

DANIELA NETO FERREIRA GOMES

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNÓLOGICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO MANGUEZAL BARRA DAS
JANGADAS, JABOATÃO DOS GUARARAPES, PERNAMBUCO**

RECIFE

FEVEREIRO/2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**BIODIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO MANGUEZAL BARRA
DAS JANGADAS, JABOATÃO DOS GUARARAPES,
PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
em Biologia de Fungos da Universidade de
Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Maria Auxiliadora Queiroz Cavalcanti

Co-Orientadores

Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Dr. José Zanon de Oliveira Passavante

RECIFE

FEVEREIRO/2007

Gomes, Daniela Neto Ferreira

Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco / Daniela Neto Ferreira Gomes. – Recife: O Autor, 2007.

iv, 94 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Fungos – Diversidade – Manguezal 2. Fenoloxidasas 3. Xilanase 4. Celulase I. Título.

**582.28 CDU (2.ed.)
579.5 CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2007-065**

Ata da Reunião de Prova pública de defesa de Tese da aluna DANIELA NETO FERREIRA GOMES, da área de concentração em MICOLOGIA BÁSICA, do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – nível DOUTORADO, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Às nove horas do dia vinte e seis de fevereiro de dois mil e sete, na sala de aulas teóricas da Pós-Graduação do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, realizou-se a prova pública de defesa de tese apresentada pela doutoranda **DANIELA NETO FERREIRA GOMES**, sob a orientação do Profa. **MARIA AUXILIADORA DE QUEIROZ CAVALCANTI**, e co-orientação da Professora **ANA LÚCIA PÔRTO**, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, titulada: "**BIODIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO MANGUEZAL BARRA DAS JANGADAS, JABOATÃO DOS GUARARAPES, PERNAMBUCO**". Presentes professores, alunos e convidados. A Banca Examinadora, aprovada pela Diretora de Pós-Graduação da PROPESQ, Dr. Maria de Fátima Militão Albuquerque em sete de fevereiro de dois mil e sete, foi composta pelos seguintes **membros titulares**: Profa. **MARIA AUXILIADORA DE QUEIROZ CAVALCANTI**, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Livre Docência pela Universidade Federal de Pernambuco, membro titular interno, e orientadora da aluna; Profa. **ELAINE MALOSSO**, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Microbiologia Molecular, pela University of Newcastle, Grã-Bretanha, membro suplente interno em substituição ao membro titular interno Prof. **JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO**, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, Doutor em Bioquímica e Microbiologia pela University of St. Andrews, Escócia; Profa. **NORMA BUARQUE DE GUSMÃO**, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Microbiologia pela Universidade de Grenoble I, França, em substituição ao membro titular interno Dra. **GALBA MARIA DE CAMPOS-TAKAKI**, do Departamento de Química e Meio Ambiente da Universidade Católica de Pernambuco, Doutora em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP; Prof. **WALDEREZ GAMBALE**, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Doutor em Microbiologia pela USP, membro titular externo e Profa. **LEONOR COSTA MAIA**, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Fitopatologia pela Universidade da Flórida, Estados Unidos, membro titular interno. Como Membro Suplente o Professor **JOSÉ LUIZ BEZERRA**, da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Centro de Pesquisa do Cacau, SEFIT, Doutor em Fitopatologia pela Universidade da Flórida, Estados Unidos, membro suplente externo. A Profa. **LEONOR COSTA MAIA** iniciou a sessão apresentando os membros da Banca Examinadora, agradecendo a

*Reunião
21/2/07*

colaboração e a presença de todos. Em seguida passou a palavra à Orientadora, Profa. **MARIA AUXILIADORA DE QUEIROZ CAVALCANTI**, que convidou a Doutoranda para apresentar a sua Tese. A seguir, os membros da Banca Examinadora discutiram alguns pontos e fizeram sugestões sobre o trabalho. Procedida a avaliação, a Banca Examinadora atribuiu à Doutoranda **DANIELA NETO FERREIRA GOMES** a menção:

— APROVADA — Nada mais havendo a tratar, eu, Giovanna de Lima Guterres, lavrei, datei e assinei a presente ATA, que também assinam os demais presentes. Recife, 26 de fevereiro de 2007.

Giovanna de Lima Guterres, Maria Auxiliadora Cavalcanti
de Faria, Jovani Costa, Maria Clara Malosso

Naura Gusmão, Ana Paula Duarte Pires

Flávia Paiva Coutinho

Josilene Malaquias de Lima

Eduardo Ricardo de Moura.

Michelline Lima Silvério

Adriana Silva

Leuciana J. de Oliveira

Ilvone Batista Cunha

Claudia Elizabete de Almeida Lima.

Stanyne Gomes

Silvia Azêdo

21/3/2007

“Quando o homem aprender a respeitar até mesmo o menor ser da criação, seja ele animal ou vegetal, ninguém precisará lhe ensinar a amar seu semelhante”.

Albert Schweitzer (Nobel da Paz em 1952)

*Aos meus pais Eduardo e Solange e
à minha irmã Maria Eduarda, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Àquele que esteve presente em todos os momentos principalmente os difíceis, concedendo oportunidade do aprendizado, revelando seu poder e sua glória a cada instante da minha vida: Deus.

Àqueles que sempre acreditaram em mim, sempre estiveram presentes em todos os momentos, que me deram a oportunidade de estar realizando mais um sonho, àqueles que eu amo muito, e que sem eles eu nada seria, meus pais Eduardo e Solange.

À minha amada e única irmã Maria Eduarda “Duda”, exemplo de amizade, companheirismo, confiança, amor, carinho e compreensão.

Aos meus avós queridos Lucy e Aluísio (*in memoriam*) expressão perfeita do verdadeiro amor.

À minha prima-irmã Ana Raphaela “Rapha” e a minha amiga-irmã Isabelle “Belle” pelos momentos de alegria e descontração, fundamentais para a realização desta tese.

À toda minha família, em especial, meus tios José Antônio, Sílvia e Leny pela expectativa e interesse em minha vida profissional.

Às minhas queridas amigas Anna Luiza, Rachel e Edmiriam pelos momentos de alegria e descontração fundamentais em minha vida.

À minha orientadora Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti pela excelente orientação, dedicação, compreensão e incentivo fundamentais para a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Ana Lúcia Porto por ter confiado e acreditado em mim, pelo carinho, incentivo, sugestões e críticas fundamentais para finalização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. José Zanon de Oliveira Passavante pelo apoio, críticas, sugestões e assistência para a realização deste trabalho.

À coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, na pessoa da Dra. Leonor Costa Maia, pelo apoio recebido no decorrer da realização do Curso de Doutorado.

Às professoras Maria José Fernandes e Débora Massa Lima do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, pelo carinho e competência fundamentais na identificação dos fungos filamentosos.

À Dra. Maria Taciana Soares pela força e amizade, e pelas análises enzimáticas realizadas para conclusão deste trabalho.

À Felipe Reis, pelas traduções dos artigos

Aos grandes amigos da Pós-graduação: Ana Paula, Eduardo (Edu), Josilene (Josi), Flavia (Flavinha), André (Dedé), Luciana (Lu), Michelline (Michel), Claudia (Claudinha), Priscilla (Pri) e Ivone pelos momentos de lazer, companheirismo, trabalho e descontração fundamentais na minha vida.

Um agradecimento especial à minha querida amiga e dupla dinâmica Silvinha, companheira constante em todos os momentos, dando ajuda e apoio fundamental para a realização deste trabalho. Exemplo de amizade pura e verdadeira que levarei para sempre em minha vida.

Um agradecimento especial a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
RESUMO GERAL	III
ABSTRACT	IV
REVISAO DA LITERATURA	1
1. MANGUEZAIS	1
1.1. Histórico e definição	1
1.2. Distribuição	1
1.3. Vegetação	2
1.4. Fauna	3
1.5. Sedimento	3
1.6. Importância do ecossistema manguezal	4
2. FUNGOS EM MANGUEZAIS	4
2.1. Fungos em manguezais no Brasil	7
3. MANGUEZAL DE BARRA DAS JANGADAS	8
4. ENZIMAS	10
4.1. Histórico e definição	10
4.2. Fungos e enzimas	11
4.2.1. Fenoloxidasas	12
4.2.2. Xilanases	15
4.2.3. Celulases	17
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

	Pág.
CAPÍTULO 1 – Fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil	37
Abstract	37
Introdução	38
Área de Estudo	39
Material e Métodos	40
Resultados e Discussão	42
Resumo	51
Referencias Bibliográficas	52
CAPÍTULO 2 – Análise qualitativa enzimática de fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco	57
Resumo	57
Abstract	58
Introdução	58
Material e Métodos	60
Resultados e Discussão	61
Referencias Bibliográficas	68
CAPÍTULO 3 – Análise quantitativa enzimática de fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco	72
Resumo	72
Abstract	73

	Pág.
Introdução	74
Material e Métodos	75
Resultados e Discussão	78
Referencias Bibliográficas	84
CONCLUSOES GERAIS	90
ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Revisão de Literatura

Figura 1. Vista parcial do Rio Jaboatão (pontos 1 e 3)	9
Figura 2. Vista parcial do Rio Pirapama (pontos 2 e 4)	10

Capítulo II

Figura 1. Expressão da atividade fenolítica em <i>Cladosporium tenuissimum</i>	66
Figura 2. Expressão da atividade fenolítica em <i>Penicillium commune</i>	66
Figura 3. Expressão da atividade celulolítica em <i>Aspergillus fumigatus</i>	67
Figura 4. Expressão da atividade celulolítica em <i>Stilbella clavispora</i>	67

Capítulo III

Figura 1. Atividade celulásica (U/mg) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE.....	81
Figura 2. Atividade xilanásica (U/mg) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE.....	82
Figura 3. Atividade enzimática específica de lacase (nanokatal/mg) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE.....	82
Figura 4. Atividade enzimática específica de manganês Peroxidase (U/mg) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE.....	83
Figura 5. Atividade enzimática específica de lignina peroxidase (U/mg/min) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE.....	83

LISTA DE TABELAS

Pág.

Capítulo I

Tabela 1. Unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE, nos períodos de estiagem e chuvoso..... 49

Tabela 2. Dados hidrológicos, pH, temperatura e salinidade do sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE..... 50

Capítulo II

Tabela 1. Análise qualitativa enzimática de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE..... 65

RESUMO GERAL - Fungos filamentosos de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, foram isolados e identificados com objetivo de proceder a caracterização enzimática. Foram coletadas amostras de sedimento do manguezal Barra das Jangadas nos meses de março e abril/2004 e outubro/2005 (período de estiagem); junho e julho/2004 e julho/2005 (período chuvoso). As coletas foram realizadas em quatro pontos em manguezais do estuário formado pelos rios Jaboatão e Pirapama, perfazendo um total de 24 amostras. Foram isoladas e identificadas 50 espécies de fungos filamentosos em $273 \text{ UFC} \times 10^4$. *Penicillium* e *Aspergillus* foram os gêneros melhor representados, com 21 e 11 espécies, respectivamente, seguidos de *Trichoderma* (5), *Fusarium*, *Phoma* e *Talaromyces* (2). Os demais gêneros foram representados por uma só espécie: *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Gongronella*, *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Stilbella* e *Thielavia*. Das 50 espécies testadas para seleção qualitativa enzimática, 21 apresentaram atividade positiva para fenoloxidase e 11 para celulase; entretanto, nenhuma foi positiva para xilanase. Em relação a análise enzimática quantitativa, apresentaram melhor atividade para celulase *Microsphaeropsis olivacea* (0,4546 U/mg) e *Stilbella clavispora* (0,3584 U/mg); para xilanase *Phoma capitulum* (271 U/mg) e *Trichoderma aureoviride* (268 U/mg). Para as fenoloxidases, *Aspergillus sclerotiorum* (739,7569 nanokatal/mg), *Penicillium commune* (8,785982 U/mg) e *Penicillium oxalicum* (28,6021 U/mg/min) foram os maiores produtores de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, respectivamente. Os fungos selecionados demonstraram potencial para serem introduzidos em processos de biorremediação, com perspectivas de resultados promissores para tratamentos de resíduos e efluentes fenólicos.

Palavras – chave: Fenoloxidases, xilanase e celulase

ABSTRACT - Filamentous fungi has been isolated from Barra das Jangadas mangrove and identified with the objective to characterize them enzymatically. Sediment samples from Barra das Jangadas mangrove has been collected in March and April/2004 and October/2005 (dry season); June and July/2004 and July/2005 (rainy season). The samples has been taken from four points on estuarine mangrove formed by Jaboatão and Pirapama rivers respectively, where the characteristic vegetation of fen was predominant, making a total of 24 samples. Spell out 50 species of filamentous fungi were isolated and identified from $273 \text{ UFC} \times 10^4$. *Penicillium* and *Aspergillus* were the best represented genera with 21 and 11 species, respectively, followed by *Trichoderma* (5), *Fusarium*, *Phoma* and *Talaromyces* (2). The rest of the genera were represented by one species each: *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Gongronella*, *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Stilbella* and *Thielavia*. Of the 50 species tested for enzymatic qualitative selection, 21 was positive for phenoloxidase and 11 for cellulase; however, none was positive for xylanase. In relation to the quantitative enzymatic analysis, the greater producers of celulase were *Microsphaeropsis olivacea* (0.4546 U/mg) and *Stilbella clavispora* (0.3584 U/mg), and for xylanase they had been *Phoma capitulum* (271 U/mg) and *Trichoderma aureoviride* (268 U/mg). For fenoloxidases, *Aspergillus sclerotiorum* (739.7569) nanokatal/mg), *Penicillium commune* (8.7859 U/mg) and *Penicillium oxalicum* (28.6021 U/mg/min) were the greater producers of lacase, manganese peroxidase and lignin peroxidase respectively. The selected fungi demonstrated an important potential and should be tested for bioremediation processes, with perspectives of promising results for treatment of residues and phenolic effluents.

Key – words: Phenoloxidases, xylanase and cellulase

Revisão de Literatura

REVISAO DE LITERATURA

1. MANGUEZAIS

1.1. Histórico e definição

Documentos sobre plantas de mangue datam de 325 a.c., referentes a uma relatório do General Nearco, que registrou a ocorrência de árvores de 14m de altura com flores brancas que cresciam no mar e troncos suportados por raízes com aspecto de candelabro. Mais tarde, em 1230, Abou'l Abbas el Nabaty, um botânico mouro que viajou pela Arábia, Síria e Iraque chamou o mangue vermelho de kendela. Em 1526, Oviedo fez a primeira descrição dos manguezais americanos e, em 1587, Gabriel Soares de Souza, um historiador português, escreveu uma das mais antigas referências sobre os manguezais brasileiros (Schaeffer-Novelli, 1995).

Por definição o manguezal consiste de um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de regiões tropicais e subtropicais, sujeito ao regime das marés. É constituído de espécies vegetais lenhosas típicas, além de micro e macroalgas, adaptadas à flutuação de salinidade e caracterizadas por colonizarem sedimentos predominantemente lodosos, com baixos teores de oxigênio. Ocorre em regiões costeiras abrigadas e apresenta condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies animais, sendo considerado importante transformador de nutrientes em matéria orgânica e gerador de bens e serviços (Schaeffer-Novelli, 1995).

1.2. Distribuição

O Brasil possui de 10.000 a 25.000 km² de manguezais, enquanto no mundo existem 162.000 km². Os manguezais apresentam maior desenvolvimento entre os

trópicos de Câncer e Capricórnio, e o desenvolvimento máximo ocorre próximo à linha do Equador. No Brasil os manguezais se estendem desde o Amapá até Laguna em Santa Catarina, limite desse ecossistema no Atlântico Sul. Embora o manguezal seja característico de regiões tropicais, também pode ocorrer em climas temperados, mas em menor proporção. As condições ideais para o desenvolvimento dos manguezais são: temperatura média acima de 20°C e temperatura mínima não inferior a 15°C, amplitude térmica anual menor que 5°C e precipitação pluvial acima de 1500 mm/ano, sem prolongados períodos de seca (Schaeffer-Novelli, 1995).

1.3. Vegetação

O manguezal é composto por plantas lenhosas, chamadas de manguê. Neste ambiente existem plantas herbáceas, epífitas, hemiparasitas e aquáticas típicas. É formado por plantas halófitas, mas devido às condições do ambiente não ocorre a formação de bosques, estando as árvores adaptadas ao ambiente inóspito que habitam. Possuem pneumatóforos que auxiliam na oxigenação, assim como na diminuição do impacto das ondas quando a maré está enchendo; adaptações fisiológicas para ultra-filtragem e secreção ativa da água salobra; e reprodução por viviparidade (Schaeffer-Novelli, 1995).

As florestas de manguê de todo o litoral brasileiro são compostas de três gêneros: *Laguncularia*, *Avicennia* e *Rhizophora*, podendo existir ainda representantes do gênero *Conocarpus*, que vivem nos bordos da floresta, sendo comum no litoral Norte. *Rhizophora* também chamada de manguê-vermelho apresenta uma casca lisa e clara; quando raspada tem cor vermelha. *Avicennia* ou siriúba possui casca lisa castanho-claro, apresentando cor amarelada quando raspada; *Laguncularia*, ou manguê branco, é pequena, cujas folhas possuem pecíolo vermelho com duas glândulas na parte

superior. Podem alcançar de 6m (*Laguncularia*) a 12m (*Rhizophora* e *Avicennia*) de altura. Geralmente *Rhizophora* ocupa as faixas frente ao mar, seguidas por *Laguncularia*. *Rhizophora* prefere substratos de lodo puro, *Laguncularia* e *Avicennia* substratos misturados com areia (Por, 1994; Schaeffer-Novelli, 1995).

1.4. Fauna

O manguezal é habitado por diversos animais, desde microscópicos até grandes peixes, aves, répteis e mamíferos. Alguns deles ocupam o sedimento ou a água, outros raízes e troncos, chegando até à copa das árvores, espaço bastante disputado, principalmente no período noturno. Esses animais têm origem nos ambientes terrestre, marinho e de água doce, podendo ser residentes ou semi-residentes. São agrupados em função do seu tamanho, como: de tamanho reduzido ou de médio e grande porte, ou então quanto ao seu habito de vida, destacando-se os herbívoros. A maior parte da fauna vem do ambiente marinho, sendo encontrada grande quantidade de moluscos, crustáceos e peixes. Do ambiente terrestre provêm aves, anfíbios, mamíferos e alguns insetos (Schaeffer-Novelli, 1995)

1.5. Sedimento

Os sedimentos do manguezal possuem características variáveis, de acordo com a sua origem. Podem ser originados no próprio ambiente, pela decomposição de folhas, galhos, restos de animais, contendo produtos de decomposição de rochas de diferentes naturezas, associados aos materiais vulcânicos, graníticos, gnáissicos, ou sedimentares; associados aos restos de plantas e animais trazidos de fora do ambiente por ondas, ventos, correntes litorâneas ou fluxo dos rios (Schaeffer-Novelli, 1995).

O substrato do manguezal é lodo-arenoso, podendo, às vezes, chegar a semi-liquido; geralmente tem muita matéria orgânica, alto conteúdo de sal, é pouco consistente e apresenta cor cinza escuro (Por, 1994; Schaeffer-Novelli, 1995).

1.6. Importância do ecossistema manguezal

Apesar da pouca diversidade, tanto animal quanto vegetal, encontrada no manguezal quando comparado com as Florestas Atlântica e Amazônica, este ecossistema é considerado um dos mais ricos do mundo, em termos de biomassa (Por, 1994).

A manutenção das florestas de mangue tem grande importância social e econômica: suas madeiras possuem alta densidade, resistência ao ataque cupins, podem ser usadas na construção de barcos, casas, postes e como fonte de combustível. As cascas das árvores possuem tanino, substância que aumenta a resistência das plantas ao consumo por herbívoros, produzem tintas utilizáveis na manufatura de roupas, e substâncias úteis à indústria farmacêutica. De forma indireta, os manguezais podem influenciar o tratamento de esgotos, a proteção da costa, e o manejo de animais selvagens. Aproximadamente 50% dos peixes capturados ao largo das costas brasileiras são dependentes dos nutrientes provenientes dos manguezais. Para milhões de moradores do litoral, a pesca artesanal fornece a maior parte da nutrição protéica (Tomlinson, 1986; Por, 1994).

2. FUNGOS EM MANGUEZAIS

Pouco se conhece a respeito dos fungos que ocorrem em manguezais. São cosmopolitas e geralmente não apresentam especificidade por hospedeiro. Sabe-se que diferentes tipos estão associados a esse ecossistema, como epífitos, sapróbios e

patógenos, em diferentes substratos, tais como folhas, caules, frutos e solo. A maioria dos fungos isolados em manguezais tropicais e subtropicais corresponde aos Basidiomycota, Ascomycota e fungos anamórficos. Em comparação com os dados de produtividade primária, o conhecimento sobre os fungos de manguezais está apenas no início, podendo ser encontradas várias espécies de fungos (Jones & Alias, 1997).

Durante muitos anos um grande número de pesquisadores estudou a ecologia e a fisiologia de sedimento dos manguezais, mas ainda há muito a ser descoberto sobre o conhecimento das comunidades nestes sedimentos (Lee & Baker, 1972). Os microorganismos têm recebido menos consideração que outros organismos. Marathe (1965) trabalhou com algas e outros microbiologistas estudaram fungos em sedimento de manguezais na Austrália (Cribb & Cribb, 1955, 1956 e 1960), no Sul da África (Swart, 1958), nos Oceanos Atlântico e Pacífico (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1965 e Kohlmeyer 1968 e 1969a e b), na Índia (Rai, Tewari & Mukerji, 1969; Jaitly & Rai, 1982; Jaitly, 1987; Sengupta & Chaudhuri, 1995) e no Hawaí (Lee & Baker, 1972).

Poucos são os estudos com fungos em folhas e madeiras de manguezais e os fungos isolados nestes substratos geralmente são encontrados no solo (Jones & Alias, 1997). Em contrapartida, vários são os estudos com fungos em substratos submersos (Rai, Garg & Jaitly, 1981; Hyde, 1989 e 1990; Tan & Leong, 1992; Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1993; Chinnaraj, 1993; Jones & Alias, 1997; Tan & Pek, 1997; Sivichai *et al.*, 1998; Maria & Shidhar, 2002, 2003, 2004).

O número de fungos marinhos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Em madeira submersa o grupo mais comum é Ascomycetes, que possui várias vantagens em ambientes aquáticos, como: pequenos corpos de frutificação, esporos com apêndices que auxiliam na dispersão e fixação, resistência às flutuações salinas (Jones & Alias, 1997). Existem também espécies patogênicas aos vegetais que ocorrem em

manguezais (Chandrashekar & Ball, 1980; Weste *et al.*, 1982; Farr *et al.*, 1989; Mendes *et al.*, 1998).

A habilidade de sobrevivência, adaptabilidade e estabelecimento de microrganismos em um habitat específico são determinados pelo ambiente. A sobrevivência da microbiota é influenciada isoladamente ou em combinação, por um número de fatores abióticos. A concentração de hidrogênio é um dos maiores fatores abióticos influenciando a capacidade de crescimento e a composição dos fungos; além deste, temperatura, salinidade, disponibilidade e diversidade de substratos, quantidade de propágulos na água são fatores que também podem influenciar a composição de fungos num ambiente específico (Jaitly, 1987; Jones & Alias, 1997).

O solo de manguezal, devido às características particulares, como salinidade, umidade, matéria orgânica e pH, aeração pobre, densa vegetação e baixa temperatura, oferece um interessante habitat para exploração dos fungos termofílicos e termotolerantes (Jaitly & Rai, 1982). Estes autores isolaram 25 espécies de fungos do manguezal de Sunderban, na Índia; desses 14 mostraram-se termotolerantes e 11 foram termofílicos.

Posteriormente, isolando fungos termofílicos do solo e de madeira no mesmo manguezal, Jaitly (1987) observou que diferentes fungos requerem diferentes níveis de pH para crescer. As 12 espécies de fungos isoladas pelo autor toleraram extremos alcalinos, mas apresentaram maior crescimento na faixa de neutro a ácido. O autor observou ainda que o pH atua mais na esporulação do que no crescimento vegetativo. Excelente esporulação foi observada em substrato com pH entre 5 e 7. Todos os fungos testados foram capazes de tolerar uma ampla faixa de pH, mas o grau de tolerância variou com a espécie. *Chaetomium termophilum* var. *coprophilum* e *Rhizomucor*

pusillus mostraram um alto grau de tolerância ao pH, entretanto *Aspergillus niveus*, *A. terreus* e *Emericella nidulans* car. *lata* foram pouco tolerantes.

Rai *et al* (1981) isolaram 87 fungos sapróbios em madeira de manguezal na Índia; destes, 4 eram Zygomycetes, 18 Ascomycetes, 6 estéreis e o restante Deuteromycetes. Dentre os anamorfos, *Aspergillus* foi o gênero dominante, espécies de *Trichoderma*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium* também foram frequentemente isoladas, enquanto *Acremonium*, *Drechslera* e *Scopulariopsis* foram raras. Dos Ascomycetes, *Chaetomium* foi o mais isolado.

2.1. Fungos em manguezais no Brasil

O conhecimento da diversidade biológica e funcional do complexo ecossistema manguezal é de grande relevância para se entender a dinâmica de cadeias envolvidas no sistema. Os fungos presentes em manguezais incluem saprotróficos, biotróficos e patógenos, porém são pouco conhecidos para esse ambiente. Citrón & Schaeffer-Novelli (1983) citam as bactérias e os fungos como importantes componentes dos manguezais, onde exercem destacado papel, atuando como agentes decompositores da matéria orgânica produzida por todo o conjunto de produtores primários.

No Brasil, o conhecimento de fungos em manguezais ainda é muito incipiente. Estudos sobre fungos em manguezais tiveram destaque especialmente referentes a fungos macroscópicos (Bononi, 1994; Almeida Filho *et al.*, 1993; Gugliotta & Capelari, 1995; Gugliotta & Bononi, 1999; Sotão *et al.*, 1991; Campos & Cavalcanti, 2000 e Campos *et al.*, 2005). Hagler *et al.* (1993) e Araújo *et al.* (1995) estudaram leveduras em manguezais no Rio de Janeiro. Recentemente, Costa (2003) isolou e identificou fungos endofíticos do manguezal do Rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco.

3. MANGUEZAL DE BARRA DAS JANGADAS

O sistema estuarino de Barra das Jangadas é formado pela junção dos rios Jaboatão (Figura 1) e Pirapama (Figura 2) e por seus afluentes. Localiza-se no município de Jaboatão dos Guararapes a 20 km ao sul da cidade do Recife. Apresenta-se na forma de um “S” alongado, é pouco profundo, tem uma largura que varia entre 200m a 250m e comprimento, e em linha reta de 300m aproximadamente. Estes rios, juntos, drenam cerca de 1002km² até a desembocadura no Oceano Atlântico (Carneiro & Coelho, 1960). Recebem despejos industriais e domésticos das localidades por eles percorridas, atravessando um total de 7 cidades e 3 localidades (CPRH, 1999).

O clima desta região é tropical quente e úmido, do tipo As', com chuvas de outono-inverno segundo Köppen, caracterizando-se por apresentar temperatura anual elevada de aproximadamente 25,5°C e precipitação anual superior a 2000 mm, com duas estações distintas: seca, determinada pela evaporação superior á precipitação e chuvosa, onde a evaporação é inferior á precipitação (Carneiro & Coelho, 1960).

Na margem esquerda do estuário encontram-se bares, hotéis, residências, marinas e viveiros de cultivo de peixes marinhos e estuarinos. Na linha de costa, especialmente na foz e á montante do Canal Olho d'água, onde existem áreas de aterro de manguezais e elevada extração de areia do leito para construção civil, são observados deslocamentos importantes na linha de costa, evidenciando-se aí um considerável avanço artificial e irregular. Na margem direita existe um coqueiral de propriedade particular, formando um istmo que separa o estuário da Praia do Paiva, não sendo observado neste local, deslocamentos significativos ao longo de toda a margem, entretanto em frente ao Canal Olho d'água está ocorrendo um deslocamento de cerca de 5m a 10m da linha de costa (Branco, 2001). A atividade econômica predominante neste estuário é caracterizada pela pesca artesanal de peixes e moluscos. Na zona litorânea o

domínio terrestre está representado pela vegetação das dunas e restingas, que demonstram ter sofrido ação antrópica e no domínio marítimo são encontrados vegetais dos manguezais, correspondentes á zona fitogeográfica do litoral, pertencentes ás espécies *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho), *Conocarpus erectus* L. (mangue-de-botão), *Laguncularia racemosa* Goaert (mangue branco) e *Avicenia schaueriana* Jacq (mangue siriúba) (Couto, 1988).



Figura 1. Vista parcial do Rio Jaboatão (pontos 1 e 3)



Figura 2. Vista parcial do Rio Pirapama (pontos 2 e 4)

4. ENZIMAS

4.1. Histórico e definição

O nome enzima provém de "in yeasts", no qual suspeitava-se que as catálises biológicas estavam envolvidas com a fermentação do açúcar em álcool. A primeira descoberta foi feita por Payen & Persoz em 1833, quando encontraram uma substância termolábil no precipitado do álcool, extrato de malte, que convertia amido em açúcar, mais tarde denominada amilase. A primeira teoria foi publicada em 1835 por Berzelius. Pasteur em 1860 postulou que as enzimas estão associadas à estrutura e a vida da célula. Em 1877 Buchener obteve sucesso na extração de enzimas de células de leveduras que catalisavam a fermentação alcóolica. Isto demonstrou que estas enzimas catalisavam a maioria das vias metabólicas energéticas e podem funcionar independentemente da sua

estrutura. A enzima foi primeiramente isolada na forma cristalina, mas isto foi compreendido melhor quando Summer em 1926 isolou urease de feijão e evidenciou que estes cristais consistem em proteínas. Atualmente 2000 diferentes enzimas são conhecidas, nas quais muitas são isoladas na forma pura homogeneizada e 200 na forma cristalizada (Lehninger *et al.* 1995).

As enzimas são proteínas especializadas em catalisar reações biológicas, ou seja, aumentam a velocidade de uma reação química sem interferir no processo. Elas estão associadas a biomoléculas, devido as suas extraordinária especificidade e poder catalítico (Lehninger *et al.* 1995).

4.2. Fungos e enzimas

Os microrganismos sintetizam inúmeros compostos de importância industrial como vitaminas, antibióticos e enzimas. Dentre esses metabólitos, as enzimas têm sido utilizadas em diversos processos industriais, principalmente no processamento de produtos alimentícios (celulases e xilanaes) e despoluição ambiental (fenoloxidades) (Gray & William, 1975).

Basicamente, são encontrados dois grupos de enzimas responsáveis pela degradação da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As enzimas oxidativas, como lacase, manganês-peroxidase e lignina-peroxidase, atuam na degradação da lignina e detoxificam o meio de crescimento dos metabólitos gerados durante a degradação. A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas como a celulase e a xilanase entre outras, atuem nas fontes de carbono, possibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para formação das frutificações (Durrant *et al.* 1991).

A microbiota sapróbia do solo desempenha função importante, degrada carboidratos, proteínas, hemiceluloses e hidrocarbonetos (Moore-Landecker, 1982). Nesse substrato, os fungos estão principalmente representados pelas ordens Monilliales e Mucorales (Drozdowicz & Kulinska, 1980). Entre esses, os gêneros mais frequentes são *Penicillium* e *Verticillium*, embora que inúmeras linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium* sejam responsáveis pela assimilação de hidrocarbonetos (Atlas, 1981). Nas últimas décadas, a utilização de fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biorremediação vêm crescendo, em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas (Bennett, 1998).

Os fungos constituem um dos grupos de microrganismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, através de sua fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos, principalmente lignocelulose (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2002).

4.2.1. Fenoloxidasas

A utilização de fungos no tratamento dos mais diversos tipos de efluentes tem sido alvo de inúmeros estudos, especialmente por sua capacidade de produzir enzimas extracelulares (Silva & Esposito, 2004), tais como a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase. Estas enzimas atuam sob compostos poluentes recalcitrantes, removendo-os ou transformando-os em outros produtos menos tóxicos (Karam & Nicel, 1997). São as enzimas mais comuns que apresentam o maior potencial para aplicações industriais. Nestas enzimas faltam à especificidade pelo substrato e,

com isso, são capazes de degradar uma ampla faixa de xenobióticos incluindo efluentes corados (De Souza & Peralta, 2003).

O mecanismo exato pelo qual os polímeros de lignina são despolimerizados e mineralizados não é completamente conhecido. Sendo a lignina um polímero com ligações aleatórias, o sistema envolvido em sua degradação, deve também agir não especificamente. Assim, não é surpresa que o sistema lignolítico destes fungos também atuem em uma grande variedade de poluentes aromáticos (Bumpus *et al.*, 1985; Bumpus & Aust, 1987; Bumpus, 1993; Camarero *et al.*, 2000; Pickard & Duhalt, 2001; Gonzales *et al.*, 2002).

A partir de estudos realizados com fungos lignolíticos nos anos setenta, se comprovou a degradação de lignina dava lugar a produtos que provinham da ruptura oxidativa dos anéis aromáticos. Pelo que pensavam, as oxigenases extracelulares poderiam estar envolvidas na transformação da lignina. Alguns anos depois, descobriu-se uma ligninase capaz de oxidar e despolimerizar a lignina e outros xenobióticos e cuja atividade enzimática depende do peróxido de hidrogênio. Esta enzima denominou-se lignina peroxidase (Kirk & Farrell, 1987).

Logo depois, foi descoberta a produção de outra peroxidase, a manganês peroxidase, que oxida o Mn^{+2} a espécie oxidante Mn^{+3} . Além dessas peroxidases, se detectou a produção de uma terceira enzima, uma fenoloxidase, denominada lacase. Esta enzima reduz o oxigênio molecular a água, e através da utilização de certos compostos pode ser capaz de ampliar seu espectro de substratos (Bourbonnais & Paice, 1990).

Karam & Nicell (1997) demonstraram que as ligninas peroxidases (LiP) mineralizam uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes e que oxidam um certo número de compostos aromáticos policíclicos e fenólicos. Estas enzimas

extracelulares apresentam um elevado poder oxidante, o que faz com que possam ser utilizadas não somente para tratamento de efluentes que contenham o seu substrato habitual, mas também uma grande variedade de espécies químicas similares à estrutura básica da lignina (Tuor *et al.*, 1995).

As lacases são enzimas que necessitam de cobre para catalisar a oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos reduzindo o oxigênio da água (Thurston, 1994; Claus, 2004). Estas enzimas têm sido estudadas enfocando sua aplicabilidade industrial, principalmente na sua capacidade em degradar compostos xenobióticos e corantes têxteis (Perrie *et al.*, 1998; Abadulla *et al.*, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2000; Wesenberg *et al.*, 2003; Couto *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004). Segundo Ferraz (2004), as lacases atuam diretamente sobre estruturas fenólicas por meio da oxidação dos fenóis através da abstração de um elétron mediada pela redução Cu^{+2} a Cu^{+1} , que por sua vez, reduz oxigênio a água, permitindo que a enzima atue de forma cíclica.

As enzimas oxidativas atuam retirando os grupos metoxila da lignina e fazendo a ruptura das ligações éter, liberando substâncias mais solúveis e expondo as cadeias restantes à ação das demais enzimas (Buswell *et al.* 1996). A lacase pode participar na degradação da lignina, através da oxidação de grupamentos fenólicos, no entanto, isso pode implicar em um papel limitado desta enzima nesta função, já que as subunidades fenólicas constituem uma pequena porção deste polímero (Bonnen *et al.* 1994).

O papel da lacase na degradação da lignina ainda é pouco conhecido. Atribui-se a lacase o papel de detoxificação de alguns monômeros fenólicos de baixo peso molecular, originados da degradação da lignina e que podem inibir o crescimento de fungos (Cai *et al.* 1998). Sendo assim, fungos que produzem enzimas oxidativas, como a lacase, exibem vantagens ambientais em relação aos fungos estritamente celulolíticos, como *Volvariella volvacea* (Bollag *et al.* 1988).

A manganês peroxidase (MnP), por sua vez, atua mediando estágios iniciais de degradação da lignina de alto peso molecular, transformando o Mn (II) em Mn (III), o qual pode atuar diretamente na oxidação de grupamentos fenólicos ou em outros compostos, já que o inespecífico (Hatakka, 1994).

Desde a década de 80, quando foram descobertas MnP e LiP peroxidases, determinados grupos de fungos, principalmente os decompositores, puderam ser classificados de acordo com sua produção enzimática: aqueles que produzem LiP – MnP, MnP – Lac e LiP – Lac, entretanto ocorrem algumas exceções (Hatakka, 1994).

4.2.2. Xilanases

A xilana é o principal polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico das plantas e consiste de uma cadeia principal formada por resíduos de xilopiranosil unidos por ligações b-1,4-glicosídicas (Biely, 1993). Em polpas Kraft de madeiras duras a xilana pode representar mais de 90% da fração hemicelulósica e cerca de 50% desta fração no caso de madeiras macias (Erikson *et al*, 1980). Localiza-se principalmente na parede celular secundária, formando uma interface entre a lignina e os outros polissacarídeos. Existem evidências de que xilana e resíduos fenólicos de lignina estejam unidos por ligações covalentes e de que pontes de hidrogênio e forças de van der Waals unem este polissacarídeo à cadeia de celulose (Ferreira Filho, 1994).

Xilanases são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por fungos e bactérias, que podem ser empregadas em indústrias de papel como auxiliares no branqueamento de polpas Kraft. Tais enzimas atuam principalmente na xilana reprecipitada, após o cozimento, na superfície das fibras da polpa, hidrolisando este polissacarídeo e proporcionando maior permeabilidade à estrutura das mesmas. Isto permite maior extração de lignina residual, o que leva à redução no consumo de

reagentes químicos à base de cloro durante o processo de branqueamento (Bajpai *et al*, 1994). Este processo é conduzido sob altas temperatura e alcalinidade e as enzimas empregadas devem ser tolerantes a estas condições, além de serem livres de celulasas para que não danifiquem as fibras.

Recentemente, existe grande interesse industrial na xilana e nos seus complexos hidrolisados enzimaticamente, como suplemento animal, para manufatura de pão, alimentos e bebidas, indústria de polpa de celulose e papel, têxtil e produção de xilitol (Dhillon *et al.* 2000). As xilanases são produzidas por diversos microorganismos, entre os quais os fungos são os maiores produtores (Pham *et al.* 1998).

A hemicelulose chega a representar 40% do peso seco de resíduos lignocelulósicos e sua degradação é realizada por hemicelulases como a xilanase, que hidrolisa este heteropolissacarídeo de cadeias curtas ramificadas, compostas de hexoses, pentoses, ácido urônico e açúcares menores.

Nakamura (1975) acompanhou a atividade amilolítica e proteolítica durante a fermentação da fécula de mandioca mencionando a presença de uma flora variada de microrganismos. Considera-se, entretanto, que o abrandamento da textura de alimentos fermentados esteja associado à ação de enzimas de maceração como as pécnicas, celulolíticas e hemicelulolíticas, que degradam a parede celular dos tecidos das plantas (Codner, 1971). Essas enzimas seriam produzidas pela flora microbiana durante o processo de fermentação ou pelas enzimas endógenas da planta (Ampe & Brauman, 1995). Almeida (1992) mostrou que na pubagem a flora de microrganismos se altera, iniciando-se com enterobactérias e corinebactérias, aos poucos substituídas por bactérias lácticas e bactérias esporuladas, surgindo, posteriormente, os fungos *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Entre as bactérias, diversas linhagens eram amilolíticas ou pectinolíticas, algumas hidrolisavam tanto o amido como a pectina e

outras nenhum desses substratos. Bactérias láticas importantes na fermentação da mandioca, como *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*, são produtoras de pectinases e algumas espécies de *Aspergillus* são reconhecidamente produtores de enzimas pécicas, celulolíticas e hemicelulolíticas (Juven *et al.*, 1985; Sakellaris *et al.*, 1989).

4.2.3. Celulases

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo (Bayer & Lamed, 1992). A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final de glicose. Estas, porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, desta forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (Thiemann *et al.* 1980).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (Robson & Chambliss, 1989).

Em geral, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função na reciclagem de nutrientes. O conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos, tornando-se importante para interações ambientais e aplicações biotecnológicas, como em industriais

alimentícias, onde a celulose é bastante utilizada (Lynch *et al.* 1981). A eficiente utilização da celulose por fungos degradadores, requer ação cooperativa de várias enzimas hidrolíticas, que atuam na hidrólise dos polissacarídeos em monômeros passíveis de absorção (Cai *et al.* 1998, 1999; Ding *et al.* 2001).

As celulasas, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose (Kubicek *et al.*, 1993). Grande parte da produção industrial de celulasas é realizada com o emprego de alguns fungos filamentosos, os quais são eficientes produtores de enzimas hidrolíticas. Do mecanismo de indução de celulasas nestes microrganismos, que ainda não está totalmente esclarecido, há evidências da participação de dissacarídeos, como a celobiose e a sofrose (Ilmén *et al.* 1997). Adicionalmente, alguns estudos realizados com *Trichoderma reesei* sugerem a possibilidade da utilização do dissacarídeo lactose como substrato indutor para a produção de celulasas (Andreotti *et al.* 1980).

Na indústria alimentícia, as celulasas são usadas em vários processos, principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (Orberg, 1981).

Atualmente, as celulasas são utilizadas principalmente no descoramento e amaciamento de tecidos. Também são empregadas em: formulações de detergentes domésticos e industriais, extração de óleos, pigmentos, essências, alcalóides e amido; produção de sucos; preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos, produtos estimulantes de digestão, rações animais, produtos estimuladores de ensilagem, adjuvante para o malte da cerveja e no tratamento de lixo orgânico (Kubicek *et al.*,

1993). Ainda, é importante destacar o uso potencial das celulases na hidrólise de material lignocelulósico para produção de xarope de glicose.

O interesse na pesquisa de enzimas lignocelulolíticas fundamenta-se na utilização destas na reciclagem de resíduos da agricultura e rejeitos urbanos (Vassilev *et al.* 1994) e também no tratamento de solos e efluentes diversos (Duran & Espósito, 2000). Estas enzimas possuem vantagens na remediação de diversos tipos de contaminantes, por não possuírem alta especificidade com os substratos, uma vez que a estrutura da lignina apresenta diversos modelos (Goldstein 1981; Bumpus *et al.* 1985; Mester & Tien 2000; Hofrichter 2002).

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abadulla, E.; Tzanov, T.; Costa, S.; Robra, K.H.; Cavaco-Paulo, A.; Gubitz G.M. 2000. Descolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 3357-3362.

Aksornkoae, S. 1993. **Ecology and manegament of mangroves**. IUCN publication. p. 176.

Allsopp, D.; Seal, K.J. 1986. **Introduction to biodeterioration**. London, Edward Arnold. p. 133.

Almeida, P.F. **Processamento e caracterização da puba**. 1992. Campinas. p. 115. (Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP).

Almeida-Filho, O.M.; Bueno, R.; Bononi, V.L. 1993. Algumas espécies de fungos Basidiomycetes de manguezais do Estado de São Paulo. **Hoehnea** 20 (½): 87 – 92.

Ampe, F.; Brauman, A. 1995. Origin of enzymes involved in detoxification and rot softening during cassava retting. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 11: 178-182.

Andreotti, R.E.; Medeiros, J.E.; Roche, C.E.; Mandels, M. 1980. Effects of strain and substrate on production of cellulases by *Trichoderma reesei* mutants. Pp. 353 – 371. In.: Ghose, T.K. (ed.) **Bioconversion and Bioengineering Symposium**, Biomedical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology, Nova Deli.

Araujo, F.V.; Soares, C.A.G.; Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C. 1995. Ascomycetous yeasts communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangroves ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek** 68: 91 – 99.

Atlas, R.M. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons - an Environmental Perspective. **Microbial Reviews**: 180 – 209.

Bajpai, P.; Bhardwaj, N.K.; Bajpai, P.K.; Jauhari, M.B. 1994. The impact of xylanases on bleaching of eucalyptus Kraft pulp. **Journal of Biotechnology** 38: 1-6.

Bayer, E.A.; Lamed, R. 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource. **Biodegradation** 3: 171-188.

Bennet, J.W. 1998. Mycothecnology: the role of fungi in biotechnology. **J. Biotechnol.** **66**: 101 – 107.

Biely, P. 1993. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: Coughlan, M. P. & Hazlewood, G. P. Pp. 29-51. **Hemicellulose and hemicellulases** ed. London, Portland Press.

Bisaria, V.S.; Ghose, T.K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrats, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme and Microbial Technology** **3**: 90-104.

Bollag, J.M.; Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied Environmental Microbiology** **48**: 849-854.

Bonnen, A.M. Anton, L.H.; orth, A.B. 1994. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology** **60**: 960-965.

Bononi, V.L. 1984. Basidiomycetes do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: IV. Adições às famílias Hymenochateacea, Stereacea e Thelephoraceae. **Rickia** **11**: 43 – 52.

Bourbonnais, R.; Paice, M.G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters** **267**: 99-102.

Branco, E. S. 2001. **Aspectos ecológicos da comunidade fitoplanctônica no sistema Estuarino de Barra das Jangadas**. Recife. p.147. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) Departamento de Oceanografia. Universidade Federal de Pernambuco.

Bumpus, J.A.; Tien, M.; Wright, D.; Aust, S.D. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungi. **Science** **228**: 1434 – 1436.

Bumpus, J.A.; Aust, S.D. 1987. Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** **53** (9): 2001-2008.

Bumpus, J.A. 1993. White-Rot Fungi and Their Potential Use in Soil Bioremediation Process. Pp. 65 – 100. In: Bollag, J.M. & Statzkin, G., (eds.). **Soil Biochemistry**. New York, Marcel Dekker Inc.

Buswell, J. A.; Cai, Y. J.; Chang, S. T.; Peberdy, J. F.; Fu, S.Y. e Yu, H.S. 1996. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **12**: 537-542.

Cai, J.Y.; Buswell, J.A. & Chang, S.T. 1998. An α -glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Enzyme and Microbial Technology** **22**: 122-129.

Cai, J.Y.; Chapman, S.J.; Buswell, J.A.; Chang, S.T. 1999. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and α -glucosidase components of the cellulolytic

system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. **Applied and Environmental Microbiology** 553-559.

Camarero, S.; Ruiz-Duenas, F.J.; Sarkar, S.; Martinez, M.J.; Martinez, A.T. 2000. The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. **FEMS Microbiology Letters** 191: 37-43.

Campos, E.L.; Cavalcanti, M.A.Q. 2000. Primeira ocorrência de *Phellinus mangrovicus* (Imaz.) Imaz. para o Brasil. **Acta Botânica Brasilica** 14: 263 – 265.

Campos, E.L.; Sotão, H.M.P; Cavalcanti, M.A.Q; Luz, A.B. 2005. Basidiomycetes de Manguezais da APA de Algodual – Maiandeuá, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi** 1 (1): 141 – 146.

Chandrashekar, M.; Ball, M. C. 1980. Leaf blight of grey mangrove in Australia caused by *Alternaria alternata*. **Transactions of the British Mycological Society** 3 (75): 413 – 418.

Chinnaraj, S, 1993. Higer marine fungi from mangroves of Andaman and Nicobar Islands. **Sydowia** 1 (45): 109 – 145.

Citrón, G.; Schaeffer-Novelli, Y. 1983. **Introducción a la ecología del manglar**. Montevideo, UNESCO/RESTLOC. p.109.

Claus, H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**. **35**: 93-96.

Codner, R.C. 1971. Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. **Journal of Applied Bacteriology** **34** (1): 147-160.

Costa, I.P.M.W. 2003. **Fungos endofíticos isolados de vegetais do manguezal do Rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil** (Dissertação). Recife, Universidade Federal de Pernambuco.

Couto, S.R.; Rosales, E.; Gundin, M.; Sanromán, M.A. 2004. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. **Journal of Food Engineering** **64**: 423 – 428.

Cribb, A.B.; Cribb, J.W. 1955. Marine fungi from Queensland. I. **Papers of University of Queensland** **3**: 77 – 81.

Cribb, A.B.; Cribb, J.W. 1956. Marine fungi from Queensland. II. **Papers of University of Queensland** **3**: 97 – 105.

Cribb, A.B.; Cribb, J.W. 1960. Marine fungi from Queensland. I. **Papers of University of Queensland** **4**: 35 – 48.

De Souza, C.G.; Peralta, R.M. 2003. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. **Journal Basic Microbiology** **43**: 278-286.

Dhillon, A.; Gupta, J.K.; Jauhari, B.M.; Khanna, S. 2000. A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerante xylanase produced by *Bacillus ciculans* AB 16 grown on rice strw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. ***Bioresource Technology* 73**: 273 – 277.

Ding, S.; Ge, W.; Buswell, J.A. 2001. Endoglucanase I from edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. Purification, caracterization, cloning and expression. ***Euro Journal Biochemistry* 268**: 5687-5695.

Dix, N.I., Webster, J. 1995. **Fungal Ecology**. University, Cambridge. p.421.

Drozdownicz, A.; Kulinska, D. 1980. **Técnicas de levantamento da microflora e de isolamento dos fungos saprófitas do solo**. Apostila U.F.R.J. Rio de Janeiro. p.101.

Duran, N.; Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. ***Appl. Catalysis B. Environmental*, 28**: 83 –99.

Durrant, A.J.; Wood, D.A.; Cain, R.B. 1991. Lignocelulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid state fermentation. ***Journal of Genera Microbiology* 137**: 751-755.

Erikson, O.; Goring, D.A.I.; Lindgren, B.O. 1980. Structure studies on the chemical bonds between lignin and carbohydrate in spruce wood. ***Sci. Technol.* 14**: 267-269.

Farr, D.F.; Bills, G.F.; Chamuris, G.P. & Rossman, A.V. 1989. **Fungi on plants and plant products in the United States**, APS Press, Minesota. p.1252.

Ferraz, A.L. 2004. Fungos decompositores de materiais lignocelulolíticos. Pp. 215 – 242. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnológica**. Caxias do Sul: Educs.

Ferreira-Filho, E.X. 1994. The xylan-degrading enzyme system (review). **Braz. J. Med. Biol. Res.** **27**: 1093-1109.

Goldstein, I.S. 1981. **Organic chemicals from biomass**. Boca Raton, CRC Press. p.310.

Gonzales, L.; Hernández, J.R.; Perestelo, F., Carnicero, A.; Falcón, M.A. 2002. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by laccase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoideum*. **Enzyme and Microbial Technology** **30**: 474-481.

Gugliotta, A.M.; Chapelari, M. 1995. Polyporacea from Ilha do Cardoso, Sao Paulo, Brasil. **Mycotaxon** **56**: 107 – 113.

Gugliotta, A.M.; Bononi, V.L.R. 1999. Polyporacea do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica** **12**: 1- 112.

Hagler, A.N.; Rosa, C.A.; Moraes, P.B.; Mendonça-Hagler, L.C.; Franco, G.M.O.; Araujo, F.V.; Soares, C.A.G. 1993. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of Southeast Brazil. **Canadian Journal of Microbiology** **39**: 973 – 977.

Harley, J. L. 1971. Fungi in Ecosystems. **Journal of Ecology** **59** 34 – 49.

Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected White-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol Rev.** **13** 125-135.

Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microbial. Technol.** **30**: 454 – 456.

Hogg, B.M., Hudson, H.J. 1966. Microfungi on leaves of *Fagus sylvatica*. I. The microfungus successions. **Transactions of the British Micological Society** **49** (2): 185 – 192.

Hyde, K. 1989. Intertidal fungi from the mangrove fern, *Acrostichum speciosum*, including *Massarina acrostichi* sp. nov. **Mycological Research** **4** (93): 435 – 438.

Hyde, K. 1990. A study of the vertical Zonation of Intertidal fungi on *Rhizophora apiculata* at Kampong Kapok Mangrove, Brunei. **Aquatic Botany** **36**: 255 – 262.

Ilmén, M.; Saloheimo, A.; Onnela, M. E Penttilä, M.E. 1997. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology** **63** (4): 1298-1306.

Jaitly, A.K. 1987. pH optima of the fungi isolated from mangroves soils in India. **Transactions of the Mycological Society of Japan** **28**: 137 – 143.

Jaitly, A.K.; Rai, J.N. 1982. Termophilic and thermotolerant fungi isolated from mangroves swamps. **Mycologia**, **6** (74): 1021 – 1022.

Jones, E.B.G.; Alias, S.A. 1997. Biodiversity of Mangrove Fungi. In: **Biodiversity of Tropical Microfungi** **6**: 71 – 92.

Juven, B. J.; Lindner, P.; Weisslowicz, H. 1985. Pectin degradation in plant materials by *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Applied Bacteriology** **53**: 533-538.

Karan, J.; Nicell, J.A. 1997. Potential applications of enzymes in wastes treatment. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** **69**: 141 – 153.

Kirk, T.K.; Farrel, R.L. 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology** **41**: 465-505.

Kohlmeyer, J. 1968. Marine fungi from the tropics. **Mycologia** **60**: 252 – 270.

Kohlmeyer, J. 1969a. Ecological notes on fungi in mangroves forests. **Transactions of the British Mycological Society** **53**: 237 – 250.

Kohlmeyer, J. 1969b. Marine fungi of Hawai including the new genus *Helicascus*. **Canadian Journal of Botany** **47**: 1469 – 1487.

Kohlmeyer, J.; Kohlmeyer, E. 1965. New marine fungi from mangroves and trees along eroding shorelines. **Nova Hedwigia** **9**: 89 – 104.

Kohlmeyer, B.V.; Kohlmeyer, J. 1993. Biogeographic observations on Pacific marine fungi. **Mycologia** **3** (85): 337 – 346.

Krebs, C.J. 1999. **Ecological methodology**. 2nd ed. Addison – Wesley Longman, Inc.

Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R.L.; Kubicek-Pranz, E.M. 1993. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme and Microbial Technology** **15**: 90-99.

Lee, B.K.H; Baker, G.E. 1972. An ecological study of the soil microfungi in a Hawaiian Mangrove swamp. **Pacific Science** **26**: 1- 10.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. 1995. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier, São Paulo. p.839.

Lynch, J.M.; Slater, J.H.; Bennett, J.A.; Harper, S.H.T. 1981. Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. **Journal of General Microbiology** **127**: 231-236.

Marathe, K.V. 1965. A study of the subterranean algae flora of some mangrove swamps. **Journal of the Indian Society of Soil Science** **13**: 81 – 84.

Maria, G.L.; Sridhar, K.R. 2002. Richness and diversity of filamentous fungi on wood litter of mangroves along the west coast of India. **Current Science** **83** (12): 1573 – 1580.

Maria, G.L.; Sridhar, K.R. 2003. Diversity of filamentous fungi on wood litter of five mangrove plant species from the southwest coast of India. **Fungal Diversity** **14**: 109 – 126.

Maria, G.L.; Sridhar, K.R. 2004. Fungal colonization of immersed wood in mangroves of the southwest coast of India. **Can. J. Bot.** **82**: 1409 – 1418.

Mendes, M.A.S.; Silva, V.L.; Dianese, J.C.; Ferreira, M.A.S.V.; Santos, C.E.N.; Neto, E.G.; Urban, A.F.; Castro, C. 1998. **Fungos em plantas no Brasil**. Embrapa – SPI. Brasília. p.555.

Mester, T.; Tien, M. 2000. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** **46**: 51-59.

Moore – Landecker, E. 1982. **Fundamentals of the fungi**. 2^a ed. New Jersey. Inc. Prentice Hall. p.578.

Nakamura, I. M. 1975. **Contribuição ao estudo da fécula de mandioca fermentada**. Campinas. (Mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, UNICAMP). p.80.

Nevalainen, K.M.H.; Pentilla, M.E.; Harkki, A.; Teeri, T.T. & Knowles, J. 1990. In: Leong, S.A. & Berka, R.M. **Molecular Industrial Mycology**, chapter 6. Eds. Marcel Dekker, Inc., New York.

Orberg, P.K. 1981. **Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei***. Dissertação de mestrado. Oregon State University, Oregon.

Pelczar, Jr., M.J., Chan, E.C.S., Kriego, N.R. 1996. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed., v. 2. São Paulo. Makronbooks. p.517.

Perrié, F.H.; Reddy, G.V.B.; Blackburn, N.J.; Gold, M.H. 1998. Purification and characterization of lacases from the white-rot Basidiomycetes *Dichomitus squalens*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 353: 349 – 355.

Pham, P.L.; Taillandier, P.; Delmas, M. Strehaiano, P. 1998. Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes. **Industrial Crops and Products** 7: 195 – 203.

Pickard, T.; Duhalt, V. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. **Letters in Applied Microbiology** **32** (5): 331.

Por, F.D. 1994. **Guia Ilustrado do Manguezal Brasileiro**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. p.82.

Rai, J.N.; Tewari, J.P.; Mukerji, K.G. 1969. Mycoflora of mangrove mud. **Mycopathologia et Mycologia Applicata** **3**: 17 – 31.

Rai, J.N.; Garg, K.L.; Jaitly, A.K. 1981. Saprophytic fungi isolated from woods in mangrove swamps and their wood-decaying capability. **Transactions of the Mycological Society of Japan** **22**: 65 – 74.

Robson, L.M. & Chambliss, G.H. 1989. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology** **11**: 626-644.

Rodríguez, E.; Nuero, O.; Guillén, F.; Martínez, A.T.; Martinez, M.J. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biology & Biochemistry** **36**: 909-916.

Sakellaris, G.; Nokolaropoulou, S.; Evangelopoulos, A.E. 1989. Purification and characterisation of an extracellular polygalacturonase from *Lactobacillus plantarum* strain BA 11. **Journal of Applied Bacteriology** **67**: 77-85.

Schaeffer-Novelli, Y. 1995. **Manguezal: Ecossistema entre a terra e o mar**. São Paulo. Caribbean Ecological Research. p.64.

Schnitler, M.; Stephenson, S.L. 2000. Myxomycete biodiversity in four different forest types in Costa Rica. **Bol. Soc. Brot** 67: 5 – 22.

Sengupta, A.; Chaudhuri, S. 1995. Ecology of microfungi in mangroves sediments at the Ganges river estuary in Índia. **Indian Forester** 807 – 812.

Silva, M.; Esposito, E. 2004. O papel dos fungos na recuperação ambiental. Pp. 337 – 378. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs.

Sivichai, S.; Goh, Teik-Khiang, Hyde, K.D.; Hywel-Jones, N.L. 1998. The genus *Brchydesmiella* from submerged wood in the tropics, including a new species and a new combination. **Mycoscience** 9: 239 – 247.

Smith, J.E.; Berry, D.R. 1975. **The filamentous fungi. I. Industrial Mycology**. Edward Publications, London. p.340.

Sotao, H.M.P., Bononi, L.R.; Figueiredo, T. 1991. Basidiomycetes de manguezais da Ilha de Manacá, Amapá. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi** 7: 109 – 114.

Sotao, H.M.P.; Campos, E.L.; Costa, S.P.S.E.; Melo, O.; Azevedo, J.C. 2002. Basidiomycetes macroscópicos de manguezais de Bragança, Pará, Brasil. **Hoehnea** 29 (3): 215 – 224.

Suberkropp, K.; Klug, M.J. 1976. Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream. **Ecology** 57: 707 – 719.

Swart, H.J. 1958. An investigation of the mycoflora in the soil of some mangrove swamps. **Acta Botanica Neerlandica** 7: 741 – 768.

Thiemann, J.E.; Xavier, M.S.S.P.; Colen, G.; Guia, M.M. 1980. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. Pp. 168 – 185. In: Furtado, J.S. (coord.). **Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo**. Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo.

Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology** 140: 19 – 26.

Tomlinson, P.B. 1986. **The Botany of Mangroves**. Cambridge University Press. USA. p. 419.

Triska, F.J., Sedell, J.R., Buckley, B. 1975. The processing of conif and hardwood leaves in two coniferous forest streams: II. Biochemical and nutrient changes. *Vereinigung fur theoretische und. Angerwanten Limnologie*. **Stuttgart** 19: 1628 – 1639.

Tuor, U.; Winterhalter, K.; Fiechter, A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology** **41**: 1-17.

Vasconcelos, A.F.D.; Barbosa, A.M.; Dekker, R.F.H.; Scarminio, I.S.; Rezende, M.I. 2000. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochemistry** **35**: 1131 – 1138.

Vassilev, N.; Baca, M.T.; Vassileva, M. 1994. Plant lignocellulose and decomposition by fungi: from nature to industrial use. **Mycologist** **8**: 113-114.

Velazquez-Cedeño, M.A.; Mata, G.; Savoie, J.M. 2002. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **18** (3): 201-207.

Wesenberg, D., Kyriakides, I.; Agathos, S.N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances** **22**: 161-187.

Weste, G.; Cahill, D.; Stamps, D.J. 1982. Mangrove dieback in north Queensland, Australia. **Transactions of the British Mycological Society** **1** (79): 165 – 167.

Wood, D.A.; Goodenough, P.W. 1977. Fruiting of *Agaricus bisporus*: changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. **Arch. Microbiology** **114**: 161-165.

Zeilinger, S.; Haller, M.; Mach, R.; Kubicek, C.P. 2000. Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jeconina*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **277**: 581-588.

capítulo 1

**Fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal Barra das Jangadas,
Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil**

**FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SEDIMENTO DO MANGUEZAL
BARRA DAS JANGADAS, JABOATÃO DOS GUARARAPES, PERNAMBUCO,
BRASIL**

Gomes, Daniela Neto Ferreira^{1*}; Cavalcanti, Maria Auxiliadora de Queiroz²;

Passavante, José Zanon de Oliveira³

^{1,2} Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Micologia, ³ Universidade
Federal de Pernambuco Departamento de Oceanografia.

ABSTRACT

Mangroves constitute transition ecosystems between terrestrial and marine environments characterized by physical-chemical properties, influencing local biota. In view of the ecological instability of Barra das Jangadas mangrove, aggravated by drain of Jaboatão and Pirapama rivers, becomes important the knowledge of filamentous fungi species from this ecosystem. The aim of this work was to isolate and to identify filamentous fungi from Barra das Jangadas mangrove, Jaboatão dos Guararapes, PE. Sediment samplings of Barra das Jangadas mangrove were collected in March and April/2004 and October 2005 (dry season); June and July/2004 and Julho/2005 (rainy season). Samplings were carried out on four points: 1 and 3, 2 and 4 in Jaboatão and Pirapama River, respectively. Twenty four sediment samples had been collected and spread, in triplicate, onto Petri dishes containing Sabouraud Agar added of

chloramphenicol. Fifty species of filamentous fungi were isolated and identified, making a total of 273 UFC. *Penicillium* and *Aspergillus* were the most frequent genera with 21 and 11 species respectively, followed by *Trichoderma* (5), *Fusarium*, *Phoma* and *Talaromyces* (2), *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Gongronella*, *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Stilbella* and *Thielavia* with 1 specie.

Key words: Filamentous fungi, mangroves, taxonomy

1. INTRODUÇÃO

O manguezal é um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de regiões tropicais e subtropicais. É constituído de espécies vegetais lenhosas típicas, adaptadas à flutuação de salinidade e caracterizadas por colonizarem sedimentos predominantemente lodosos, com baixos teores de oxigênio (34). Apresenta condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies animais, sendo considerado importante transformador de nutrientes em matéria orgânica e gerador de bens e serviços (30).

Pouco se conhece a respeito dos fungos que ocorrem em manguezais. Sabe-se que diferentes tipos estão associados a esse ecossistema, como sapróbios e patógenos, em diferentes substratos, tais como folhas, caules, frutos e solo. A maioria dos fungos isolados em manguezais tropicais e subtropicais corresponde aos Basidiomycota, Ascomycota e anamorfos (22). Durante muitos anos, pesquisadores estudaram a ecologia e a fisiologia de sedimentos dos manguezais, mas ainda há muito a ser descoberto sobre as comunidades microbianas fúngicas nesses sedimentos (24).

No Brasil, o conhecimento de fungos em manguezais ainda é muito incipiente. Estudos sobre fungos em manguezais tiveram destaque especialmente referentes a fungos macroscópicos (1, 3, 5, 6, 17, 18, 37, 38). Hagler *et al.* (19) e Araújo *et al.* (2) estudaram leveduras em manguezais no Rio de Janeiro. Recentemente, Costa (10) isolou e identificou fungos endofíticos do manguezal do Rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco.

Tendo em vista a instabilidade ecológica do manguezal Barra das Jangadas, provocado pelos deságües dos Rios Jaboatão e Pirapama, torna-se importante o conhecimento de espécies de fungos filamentosos desse ecossistema. Este trabalho visou o isolamento e a identificação fungos filamentosos de sedimentos do manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco.

2. ÁREA DE ESTUDO

O sistema estuarino de Barra das Jangadas é formado pela junção dos Rios Pirapama e Jaboatão e por seus afluentes. Localiza-se no município de Jaboatão dos Guararapes a 20 km ao sul da cidade do Recife. Apresenta-se na forma de um “S” alongado, é pouco profundo e tem uma largura que varia entre 200 e 250 m de comprimento. Estes rios, juntos, drenam cerca de 1000 km² até a desembocadura no Oceano Atlântico (7). Recebem despejos industriais e domésticos das localidades por eles percorridas, atravessando um total de sete cidades (9).

O clima é tropical quente e úmido, do tipo As', com chuvas de outono-inverno segundo Köppen, caracterizando-se por apresentar temperatura anual elevada de aproximadamente 25,5°C e precipitação anual superior a 2000 mm, com duas estações distintas: seca, determinada pela evaporação superior a precipitação; e chuvosa, onde a evaporação é inferior à precipitação (7). Na zona litorânea o domínio terrestre está

representado pela vegetação das dunas e restingas, que demonstram ter sofrido ação antrópica e no domínio marítimo são encontrados vegetais dos manguezais, correspondentes a zona fitogeográfica do litoral, pertencentes às espécies *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho), *Conocarpus erectus* L. (mangue-de-botão), *Laguncularia racemosa* Goert (mangue branco) e *Avicenia schaueriana* Jacq (mangue siriúba) (11).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DO SEDIMENTO

Foram coletadas amostras de sedimento do manguezal Barra das Jangadas nos meses de março e abril/2004 e outubro/ 2005 (período de estiagem), junho e julho/2004 e julho/2005 (período chuvoso). As coletas foram realizadas em quatro pontos onde a vegetação característica de mangue era predominante. Em cada ponto foi coletada uma amostra de sedimento, perfazendo um total de 24 amostras. Os pontos 1 e 3 foram delimitados ao longo do Rio Jaboatão e os pontos 2 e 4 assinalados ao longo do Rio Pirapama. Estes pontos recebem despejos de resíduos industriais e domésticos dos municípios vizinhos. As amostras de sedimento foram coletadas com o auxílio de uma pá de jardinagem, acondicionadas em sacos plásticos e encaminhados para o Laboratório da Pós – graduação em Biologia de Fungos.

3.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Para o isolamento das amostras fúngicas, o sedimento foi suspenso e plaqueado segundo o método de Clark (8) modificado, com o seguinte procedimento: 25g de cada amostra do sedimento foi suspensa em 225ml de água destilada e esterilizada. Desta suspensão foi retirado 10ml e adicionado a 990 ml de água destilada e esterilizada, onde 1

ml foi retirado e semeado em placas de Petri contendo Agar Sabouraud + cloranfenicol (100mg/L). As placas permaneceram em temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e o crescimento das colônias foi acompanhado por 72h. Após a confirmação da pureza, os fungos foram identificados de acordo com as características macroscópicas e microscópicas, seguindo literatura específica (4, 12, 13, 14, 15, 28, 32, 33 e 39).

3.3. FATORES ABIÓTICOS: pH, temperatura e salinidade

A temperatura da água e do sedimento foi medida com um termômetro digital Hanna, o pH do sedimento foi utilizado o pHmetro digital Hanna, e a salinidade da água foi determinada através de um refratômetro manual de marca ATAGO.

3.4. FREQUÊNCIA E DIVERSIDADE DAS ESPÉCIES

A frequência foi calculada de acordo com Schnitler & Stephenson (35), empregando-se a fórmula abaixo e considerando as seguintes categorias: rara ($< 0,5\%$), ocasional ($> 0,5\% - 1,5\%$), comum ($> 1,5 - 3\%$) e abundante ($> 3\%$). $Di = ni \times 100/N$, onde: Di = distribuição da espécie i ; ni = número de amostras da espécie i e N = número total de amostras.

Para determinar a diversidade foi utilizado o índice de Shannon e para verificar se houve diferença significativa de diversidade entre os pontos, foi aplicado o teste t utilizando o software Systat 10.0. O nível de significância crítico admitido para rejeição da hipótese nula adotado foi de uma possibilidade máxima de erro de 1% ($p < 0,01$) e 5% ($p < 0,05$), a depender do caso: $t = H_1 - H_2 / s H_1 - H_2$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de fungos filamentosos em manguezais

Através de diluições de 24 amostras de sedimentos do manguezal Barra das Jangadas, obteve-se o isolamento de 50 espécies de fungos filamentosos, perfazendo um total de 273 UFC. *Penicillium* e *Aspergillus* foram dominantes com 21 e 11 espécies respectivamente, seguidos de *Trichoderma* (5), *Fusarium*, *Phoma* e *Talaromyces* (2), sendo os demais gêneros: *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Gongronella*, *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Stilbella* e *Thielavia* representados por 1 espécie (Tabela 1).

Estudando a ecologia de microfungos em sedimento de manguezal no Hawaii, Lee & Baker (24) isolaram um total de 52 espécies. Os anamorfos foram dominantes em número de espécies (47). *Penicillium* (14 espécies) foi considerado o gênero com maior número de espécies, seguidos de *Fusarium* (7), *Aspergillus* (6) e *Trichoderma* (2). Na presente pesquisa, os anamorfos também foram dominantes (44 espécies). *Penicillium* foi o gênero com maior número de espécies (21), seguido de *Aspergillus* (11), *Trichoderma* (5), *Fusarium* e *Phoma* (2), *Cladosporium*, *Microsphaeropsis* e *Stilbella* (1 espécie). O mesmo foi observado em estudos realizados em sedimento de manguezal no Rio Ganges na Índia por Sengupta & Chaudhuri (36). Foi isolado um total de 38 espécies. *Penicillium* e *Aspergillus* foram os gêneros dominantes com 14 e 9 espécies respectivamente.

Espécies do gênero *Thielavia* e *Microsphaeropsis* foram referidas em pedaços de madeira em manguezal na Índia (20, 31) e como fungo endofítico em folhas de 3 vegetais do manguezal do Rio Paripe, Itamaracá, Pernambuco (10), respectivamente. Os mesmos gêneros *Thielavia* e *Microsphaeropsis* também foram isolados na presente pesquisa, com as espécies *T. coactalis* e *M. olivacea*. Estudando a diversidade de fungos filamentosos em pedaços de madeiras em manguezais na Costa da Índia, Maria & Shidhar (25), isolaram um

total de 78 espécies: 46 Ascomycetes, 1 Basidiomycete e 31 anamorfos. Na presente pesquisa, as 50 espécies isoladas estão divididas em anamorfos (44), Ascomycetes (4) e Zygomycetes (2 espécies).

Dos fungos endofíticos isolados em folhas de 3 vegetais do manguezal do Rio Paripe, Itamaracá, Pernambuco, Costa (10) citou três espécies também referidas na presente pesquisa: *Penicillium pinophilum*, *Phoma eupyrena* e *Trichoderma pseudokoningii*.

Maria & Shidhar (27), estudaram a colonização de fungos em madeira submersa em manguezal na Costa da Índia, isolando um total de 45 espécies, onde 25 foram anamorfos. Alguns gêneros citados pelos autores, tais como: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Phoma*, também foram isolados em sedimento do manguezal Barra das Jangadas.

Gongronella butleri e *Stilbella clavispora*, ambas isoladas nesta pesquisa, são considerados como primeira ocorrência em sedimento de manguezal para o Brasil.

4.2. Fatores abióticos: pH, temperatura e salinidade

A habilidade de sobrevivência, adaptabilidade e estabelecimento de microrganismos em um habitat específico é determinada pelo ambiente. A sobrevivência da microbiota é influenciada isoladamente ou em combinação, por um número de fatores abióticos. A concentração de hidrogênio é um dos maiores fatores abióticos influenciando a capacidade de crescimento e a composição dos fungos; além deste, a temperatura, a salinidade, a disponibilidade, a diversidade de substratos e a quantidade de propágulos na água são fatores que também podem influenciar a composição de fungos em um ambiente específico (21,22). Durante os períodos de coleta, o sedimento do manguezal Barra das Jangadas apresentou pH alcalino variando entre 6,44 a 7,83 no período de estiagem e 6,70 a 7,94 no

chuvoso (tabela 2). Estudando a ecologia de fungos filamentosos em sedimento de manguezais do Rio Ganges na Índia, Sengupta & Chaudhuri (36) encontraram pH alcalino semelhante, variando de 7,2 a 8,0. Isolando fungos termofílicos do solo e de madeira no mesmo manguezal, Jaitly (21) observou que diferentes fungos requerem diferentes níveis de pH para crescer. As 12 espécies de fungos isoladas pelo autor toleraram extremos alcalinos, mas apresentaram maior crescimento na faixa de neutro a ácido. O autor observou ainda que o pH atua mais na esporulação do que no crescimento vegetativo. Excelente esporulação foi observada em substrato com pH entre 5,0 e 7,0. Todos os fungos testados foram capazes de tolerar uma ampla faixa de pH, mas o grau de tolerância variou com a espécie. *Chaetomium termophilum* e *Rhizomucor pusillus* mostraram um alto grau de tolerância ao pH, entretanto *Aspergillus niveus*, *A. terreus* e *Emericella nidulans* foram pouco tolerantes. Na presente pesquisa, *Aspergillus terreus* foi a espécie com maior número de unidades formadoras de colônias (47 UFC), diferente dos resultados observados por Jaitly (21).

Durante a presente pesquisa, a temperatura do sedimento oscilou entre 25,9 a 29,0°C no período de estiagem e 23,0 a 24, 30°C no período chuvoso (tabela 2). Maior quantidade de fungos foi isolada no período de estiagem, corroborando com estudos realizados por Evans (16).

O solo de manguezal, devido às características particulares, como salinidade, umidade, matéria orgânica, pH, aeração pobre, densa vegetação e baixa temperatura, oferece um excelente habitat para exploração dos fungos termofílicos e termotolerantes (20). Estes autores isolaram 25 espécies de fungos do manguezal de Sunderban, na Índia, sendo 14 termotolerantes e 11 termofílicos. Das 14 espécies termotolerantes, cinco foram isoladas do sedimento no manguezal Barra das Jangadas: *Aspergillus carneus*, *A. flavus*, *A.*

fumigatus, *A. niger* e *A. terreus*. A salinidade foi alta no período de estiagem e baixa no chuvoso, variando entre 25 a 32‰ e 3 a 10‰ respectivamente (Tabela 2). Rai *et al.* (31) citam que os anamorfos constituem um grupo de fungos sendo *Aspergillus* o mais prevalente. O domínio de *Aspergillus* em manguezal indica que são os fungos mais tolerantes a baixas concentrações de salinidade (3 ou 6‰). Diferentes resultados foram observados na presente pesquisa, onde *Penicillium* foi considerado o gênero com maior diversidade de espécies, com a maioria das espécies isoladas no período de estiagem, onde a salinidade foi considerada alta. Resultados semelhantes a esta pesquisa foram observados em estudos realizados por Sengupta & Chaudhuri (36), onde a maioria dos fungos isolados foram considerados halotolerantes, com a salinidade variando entre 11 a 15‰. Das 38 espécies isoladas pelos autores, três foram isoladas na presente pesquisa: *Aspergillus niger*, *A. terreus* e *Penicillium oxalicum*.

Trabalhando com fungos isolados de madeira submersa em manguezais da Costa Sudeste da Índia, Maria & Shidhar (27), isolaram durante o período chuvoso espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Phoma* com os seguintes parâmetros hidrológicos: temperatura 28,6°C, pH 7,2 e salinidade 1,1 a 5,7‰. Na presente pesquisa, espécies destes gêneros também foram isoladas em condições semelhantes no período chuvoso (pH 6,70 a 7,94, temperatura 23,0 a 24, 30°C e salinidade 3 a 10‰).

4.3. Frequência e diversidade das espécies

O método de Schnitler & Stephenson (35) apontou *Aspergillus terreus* (17,21%), *A. sclerotiorum* (16,48%), *Penicillium commune* (10,25%), *A. japonicus* e *A. ustus* (5,12%), *Trichoderma aureoviride* (4,39%), *P. corylophilum* e *T. virens* (3,66%) e *P. oxalicum* (3,29%) como espécies abundantes; *Aspergillus niger* (2,56%), *Mucor hiemalis*, *Penicillium*

fellutanum, *P. islandicum* e *Talaromyces flavus* (1,83%) como comum; *Penicillium janczewski* e *Phoma capitulum* (1,46%), *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium paxilli*, *P. waksmanii* e *Trichoderma pseudokoningii* (1,09%), *Cladosporium tenuissimum*, *Eupenicillium brefeldianum*, *Microsphaeropsis olivacea*, *Penicillium expansum*, *P. funiculosum*, *P. lividum* e *Trichoderma harzianum* (0,73%) como ocasionais. *Aspergillus caespitosus*, *A. carneus*, *A. ochraceus*, *A. sydowi*, *A. tamarisii*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Gongronella butleri*, *Penicillium brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. decumbens*, *P. glabrum*, *P. grandicola*, *P. lanosum*, *P. lapidosum*, *P. pinophilum*, *P. turbatum*, *Phoma eupyrena*, *Stilbella clavispora*, *Talaromyces wortmanii*, *Thielavia coactalis* e *Trichoderma koningii* (0,36%), foram as espécies de rara ocorrência.

Estudando a ecologia de microfungos em sedimento de manguezal no Hawaii, Lee & Baker (24) isolaram um total de 52 espécies. Os anamorfos foram dominantes em número de espécies (47). Dentre os gêneros, *Trichoderma* foi o mais comum representando 34,8% do total de isolados, seguido de *Penicillium* (12,2%), *Fusarium* (9,1%) e *Aspergillus* (3,3%). Na presente pesquisa, o gênero *Aspergillus* representou 49,38% do total de isolados, seguido de *Penicillium* (30,29%), *Trichoderma* (10,23%) e *Fusarium* (0,72%).

Rai *et al* (31) isolaram 87 fungos sapróbios em madeira de manguezal na Índia; destes, 4 eram Zygomycetes, 18 Ascomycetes e o restante anamorfos. Dentre os anamorfos, *Aspergillus* foi o gênero dominante. Espécies de *Trichoderma*, *Fusarium* e *Penicillium* também foram frequentemente isoladas. Na presente pesquisa, *Aspergillus terreus*, *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma aureoviride* foram as espécies abundantes. *Fusarium solani* e *F. oxysporum* foram as espécies de rara ocorrência.

Pesquisando a incidência de fungos termofílicos e termotolerantes no manguezal de Sunderban na Índia, Jaitly & Ray (20) isolaram 25 espécies de fungos filamentosos.

Aspergillus fumigatus (56%) e *A. terreus* (52%) foram muito abundantes e *A. niger* (32%) como freqüente. Na presente pesquisa estas mesmas espécies foram isoladas, porém com resultados diferentes em relação à freqüência. *Aspergillus terreus* (17,21%) foi a espécie mais abundante, *A. niger* (2,52%) comum e *A. fumigatus* (1,09%) de rara ocorrência.

Maria & Shidhar (25) isolaram um total de 48 gêneros de fungos filamentosos em pedaços de madeira em manguezais da Costa Leste da Índia, dentre os quais *Aspergillus* (1,8%), *Fusarium* e *Penicillium* (0,4%) e *Phoma* (1,6%). Os 4 gêneros isolados na Índia também foram isolados no manguezal Barra das Jangadas, apresentando uma freqüência diferente: *Aspergillus* (49,38%), *Penicillium* (30,29%), *Phoma* (1,82%) e *Fusarium* (0,72%).

Posteriormente, Maria & Shidhar (27) investigando fungos isolados de madeira submersa em manguezais da Costa Sudeste da Índia isolaram e analisaram a freqüência de ocorrência dos seguintes gêneros: *Aspergillus* (16,7%), *Cladosporium* (6,7%), *Penicillium* (10,0%) e *Phoma* (13,4%). Na presente pesquisa estes mesmos gêneros também foram isolados, mas a freqüência foi determinada com diferentes valores, *Aspergillus* (49,38%), *Cladosporium* (0,73%), *Penicillium* (30,29%) e *Phoma* (1,82%).

Comparando a diversidade entre os pontos de coletas nos períodos de estiagem e chuvoso, houve diferença significativa ($t_c = 2,2934 > t_t = 1,672$ período chuvoso; $t_c = 4,5017 > t_t = 1,659$ período de estiagem). Entretanto, a diversidade entre os períodos nos pontos 1, 2, 3 e 4, houve diferença significativa para os pontos 1 e 3 ($t_c = 5,9516 > t_t = 1,661$). Para os pontos 2 e 4 não houve diferença significativa ($t_c = 0,1071 < 1,671$). Onde t_c = valor de t calculado e t_t = valor do t tabelado.

Com relação à diversidade dos fungos isolados, tanto nos pontos de coletas quanto nos períodos, levando em conta o ecossistema manguezal, verificou-se que houve maior

incidência de fungos no período de estiagem (77%) em relação ao chuvoso (23%). Deve-se levar em consideração que, durante o período de estiagem, o fluxo e refluxo das marés, a atividade das populações ribeirinhas, a atividade de banhistas locais nas marinas e o fluxo de embarcações no manguezal Barra das Jangadas foi maior, aumentando com isso a poluição, e em consequência maior número de fungos isolados.

O manguezal Barra das Jangadas apresentou maior diversidade de espécies durante o período de estiagem ($H' = 32$) e menor no chuvoso ($H' = 29$). Dentre essas espécies, 11 (*Aspergillus terreus*, *A. niger*, *Eupenicillium brefaldianum*, *Microsphaeropsis olivacea*, *Penicillium commune*, *P. corylophilum*, *P. funiculosum*, *P. islandicum*, *Phoma capitulum*, *Trichoderma aureoviride* e *T. virens*) foram comuns em ambos os períodos. Diferentes resultados foram encontrados em estudos realizados por Maria & Shidhar (26) sobre a diversidade de fungos filamentos em madeira de cinco espécies de vegetais de manguezais na Costa Sudeste da Índia, os quais referem maior diversidade de fungos no período chuvoso ($H' = 79$) e menor no de estiagem ($H' = 49$), corroborando com Pinto *et al.* (29), onde a precipitação pluviométrica em ecossistemas terrestre e aquático influencia de maneira significativa na quantidade de fungos isolados, visto que, após um período de chuva, a quantidade de isolados é maior que no período de estiagem.

Tabela 1. Unidades formadoras de colônias (UFC x 10⁴/g) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE, nos períodos de estiagem e chuvoso

GÊNEROS/ ESPÉCIES	PERÍODO DE ESTIAGEM		PERÍODO CHUVOSO		TOTAL
	PONTO 1	PONTO 3	PONTO 2	PONTO 4	
<i>Aspergillus caespitosus</i> Raper & Thom	1	0	0	0	1
<i>A. carneus</i> (v. Tiegh) Blochwitz	0	0	1	0	1
<i>A. fumigatus</i> Fresenius	2	1	0	0	3
<i>A. japonicus</i> Saito	14	0	0	0	14
<i>A. niger</i> van Thieghem	3	2	2	0	7
<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	1	0	0	0	1
<i>A. sydowi</i> (Bain & Sart.) Thom & Church	0	0	1	0	1
<i>A. sclerotiorum</i> Huber	45	0	0	0	45
<i>A. tamarii</i> Kita	0	1	0	0	1
<i>A. terreus</i> Thom	38	3	3	3	47
<i>A. ustus</i> (Bainier) Thom & Church	14	0	0	0	14
<i>Cladosporium tenuissimum</i> Cooke	0	0	0	2	2
<i>Eupenicillium brefeldianum</i> Dodge	1	0	0	1	2
<i>Fusarium oxysporum</i> Schelecht	0	1	0	0	1
<i>F. solani</i> (Mart.) Appel & Wollenw	0	0	1	0	1
<i>Gongronella butleri</i> Peyronel & Valdesco	0	0	1	0	1
<i>Microsphaeropsis olivacea</i> (Bonod.) Hohn	1	0	1	0	2
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	5	0	0	0	5
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0	0	1	0	1
<i>P. citrinum</i> Thom	0	1	0	0	1
<i>P. commune</i> Thom	25	1	2	0	28
<i>P. corylophilum</i> Dierckx	1	7	1	1	10
<i>P. crustosum</i> Thom	1	0	0	0	1
<i>P. decumbens</i> Thom	1	0	0	0	1
<i>P. expansum</i> Link	0	2	0	0	2
<i>P. fellutanum</i> Biourge	0	5	0	0	5
<i>P. funiculosum</i> Thom	0	1	0	1	2
<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	0	0	0	1	1
<i>P. grandicola</i> (Oudem.) Seifert & Samson	0	1	0	0	1
<i>P. islandicum</i> Biourge	1	2	2	0	5
<i>P. janczewskii</i> Zaleski	0	0	1	3	4
<i>P. lanosum</i> Westling	1	0	0	0	1
<i>P. lapidosum</i> Raper & Fennell	0	0	0	1	1
<i>P. lividum</i> Westling	0	0	0	2	2
<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom	0	0	2	7	9
<i>P. paxilli</i> Bainier	0	0	3	0	3
<i>P. pinophilum</i> Hedgcock	0	0	1	0	1
<i>P. turbatum</i> Westling	0	0	0	1	1
<i>P. waksmanii</i> Zaleski	0	0	1	2	3
<i>Phoma capitulum</i> Speg.	2	1	1	0	4
<i>P. eupyrena</i> Sacc.	0	1	0	0	1
<i>Stillbella clavispota</i> Seifert	0	0	1	0	1
<i>Talaromyces flavus</i> (Klocker) Stolk & Samson	3	2	0	0	5
<i>T. wortmanni</i> (Klocker) C. R. Benjamin	0	1	0	0	1
<i>Thielavia coactalis</i>	0	0	0	1	1
<i>Trichoderma aureo viride</i> Rifai	2	6	0	4	12
<i>T. harzianum</i> Rifai	0	0	1	1	2
<i>T. koningii</i> Oud.	0	1	0	0	1
<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	0	3	0	0	3
<i>T. virens</i> (Muller, Gidden & Foster) von Arx	3	2	3	2	10
TOTAL DE UFC	165	45	30	33	273

Tabela 2. Temperatura, pH e salinidade do sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE

COLETAS	ESTIAGEM						CHUVOSO					
	PONTOS 1 e 3			PONTOS 2 e 4			PONTOS 1 e 3			PONTOS 2 e 4		
	pH	T	S	pH	T	S	pH	T	S	pH	T	S
	(°C)	(‰)		(°C)	(‰)		(°C)	(‰)		(°C)	(‰)	
09/03/04	6,44	27,4	25,0	7,72	28,40	32,0	-	-	-	-	-	-
05/04/04	6,50	28,4	30,0	7,80	26,50	30,0	-	-	-	-	-	-
30/06/04	-	-	-	-	-	-	7,50	23,2	3,0	7,41	23,44	9,0
29/07/04	-	-	-	-	-	-	6,70	23,8	7,0	7,82	23,00	7,0
25/07/05	-	-	-	-	-	-	7,94	23,90	10,0	7,85	24,30	7,0
03/10/05	7,02	29,0	25,0	7,83	25,90	29,0	-	-	-	-	-	-

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas de transição entre os ambientes terrestre e marinho caracterizados por propriedades físico-químicas únicas, influenciando a biota local. Tendo em vista a instabilidade ecológica do manguezal Barra das Jangadas, provocado pelos deságües dos rios Jaboatão e Pirapama, torna-se importante o conhecimento de espécies de fungos filamentosos desse ecossistema. Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar fungos filamentosos de sedimentos do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. Foram coletadas amostras de sedimento do manguezal Barra das Jangadas nos meses de março e abril/2004 e outubro/2005 (período de estiagem); junho e julho/2004 e julho/2005 (período chuvoso). As coletas foram realizadas em quatro pontos: 1 e 3, 2 e 4, ao longo dos Rios Jaboatão e Pirapama, respectivamente. Vinte e quatro amostras foram coletadas e semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol. Foram isoladas e identificadas 50 espécies de fungos filamentosos, perfazendo um total de 273 UFC. *Penicillium* e *Aspergillus* foram os gêneros dominantes com 21 e 11 espécies respectivamente, seguidos de *Trichoderma* (5), *Fusarium*, *Phoma* e *Talaromyces* (2), sendo os demais gêneros: *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Gongronella*, *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Stilbella* e *Thielavia* com uma espécie.

Palavras-chaves: Fungos filamentosos, manguezais, taxonomia

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida-Filho, O.M.; Bueno, R.; Bononi, V.L. Algumas espécies de fungos Basidiomycetes de manguezais do Estado de São Paulo. *Hoehnea*, 20 (½), 87 – 92, 1993.
2. Araujo, F.V.; Soares, C.A.G.; Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C. Ascomycetous yeasts communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangroves ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68, 91 – 99, 1995.
3. Bononi, V.L. Basidiomycetes do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: IV. Adições às famílias Hymenochateacea, Stereacea e Thelephoraceae. *Rickia*, 11, 43 – 52, 1984.
4. Booth, C. *The genus Fusarium*, Kew Surrey: Commonwealth Institute, 1971, 237 p.
5. Campos, E.L.; Cavalcanti, M.A.Q. Primeira ocorrência de *Phellinus mangrovicus* (Imaz.) Imaz. para o Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, 14, 263 – 265, 2000.
6. Campos, E.L.; Sotão, H.M.P; Cavalcanti, M.A.Q; Luz, A.B. Basidiomycetes de Manguezais da APA de Algodual – Maiandeuá, Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, Serie Ciências Naturais, 1(1), 141 – 146, 2005.
7. Carneiro, O.; Coelho, P. A. Estudo ecológico da Barra das Jangadas. Nota Prévia. *Trabalhos do Instituto de Biologia Marinha e Oceanografia*, 2:1, 237- 248, 1960.
8. Clark, F.E. Agar-plate method for total microbial count. In: Black, C.A.; Evans, D.D.; White, J.L.; Ensminger, L.E.; Clark, F.E. Dinauer, R.C. (eds.): *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. Madson Inc., New York, 1965, p.1460-1466.

9. Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e de Administração dos Recursos Hídricos (CPRH). *Relatório da Bacia Hidrográfica dos rios Pirapama e Jaboatão*. Recife, 1999, 21p.
10. Costa, I.P.M.W. Fungos endofíticos isolados de vegetais do manguezal do Rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil (Dissertação). Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.
11. Couto, L.M.M.R. Ciclo reprodutivo e influência da salinidade sobre a gametogênese de *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) (Mollusca: Bivalvia: Donacidae), no estuário da Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, 1988, 198p. Tese (Mestrado em Oceanografia/ Universidade Federal de Pernambuco).
12. Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T.H. *Compendium of soil fungi*. Academic Press, New York, 1980, 859 p.
13. Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T.H. *Compendium of soil fungi*. Academic Press, New York, 1993, 860 p.
14. Ellis, M.B. *Dematiaceus hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971, 608 p.
15. Ellis, M.B. *More Dematiaceus hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1976, 507 p.
16. Evans, H.C. Thermophilous fungi of coal spoil tips. II. Occurrence, distribution and temperature relationships. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57, 237 – 250, 1971.
17. Gugliotta, A.M.; Capelari, M. Polyporacea from Ilha do Cardoso, Sao Paulo, Brasil. *Mycotaxon*, 56, 107 – 113, 1995.

18. Gugliotta, A.M.; Bononi, V.L.R. Polyporacea do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Botânica*, 12, 1- 112, 1999.
19. Hagler, A.N.; Rosa, C.A.; Moraes, P.B.; Mendonça-Hagler, L.C.; Franco, G.M.O.; Araujo, F.V.; Soares, C.A.G. Yeasts and coprophylum bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of Southeast Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 973 – 977, 1993.
20. Jaitly, A.K.; Rai, J.N. Thermophilic and thermotolerant fungi isolated from mangrove swamps. *Mycologia*, 6:74, 1021 – 1022, 1982.
21. Jaitly, A.K. pH optima of the fungi isolated from mangrove soils in India. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 28, 137 – 143, 1987.
22. Jones, E.B.G.; Alias, S.A. Biodiversity of Mangrove Fungi. In: *Biodiversity of Tropical Microfungi*. University Press, Hong Kong, 1997, p. 71 – 92.
23. Krebs, C. J. *Ecological methodology*. 2nd ed. Addison – Wesley Longman, Inc., 1999.
24. Lee, B.K.H.; Baker, G.E. An ecological study of the soil microfungi in a Hawaiian Mangrove swamp. *Pacific Science*, 26, 1- 10, 1972.
25. Maria, G.L.; Sridhar, K.R. Richness and diversity of filamentous fungi on wood litter of mangroves along the west coast of India. *Current Science*, 83 (12), 1573 – 1580, 2002.
26. Maria, G.L.; Sridhar, K.R. Diversity of filamentous fungi on wood litter of five mangrove plant species from the southwest coast of India. *Fungal Diversity*, 14, 109 – 126, 2003.
27. Maria, G.L.; Sridhar, K.R. Fungal colonization of immersed wood in mangroves of the southwest coast of India. *Can. J. Bot.*, 82, 1409 – 1418, 2004.

28. Pitt, J.I. *A laboratory guide to common Penicillium species*. Academic Press, Australia, 1985, 182 p.
29. Pinto, I.M.A.; Cavalcanti, M.A.Q.; Passavante, J.Z.O. Hongos filamentosos aislados desde el suelo y el agua en la playa de Boa Viagem (Recife – Brasil). *Boletín Micológico*, 7:1-2, 39 – 45, 1992.
30. Por, F.D. *Guia Ilustrado do Manguezal Brasileiro*. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1994, 82p.
31. Rai, J.N.; Garg, K.L.; Jaitly, A.K. Saprophytic fungi isolated from woods in mangrove swamps and their wood-decaying capability. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 22, 65 – 74, 1981.
32. Raper, K.B.; Fennell, D.I. *The genus Aspergillus*. Robert and Krieger, Publishing Company, Inc., Florida, 1977, 686 p.
33. Raper, K.B.; Thom, C.A. *Manual of the Penicillia*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1949, 875p.
34. Schaeffer-Novelli, Y. Manguezal: Ecossistema entre a terra e o mar. Caribbean Ecological Research, São Paulo, 1995, 64p.
35. Schnitler, M.; Stephenson, S.L. Myxomycete biodiversity in four different forest types in Costa Rica. *Bol. Soc. Brot.*, 67, 5 – 22, 2000.
36. Sengupta, A.; Chaudhuri, S. Ecology of microfungi in mangroves sediments at the Ganges river estuary in Índia. *Indian Forester*, 807 – 812, 1995.
37. Sotao, H.M.P.; Bononi, L.R.; Figueiredo, T. Basidiomycetes de manguezais da Ilha de Manacá, Amapá. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, Serie Botânica*, 7, 109 – 114, 1991.

38. Sotao, H.M.P.; Campos, E.L.; Costa, S.P.S.E.; Melo, O.; Azevedo, J.C. Basidiomycetes macroscópicos de manguezais de Bragança, Pará, Brasil. *Hoehnea*, 29(3), 215 – 224, 2002.
39. Sutton, B. C. *The Coelomycetes: fungi imperfect with picnidia, acervuli and stroma*. Kew, CAB International Mycological Institute, 1980, 696 p.

Capítulo 2

Análise qualitativa enzimática de fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco

**ANÁLISE QUALITATIVA ENZIMÁTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DE SEDIMENTO DO MANGUEZAL BARRA DAS JANGADAS,
JABOATÃO DOS GUARARAPES, PERNAMBUCO**

Gomes, Daniela Neto Ferreira¹; Cavalcanti, Maria Auxiliadora de Queiroz¹;

Porto, Ana Lúcia Figueiredo²

¹Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Micologia, ²Universidade
Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Morfologia e Fisiologia

RESUMO

Os fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar sua nutrição. Desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados. Os compostos fenólicos enquadram-se nos resíduos resultantes da biodegradação de resíduos naturais e da atividade antrópica. Apesar de amplamente distribuídos na natureza, os compostos fenólicos fazem parte dos principais poluentes tóxicos residuais descartados pela indústria petroquímica, têxtil, entre outras. Utilizou-se 50 espécies de fungos filamentosos isoladas de sedimento do manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, com a finalidade de selecionar qualitativamente os produtores de fenoloxidasas, celulase e xilanase. Das 50 espécies testadas, 21 apresentaram-se positivas para fenoloxidase e 11 para celulase, entretanto nenhuma foi positiva para xilanase. Os fungos selecionados demonstraram potencial para serem introduzidos em processos de biorremediação, com perspectivas de resultados promissores para

tratamento de resíduos e efluentes fenólicos.

Palavras – chave: fungos filamentosos, fenoloxidasas, xilanase e celulase

ABSTRACT

Fungi show a great enzyme diversity in the environment that is used to assist its nutrition. In this way they are responsible for the deterioration of some natural, fine or processed materials. The phenolic compounds are fit in the resultant residues of the biodegradação of natural residues and men activity. Although widely distributed in the nature, the phenolic compounds are part of the main discarded residual toxic pollutants for the petrochemical industry, textile, among others. Fifty species of filamentous fungi from sediment of Barra das Jangadas mangrove, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, were used with the purpose qualitatively to select the producers of phenoloxidasas, cellulase and xylanase. Of the 50 tested species, 21 were positive for fenoloxidase and 11 for cellulase, however none was positive for xylanase. The selected fungi demonstrated potential to be introduced in bioremediation processes, with perspectives of promising results for treatment of phenolic effluent residues.

Key – words: filamentous fungi, phenoloxidasas, xylanase and cellulase

1. INTRODUÇÃO

Os fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar sua nutrição. Desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados. Nas últimas décadas, a utilização de fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de

biorremediação vêm crescendo, em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas (Bennett, 1998).

Basicamente, são encontrados dois grupos de enzimas responsáveis pela degradação da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As enzimas oxidativas, como lacase, manganês-peroxidase e lignina-peroxidase, atuam na degradação da lignina e detoxificam o meio de crescimento dos metabólitos gerados durante a degradação. A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas como a celulase e a xilanase entre outras, atuem nas fontes de carbono, possibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para formação das frutificações (Durrant *et al.* 1991).

A utilização de fungos no tratamento dos mais diversos tipos de efluentes tem sido alvo de inúmeros estudos, especialmente por sua capacidade de produzir enzimas extracelulares (Silva & Esposito, 2004), tais como a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase. Estas enzimas atuam sob compostos poluentes recalcitrantes, removendo-os ou transformando-os em outros produtos menos tóxicos (Karam & Nicel, 1997). São as enzimas mais comuns que apresentam o maior potencial para aplicações industriais. Nestas enzimas falta especificidade pelo substrato e, com isso, são capazes de degradar uma ampla faixa de xenobióticos, incluindo efluentes corados (De Souza & Peralta, 2003).

Tendo em vista a instabilidade ecológica do Manguezal Barra das Jangadas, provocada pelos deságües dos Rios Jaboatão e Pirapama, este trabalho teve como objetivo, a análise qualitativa enzimática de fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, com a possível utilização destes em processos biotecnológicos, principalmente a sua aplicação nos processos de biorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ESPECIES DE FUNGOS TESTADAS

Foram utilizadas 50 espécies de fungos filamentosos (21 de *Penicillium*, 11 de *Aspergillus*, 5 de *Trichoderma*, 2 de *Fusarium*, *Phoma* e *Talaromyces*, 1 de *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Gongronella*, *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Stilbella* e *Thielavia*) isoladas de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. As espécies foram cultivadas em meios de BDA e Agar Czapeck, durante cinco dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após esta etapa, inóculos de 5 mm de diâmetro foram depositados em placas de Petri contendo os meios de cultura específicos suplementado com diferentes substratos indutores.

2.2. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

2.2.1. FENOLOXIDASES

Os inóculos foram depositados em placas de Petri contendo Agar malte acrescido de 0,5% de ácido gálico. Durante 15 dias, a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, acompanhou-se a progressão do halo e a intensidade da cor, através do aparecimento de uma zona de difusão acastanhada ao redor da colônia, indicando a oxidação do ácido gálico (Davidson *et al.*, 1938).

2.1.2. CELULASE

Os inóculos foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura acrescido de carboximetilcelulose (sulfato de amônia 1,0g; fosfato de potássio 2,0g; sulfato de magnésio 0,1g; cloreto de potássio 3,8g; citrato de sódio 10Mm; extrato de malte 0,6g; carboximetilcelulose 10,0g; ágar 15g e água destilada 1000mL). Após o término do período de incubação (10 dias) foi adicionado em cada placa 10mL de uma

solução de vermelho-congo (0,025% em tampão Tris HCl 0,1M, pH 8,0) por 30 minutos. As culturas foram lavadas com 5mL de uma solução de NaCl 0,5M. Após 5 minutos a exibição de uma zona de difusão clara ao redor da colônia, indica a hidrólise da celulose (Neirotti & Azevedo, 1988).

2.1.3. XILANASE

Os inóculos foram depositados em placas de Petri contendo Agar acrescido de 1% de Xilana. As culturas foram incubadas durante 14 dias à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A positividade é indicada apenas pelo aparecimento do halo translúcido de inibição (Dingle *et al.*, 1953), modificado com 15g de extrato de malte.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A "Reação de Bavendamm" pode ser citada como um exemplo clássico da utilização das técnicas de formação de halo. Nesta reação, o ácido gálico (3,4,5-trihidroxibenzóico) (Davidson *et al.*, 1938; Nobles, 1965), sob ação das fenoloxidasas fúngicas formam quinonas, que são identificadas pela formação de um halo de cor âmbar em torno do micélio. Das 50 espécies testadas, 21 apresentaram reação positiva através do aparecimento de uma zona de difusão acastanhada (âmbar) ao redor da colônia, indicando a oxidação do ácido gálico (Tabela 1). *Cladosporium tenuissimum* e *Penicillium commune* apresentaram os melhores halos em relação à cor (Figuras 1 e 2), seguidos de *Trichoderma*, *Fusarium* e *Eupenicillium*.

Hofrichter *et al.* (1993) selecionaram os gêneros *Penicillium* e *Mucor* isolados de solos contaminados por fenóis e benzeno provenientes do efluente industrial no Leste da Alemanha; Zhdanova *et al.* (2001) isolaram os gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Mucor*, em locais com altos índices de radiação na Usina

Nuclear de Chernobyl, alguns anos após um acidente nuclear. Espécies destes gêneros foram isoladas no Manguezal de Barra das Jangadas, constituindo um grupo de fungos filamentosos que definitivamente apresentam mecanismos de resistência a condições ambientais adversas. De acordo com a reação de Bavendamm, várias espécies destes fungos são capazes de degradar compostos fenólicos.

Alguns dos gêneros isolados e selecionados na presente pesquisa (*Cladosporium* e *Phoma*) mostraram-se efetivos na degradação do ácido gálico. No trabalho realizado por Seigle-Murandi *et al.* (1995), *Phoma* degradou aproximadamente 30% do organoclorado (100mg L⁻¹). Minoura & Okazaki (1968) citaram a formação de um halo em meio de ácido gálico ou tânico por *Cladosporium cladosporioides*; Rosch & Liese (1971) demonstraram que *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium* sp. desenvolvem-se em meio contendo taninos, os quais apresentam estruturas moleculares semelhantes às do ácido gálico. Donnison *et al.* (2000) revelaram a produção de fenoloxidasas e peroxidasas pelos gêneros *Phoma* e *Cladosporium*, isolados de solos alterados por organoclorados na Inglaterra.

Trabalhando com fungos filamentosos biodegradadores de compostos fenólicos isolados do Rio Atibaia (SP) e refinaria de petróleo, Conceição *et al.* (2005) determinaram a atividade fenolítica de 257 amostras fúngicas. *Cladosporium*, *Fusarium*, *Phoma* e *Penicillium* foram caracterizados. Na presente pesquisa estes mesmos gêneros foram isolados de sedimento do manguezal e também determinada a atividade fenolítica, onde foi aplicada a mesma metodologia que caracteriza a reação de Bavendamm.

Das 50 espécies testadas para atividade celulolítica, 42 germinaram, entretanto somente 11 apresentaram uma zona de difusão clara ao redor da colônia, indicando a hidrólise da celulose (Tabela 1). *Aspergillus fumigatus* e *Stilbella clavispora*

apresentaram os halos significativos (Figuras 3 e 4), seguidos de *Cladosporium tenuissimum*, *Phoma capitulum*, *Phoma eupyrena*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium grandicola*, *Aspergillus carneus*, *Aspergillus caespitosus*, *Talaromyces flavus* e *Talaromyces wortmanii*. Resultado semelhante foi observado em 36 linhagens de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia – Itatins (SP) por Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004), onde 11 apresentaram halo ao redor das colônias.

Estudando fungos filamentosos isolados de aveia processada, Nogueira & Cavalcanti (1996) testaram 48 espécies quanto à capacidade celulolítica. Das 48 espécies, 13 também foram testadas na presente pesquisa. A mesma metodologia foi aplicada, porém apenas duas (*Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium tenuissimum*) das treze espécies testadas apresentaram atividade celulolítica.

O halo indicador da degradação não foi observado em 42 espécies, incluindo 5 do gênero *Trichoderma* (*T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* e *T. virens*), considerado como fonte de celulasas (Feldman *et al.* 1988, Galliano *et al.* 1988). A visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas do meio de cultura podem interferir no corante proporcionando resultados falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos (Neirotti & Azevedo, 1988). As outras espécies isoladas não cresceram nas condições desse experimento. Esse resultado ressaltou a importância do controle dos fatores ambientais de crescimento, como a presença de aminoácidos e/ou fontes orgânicas de nitrogênio, além de outros.

Trabalhando com a produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis pernicioso*, Bastos (2005) detectou atividade celulolítica para 5 isolados desta espécie, quando celulose Whatman foi usada como substrato. Contudo, nenhum dos isolados demonstrou atividade para degradar carboximetilcelulose. Diferentes resultados foram

encontrados na presente pesquisa, quando 11 das 50 espécies testadas apresentaram atividade celulolítica para carboximetilcelulase.

Todas as espécies testadas em meio de cultura contendo xilana germinaram, entretanto nenhuma apresentou a formação de um halo translúcido de inibição de acordo com a metodologia aplicada (Tabela 1). A metodologia utilizada permitiu uma interpretação simples dos resultados obtidos na seleção, principalmente por causa da concentração utilizada (0,5% de ácido gálico e 1% de carboximetilcelulose e xilana). Torna-se importante mencionar que o presente trabalho não objetivou a degradação da molécula lignina, apesar do equipamento enzimático dos fungos selecionados possibilitarem esta experimentação.

Os fungos selecionados demonstraram potencial importante para serem introduzidos em processos de biorremediação, com perspectivas de resultados promissores para tratamentos de resíduos e efluentes fenólicos, reforçando a idéia que numerosas espécies com potencial para degradar e/ou reciclar compostos tóxicos, podem ser isoladas de ambientes alterados pela poluição.

Tabela 1. Análise qualitativa enzimática de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE

Fungos filamentosos	Fenoloxidasas	Celulase	Xilanase
<i>Aspergillus caespitosus</i>	-	+	-
<i>Aspergillus carneus</i>	-	+	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	+	-
<i>Aspergillus japonicus</i>	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	-
<i>Aspergillus sydowi</i>	-	-	-
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	-	-	-
<i>Aspergillus tamari</i>	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	+	-	-
<i>Aspergillus ustus</i>	-	-	-
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	+	+	-
<i>Eupenicillium brefaldianum</i>	+	-	-
<i>Fusarium solani</i>	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	-	-
<i>Gongronella butleri</i>	-	-	-
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	+	-	-
<i>Mucor hiemalis</i>	-	-	-
<i>Penicillium brevicompactum</i>	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-
<i>Penicillium commune</i>	+	-	-
<i>Penicillium corylophyllum</i>	+	-	-
<i>Penicillium crustosum</i>	-	+	-
<i>Penicillium decumbens</i>	-	-	-
<i>Penicillium expansum</i>	-	-	-
<i>Penicillium fellutanum</i>	-	-	-
<i>Penicillium funiculosum</i>	+	-	-
<i>Penicillium glabrum</i>	-	-	-
<i>Penicillium grandicola</i>	+	+	-
<i>Penicillium islandicum</i>	-	-	-
<i>Penicillium janczewski</i>	+	-	-
<i>Penicillium lanosum</i>	-	-	-
<i>Penicillium lapidosum</i>	-	-	-
<i>Penicillium lividum</i>	+	-	-
<i>Penicillium oxalicum</i>	+	-	-
<i>Penicillium paxilli</i>	-	-	-
<i>Penicillium pinophilum</i>	-	-	-
<i>Penicillium turbatum</i>	-	-	-
<i>Penicillium waksmanii</i>	-	-	-
<i>Phoma capitulum</i>	-	+	-
<i>Phoma eupyrena</i>	-	+	-
<i>Stilbella aciculosa</i>	+	+	-
<i>Talaromyces flavus</i>	+	+	-
<i>Talaromyces wortmanni</i>	+	+	-
<i>Thielavia coactalis</i>	-	-	-
<i>Trichoderma aureoviride</i>	+	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	+	-	-
<i>Trichoderma koningii</i>	+	-	-
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	+	-	-
<i>Trichoderma virens</i>	+	-	-

(+) **positivo** (presença de halo) e (–) **negativo** (ausência de halo)

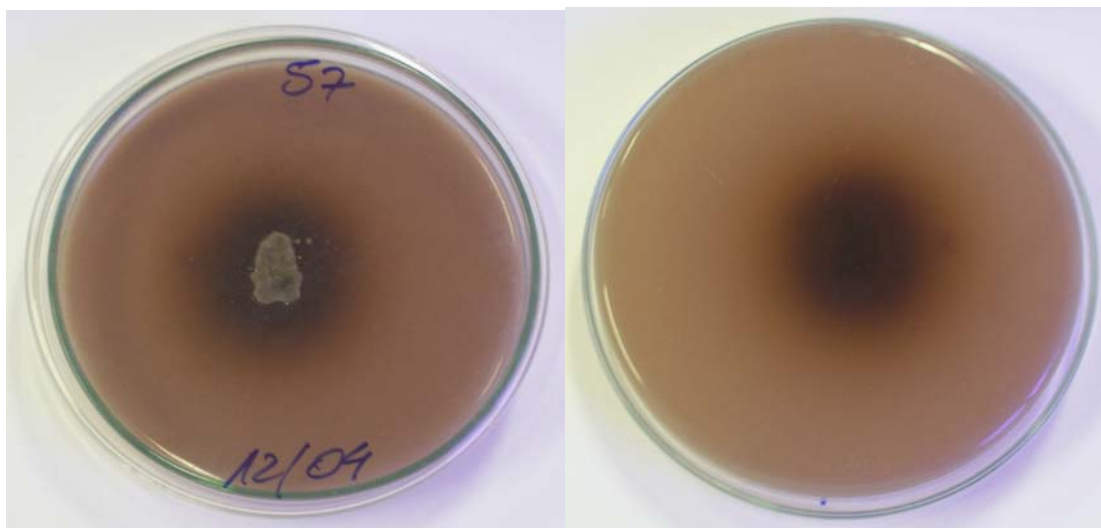


Figura 1. Expressão da atividade fenolítica em *Cladosporium tenuissimum* cultivado em meio Agar Malte acrescido de 0,5% de ácido gálico.

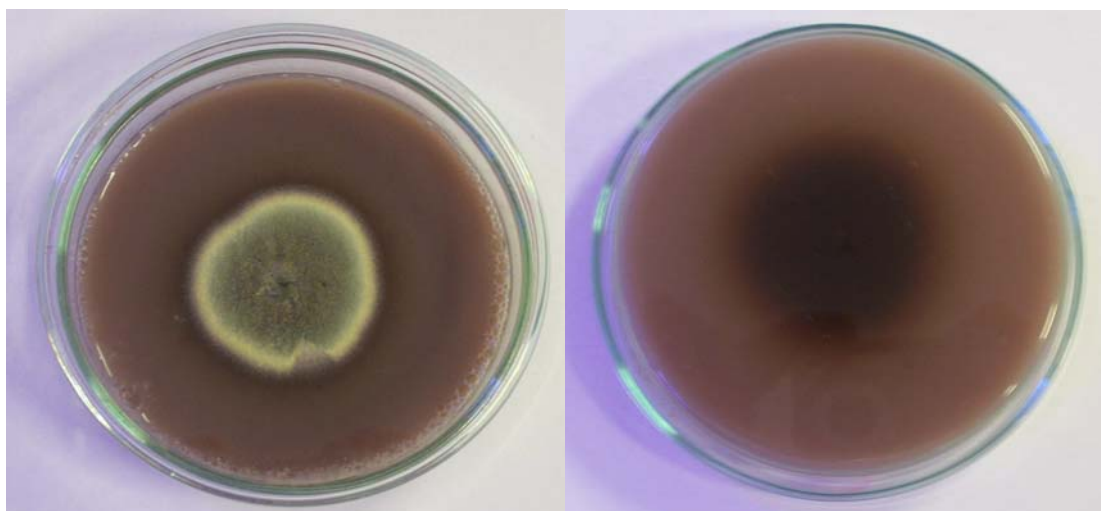


Figura 2. Expressão da atividade fenolítica em *Penicillium commune* cultivado em meio Agar Malte acrescido de 0,5% de ácido gálico.



Figura 3. Expressão da atividade celulolítica em *Aspergillus fumigatus* cultivado em meio de cultura contendo solução de sais, acrescido de carboximetilcelulose e revelado com uma solução de vermelho-congo (0,025% em tampão Tris HCl 0,1M, pH 8,0).



Figura 4. Expressão da atividade celulolítica em *Stilbella clavispora* cultivado em meio de cultura contendo solução de sais, acrescido de carboximetilcelulose e revelado com uma solução de vermelho-congo (0,025% em tampão Tris HCl 0,1M, pH 8,0).

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bastos, C. N. Produção de Enzimas Extracelulares por *Crinipellis perniciosa*. *Fitopatol. bras.* 30 (3), 2005.

Bennet, J.W. Mycothecnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, 66, 101 – 107, 1998.

Carneiro, O.; Coelho, P.A. Estudo ecológico da Barra das Jangadas. Nota Prévia. *Trabalhos do Instituto de Biologia Marinha e Oceanografia*. Recife, 2(1), 237 – 248, 1960.

Clark, F.E. Agar-plate method for total microbial count. In: Black, C.A., Evans, D. D., White, J.L., Ensminger, L.E., Clark, F.E. Dinauer, R.C. (eds), *methods of soil analysis, Part 2 – chemical and microbiological properties*. New York; Madson Inc. p. 1460 – 1466, 1965.

Coll, P.M.; Fernandez-Abalos, J.M.; Villanueva, J.R.; Santamaria, R.; Perez, P. Purification and characterization of phenoloxidase (laccase) from lignin – degrading basidiomycete PM1(CECT2971). *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(8), 2607 – 2613, 1993.

Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e de Administração dos Recursos Hídricos (CPRH). 1999. *Relatório da Bacia Hidrográfica dos rios Pirapama e Jaboatão*. Recife, 21p.

Conceição, D.M.; de Angelis, D.A.; Bidoia, E.D.; de Angelis, D.F. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia (SP) e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 72(1), 99-106, 2005.

Davidson, R.W.; Campbell, W.A.; Blaisdell, D.J. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *J. of Agric. Res.*, 57(9), 683-685, 1938.

Dingle, J.; Reid, W.W.; Solomons, G.L. The enzymic degradation of pectin and others polysaccharides II. – Applications of the “Cup-plate” Assay to the Estimation of Enzymes. *J. Sci. Food Agric.*, 4, 149-155, 1953.

Onnison, L.M.; Griffith, G.S.; Hedger, J.; Hobbs, P.L.; Bardgett, D. Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 253 – 263, 2000.

Durrant, A.J.; Wood, D.A.; Cain, R.B. Lignocelulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid state fermentation. *Journal of General Microbiology*, 137, 751-755, 1991.

Feldman, K.A., Lovett, J.S.; Tsao, G.T. Isolation of the cellulase enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and regulation of enzyme production. *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 262-272, 1988.

Galliano, H., Gas, G.; Durant, H. Lignocellulose biodegradation and ligninase excretion by mutant strains of *Phanerochaete chrysosporium* hyperproducing cellulases. *Biotechnology Letters*, 10, 655-660, 1988.

Hofrichter, M.; Gunther, T.; Fritsche, W. Metabolism of phenol, chloro and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 7/2 isolated from a contaminated soil. *Biodegradation*, 3, 415 – 421, 1993.

Karan, J.; Nicell, J.A. Potential applications of enzymes in wastes treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 69, 141 – 153, 1997.

Marr, J.; Kremer, S.; Sterner, O.; Anke, H. Transformation and mineralization of halophenols by *Penicillium simplicissimum* SK9117. *Biodegradation*, 7, 165-171, 1996.

Minoura, K.; Okazaki, G. Taxonomic Studies on cladosporia – physiological properties. *J. Ferment. Technol.*, 46, 269-275, 1968.

Neirotti, E.; Azevedo, J.L. Técnica semiquantitativa de avaliação de produção de celulase em *Humicola* sp. *Revista de Microbiologia* 19, 78-81, 1988.

Nobles, M.K. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. *Can. J. Bot.*, 43, 1097-1139, 1965.

Nogueira, E.B.S.; Cavalcanti, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Rev. Microbiol.*, 27 (1), 7 – 9, 1996.

Rösch, R.; Liese, W. Untersuchungen über die enzyme von Bläuepilsen Phenoxidasen-Aktivität. *Arch. Mikrobiol.*, 76, 212-218, 1971.

Rueggerr, M.J.S.; Tauk-Tornisielo, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 27, 2, 205-211, 2004.

Seigle-Murandi, F.; Toé, A. Benoit-Guyod, J.L.; Steiman, R.; Kadri, M. Depletion of pentachlorophenol by Deuteromycetes isolated from soil. *Chemosphere*, 31(2), 2677-2686. 1995.

Zhdanova, N.N.; Zakharchenko, V.A.; Vember, V.V. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycol. Res.*, 104(12), 1421-1426, 2000.

Capítulo 3

Análise quantitativa enzimática de fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco

**ANALISE QUANTITATIVA ENZIMÁTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DE SEDIMENTO DO MANGUEZAL BARRA DAS JANGADAS,
JABOATÃO DOS GUARARAPES, PERNAMBUCO**

**Gomes, Daniela Neto Ferreira¹; Cavalcanti, Maria Auxiliadora de Queiroz¹; Porto,
Ana Lúcia Figueiredo²; Cavalcanti, Maria Taciana Holanda².**

¹Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Micologia, ²Universidade
Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Morfologia e Fisiologia e Laboratório
de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE)

RESUMO

Os microrganismos sintetizam inúmeros compostos de importância industrial tais como vitaminas, antibióticos e enzimas. Dentre esses metabólitos, as enzimas têm sido utilizadas em diversos processos industriais, principalmente no processamento de produtos alimentícios (celulases e xilanases) e despoluição ambiental (fenoloxidasas). Este trabalho teve como objetivo selecionar quantitativamente fungos filamentosos produtores de enzimas hidrolíticas (celulase e xilanase) e lignolíticas (manganês-peroxidase, lignina-peroxidase e lacase), com a possível utilização destes em processos principalmente a sua aplicação nos processos de biorremediação. Foram utilizadas 50 espécies de fungos filamentosos isoladas de sedimento do Manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. De acordo com os métodos utilizados, os maiores produtores de celulase foram *Microsphaeropsis olivacea* (0,4546 U/mg) e *Stilbella clavispora* (0,3584 U/mg), e de xilanase foram *Phoma capitulum* (271

U/mg) e *Trichoderma aureoviride* (268 U/mg). Para as fenoloxidasas, *Aspergillus sclerotiorum* (739,7569 nanokatal/mg), *Penicillium Commune* (8,785982 U/mg) e *Penicillium oxalicum* (28,6021 U/mg/min) foram os maiores produtores de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, respectivamente.

Palavras – chave: fungos filamentosos, análise quantitativa, fenoloxidasas, xilanase e celulase

ABSTRACT

Microorganisms synthesize countless compounds of industrial importance such as vitamins, antibiotics and enzymes. Amongst these metabolites, the enzymes have been used in diverse industrial processes, mainly in the processing of food products (cellulase and xylanase) and environment clean up (phenoloxidase). This work had the aim of selecting filamentous fungi producing quantitatively hidrolitic enzymes (cellulase and xylanase) and lignolitic (manganese-peroxidase, lignin-peroxidase and lacase), with the possible use of these in biotechnological processes, mainly its application in the biorremediation processes. Fifty species of filamentous fungi, isolated from sediment of Barra das Jangadas mangrove, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, had been used. In accordance with the used methodologies, the greatest producers for celulase had been *Microsphaeropsis olivacea* (0.4546 U/mg) and *Stilbella clavispora* (0.3584 U/mg), and for xylanase they had been *Phoma capitulum* (271 U/mg) and *Trichoderma aureoviride* (268 U/mg). For phenoloxidase, *Aspergillus sclerotiorum* (739.7569 nanokatal/mg), *Penicillium commune* (8.7859 U/mg) and *Penicillium oxalicum* (28.6021 U/mg/min) were the greatest producers of lacase, manganese peroxidase and lignin peroxidase, respectively.

Key – words: filamentous fungi, quantitative analysis, phenoloxidasas, xylanase and cellulase

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos sintetizam inúmeros compostos de importância industrial como vitaminas, antibióticos e enzimas. Dentre esses metabólitos, as enzimas têm sido utilizadas em diversos processos industriais, principalmente no processamento de produtos alimentícios (celulases e xilanases) e despoluição ambiental (fenoloxidasas) (Gray & William, 1975).

Os fungos constituem um dos grupos de microrganismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Essa atividade ocorre na sua fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos, principalmente lignocelulose (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2002). Os requisitos nutricionais e ambientais da fase reprodutiva diferem daqueles que são ótimos para o crescimento miceliano e, portanto, o estudo da ecologia e fisiologia de um fungo deve considerar ambas as fases do ciclo, no entanto, estudos durante a fase vegetativa podem evidenciar a capacidade degradativa e competitiva, entre outras, que refletem diretamente na produtividade (Brum, 2005).

O interesse na pesquisa de enzimas lignocelulolíticas fundamenta-se na utilização destas na reciclagem de resíduos da agricultura e rejeitos urbanos (Vassilev *et al.* 1994) e também no tratamento de solos e efluentes diversos (Duran & Esposito, 2000). Estas enzimas possuem vantagens na remediação de diversos tipos de contaminantes, por não possuírem alta especificidade para os substratos, uma vez que a

estrutura da lignina apresenta diversos modelos (Goldstein 1981; Bumpus *et al.* 1985; Mester & Tien 2000; Hofrichter, 2002).

Tendo em vista a instabilidade ecológica do Manguezal de Barra das Jangadas, provocada pelos deságües dos Rios Jaboatão e Pirapama, este trabalho teve como objetivo a quantificação das enzimas produzidas por fungos filamentosos, com vistas à possível utilização destes em processos biotecnológicos, principalmente a sua aplicação nos processos de biorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS TESTADAS

Foram utilizadas 50 espécies de fungos filamentosos (21 de *Penicillium*, 11 de *Aspergillus*, 5 de *Trichoderma*, 2 de *Fusarium*, *Phoma* e *Talaromyces*, 1 de *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Gongronella*, *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Stilbella* e *Thielavia*) isoladas de sedimento do Manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. As espécies foram cultivadas em meios de BDA e Agar Czapeck, durante cinco dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após esta etapa, inóculos de 5mm de diâmetro foram depositados em frascos de Erlenmeyers contendo solução de Manachini *et al.*, (1987) e suplementado com diferentes substratos indutores.

2.2. PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO

Para o crescimento das diferentes espécies e indução das enzimas, utilizou-se solução de Manachini suplementada com diferentes substratos indutores (carboximetilulose, xilana e ácido tânico), numa proporção de 0,5%. O pH de cada meio foi ajustado de acordo com a enzima analisada; celulase e xilanase (pH 5,0) e fenoloxidasas (pH 6,0). Os cultivos foram mantidos sob agitação constante (140 rpm), a

30°C durante 72 horas, em agitador horizontal. Após o período de incubação, as culturas foram filtradas sob vácuo em papel de filtro Waltman nº 10, para separar a massa micelial do fluido da cultura e posterior quantificação enzimática (Teixeira, 1997).

2.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

2.3.1. CELULASE

A atividade celulásica foi detectada utilizando como substrato carboximetilcelulose a 1% em tampão citrato fosfato pH 5,5 (0,1M) (Kansoh *et al.*, 1999), e determinada pelo método de DNSA (Acido dinitrosalicílico), utilizando a glicose como padrão (Miller, 1959).

2.3.2. XILANASE

A atividade xilanásica foi realizada utilizando como substrato xilana a 1% em tampão acetato pH 5,5 (0,05M) (Oliveira *et al.*, 2006), e determinada pelo método de DNSA (Acido dinitrosalicílico), utilizando a xilose como padrão (Miller, 1959).

2.3.3. FENOLOXIDASES

2.3.3.1. Lacase

A lacase foi determinada espectrofotometricamente a 436 nm em 5 min a partir da degradação de ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzathiazoline-6-sulfonic acid)] 14µM em tampão glicina – HCl 50 mM (pH 3,0), a atividade foi expressa em nanokatal (nanomoles/seg) em 1mL (Sirinivasan *et al.*, 1995).

2.3.3.2. Lignina-peroxidase

A atividade da lignina-peroxidase foi analisada pela oxidação do corante Azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio a 651 nm. A mistura foi composta por tampão tartarato de sódio 50 mM (pH 4,0), Azul de metileno 32 μ M e 0,49 mL do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de H₂O₂. Uma unidade enzimática foi equivalente à quantidade de enzima necessária para diminuir a absorbância em 0,1 por minuto (Archibald, 1992 e Arora *et al.*, 2002).

2.3.3.3. Manganês-peroxidase

A atividade da enzima foi determinada pela oxidação do vermelho fenol como substrato, na concentração de 0,01% no volume de 1mL, complementada com lactato de lítio (25 mM), sulfato de manganês (100 μ M), ovoalbumina (0,1%) em tampão succinato de sódio 20mM pH 4,5. A mistura de reação contendo 1mL da solução substrato acima descrita, 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 0,4 mM, foi incubada a 30°C por 5 min. A reação foi paralisada pela adição de 0,04 mL de hidróxido de sódio 2 M e realizada a leitura em espectrofotômetro a 610nm (Kuwahara *et al.*, 1984).

2.4. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

O conteúdo protéico foi determinado pelo método de Bradford (1976), que utiliza o coomassie blue como substrato. A albumina sérica bovina foi utilizada como proteína padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 50 espécies testadas, 20 mostraram atividade quantitativa enzimática para celulase, destacando-se *Microsphaeropsis olivacea* (0,4546 U/mg) e *Stilbella clavispora* (0,3584 U/mg) com produção significativa (figura 1); 28 mostraram atividade enzimática para xilanase destacando-se *Phoma capitulum* (271 U/mg) e *Trichoderma aureoviride* (268 U/mg) (figura 2). Para as fenoloxidasas, 25 espécies mostraram atividade enzimática, destacando-se *Aspergillus sclerotiorum* (739,7569 nanokatal/mg), *Penicillium commune* (8,785982 U/mg) e *Penicillium oxalicum* (28,6021 U/mg/min) como boa produção de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase respectivamente (Figuras 3,4 e 5).

As celulasas constituem-se em um complexo de enzimas encontradas em secreções de microrganismos, como fungos e bactérias. Também estão presentes no sistema digestório de algumas espécies de gastrópodes. Esse complexo enzimático é capaz de hidrolisar a celulose até moléculas de glicose e pequenos oligossacarídeos (Kubicek *et al.*, 1993). Analisando a atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia – Itatins, São Paulo, Ruegger & Tauk – Tornisielo (2004) mostraram *Trichoderma harzianum* (1,64 U) como a espécie de melhor atividade em meio de cultura contendo farelo de trigo. Na presente pesquisa, três espécies de *Trichoderma* apresentaram atividade enzimática em meio de cultura contendo carboximetilcelulose, tais como: *T. aureoviride* (0,1967), *T. pseudokoningii* (0,181 U/mg) e *T. virens* (0,0056 U/mg). Entretanto, de acordo com a metodologia aplicada, não foram consideradas as mais expressivas na produção de celulase. Observa-se que a atividade da celulase depende, não somente das espécies, mas das técnicas utilizadas.

Apesar de estudos demonstrarem o potencial de *Trichoderma* na produção de celulasas (Cochet 1991, Gashe 1992), e serem algumas espécies usadas intensivamente

para a despoluição ambiental pela capacidade de degradarem resíduos e efluentes (Buchert *et al.* 1993), espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também têm sido citadas como boas produtoras destas enzimas (Kurasawa *et al.* 1992, Kuhad & Singh 1993, Castillo *et al.* 1994, Kim *et al.* 1997). Na presente pesquisa, duas espécies de *Aspergillus* foram testadas e apresentaram diferentes resultados *A. niger* (0,0633 U/mg) e *A. sydowi* (0,0204 U/mg). O gênero *Penicillium*, representado por maior número de espécies aqui estudadas (9 espécies) tem sido constantemente utilizado como fonte de enzimas em vários setores industriais (Carvalho *et al.* 1992, Teixeira 1994).

Trabalhando a atividade celulásica de fungos filamentosos, Ruegger & Tauk – Tornisielo (2004) analisaram seis espécies de fungos filamentosos também estudadas na presente pesquisa. Entretanto, diferentes resultados foram encontrados em ambas as pesquisas. *Aspergillus niger* (1,01 U), *Penicillium corylophilum* (0,60 U), *P. decumbens* (0,18 U), *P. funiculosum* (0,57 U), *P. oxalicum* (0,79 U) e *Trichoderma pseudokoningii* (1,275 U) isoladas da Estação Ecológica de Juréia, São Paulo; e *A. niger* (0,0633 U/mg), *P. corylophilum* (0,2022 U/mg), *P. decumbens* (0,0243 U/mg), *P. funiculosum* (0,1531 U/mg), *P. oxalicum* (0, 1301 U/mg) e *Trichoderma pseudokoningii* (0,1810 U/mg) isoladas do Manguezal de Barra das Jangadas, Pernambuco.

De acordo com a literatura estudada para realização desta pesquisa, nenhum registro foi feito sobre atividade celulásica em Zigomycetes e Ascomycetes. Na presente pesquisa, duas espécies representantes destas classes (*Stilbella clavispora* e *Microsphaeropsis olivacea*) destacaram-se como melhores produtoras de celulase.

Xilanases são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por fungos e bactérias (Bajpai *et al.*, 1994). Os fungos xilanolíticos conhecidos são na maioria Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes. Atenção particular foi concedida as enzimas produzidas por *Aspergillus* (de Vries & Visser, 2001 e Shah & Madamwar,

2004), *Trichoderma* (Wong & Saddler, 1992) e *Penicillium* (Chavéz *et al.*, 2006). Os fungos filamentosos estudados na presente pesquisa, corroboram com os autores acima, pois *Phoma capitulum* (271,4 U/mg) e *Trichoderma aureoviride* (268 U/mg) apresentaram melhores atividades enzimáticas específicas.

Penicillium representa um grupo de fungos sapróbios que crescem nos mais variados substratos orgânicos e produzem hidrolases extracelulares, tais como celulasas e xilanases (Hamlyn *et al.*, 1987). A produção de xilanases por *Penicillium* tem sido estudada em muitas espécies, destacando-se *P. funiculosum* e *P. expansum*. Na presente pesquisa, estas duas espécies foram cultivadas em meio de cultura contendo carboximetilcelulose e apresentaram atividade enzimática de 15,3 U/mg e 13,9 U/mg para *P. funiculosum* e *P. expansum* respectivamente. Resultados superiores foram encontrados para *P. expansum* (26 U/mg) por Querido *et al.*, 2006 e *P. funiculosum* (16 U/mg) por Mishra *et al.*, 1985, ambas cultivadas em meio de cultura contendo farelo de trigo.

A utilização de fungos no tratamento dos mais diversos tipos de efluentes tem sido alvo de inúmeros estudos, especialmente por sua capacidade de produzir enzimas extracelulares (Silva & Esposito, 2004), tais como a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase. Das 50 espécies de fungos filamentosos testadas na presente pesquisa, 25 apresentaram atividade enzimática para fenoloxidasas, destacando-se *Aspergillus sclerotiorum* (739,7569 nanokatals/mg), *Penicillium commune* (8,785982 U/mg) e *Penicillium oxalicum* (28,6021 U/mg/min) como os maiores produtores de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase respectivamente. Estas enzimas atuam sob compostos poluentes recalcitrantes, removendo-os ou transformando-os em outros produtos menos tóxicos (Karam & Nicel, 1997).

Os substratos enzimáticos mais utilizados para a determinação das atividades de lacases, lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP) são o ABTS, o álcool veratrílico e o vermelho de fenol, respectivamente (Kuwahara *et al.* 1984, Tien & Kirk 1984, Bourbonnais & Paice 1988). Estes métodos são simples, versáteis, muito sensíveis e de baixo custo. Durante os ensaios enzimáticos, realizados na presente pesquisa, estes mesmos substratos foram utilizados, exceto para lignina peroxidase, onde foi utilizado o azul de metileno, de acordo com a metodologia descrita por Archibald (1992) e Arora *et al.*, (2002).

Alguns fungos, aparentemente, apresentam os dois tipos de exoenzimas (peroxidases e lacases) enquanto outros podem ter um ou o outro tipo (Tuor *et al.*, 1995; Hofrichter, 2002). Na presente pesquisa, *Penicillium commune* apresentou atividade enzimática para as três enzimas testadas com os seguintes valores: lacase (585, 5585 nanokatal/mg), manganês peroxidase (8,7859 U/mg) e lignina peroxidase (20,1682 U/mg/min).

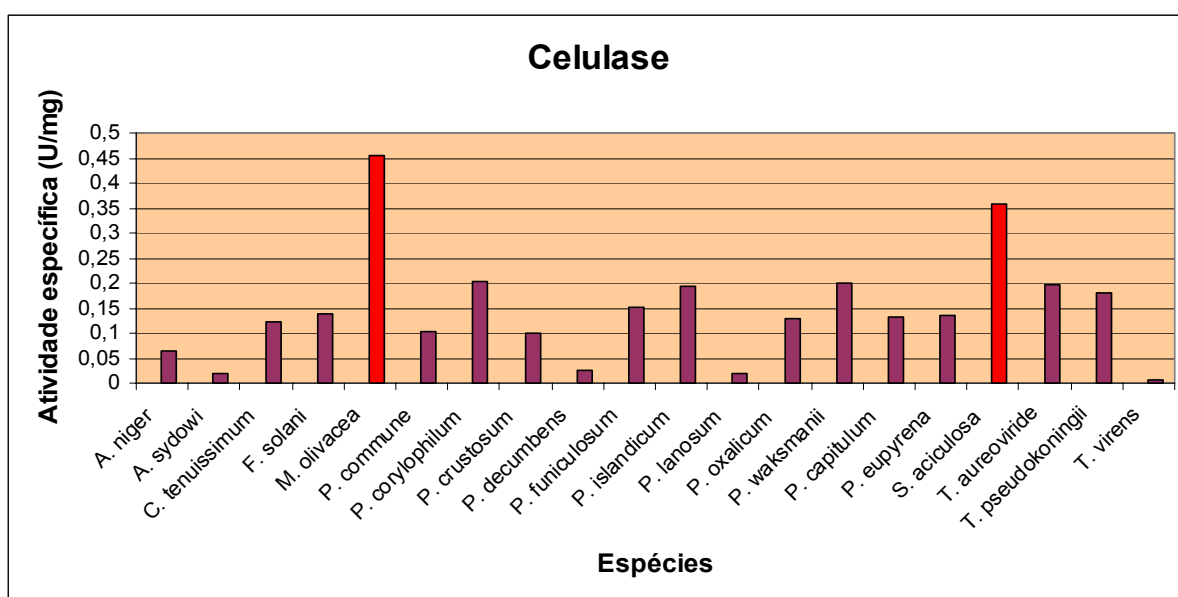


Figura 1. Atividade celulásica (U/mg) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE

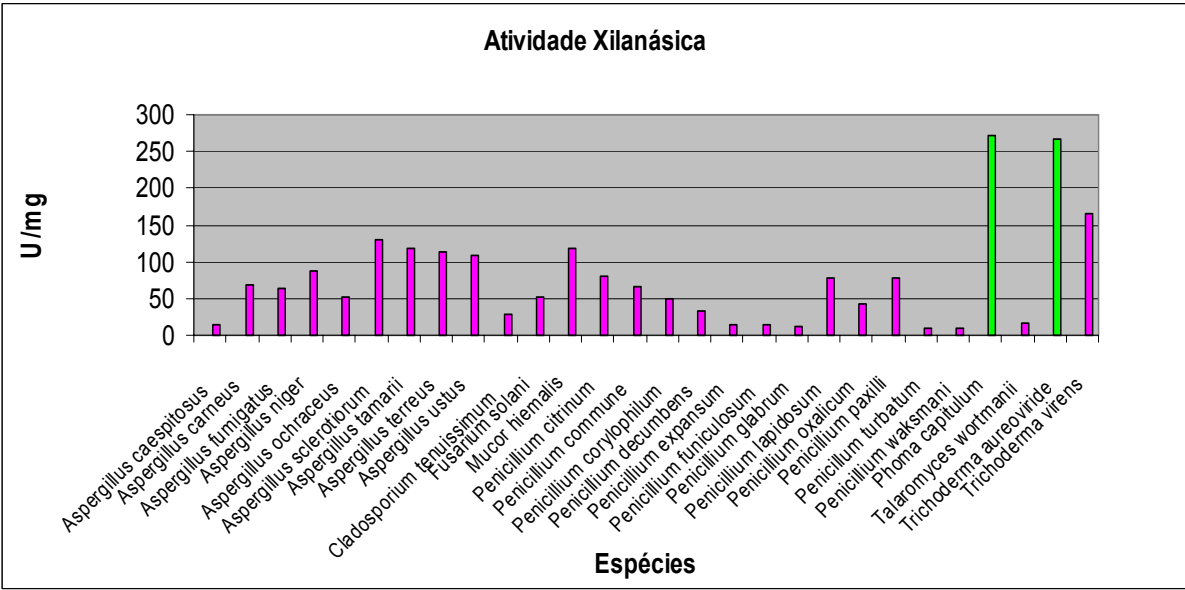


Figura 2. Atividade xilanásica (U/mg) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE

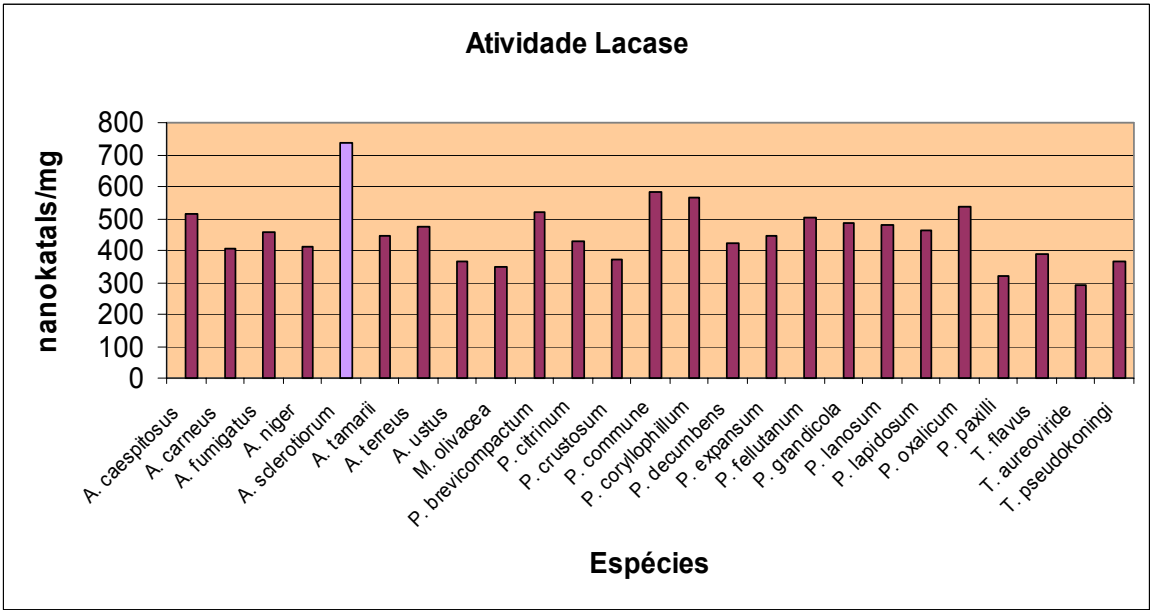


Figura 3. Atividade enzimática específica de lacase (nanokatal/mg) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE.

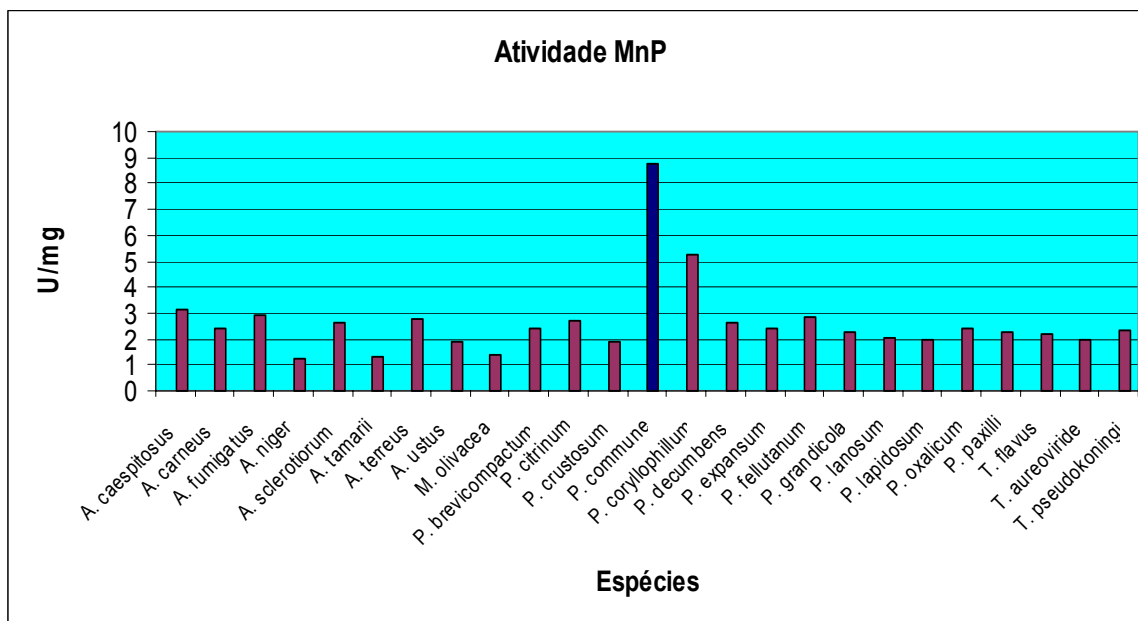


Figura 4. Atividade enzimática específica de manganês Peroxidase (U/mg) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE.

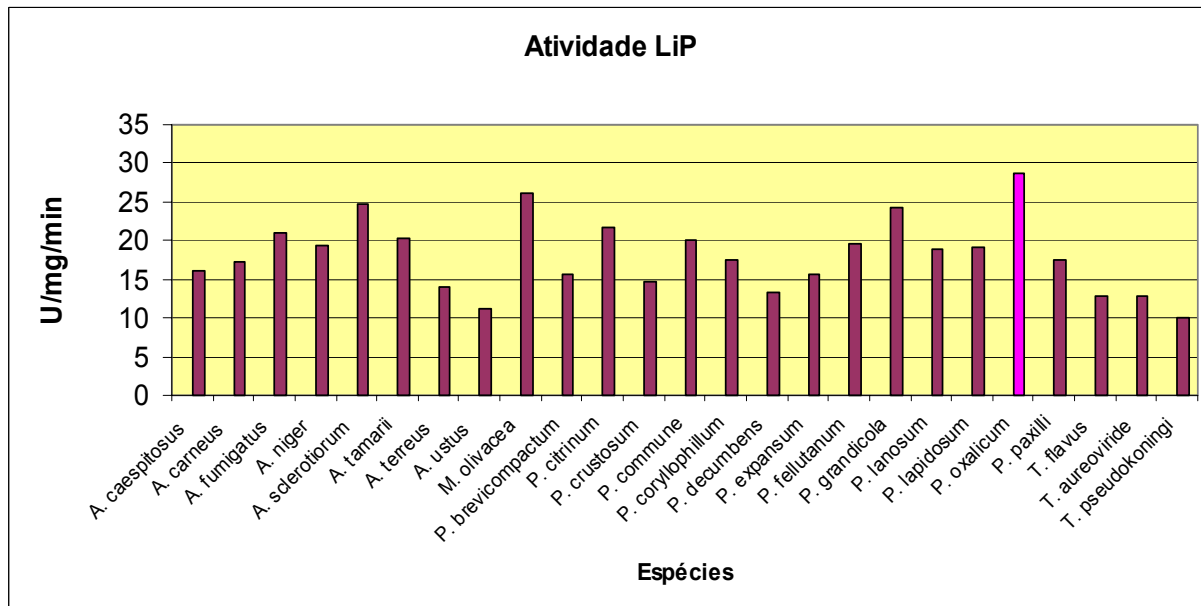


Figura 5. Atividade enzimática específica de lignina peroxidase (U/mg/min) de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Archibald, F.S. A new assay for lignin type peroxidase employing the dye Azure B. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 3110-3116, 1992.

Arora, D.S.; Chander, M.; Gill, P.K. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective lignolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 50, 115-120, 2002.

Bajpai, P.; Bhardwaj, N.K.; Bajpai, P.K.; Jauhari, M.B. *The impact of xylanases on bleaching of eucalyptus Kraft pulp*. Journal of Biotechnology, 38, 1-6, 1994.

Bourbonnais, R.; Paice, M.G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochemical Journal*. 255, 445-450, 1988.

Bradford, M.M.A. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, 1976.

Brum, A.A. *Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de Agaricus brasiliensis em diferentes substratos*. Santa Catarina, 2005, 112p. Dissertação (Mestrado/ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina).

Buchert, J.; Salminen, J.; Siika-Aho, M.; Ranua, M.; Viikari, L. The role of *Trichoderma reesei* xylanase and mannanase in the treatment of softwood kraft pulp prior to leaching. *Holzforschung*, 47, 473-478, 1993.

Bumpus, J.A.; Tien, M.; Wright, D.; Aust, S.D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungi. *Science*, 228, 1434 – 1436, 1985.

Carvalho, S.M.S.; Teixeira, M.F.S.; Esposito, E.; Machuca, A.; Ferraz, A.; Dúran, N. Fungal screening from decayed Laurel and Cedar trees. *Applied Biochemical and Biotechnology*, 37, 150-157, 1992.

Castillo, M.R.; Gutierrez-Correa, M.; Linden, J.C.; Tengerdy, R.P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 16, 967-972, 1994.

Cochet, N. Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile. *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 104-109, 1991.

de Vries, R.P.; Visser, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 497–522, 2001.

Duran, N.; Esposito, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catalysis B. Environmental*, 28, 83 –99, 2000.

Gashe, B.A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. *Journal of Applied Bacteriology* 73:79-82, 1992.

Goldstein, I.S. *Organic chemicals from biomass*. Boca Raton: CRC Press, 1981. 310p.

Gray, T.R.G.; Williams, S.T. *Soil microorganisms*. Logman, Lectures in Botany, The University of Liverpool, 1975.

Hamlyn, P.F.; Wales, D.S.; Sagar, B.F. Extracellular enzymes of *Penicillium*. In: Peberdy, J.F. (Ed.), *Penicillium and Acremonium*. Plenum Press, New York, pp. 245–284, 1987.

Hofrichter, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbial. Technol.*, 30, 454 – 456, 2002.

Kansoh, A.L.; Essam, S.A.; Zeinat, A.N. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. *Polym. Degrad. Stab*, 62, 273-278, 1999.

Kim, S.W.; Kang, S.W.; Lee, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresource Technology* 59, 63-67, 1997.

Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R.L.E.; Kubicek-Pranz, E.M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 90-99, 1993.

Kuhad, R.C.; Singh, A. Enhanced production of cellulases by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation of cellulosic residue. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 100-101, 1993.

Kurasawa, T.; Yachi, M.; Suto, M.; Kamagata, Y.; Takao, S.; Tomita, F. Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 106-110, 1992.

Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M.A. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 169, 247-250, 1984.

Manachini, P.L.; Fortina, M.G.; Parini, C. Purification and properties of an endopolycalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechn. Lett.* 9(3), 219-224, 1987.

Mester, T.; Tien, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 46, 51-59, 2000.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 424-426, 1959.

Mishra, C., Seeta, R., Rao, M., 1985. Production of xylanolytic enzymes in association with the cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 295-299.

Velazquez-Cedeño, M.A.; Mata, G.; Savoie, J.M. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 201-207, 2002.

Vassilev, N.; Baca, M.T.; Vassileva, M. Plant lignocellulose and decomposition by fungi: from nature to industrial use. *Mycologist*, 8, 113-114, 1994.

Wong, K.K.Y.; Tam, L.U.L.; Saddler, J.N. Multiplicity of 1,4 xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52, 305-317, 1988.

Oliveira, L.A.; Porto, A.L.F; Tambourgi, E.B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 2006, 97, p. 862 – 867.

Sirinivasan, C.; D'Souza, T.M.; Boominathan, K.; Reddy, C.A. Demonstration of laccase in the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM – F1767. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61:12, p. 4274 – 4277.

Teixeira, M.F.S. 1994. Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Teixeira, M.F.S. 1997. Otimização da produção de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus japonicus* 586. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco.

Tien, M. & Kirk, T.K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science*. 81: 2280-2284.

Tuor, U.; Winterhalter, K.; Fiechter, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, v. 41, p. 1-17, 1995.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- Os fungos anamórficos são predominantes no sedimento do manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco;
- *Gongronella butleri* e *Stilbella aciculosa*, são consideradas primeira ocorrência em sedimento de manguezal para o Brasil;
- Com relação à abundância dos fungos isolados, verificou-se que houve maior incidência de fungos no período de estiagem e nos pontos 1 e 3, localizados ao longo do Rio Jaboatão;
- Na análise enzimática qualitativa, das 50 espécies testadas, 21 apresentaram reação positiva para degradação de compostos fenólicos;
- *Aspergillus niger*, *Penicillium commune*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. oxalicum* e *Trichoderma aureoviride* apresentaram potencial enzimático para todas as enzimas testadas;
- Os fungos filamentosos testados demonstraram potencial para serem introduzidos em processos biotecnológicos.

ANEXOS

Normas gerais para publicação de artigos na **Brazilian Journal of Microbiology**

A **Brazilian Journal of Microbiology** destina-se à publicação de trabalhos de pesquisa originais, notas breves e, ocasionalmente, revisões, envolvendo todos os aspectos da microbiologia. Os textos submetidos à publicação devem ser redigidos em inglês, e conter Título, Resumo e Palavras-chave também em português. A **Brazilian Journal of Microbiology** tem uma política muito severa de avaliação dos trabalhos submetidos à publicação, sendo cada manuscrito avaliado por pelo menos dois revisores criteriosamente selecionados.

Publicação de um manuscrito

Manuscritos são aceitos para publicação somente após criticamente revisados. Os trabalhos são avaliados por revisores indicados pelo Editores. Após a revisão, os manuscritos são devolvidos para o autor indicado, para as correções sugeridas pelos revisores, quando necessárias. Os autores devem retornar o novo texto para os Editores. O autor indicado recebe uma notificação sobre o recebimento, a aceitação ou a recusa de um trabalho submetido à publicação.

Quando um manuscrito é aceito, o autor indicado é avisado sobre a necessidade de envio de um disquete de computador contendo o texto. O autor indicado receberá provas tipográficas para correção, que deverão ser cuidadosamente revisadas de acordo com as instruções enviadas e devolvidas no prazo de 5 dias.

Preparação do texto

Geral

1. Todos os manuscritos devem ser datilografados em espaço duplo, com

amplas margens, com as páginas numeradas em seqüência. Trabalhos de pesquisa devem ter no máximo 15 páginas impressas, incluindo figuras e tabelas. Notas breves devem ter no máximo 6 páginas.

2. Todos os manuscritos devem ser redigidos em inglês. Os Editores recomendam que, antes de ser submetido, o texto seja cuidadosamente revisado por alguém fluente em inglês. Manuscritos em inglês precário não serão aceitos.

3. O texto deve ser organizado em tópicos, conforme descrito no próximo parágrafo. O nome dos tópicos deve ser digitado em letras maiúsculas (ABSTRACT, INTRODUCTION etc.). A citação de tabelas e de figuras deve iniciar com maiúsculas (as shown in Table 1..., as presented in Fig. 2..., etc.).

4. A abreviação de palavras e de símbolos deve seguir as recomendações da IUPAC-IUB Commission. O Sistema Métrico deve ser adotado em todo o texto.

5. Como regra, as referências devem ser citadas por seus números. Excepcionalmente, quando autores são mencionados no texto, a menção deve ser feita de acordo com os seguintes exemplos: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número) mentioned that... Não utilizar letras maiúsculas.

6. Aos autores dos trabalhos aceitos para publicação será solicitado o envio de um disquete de 3 1/2" contendo o trabalho digitado em um processador de texto adequado para PC. Esse material pode ser enviado também por correio eletrônico.

Organização

Página de título: Uma página separada deve conter o título do trabalho, o nome completo (inclusive o primeiro nome e as iniciais intermediárias) e a afiliação de cada autor. Um asterisco deve indicar o autor para correspondência. Os números de telefone e fax e o endereço eletrônico, quando disponível, devem ser assinalados no pé da página. A página de título não deve ter nenhum texto. O título deve ser o mais conciso possível e indicar claramente o objetivo do trabalho, não devendo conter abreviações. Expressões do tipo "Effects of...", "Influence of...", "Study on..." etc. devem ser evitadas. O título deve ser preparado com muito cuidado pois ele é utilizado nos sistemas de busca.

Abstract: Deve ser apresentado em uma página separada, limitando-se a no máximo 250 palavras. Ele deve resumir o conteúdo básico do trabalho, devendo ser compreensível mesmo sem a consulta do texto completo. Um *abstract* não deve conter referências, tabelas ou abreviações incomuns. *Abstracts* devem ser preparados com muito cuidado pois são publicados em textos de referência e lidos por pessoas que não têm acesso ao trabalho completo. Três a cinco *keywords* também devem ser apresentados.

Resumo: *Resumo* é o *abstract* redigido em português. Sua preparação deve seguir as recomendações para a preparação do *abstract* em inglês. O *resumo* deve ter também um título em português. As regras para o título em português são as mesmas para o título em inglês (ver acima). Três a cinco *palavras-chave* também devem ser apresentadas. O *resumo* e o título em português também devem ser apresentados em página separada.

Introdução: Deve iniciar em página nova e fornecer ao leitor informações suficientes para que os resultados relatados no trabalho possam ser avaliados sem consulta à literatura. Entretanto, a *introduction* não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve também dar subsídios para a compreensão dos objetivos do trabalho que está sendo apresentado.

Materiais e Métodos: Esse tópico deve fornecer informações suficientes para a repetição do trabalho. Descrição repetida de detalhes de técnicas anteriormente publicadas deve ser evitada. Quando um método publicado é modificado pelos autores, essas modificações devem constar do texto. A origem de reagentes, meios de cultura e equipamentos (companhia, cidade, estado, país) deve ser mencionada. Nomes comerciais e marcas registradas também devem ser indicados. A utilização de subtópicos geralmente facilita a leitura e a compreensão desse item.

Resultados: Esse tópico deve, através de texto, tabelas ou figuras, fornecer os resultados experimentais. Caso um tópico relativo à *Discussion* seja incluído, evitar a excessiva interpretação dos resultados, que deverá ser feita na *Discussion*. Caso *Results* e *Discussion* sejam combinados em um único tópico, os resultados devem ser discutidos no texto quando adequado. Tabelas devem ser numeradas independentemente das figuras, devendo-se utilizar números arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto. A localização mais adequada das tabelas e figuras deve ser assinalada.

Discussão: Deve fornecer a interpretação dos resultados em função das informações disponíveis.

Agradecimentos: Esse tópico é opcional e deve vir após a discussão. Destina-se a agradecimentos por apoio financeiro e pessoal.

Referências: A lista de referências bibliográficas deve ser apresentada em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro autor. Todos os autores devem ser mencionados. As referências devem ser numeradas em ordem crescente. Cada referência deve ser citada no texto por seu número. Os nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com o sistema utilizado pelo *Biological Abstracts* ou *Chemical Abstracts*. Todas as referências mencionadas na lista devem ser citadas no texto, assim como todas as referências citadas no texto devem constar da lista. Seguir os seguintes exemplos:

a. Artigo em revista

Campos, L.C.; Whittam, T.S.; Gomes, T.A.T.; Andrade, J.R.C.; Trabulsi, L.R. *Escherichia coli* serogroup 0111 includes several clones of diarrhaegenic strains with different virulence properties. *Infect. Immun.*, 62:3282-3288, 1994.

b. Trabalho ou capítulo em livro

Nelson, E.B. Current limits to biological control of fungal phytopathogens. In: Arora, D.K.; Rai, B.; Mukerji, K.G.; Knudsen, G. (eds). *Handbook of applied mycology: soils and plants*. Marcel Dekker, New York, 1991, p.327-355.

c. Livro pelos autores

Salyers, A.A.; Whitt, D.D. *Bacterial pathogenesis. A*

molecular approach. ASM, Washington, 1994, 418p.

d. Patente

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. Manufacture of cottage cheese. *U.S. Pat.* 3,117,870. Jan.14, 1964.

e. Tese

Calzada, C.T. *Campylobacter jejuni e Campylobacter coli – caracterização em sorogrupos e biotipos das cepas isoladas no município de São Paulo no período de 1983-1989*. São Paulo, 1991, 131p. (Ph.D. Thesis. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Publicação com autor ou editor desconhecido

Anonymous. The economy of by-products. *Alcool Alcoolquim.*, 2: 33-40, 1985.

g. Comunicações em eventos (Simpósios, Conferências etc.)

Simões, G.S.; Silva, J.; Toledo, A.S.; Gontijo Filho, P.P. *Micobactérias não tuberculosas isoladas de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida*. XVII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, 1993, p.41.

Referências como *personal communication* ou *unpublished data* devem ser evitadas, embora algumas vezes elas sejam necessárias. Nesses casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências bibliográficas. Referências a respeito de trabalhos *accepted for publication* ou *in press* podem ser utilizadas. No entanto, referências de trabalhos *submitted* ou *in preparation* não devem ser utilizadas.

Tabelas

As tabelas não devem estar no meio do texto. Cada tabela deve ser apresentada em uma página separada e numerada em sequência empregando números arábicos. O título da tabela deve aparecer no topo, e descrever de maneira clara as informações apresentadas. Títulos e subtítulos devem ser concisos, apresentando os dados em colunas e linhas, cuidadosamente arranjadas.

Figuras

As figuras devem ser identificadas com números arábicos. Dados apresentados em tabelas não devem ser repetidos nas figuras. A legenda deve vir no pé da figura.

Fotografias e desenhos

Apenas fotografias extremamente necessárias para a compreensão do

trabalho devem ser apresentadas. Sua qualidade deve ser suficiente para garantir boa reprodução. As fotografias devem ser numeradas no verso e identificadas com o nome do autor. No caso de desenhos, os detalhes devem ter qualidade suficiente para permitir redução. Desenhos e figuras devem ser desenhados ou impressos em preto e devem ser preparados como indicado para as fotografias. Ilustrações coloridas não são aceitas.

Cópias

O autor indicado receberá gratuitamente quinze cópias do trabalho. Cópias adicionais, pagas, devem ser requisitadas no retorno da prova gráfica corrigida.