DIAS, A. C. F. et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1305-1311, 2009.

DING, Z. et al. Production and characterization of laccase from *Pleurotus ferulae* in submerged fermentation. **Annals of microbiology**, v. 64, n. 1, p. 121-129, 2014.

DIWANIYAN, S. et al. Decolorization of synthetic dyes and textile effluents by basidiomycetous fungi. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 210, n. 1-4, p. 409-419, 2010.

DOS SANTOS, H. F. et al. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: Bacterial proxies for oil pollution. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2011.

D'SOUZA, D. T. et al. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 504-511, 2006.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. v. 28, p. 83-99, 2000.

EL-MORSY, E. M. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. **Fungal Diversity**, v. 5, p. 43-54, 2000.

ERKURT, E. A.; ÜNYAYAR, A.; KUMBUR, H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1429-1435, 2007.

FARACO, V.; GIARDINA, P.; SANNIA, G. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. **Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 2155-2162, 2003.

FASANELLA, C. C. Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de São Paulo. PhD Thesis. Universidade de São Paulo, 2012.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2^oed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FERNANDO, L. et al. Selection of vinasse degrading microorganisms. p. 1613-1621, 2010.

FERRAZ, F. O. Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

- GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 30, n. 4, p. 529–536, 2002.
- GHIZELINI, A. M. et al. Fungal communities in oil contaminated mangrove sediments—Who is in the mud?. ***Marine Pollution Bulletin***, v. 139, p. 181-188, 2019.
- GHIZELINI, A. M.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S; MACRAE, A. Microbial diversity in brazilian mangrove sediments - A mini review. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 43, n. 4, p. 1242-1254, 2012.
- GHOSHAL, G. Biotechnology in Food Processing and Preservation: An Overview. In: ***Advances in Biotechnology for Food Industry***. Academic Press. p. 27-54, 2018.
- GIARLETTI, O. L. A. Estudo da atividade antifúngica de metabólitos produzidos pelo fungo *Epicoccum nigrum* isolado de *Rizophora mangle*. PhD Thesis. Universidade de São Paulo, 2014.
- GILL, P.; ARORA, D. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. ***Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology***, v. 30, n. 1, p. 28-33, 2003.
- GOMES, D. N. F.; CAVALCANTI, M. A.; PASSAVANTE, J. Z. O. Fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. ***Tropical Oceanography-ISSN***, v. 39, n. 1, p. 1679-3013, 2011.
- GONÇALVES, A. Z. L. Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal. p. 132, 2010.
- GUPTA, V. K., et al. Decolorization of mixture of dyes: a critical review. ***Global Journal of Environmental Science and Management***, v. 1, n. 1, p. 71-94, 2015.
- HAAS, R. et al. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 63, n. 5, p. 564–566, 2004.
- HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. ***Journal of hazardous materials***, v. 169, n. 1-3, p. 1-15, 2009.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. ***Biotechnology Advances***, v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. ***Biotechnology advances***, v. 27, n.6, p. 782-798, 2009.

HO, H. H., JONG, S. C. Halophytophthora gen. nov., a new member of the Family Pythiaceae. **Mycotaxon**, v. 36, p. 377-382, 1990.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454-466, 2002.

HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by Pleurotus ostreatus and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415-1419, 2004.

HUANG, J.; FU, Y.; LIU, Y. Comparison of alkali-tolerant fungus Myrothecium sp. IMER1 and white-rot fungi for decolorization of textile dyes and dye effluents. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 5, n. 3, p. 1, 2014.

HUSAIN, Q. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v.26, n.4, p. 201-221, 2006.

HYDE, K. D. A comparison of intertidal mycota of five mangrove tree species. **Asian Marine Biology**, v. 7, p. 93-107, 1990.

INTRIAGO, P. Marine Microorganisms: perspectives for getting involved in cellulosic ethanol. **AMB Express**, v. 2, n.1, p. 46, 2012.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

JONES, E. B. G. et al. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. **Fungal Diversity**, v. 35, p. 1-187, 2009.

JONES, E. B. G. et al. Dactylospora mangrovei sp. nov. (Discomycetes, Ascomycota) from mangrove wood. **Mycoscience**, v. 40, n. 4, p. 317, 1999.

JONES, E. B. G. Marine fungi: some factors influencing biodiversity. p. 53-73, 2000.

JONES, E. B. G.; PANG, K. Marine fungi: and fungal-like organisms. **Walter de Gruyter**, 2012.

JONES, E. G.; ABDEL-WAHAB, M. A. Marine fungi from the Bahamas Islands. **Botanica Marina**, v. 48, n. 5-6, p. 356-364, 2005.

JØRGENSEN, H. et al. Production of cellulases and hemicellulases by three Penicillium species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 42-48, 2005.

KANG, S. W., et al. Production of cellulases and hemicellulases by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 91, n. 2, p. 153-156, 2004.

KANWAR, S. S.; DEVI, S. Thermostable xylanases of microbial origin: Recent insights and biotechnological potential. *The International Journal of Biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 1-19, 2012.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*, v 57, p. 503-507, 2008.

KETIPALLY, R.; RAM, M. R. Optimization of Pectinase Production by *Aspergillus Oryzae* RR 103, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2018.

KIRAN, S. et al. Comparative study on decolorization of reactive dye 222 by white rot fungi *Pleurotus ostreatus* IBL-02 and *Phanerochaete chrysosporium* IBL-03. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 15, p. 3639-3650, 2012.

KIRK, T. K.; TIEN, M.; FAISON, B. D. Biochemistry of the oxidation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Advances*, v. 2, n. 2, p. 183-199, 1984.

KOUKER, G.; JAEGER, K. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011.

KUMAR S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

KUMAR, N. V. et al. Prospecting Multiple Enzyme Systems of Mangrove Fungi for Dye Decolourization Potential. In: *Bioremediation and Sustainable Technologies for Cleaner Environment*. *Springer, Cham*, p. 319-327, 2017.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research*, v. 105, n. 11, p. 1388-1391, 2001.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, v. 169, n. 2, p. 247–250, 1984.

LANA P. C. Novas formas de gestão dos manguezais brasileiros: a Baía de Paranaguá como estudo de caso. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, p. 10, 2004.

LEVIN, L.; MELIGNANI, E.; RAMOS, A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource technology*, v. 101, n. 12, p. 4554-4563, 2010.

LI, J. et al. Mechanism of salt-induced activity enhancement of a marine-derived laccase, Lac15. **European Biophysics Journal**, v. 47, n. 3, p.225-236, 2018.

LI, L. et al. Diversity and biochemical features of culturable fungi from the coastal waters of Southern China. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 60, 2014.

LI, L. et al. Diversity and biochemical features of culturable fungi from the coastal waters of Southern China. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 60, 2014.

LI, Q.; COFFMAN, A. M.; JU, L. K. Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 72, p. 42-48, 2015.

LI, X.; KONDO, R.; SAKAI, K. Studies on hypersaline-tolerant white-rot fungi IV: effects of Mn²⁺ and NH⁴⁺ on manganese peroxidase production and Poly R-478 decolorization by the marine isolate *Phlebia* sp. MG-60 under saline conditions. **Journal of wood science**, v. 49, n. 4, p. 355-360, 2003.

LIU, X. et al. Xyloketal H from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. 2508. v. 55, n. 6, p. 1091–1092, 2006.

LOPEZ, M. J. et al. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 794-800, 2007.

LORENZO, M. et al. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 2, p. 109-113, 2002.

LU R et al. White-rot fungus *Ganoderma* sp.En3 had a strong ability to decolorize and tolerate the anthraquinone, indigo and triphenylmethane dye with high concentrations. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 39, p. 381-390, 2016.

LYND, L. R et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular*. **Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MABROUK A. M. et al. Screening of some marine-derived fungal isolates for lignin degrading enzymes (LDEs) production. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1, n. 4, p. 591-9, 2010.

MADHU, K. M.; BEENA, P. S.; CHANDRASEKARAN, M. Extracellular β -glucosidase production by a marine *Aspergillus sydowii* BTMFS 55 under solid state fermentation using statistical experimental design. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 4, p. 457-466, 2009.

MAGRIS, R. A.; BARRETO, R. Mapping and assessment of protection of mangrove habitats in Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 5, n. 4, p. 546-556, 2010.

MAINARDI, P. H. Produção de lacases pelo fungo filamentososo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada, 2015.

MALLER, A. et al. Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niger*. **Master's thesis, University of São Paulo, Ribeirão Preto**, 2008.

MALVESSI, E.; DA SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 693-702, 2004.

MANOHARACHARY, C., et al. Fungal biodiversity: distribution, conservation and prospecting of fungi from India. **Current Science**, p. 58-71, 2005.

MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJA, N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **Journal of Agricultural technology**, v. 1, p. 67-80, 2005.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 2^oed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MAYER, A. et al. Marine pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine drugs**, v. 11, n. 7, p. 2510-2573, 2013.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current opinion in microbiology**, v. 4, n. 3, p. 324-329, 2001.

MOHAMED I. A. ALI. Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 16, p. 3783–3790, 2012.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, **Applications and Commercialization**, v. 10, p. 251–275, 2013.

MOUGIN, C. et al. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, n. 2, p. 145-148, 2003.

MTUI, G.; MASALU, R. Extracellular enzymes from brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus* isolated from mangrove forests of coastal Tanzania. **Scientific research and essays**, v. 3, n. 4, p. 154-161, 2008.

MURRAY, P. M. et al. Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. **New biotechnology**, v. 30, n.6, p. 839-850, 2013.

NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n.5, p. 1163-1196, 2012.

NAKAGIRI, A. et al. A new Halophytophthora species, *H. porrigovesica*, from subtropical and tropical mangroves. **Mycoscience**, v. 42, n. 1, p. 33-41, 2001.

NAMBIAR, G. R.; RAVEENDRAN, K. A Checklist of Marine Fungi from Kerala State, India, v. 1, n. 3, p. 73–77, 2008.

NAMBIAR, G. R.; RAVEENDRAN, K. Manglicolous Marine Fungi on *Avicennia* and *Rhizophora* along Kerala Coast (India), v. 4, n. 1, p. 48-51, 2009a.

NAMBIAR, R. G.; RAVEENDRAN, K. Manglicolous Marine Fungi of Kerala (South India), v. 2, n. 3, p. 206–210, 2009b.

NASCIMENTO DE OLIVEIRA, A. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 4, 2006.

NEEMA J., Manomi S.; PHILIP, R. Isolation and Characterization of Endophytic Fungi From *Avicennia Officinalis*. International Journal of Research in **Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 4-8, 2015.

NEIFAR, M. et al. Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications*. **Wiley, Hoboken**, p. 245-268, 2015.

NETO, S. L. M. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. **PhD Thesis. Instituto de Botânica**, 2006.

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 299-306, 2006.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 597-611, 2013.

NOERNBERG, M. A et al. Remote sensing and GIS integration for modelling the Paranagua estuarine complex -Brazil. **Journal of Coastal Research**, v. 3, n. 39, p. 1627-1631, 2006.

NTULI, F. et al. Characterization of effluent from textile wet finishing operations, 2009.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. *Surculiseria rugispora* gen. et sp. nov., a new endophytic mitosporic fungus from leaves of *Bruguiera gymnorrhiza*. **Mycoscience**, v.42, n.1, p.115-122, 2001.

OTTONI, C. A. Descoloração de corantes têxteis por fungos ligninolíticos em condições de pH e salinidade elevada, 2012.

PALOMER, X. et al. Study of the strawberry Cel1 endo- β -(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. ***Plant Science***, v. 167, n. 3, p. 509-518, 2004.

PANAGIOTOU, G. et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. ***Industrial Crops and Products***, v. 18, n.1, p. 37-45, 2003.

PANG, K. et al. Diversity and physiology of marine lignicolous fungi in Arctic waters: a preliminary account. ***Polar Research***, v. 30, n. 1, p. 5859, 2011.

PARANÁ. CEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente. (2009) Resolução nº 070/2009. Disponível em:
<http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislacao_estadual/RESOLUCOES/resolucao_cema_70_2009.pdf>

PARTE, S.; SIRISHA, V. L.; D’SOUZA, J. S. Biotechnological applications of marine enzymes from algae, bacteria, fungi, and sponges. ***In Advances in food and nutrition research***, v. 80, p. 75-106, 2017.

PASSARINI, M. R. Z et al. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Dragmacidon reticulatum*. ***Archives of Microbiology***, v. 195, n. 2, p. 99-111, 2013.

PEDROLLI, D. B. et al. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. ***The Open Biotechnology Journal***, v. 3, n. 1, p. 9–18, 2009.

PEIXOTO, R.; ROSADO, A.; RG, T. “Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável” in *Microbiologia Ambiental*, eds I. Melo and J. Azevedo Jaguariúna: ***CNPMA/EMBRAPA Editora***, p. 83-106, 2008.

PEPPER, I. L. et al. (ed.). *Environmental microbiology*. Academic Press, 2011.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. ***Studies in Mycology***, v. 59, p. 53–66, 2007.

PILANTANAPAK, A.; JONES, E. B. G.; EATON, R. A. Marine fungi on *Nypa fruticans* in Thailand. ***Botanica Marina***, v. 48, n. 5-6, p. 365-373, 2005.

PILANTANAPAK, A.; JONES, E. G.; EATON, R. A. Marine fungi on *Nypa fruticans* in Thailand. ***Botanica Marina***, v. 48, n. 5-6, p. 365-373, 2005.

PINTO, P. A da. C. S. B. Deslenhificação de palha de trigo por fungos da podridão branca: Inibição da lacase de *Fomes fomentarius* pelo ião Cl⁻. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrária) – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2010

PIRES, O. A. B. Produção e aplicação de extratos enzimáticos de fungos da podridão branca como pré-tratamento para sacarificação de resíduos agrícolas. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

PIZATO, E. et al. Caracterização de efluente têxtil e avaliação da capacidade de remoção de cor utilizando o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, p. 5-22, 2017.

POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v. 2, p. 17-33, 1999.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PORTER, T. M.; BRIAN GOLDING, G. Are similarity-or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons?. **New Phytologist**, v. 192, n. 3, p. 775-782, 2011.

PRATIWI, I. A.; IRAWAN, B. Mold community diversity differences in Wonorejo Surabaya habitats. **In AIP Conference Proceedings**, v. 2002, n. 1, p. 020034, 2018.

RABONATO, A. C. Linhagens fúngicas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. p. 1–69, 2013.

RAGHUKUMAR, C. et al. Degradation of lignin and decolorization of paper mill bleach plant effluent (BPE) by marine fungi. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 1, p. 105-106, 1996.

RAGHUKUMAR, C. et al. Laccase and Other Lignocellulose Modifying Enzymes of Marine Fungi Isolated from the Coast of India. v. 37, p. 515-523, 1994.

RAGHUKUMAR, C., et al. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. **Botanica Marina**, v. 37, n. 6, p. 515-524, 1994.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA-TICLO, D.; VERMA, A. Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: an emerging role of marine-derived fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 3-4, p. 189-206, 2008.

RAGHUKUMAR, C.; SOUZA-TICLO, D. D.; VERMA, A. K. Treatment of Colored Effluents with Lignin-Degrading Enzymes : An Emerging Role of Marine-Derived Fungi. p. 189-206, 2008.

RÄMÄ, T. et al. Fungi ahoy! Diversity on marine wooden substrata in the high North. **Fungal Ecology**, v. 8, p. 46-58, 2014.

RAMOS T. C. D. A. Identificação e caracterização genética para prospecção do potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solos do quadrilátero ferrífero–MG, 2016.

RANGARAJAN, V. et al. Pectinase Production from Orange Peel Extract and Dried Orange Peel Solid as Substrates Using *Aspergillus niger*. v. 6, n. 3, p. 445-453, 2010.

RANI, C.; PANNEERSELVAM, A. Diversity of lignicolous marine fungi recorded from muthupet environs, east coast of india. **ARPJ Agric Biol Sci**, v. 4, p. 1-6, 2009.

RANIMOL, G. et al. Production of laccase from *Trichoderma harzianum* and its application in dye decolourisation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 400-404, 2018.

RIDDELL, R. W.; MYCOLOGIA, S.; APR, N. M. Mycological Society of America Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. v. 42, n. 2, p. 265–270, 2013.

RODRIGUES, A. et al. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 2, 244-255, 2011.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enzymatic Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 15-32, 2010.

RORIZ, M. S. et al. Application of response surface methodological approach to optimise Reactive Black 5 decolouration by crude laccase from *Trametes pubescens*. **Journal of hazardous materials**, v. 169, n. 1-3, p. 691-696, 2009.

SÁ, A.L.B et al. Screening of endoglucanase-producing bacteria in the saline rhizosphere of *Rhizophora mangle*. **Braz J Microbiol**, v. 45, p. 193-197, 2014.

SAHA, N. et al. Industrial metal pollution in water and probabilistic assessment of human health risk. **Journal of environmental management**, v. 185, p. 70-78, 2017.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual (Nº. Ed. 2). **Cold spring harbor laboratory press**, 1989.

SAMSON, R. A. et al. The species concept in *Aspergillus*: Recommendations of an international panel. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 71–73, 2007.

SANDRI, I. G. Enzimas pectinolíticas: seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processos da indústria de alimentos. 114f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2010.

SANTOS, N. M. Os manguezais do complexo estuarino de Paranaguá. 2013.

SARAVANAKUMAR, K.; KATHIRESAN, K. Bioremoval of the synthetic dye malachite green by marine *Trichoderma* sp. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 631, 2014.

SARMA, V. V.; HYDE, K. D. A review on frequently occurring fungi in mangroves. **Fungal Divers**, v. 8, p. 1-34, 2001.

SARMA, V. V.; HYDE, K. D. A review on frequently occurring fungi in mangroves. **Fungal Divers**, v. 8, p. 1-34, 2001.

SARMA, V. V.; HYDE, K. D. A review on frequently occurring fungi in mangroves. **Fungal Divers**, v. 8, p. 1-34, 2001.

SARMA, V. V.; VITTAL, B. P. R. Biodiversity of mangrove fungi on different substrata of *Rhizophora apiculata* and *Avicennia* spp. from Godavari and Krishna deltas, east coast of India. **Fungal Diversity**, v. 5, p. 23-41, 2000.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: Ecosistema entre a terra e o mar. **São Paulo: Caribbean Ecological Research**, 1995.

SENGUPTA, A.; CHOWDHURY, A. R.; CHAUDHURI, S. Ecology of cellulose decomposition by microfungi in the rhizosphere of mangrove angrove plant community at the Ganges River Estuary in India. v. 7, n. 3, p. 17-24, 2018.

SETTE, L. D. et al. Recomendações para operação e gerenciamento de coleções de culturas de microrganismos. **Brazilian Society of Microbiology**, v. 2, p. 49-55, 2007.

SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. **Fungal genetics and biology**, v. 60, p. 2-8, 2013.

SHEARER, C. A. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**, v.16, n.1, p.49-67, 2007.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SIVAKUMAR, T. A review on biodiversity of marine and mangrove fungi. **Int. J. Adv. Multidiscip. Res**, v. 3:5, n. 38-48, 2016.

SPACH, H. L. et al. Padrões estruturais da assembléia de peixes em duas áreas do Canal da Cotinga, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil, v. 21, p. 2, 2012.

STEINKE, T. D. Mangrove fungi on dead prop roots of *Rhizophora mucronata* at three localities in South Africa. **South African Journal of Botany**, v.66, n.2, p. 91-95, 2000.

SUBRAMANI, R. et al. Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite

of *Penicillium* sp. ***Asian Pacific Journal of tropical biomedicine***, v. 3, n. 4, p. 291, 2013.

SUN, X.; GUO, L.; HYDE, K. D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. ***Fungal Diversity***, v. 47, n. 1, p. 85-95, 2011.

TAHA, M. et al. Synthesis of novel inhibitors of α -glucosidase based on the benzothiazole skeleton containing benzohydrazide moiety and their molecular docking studies. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, v. 92, p. 387–400, 2015.

TAKETANI, R. G. et al. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. *Antonie van Leeuwenhoek*, ***International Journal of General and Molecular Microbiology***, v. 97, n. 4, p. 401-411, 2010.

TARIQ, M.; DAWAR, S.; MEHDI, F. S. Occurrence of fungi on mangrove plants. v. 38, n. 4, p. 1293–1299, 2006.

TAVARES, A. P. M. et al. Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira, 2006.

THATOI, H.; BEHERA, B. C.; MISHRA, R. R. Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: A review. ***Mycology***, v. 4, n. 1, p. 54-71, 2013.

TORRES, J. M. O.; DELA CRUZ, T. E. E. Production of xylanases by mangrove fungi from the Philippines and their application in enzymatic pretreatment of recycled paper pulps. ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, v. 29, n. 4, p. 645–655, 2013.

TRIERVEILER-PEREIRA, L.; BALTAZAR, J. M.; LOGUERCIO-LEITE, C. Santa Catarina Island mangroves 4–xylophilous basidiomycetes. ***Mycotaxon***, v. 109, n. 1, p. 107-110, 2009.

TSUI, C. K.; HYDE, K. D. Biodiversity of fungi on submerged wood in a stream and its estuary in the Tai Ho Bay, Hong Kong. ***Fungal Diversity***, 2004.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. ***Química Nova***, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

VALLECILLOS, L. et al. Degradation of synthetic fragrances by laccase-mediated system. ***Journal of hazardous materials***, v. 334, p. 233-243, 2017.

VARON-LOPEZ, M. et al. Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. ***Environmental Microbiology***, v. 16, n. 3, p. 845-855, 2014.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalizadores da hidrólise de triacilgliceróis. ***REB-Revista Eletrônica de Biologia***, v. 5, n. 3, p. 42-58, 2012.

VELÁSQUEZ, V. et al. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. ***Genetics and Molecular Biology***, v. 30, n. 1, p. 89-99, 2007.

VELMURUGAN, N.; LEE, Y. S. (2012). Enzymes from marine fungi: current research and future prospects in Marine Fungi and Fungal-like Organisms. ***Marine and Fresh water Botany***, ed.E.B.G.Jones (Berlin:WalterdeGruyter), p. 441-474.

VERMA, A. K. et al. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. ***Biodegradation***, v. 21, n. 2, p. 217-233, 2010.

VITTAL, B. P. R.; SARMA, V. V. Diversity and ecology of fungi on mangroves of Bay of Bengal region - An overview, v. 35, p. 308–317, 2006.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. ***Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular***. 2^oed. Porto alegre: Artemed, 2008.

VRIJMOED, L. L. P.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. With the description of two new ascomycetes : Diaporthe. ***Mycological Research***, v. 98, n. 6, p. 699-704, 1994.

WANG, T. et al. Decolorization of the azo dye reactive black 5 using laccase mediator system. v. 10, n. 75, p. 17186–17191, 2011b.

WANG, W. et al. Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. ***Food Chemistry***, v. 178, p. 106-114, 2015.

WANG, Y. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in two mangroves in South China. ***Plant and soil***, v. 331, n. 1-2, p. 181-191, 2010.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Kinetic mechanism and role of chelators. ***Journal of Biological Chemistry***, v. 267, n. 33, p. 23688–23695, 1992.

WHITE, T. J.; BRUNS, S.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal genes for phylogenetics. ***PCR Protocols: A Guide to methods and applications***. Academic Press, San Diego, CA, USA, p. 15–22, 1990.

XING, C. et al. An Electromotive Force Measurement System for Alloy Fuels. In: ASME 2010 International Mechanical Engineering Congress and Exposition. ***American Society of Mechanical Engineers***, p. 403-408, 2010.

YAMANAKA, R. et al. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 39, n. 1, p. 78-84, 2008.

YANG, B. et al. Optimum removal conditions of aniline compounds in simulated wastewater by laccase from white-rot fungi. ***Journal of Environmental Health Science and Engineering***, p. 1-6, 2019.

YEŞİLADA, ÖZFER, et al. Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *Funalia trogii*. ***Turkish Journal of Biology***, v. 38, n. 1, p. 103-110, 2014.

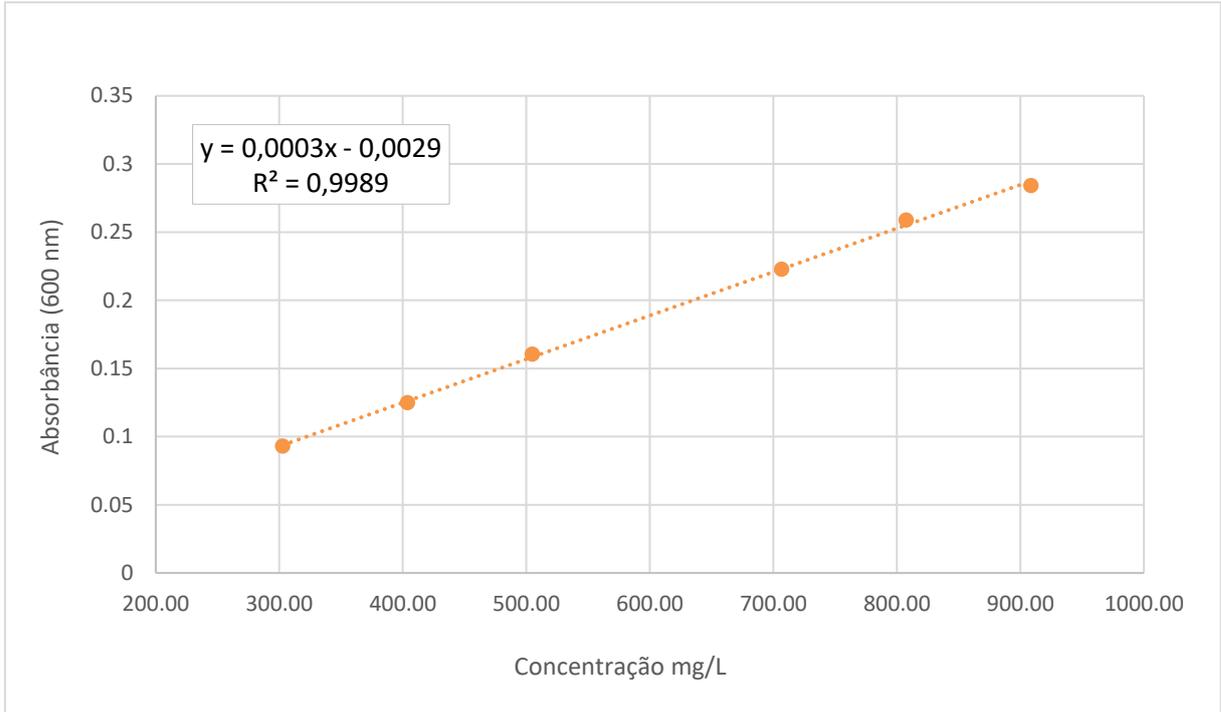
ZAMPIERI, D. Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum*, 2015.

ZENG, S.; QIN, X.; XIA, L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. ***Biochemical Engineering Journal***, v. 119, p. 92-100, 2017.

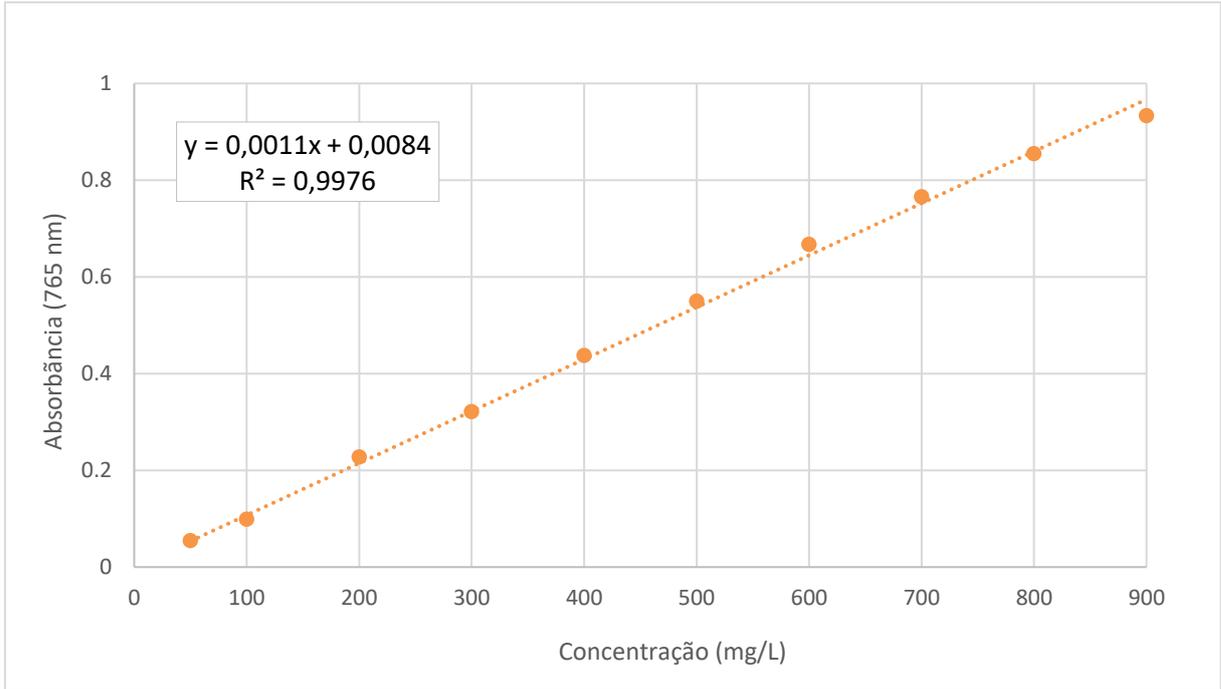
ZHANG, C.; KIM, S. K. Application of marine microbial enzymes in the food and pharmaceutical industries. ***In Advances in food and nutrition research***, v. 65, p. 423-435, 2012.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. ***Biotechnology advances***, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

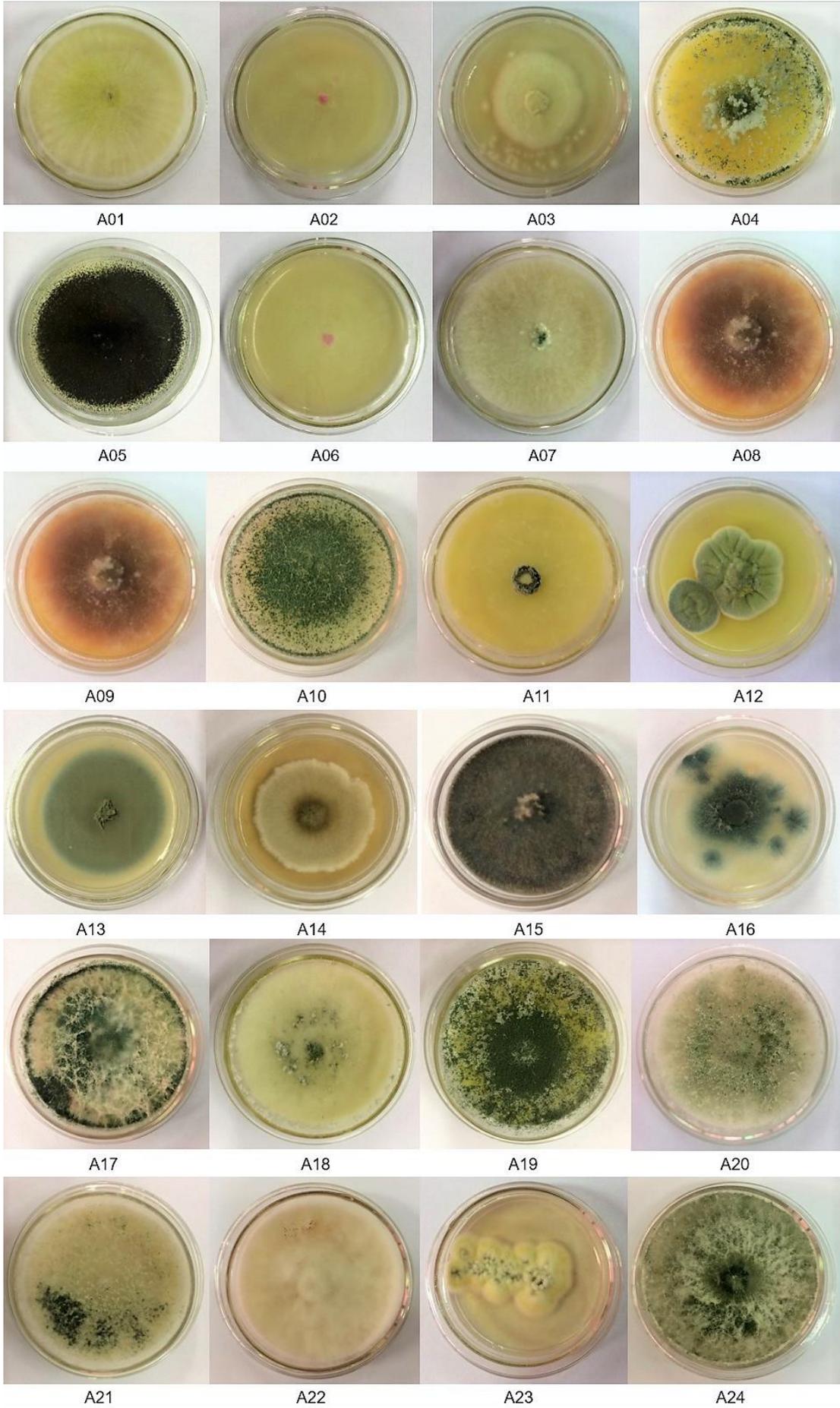
APÊNDICE A - Curva padrão da Demanda Química de Oxigênio (DQO), medindo biftalato de potássio (KHP) de 300 a 900 mg/L.

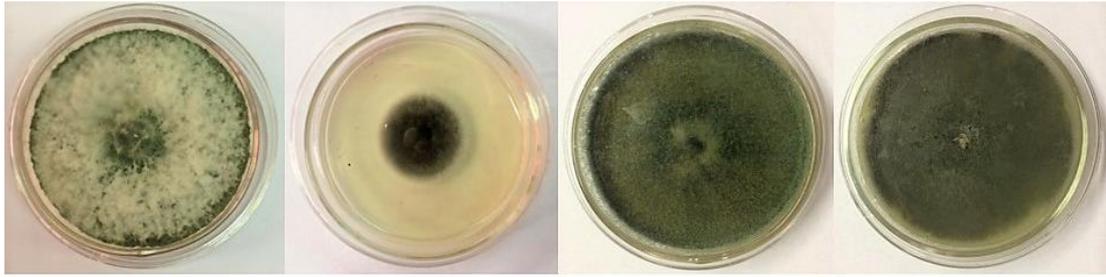


APÊNDICE B - Curva padrão de fenólicos totais medindo ácido gálico de 50 a 900 mg/L, através da metodologia por reagente de Folin.



APÊNDICE C - Fotografia das colônias fúngicas obtidas a partir da raiz aérea de árvores de manguezal, cultivadas em placas de Patri (94 mm) contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), incubadas a 28°C durante sete dias.



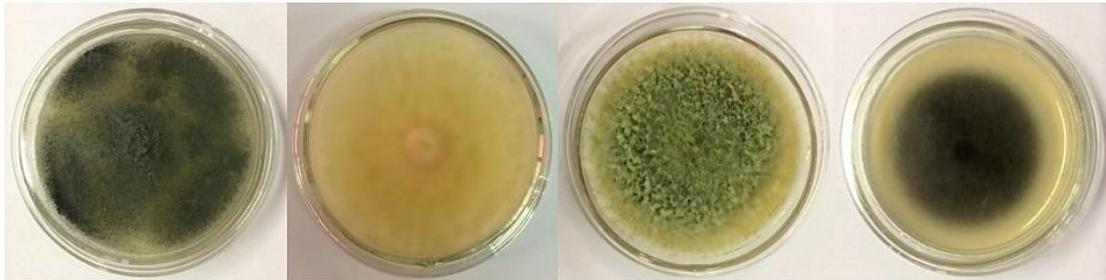


A25

A26

A27

A28



A29

A30

A31

A32

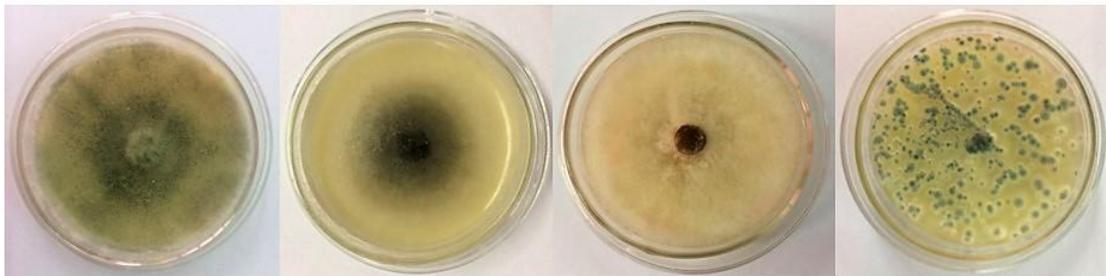


A33

A34

A35

A36



A37

A38

A39

A40

ANEXO A - Direitos autorais - Lei nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998.
Disposições preliminares



Presidência da República
Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos

LEI Nº 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998.

Mensagem de veto

Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Título I

Disposições Preliminares

Art. 1º Esta Lei regula os direitos autorais, entendendo-se sob esta denominação os direitos de autor e os que lhes são conexos.

Art. 2º Os estrangeiros domiciliados no exterior gozarão da proteção assegurada nos acordos, convenções e tratados em vigor no Brasil.

Parágrafo único. Aplica-se o disposto nesta Lei aos nacionais ou pessoas domiciliadas em país que assegure aos brasileiros ou pessoas domiciliadas no Brasil a reciprocidade na proteção aos direitos autorais ou equivalentes.

Art. 3º Os direitos autorais reputam-se, para os efeitos legais, bens móveis.

Art. 4º Interpretam-se restritivamente os negócios jurídicos sobre os direitos autorais.

Art. 5º Para os efeitos desta Lei, considera-se:

I - publicação - o oferecimento de obra literária, artística ou científica ao conhecimento do público, com o consentimento do autor, ou de qualquer outro titular de direito de autor, por qualquer forma ou processo;

II - transmissão ou emissão - a difusão de sons ou de sons e imagens, por meio de ondas radioelétricas; sinais de satélite; fio, cabo ou outro condutor; meios óticos ou qualquer outro processo eletromagnético;

III - retransmissão - a emissão simultânea da transmissão de uma empresa por outra;

IV - distribuição - a colocação à disposição do público do original ou cópia de obras literárias, artísticas ou científicas, interpretações ou execuções fixadas e fonogramas, mediante a venda, locação ou qualquer outra forma de transferência de propriedade ou posse;

V - comunicação ao público - ato mediante o qual a obra é colocada ao alcance do público, por qualquer meio ou procedimento e que não consista na distribuição de exemplares;

VI - reprodução - a cópia de um ou vários exemplares de uma obra literária, artística ou científica ou de um fonograma, de qualquer forma tangível, incluindo qualquer armazenamento permanente ou temporário por meios eletrônicos ou qualquer outro meio de fixação que venha a ser desenvolvido;

VII - contrafação - a reprodução não autorizada;

VIII - obra:

a) em co-autoria - quando é criada em comum, por dois ou mais autores;

b) anônima - quando não se indica o nome do autor, por sua vontade ou por ser desconhecido;

c) pseudônima - quando o autor se oculta sob nome suposto;

d) inédita - a que não haja sido objeto de publicação;

e) póstuma - a que se publique após a morte do autor;

f) originária - a criação primígena;

g) derivada - a que, constituindo criação intelectual nova, resulta da transformação de obra originária;

h) coletiva - a criada por iniciativa, organização e responsabilidade de uma pessoa física ou jurídica, que a publica sob seu nome ou marca e que é constituída pela participação de diferentes autores, cujas contribuições se fundem numa criação autônoma;

i) audiovisual - a que resulta da fixação de imagens com ou sem som, que tenha a finalidade de criar, por meio de sua reprodução, a impressão de movimento, independentemente dos processos de sua captação, do suporte usado inicial ou posteriormente para fixá-lo, bem como dos meios utilizados para sua veiculação;

IX - fonograma - toda fixação de sons de uma execução ou interpretação ou de outros sons, ou de uma representação de sons que não seja uma fixação incluída em uma obra audiovisual;

X - editor - a pessoa física ou jurídica à qual se atribui o direito exclusivo de reprodução da obra e o dever de divulgá-la, nos limites previstos no contrato de edição;

XI - produtor - a pessoa física ou jurídica que toma a iniciativa e tem a responsabilidade econômica da primeira fixação do fonograma ou da obra audiovisual, qualquer que seja a natureza do suporte utilizado;

XII - radiodifusão - a transmissão sem fio, inclusive por satélites, de sons ou imagens e sons ou das representações desses, para recepção ao público e a transmissão de sinais codificados, quando os meios de decodificação sejam oferecidos ao público pelo organismo de radiodifusão ou com seu consentimento;

XIII - artistas intérpretes ou executantes - todos os atores, cantores, músicos, bailarinos ou outras pessoas que representem um papel, cantem, recitem, declamem, interpretem ou executem em qualquer forma obras literárias ou artísticas ou expressões do folclore.

Art. 6º Não serão de domínio da União, dos Estados, do Distrito Federal ou dos Municípios as obras por eles simplesmente subvencionadas.