



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA –
REDE BIONORTE

AVALIAÇÃO DE ENZIMAS DE FUNGOS DA AMAZÔNIA VISANDO A MELHORA
DO PROCESSAMENTO DAS FIBRAS DA MALVA (*Urena lobata* L., 1753)

SARAH RAQUEL SILVEIRA DA SILVA SANTIAGO

MANAUS-AM
2022

SARAH RAQUEL SILVEIRA DA SILVA SANTIAGO

**AVALIAÇÃO DE ENZIMAS DE FUNGOS DA AMAZÔNIA VISANDO A MELHORA
DO PROCESSAMENTO DAS FIBRAS DA MALVA (*Urena lobata* L., 1753)**

Tese de doutorado ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

**MANAUS-AM
MARÇO/2022**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S235a Santiago, Sarah Raquel Silveira da Silva
Avaliação de enzimas de fungos da Amazônia visando a melhora do processamento das fibras da malva (*Urena lobata* L., 1753). / Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago . 2022
108 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Queiroz Lima de Souza
Coorientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Urena lobata*. 2. Lignocelulases. 3. Fungos endofíticos. 4. Fungos do solo. I. Souza, Antonia Queiroz Lima de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

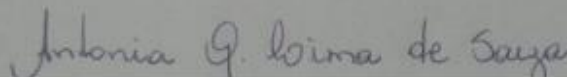
SARAH RAQUEL SILVEIRA DA SILVA SANTIAGO

**AVALIAÇÃO DE ENZIMAS DE FUNGOS DA AMAZÔNIA VISANDO A MELHORA
DO PROCESSAMENTO DAS FIBRAS DA MALVA (*Urena lobata* L., 1753)**

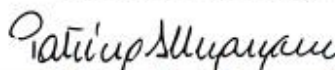
Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 29/03/2022

Banca examinadora



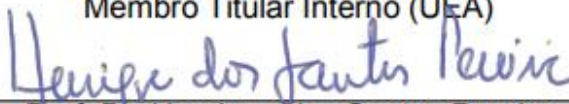
Prof. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza
Presidente (UFAM)



Prof. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque
Membro Titular Interno (UEA)



Prof. Dr. Jair Max Furtunato Maia
Membro Titular Interno (UEA)



Prof. Dr. Henrique dos Santos Pereira
Membro Titular Externo (UFAM)



Documento assinado digitalmente
JAIR MAX FURTUNATO MAIA
Data: 04/05/2022 11:35:12-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>



Documento assinado digitalmente
LEONOR ALVES DE OLIVEIRA DA SILVA
Data: 19/04/2022 10:20:57-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Leonor Alves de Oliveira da Silva
Membro Titular Externo (UFPE)

AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai todo-poderoso e misericordioso que me sustentou e fortaleceu para chegar ao fim dessa jornada.

Ao meu amado esposo, companheiro e amigo, Paulo Alexandre Lima Santiago, por todo amor, cuidado, apoio, esforço, paciência, ensinamentos e colaboração ao longo de todo o trabalho.

Aos meus pais Janete Silveira da Silva e Waldenilson Rebelo da Silva por todo apoio, cuidado e compreensão durante todo o processo.

À minha querida orientadora Dr^a Antonia Queiroz Lima de Souza por mais essa oportunidade de aprendizado, pelo companheirismo, dedicação, ensinamentos e confiança para execução dessa pesquisa juntamente com o meu co-orientador Dr. Afonso Duarte Leão de Souza.

Aos companheiros de laboratório Marta Oliveira, Rafael Rodrigues, Anderson Nogueira, Ricardo Katak, Ketlen Ohse, Phellipe Bieler, Thalita Alves, Elison Sevalho, Douglas Couceiro por toda ajuda e parceria.

Ao Programa de Pós-Graduação Bionorte pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa concedida e auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pelos recursos financeiros para a execução deste trabalho.

“Fiz o melhor que pude na corrida, cheguei até o fim, conservei a fé.”

2 Timóteo 4:7

SANTIAGO, Sarah Raquel Silveira da Silva, **Avaliação de enzimas de fungos da Amazônia visando a melhora do processamento das fibras da malva (*Urena lobata* L., 1753).** 2022. 108 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

RESUMO

O cultivo de malva (*Urena lobata*) para a produção de fibras é cultural no Estado do Amazonas desde 1970 com a imigração japonesa e essas fibras tiveram seus altos e baixos na economia local ao longo do tempo. Atualmente são cultivadas por ribeirinhos sendo uma das principais culturas do Estado do Amazonas. Os malvicultores encontram várias adversidades no processo de obtenção da fibra, tais como onicomicoses, dermatoses, além do risco de ataques de animais peçonhentos. A região Amazônica é potencialmente rica em microrganismos e dentre estes estão os fungos endofíticos, fungos associados a ambientes aquáticos e ao solo. No capítulo I, apresenta-se os microrganismos isolados e preservados dos tecidos da malva *in natura* e macerada, além dos ambientes associados ao seu plantio, obtendo-se 191 fungos preservados de um total de 344 microrganismos isolados. Os fungos foram agrupados e 10% do total de cada grupo foi sequenciado obtendo-se 24 espécies diferentes com potenciais biotecnológicos relatados na literatura científica. No capítulo II as linhagens *Fusarium pseudocircinatum* (1290) e *Corynespora torulosa* (1291) foram avaliadas quanto ao seu potencial de produção de lignocelulases usando como substrato a malva seca e triturada nas soluções de sais minerais Manachini e GLBN 40 ao longo de 10 dias sob agitação em cultivo submerso. Os extratos enzimáticos foram filtrados em sistema de filtração a vácuo (Millipore 0,22 µm) e quantificadas as atividades de lignocelulases. *C. torulosa* foi o melhor produtor de lacase (8.691 U/L), MnP (5.353 U/L), β-glicosidase (0,3285 U/mL) e CMCase (0,7038 U/mL) e o *F. pseudocircinatum* foi o melhor produtor de FPase (1,29 U/mL), xilanase (12,05 U/mL) e pectinase (0,18 U/mL). Nenhuma das linhagens apresentou atividade de Lignina Peroxidase. No capítulo III as linhagens *F. pseudocircinatum*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Talaromyces pratensis* foram avaliadas quanto à produção de pectinase variando a temperatura (28, 30 e 32° C), pH (4, 5 e 6) e tempo de cultivo (3, 4 e 5 dias) utilizando malva seca (5%) como substrato em cultivo submerso. O *F. pseudocircinatum* apresentou o maior pico de produção de pectinase (0,2261 U/mL) nas condições de ensaio 28° C, pH 6, no 4° dia de cultivo. Nestas condições, 23 fungos foram testados quanto à produção de pectinase e as três melhores linhagens [*F. pseudocircinatum* (1290) 0,2261 U/mL, *Westerdykella dispersa*, (1321) 0,2113 U/mL e *Diaporthe eucalyptorum*, (1300) 0,1981 U/mL] foram submetidos à quantificação de xilanase [1290 (4,6113 U/mL), 1321 (2,7388 U/mL) e 1300 não apresentou atividade] e CMCase [1300 (0,1003 U/mL), 1321 (0,0887 U/mL) e 1290 não apresentou atividade]. As linhagens 1290 e 1321 foram selecionadas para a produção em escala maior e para o ensaio de desfibramento onde talos de malva (10 cm) foram submersos em solução enzimática nas concentrações 50, 100 e 200 mg/mL, temperatura de 40 e 50° C e analisados com 3, 5 e 7 dias. Ambos os extratos enzimáticos promoveram o amolecimento da fibra e desfibramento. O extrato da linhagem de *F. pseudocircinatum* (1290), temperatura de 40° C, 200 mg/mL e 7 dias de incubação foi mais eficiente no desfibramento de malva possibilitando a redução do tempo de maceração desta. O potencial de enzimas fúngicas para o processamento da malva em busca de uma alternativa que proporcione a redução do tempo de desfibramento e aprimore a qualidade das fibras foi comprovado com esta pesquisa.

Palavras-chave: *Urena lobata*, Lignocelulases, Fungos endofíticos, Fungos do solo.

SANTIAGO, Sarah Raquel Silveira da Silva, **Evaluation of fungal enzymes from the Amazon to improve the processing of caesarweed fibers (*Urena lobata* L., 1753).** 2022. 108 f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – State University of Amazonas, Manaus, 2022.

ABSTRACT

The cultivation of caesarweed (*Urena lobata*) is cultural in the State of Amazonas since 1970 and the production of these fibers has had its ups and downs in the local economy. Currently, they are cultivated by riverside dwellers, being one of the main crops in the State of Amazonas. Malviculturists face some adversities in the process of obtaining fiber, such as onychomycosis, dermatoses, in addition to the risk of attacks by venomous animals. The Amazon region is potentially rich in microorganisms and among these are endophytic fungi, fungi associated with aquatic environments and soil. In chapter I, the microorganisms isolated and preserved from the tissues of in natura and macerated caesarweed are presented, in addition to the environments associated with their planting, obtaining 191 preserved fungi from a total of 344 isolated microorganisms. The fungi were grouped and 10% of the total of each group was sequenced, obtaining 24 different species with biotechnological potentials reported in the literature. In chapter II, *Fusarium pseudocircinatum* (1290) and *Corynespora torulosa* (1291) strains were evaluated for their potential for lignocellulase production using dried and crushed caesarweed as substrate in Manachini and GLBN 40 mineral salt solutions over 10 days under agitation, in submerged cultivation. The enzymatic extracts were filtered in a vacuum filtration system (Millipore 0.22 µm) and the lignocellulases activities were quantified. *C. torulosa* was the best producer of laccase (8,691 U/L), MnP (5,353 U/L), β-glucosidase (0.3285 U/mL) and CMCase (0.7038 U/mL) and *F. pseudocircinatum* was the best producer of FPase (1.29 U/mL), xylanase (12.05 U/mL) and pectinase (0.18 U/mL). None of the strains showed Lignin Peroxidase activity. In chapter III, the strains *F. pseudocircinatum*, *Trichoderma longibrachiatum* and *Talaromyces pratensis* were evaluated for pectinase production varying the temperature (28, 30 and 32° C), pH (4, 5 and 6) and cultivation time (3, 4 and 5 days) using dry caesarweed (5%) as substrate in submerged cultivation. *F. pseudocircinatum* showed the highest peak of pectinase production (0.2261 U/mL) under test conditions 28 °C, pH 6, on the 4th day of cultivation. Under these conditions, 18 fungi were tested for pectinase production and the three best strains [*F. pseudocircinatum* (1290) 0.2261 U/mL, *Westerdykella dispersa*, (1321) 0.2113 U/mL] and *Diaporthe eucalyptorum*, (1300) 0.1981 U/mL] were subjected to xylanase quantification [1290 (4.6113 U/mL), 1321 (2.7388 U/mL) and 1300 showed no activity] and CMCase [1300 (0.1003 U/mL), 1321 (0.0887 U/mL) and 1290 showed no activity]. Strains 1290 and 1321 were selected for production on a larger scale and for the shredding test where caesarweed stalks (10 cm) were submerged in an enzymatic solution at concentrations of 50, 100 and 200 mg/mL, at temperatures of 40 and 50 °C and collected at 3, 5 and 7 days. Both enzymatic extracts promoted fiber softening and defibration. The extract of the strain of *F. pseudocircinatum* (1290), temperature of 40 °C, 200 mg/mL and 7 days of incubation was more efficient in the defibration of caesarweed, allowing the reduction of the maceration time. Therefore, this research aimed to evaluate the potential of fungal enzymes for the processing of caesarweed in search of an alternative that provides a reduction in the defibering time and improves the quality of the fibers.

Key words: *Urena lobata*, Lignocellulases, Endophytic fungi, Soil fungi.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	1
Figura 1: <i>Urena lobata</i> L.	4
Figura 2: Produção Brasileira de juta e malva em toneladas.	6
Figura 3: Processo produtivo da fibra de juta e malva.	7
Figura 4: Distribuição de sementes pela cooperativa.	8
Figura 5: Semeio de malva na vazante do rio Solimões.	9
Figura 6: Malvicultor com feixes de malva recém cortada.	9
Figura 7: Processo de maceração onde as fibras ficam imersas para o posterior desfibramento.	10
Figura 8: Processo de desfibramento onde os agricultores ficam imersos durante horas diariamente.	10
Figura 9: Fibras secando ao sol e ar livre em varais.	11
Figura 10: Fardos de fibra empilhadas no paiol do agricultor.	11
Figura 11: Pesagem dos fardos de fibra.	12
Figura 12: Estrutura da parede celular das células vegetais.	13
CAPÍTULO I	33
Figura 1: Ambientes associados ao cultivo da malva	36
Figura 2: Gráfico das porcentagens de microrganismos totais conservados.	39
Figura 3: Árvore filogenética da diversidade fúngica relacionada à malva no Amazonas.	42
CAPÍTULO II	73
Figure 1. Strain 1291, <i>Corynespora torulosa</i>	80
Figure 2. Strain 1290, <i>Fusarium pseudocircinatum</i>	80
Figure 3. FPase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (<i>Urena lobata</i>) in the State of Amazonas – Brazil.	81
Figure 4. CMCase and β -glycosidase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (<i>Urena lobata</i>) in the State of Amazonas – Brazil.	81
Figure 5. Xylanase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (<i>Urena lobata</i>) in the State of Amazonas – Brazil.	82
Figure 6. Pectinase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (<i>Urena lobata</i>) in the State of Amazonas – Brazil.	83
Figure 7. Laccase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (<i>Urena lobata</i>) in the State of Amazonas – Brazil.	83
Figure 8. Manganese peroxidase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (<i>Urena lobata</i>) in the State of Amazonas – Brazil.	84
CAPÍTULO III	88
Figura 1. Protocolo de desfibramento de malva.	94
Figura 2. Gráfico de padronização da produção de pectinase com as variações de temperatura, pH e dias de cultivo.	95
Figura 3. Produção de pectinase por diferentes fungos em cultivo submerso em solução de Manachini, 28° C, pH 6, filtrado no 4° dia de cultivo.	96

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Diferentes características nos processos de cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso (CS).	22
--	----

CAPÍTULO I

Tabela 1: Fungos filamentosos isolados de todos os tecidos e ambientes coletados.	40
Tabela 2: Distribuição por grupos dos fungos conservados.	41
Tabela 3. Identificação molecular das linhagens 1306, 1307, 1308 e 1309.	43
Tabela 4. Identificação molecular das linhagens 1290, 1317, 1324, 1325 e 1326.	45
Tabela 5. Identificação molecular das linhagens 1292, 1293, 1294, 1295, 1296, 1297, 1298, 1299, 1300.	47
Tabela 6. Identificação molecular da linhagem 1304.	50
Tabela 7. Identificação molecular das linhagens 1310, 1311, 1312.	51
Tabela 8. Identificação molecular da linhagem 1303.	52
Tabela 9. Identificação molecular das linhagens 1315.	53
Tabela 10. Identificação molecular das linhagens 1291, 1322 e 1323.	54
Tabela 11. Identificação molecular da linhagem 1301.	55
Tabela 12. Identificação molecular da linhagem 1302.	56
Tabela 13. Identificação molecular da linhagem 1305.	57
Tabela 14. Identificação molecular da linhagem 1313.	57
Tabela 15. Identificação molecular da linhagem 1314.	58
Tabela 16. Identificação molecular da linhagem 1316.	59
Tabela 17. Identificação molecular da linhagem 1318.	60
Tabela 18. Identificação molecular da linhagem 1319.	60
Tabela 19. Identificação molecular da linhagem 1320.	61
Tabela 20. Identificação molecular da linhagem 1321.	63

CAPÍTULO III

Tabela 1. Linhagens utilizadas na produção enzimática de pectinase.	91
Tabela 2. Quantificação enzimática de xilanase, pectinase e CMCase por fungos associados à malva na Amazônia.	97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	3
Geral:	3
Específicos:	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 MALVA	4
2.2 ASPÉCTOS SÓCIOECONÔMICOS DA MALVA	5
2.3 PROCESSO PRODUTIVO DAS FIBRAS DE MALVA	7
2.4 COMPOSIÇÃO DOS LIGNOCELULÓSICOS	12
2.5 DIVERSIDADE MICROBIANA	14
2.5.1 Microrganismos endofíticos	15
2.5.2 Microrganismos de solo	15
2.5.3 Microrganismos de ambientes aquáticos	16
2.6 FUNGOS PRODUTORES DE LIGNOCELULASES	16
2.7 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS E SUAS APLICAÇÕES	18
2.8 PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOTÍICAS DE ORIGEM MICROBIANA	21
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO I: BIODIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E DE AMBIENTES ASSOCIADOS A <i>Urena lobata</i> L., (1753) NA AMAZÔNIA	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 LOCAL DE COLETA E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DA MALVA E SEU HABITAT	35
2.2 PURIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	37
2.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR	37
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	39
3.1 FREQUÊNCIAS DOS ISOLADOS	39
4. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO II: Evaluation of enzymatic production of hydrolases and oxyredutases by <i>Fusarium pseudocircinatum</i> and <i>Corynespora torulosa</i> isolated from caesarweed (<i>Urena lobata</i> L., 1753)	73
1. Introduction	74
2. Methodology	75
2.1 Microorganisms	75
2.2 Morphological and molecular identification	76
2.2.1 DNA extraction	76
2.2.2 Bioinformatics sequencing and analysis	76
2.3 Submerged cultivation and obtaining of enzyme extracts	76
2.4 Determination of enzymatic activities	77
2.4.1 Determination of total cellulase activity (FPase)	77
2.4.2 Determination of β -glycosidase (BGL) activity	77
2.4.3 Determination of the enzymatic activity of xylanase and CMCase	77
2.4.4 Determination of pectinase activity	77
2.4.5 Determination of enzymatic activity of laccase	78
2.4.6 Determination of manganese peroxidase (MnP) enzymatic activity	78
2.4.7 Determination of lignin peroxidase (LiP) enzyme activity	78
3. Results and discussion	79

3.1 Molecular identification	79
3.2.1 Determination of activity of total cellulases (FPase)	80
3.2.2 Determination of the enzymatic activity of CMCase and β -glycosidase.....	81
3.2.3 Determination of xylanase enzyme activity	82
3.2.4 Determination of pectinase activity	82
3.2.5 Determination of enzymatic activity of laccase	83
3.2.6 Determination of enzymatic activity of MnP	84
3.2.7 Determination of LiP enzymatic activity.....	84
4. Conclusion	85
Acknowledgments	85
References.....	85
CAPÍTULO III: DESFIBRAMENTO DA MALVA (<i>Urena lobata</i> L., 1753) POR ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS PRODUZIDAS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS	88
1. INTRODUÇÃO	89
2. MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1 MICRORGANISMOS.....	90
2.2 PADRONIZAÇÃO CULTIVO SUBMERSO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS	91
2.3 QUANTIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	92
2.3.1 Determinação da atividade de Poligalacturonase	92
2.3.2 Determinação da atividade enzimática de Xilanase	92
2.3.3 Determinação da atividade enzimática de CMCase	93
2.4 ESCALA LABORATORIAL.....	93
2.5 TESTE DE DESFIBRAMENTO	93
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.1 CULTIVO SUBMERSO DA PRADRONIZAÇÃO	94
3.2 TESTE DE DESFIBRAMENTO	98
4. CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
PERSPECTIVAS	108

1. INTRODUÇÃO

A cultura de malva (*Urena lobata* L., 1753) e juta (*Corchorus capsularis* L., 1753) tem importância nacional no setor produtivo de fibras e diversas famílias ribeirinhas sobrevivem dos seus cultivos na região Amazônica. O baixo Amazonas é reconhecidamente o local de desenvolvimento de tais culturas que são plantadas na beira do rio Solimões de outubro a dezembro na vazante e colhida na cheia, geralmente em meados de maio e junho (SILVA e FRAXE, 2012; MACIEL, 2015).

Tais fibras orgânicas são muito utilizadas na produção de sacarias e os países que possuem extensa tradição no cultivo são Bangladesh, Índia e Paquistão. Por volta de 1920, chegaram ao Brasil as primeiras sementes oriundas desses países, onde as primeiras experiências com o plantio de juta ocorreram em 1929 através da Companhia Industrial Amazonense S.A., no município de Parintins – Amazonas. O plantio da malva iniciou-se em 1971 no Amazonas, como substituição do cultivo de juta diante da similaridade das duas culturas e melhor poder germinativo por parte das sementes da malva possibilitando um armazenamento prolongado quando comparado à juta (MEDEIROS e FRAXE, 2008; COELHO, 2017).

A cadeia produtiva dessas fibras é realizada de maneira artesanal e praticamente inalterada desde a introdução da juta em meados de 1930, não atendendo ao requisito de sustentabilidade diante das condições precárias de trabalho dos malvicultores e juticultores. Os agricultores aproveitam a cheia do rio para imergir a juta e a malva que fica submersa durante 15-21 dias, tempo necessário para a mercerização das fibras (FRAXE, 2000; HOMMA, 2010; MACIEL, 2015). Nesta etapa, os agricultores ficam parcialmente imersos na água e dependendo da cheia, podem ficar com água na altura do pescoço expondo-se aos perigos naturais das regiões de várzea como ataques de animais peçonhentos além de adquirirem doenças ocasionadas pelo ofício.

Diante dessas problemáticas, busca-se alternativas para melhorar as condições de trabalho dos agricultores e otimizar o processo de extração da fibra. Vários fungos associados a diversas culturas tais como os endofíticos, possuem um amplo potencial biotecnológico na produção de metabólitos secundários com importâncias múltiplas como atividade anti-câncer, atividade antimicrobiana, atividade inseticida, estimulantes de crescimento vegetal, proteção de culturas e fitorremediação (SUDHA *et al.*, 2016). Endófitos isolados de plantas medicinais possuem fortes metabólitos fungicidas, bactericidas e citotóxicos, além de produzirem enzimas que podem ser usadas em várias finalidades tais como degradação e biotransformação de compostos orgânicos (WANG *et al.*, 2007; PIMENTEL *et al.*, 2011). As ligninocelulases são amplamente utilizadas em diversos setores e em especial, no setor têxtil que são utilizadas para o aprimoramento de fibras vegetais e melhoramento das etapas de produção.

A partir de um protocolo de desfibramento que otimize o processo e o produto final, seria possível obter condições de trabalho mais dignas, redução da exposição à doenças e riscos eminentes, além de benefícios financeiros a inúmeras famílias da região Amazônica. O conhecimento da biodiversidade associado à cultura de malva e seus ambientes associados são de extrema importância para a comunidade científica, pois a partir disso é possível o avanço nas pesquisas no que tange a melhoria das culturas de malva e juta, além da utilização dos mesmos na geração de produtos biotecnológicos de interesse industrial.

1.2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar o potencial de enzimas fúngicas para o processamento da malva (*Urena lobata* L.) em busca de uma alternativa que proporcione a redução do tempo de desfibramento e aprimore a qualidade das fibras.

Específicos:

- 1-Investigar a diversidade de fungos endofíticos de *U. lobata* L. e dos locais associados ao seu plantio na região Amazônica;
- 2-Avaliar o potencial lignocelulolítico dos fungos obtidos a partir do item 1, utilizando como substrato indutor a malva;
- 3-Selecionar os três melhores fungos produtores de pectinase e xilanase apontados no item 2;
- 4-Estabelecer um protocolo para o desfibramento da malva a partir da utilização de enzimas fúngicas produzidas pelos fungos selecionados no item 3;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MALVA

A malva é uma planta anual e perene nos trópicos que pertence ao Reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Malvales, família Malvaceae e espécie *Urena lobata* (BENZZONI, 1973). Mede entre 0,6 a 3 m de altura com até 7 cm de diâmetro basal. Cresce em regiões úmidas, no entanto, prefere climas quentes e úmidos, com a luz do sol, o solo rico e bem drenado. É encontrada amplamente nas zonas tropicais e temperadas das Américas do Norte e do Sul, na Ásia, Indonésia, Filipinas e África. Além disso, é encontrada em culturas cultivadas na Bacia do Congo, na África Central, no Brasil, na Índia e em Madagascar (ISLAM e UDDIN, 2017). Segundo Benzzoni (1973), suas folhas são geralmente largas podendo medir até 11,3 cm de comprimento, serrilhadas, dentada, ou palmada peluda, arredondada variando em tamanhos e números. As flores são róseas e pequenas, agrupadas nas axilas medindo aproximadamente 15 mm de corola com cinco pétalas. Os frutos são variáveis predominando a cápsula e o período de produção dos mesmos e também das sementes, acontece concomitantemente à floração que, por sua vez, ocorre em torno do sétimo mês após o semeio estendendo-se até o final do ciclo tendo seu ápice no oitavo mês. Uma peculiaridade é o fechamento das flores nos horários de maior incidência solar (BENTES, 2015) (Fig. 1).

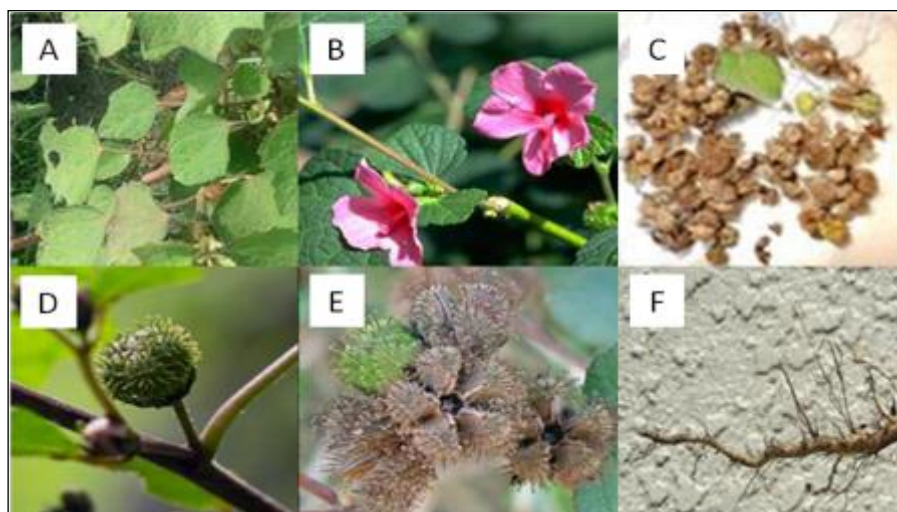


Figura 1: *Urena lobata* L. A: Folhas, B: Flores, C: Sementes, D: Fruto imaturo, E: Fruto maduro, F: Raíz. **Fonte:**Islam e Uddin, (2017) (Adaptado)

O cultivo da malva na Amazônia iniciou-se em 1970 no estado do Pará, no entanto, ela foi introduzida no estado do Amazonas a partir de 1971, atingindo 1.750 toneladas na sua primeira produção (MEDEIROS e FRAXE, 2008). Em 1983, a produção de malva no Amazonas já era três vezes superior à fibra de juta, tendo seu maior pico em 1988 com 30.346 toneladas, demonstrando o

potencial adaptativo dessa planta na várzea amazonense, bem como a aceitação dos produtores locais. Julgando por seu caráter ruderal e contexto histórico de produção, inicialmente considerada uma praga, além da inexistência de relatos da utilização dessa planta por parte dos indígenas locais em épocas coloniais, é provável que a malva, seja exótica (HOMA, 1998). Ao ser macerada, a malva libera fibras longas, claras, brilhosas, flexíveis e resistentes muito utilizadas na confecção de sacarias e de produtos artesanais (SOUZA, 2012).

2.2 ASPÉCTOS SÓCIOECONÔMICOS DA MALVA

O cultivo da juta e malva preenche o espaço deixado pelo declínio das atividades extrativistas da borracha, sendo a maioria da mão de obra dos antigos seringais incorporada, em grande parte, no cultivo e extração dessas fibras vegetais (FERREIRA, 2009).

O estado do Amazonas é o principal produtor de fibras de juta e malva do Brasil e a cadeia produtiva dessas culturas, é principalmente impulsionada pelas cooperativas de Manacapuru, que desempenham um papel de suma importância para os agricultores desde a distribuição das sementes, beneficiamento, apoio logístico para distribuição da produção e comercialização das fibras. No entanto, enfrentam problemas como a competitividade do mercado, barateamento do produto, condições de produção e o ciclo das águas que dificultam a produção destas (SOARES, 2015; IDAM, 2020).

A produção de fibras de malva supera a produção de fibras de juta devido ao rendimento de fibras por semente plantada/ha sendo que a fibra de malva corresponde a 20kg/ha em média, enquanto que a fibra de juta corresponde a 8kg/ha em média (SOARES, 2015).

Até o final da década de 1980, a juta e malvicultura representaram relevante importância econômica para o Amazonas declinando a partir do surgimento de fibras sintéticas, utilizadas para as mesmas finalidades dessas fibras, tais como confecções de sacarias e produtos similares, bem como a importação de fibras orgânicas oriundas de outros países como Bangladesh e Índia. Tais fatores refletiram diretamente no barateamento das fibras e consequentemente na renda dos produtores das fibras que passaram a receber ofertas cada vez menores (SOARES, 2015). Apesar de passar por períodos altos e baixos, a produção das fibras de juta e malva ainda é uma das principais atividades agrícolas de muitos ribeirinhos garantindo o sustento de aproximadamente 2,08 mil agricultores familiares e produtores rurais no Amazonas (IDAM, 2021a).

A produção de juta/malva no Brasil estava em declínio desde o ano de 2011 devido à competição com as fibras sintéticas, o valor de importação mais acessível e a falta de estrutura da cadeia produtiva (Fig.2). No entanto, devido às condições climáticas mais favoráveis no ano de 2017,

houve um aumento na produção de 2.500 toneladas em 2016 para 3.800 toneladas em 2017 (CONAB, 2018).

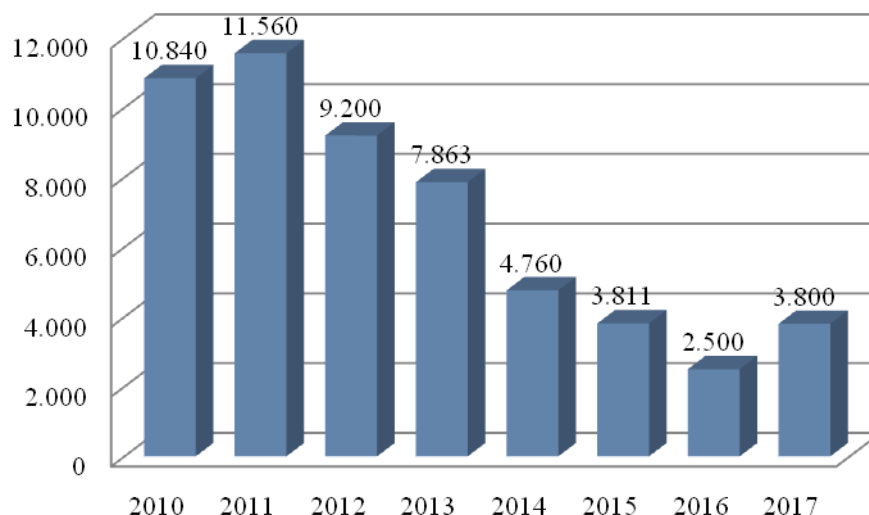


Figura 2: Produção Brasileira de juta e malva em toneladas. **Fonte:** FAO/Conab/Mercado (2018).

A mudança no cenário atual de produção de fibras vegetais sem causar impactos ambientais, permitiu uma revitalização na produção de juta e malva, que deu início em 2004 devido às pressões ambientalistas sobre sustentabilidade e uso de fibras liberianas diante de uma ascendente procura por atividades produtivas sustentáveis e ambientalmente corretas, tanto no quesito preservação de recursos naturais, quanto ao envolvimento humano nestas atividades (MOREIRA, 2008). Tal mudança permitiu um maior envolvimento das cooperativas na cadeia produtiva dessas fibras propiciando o surgimento de empregos, diretos e indiretos no período da safra, e consequentemente, 2,08 mil agricultores familiares e produtores rurais são beneficiados nesta ocupação (SOARES, 2015, IDAM, 2020). Atualmente, de acordo com o IBGE, o cultivo de malva representa 76,38% da produção brasileira de fibras, sendo os municípios de Manacapuru, Codajás e Parintins os maiores produtores da safra 2019-2020 (IDAM, 2021b).

No entanto, o processo artesanal de produção das fibras não atende às condições de sustentabilidade em relação às condições de trabalho visto que em uma das etapas do processo chamada maceração, os agricultores ficam parcialmente imersos na água durante várias horas por dia gerando diversos problemas de saúde tais como: reumatismos, doenças oftalmológicas devido à exposição ao sol e à radiação solar refletida pela água, gripes e resfriados, hepatites, dermatites, e infecções, bem como risco acentuado de mordidas e ferroadas de animais peçonhentos (ARAÚJO, 2012).

2.3 PROCESSO PRODUTIVO DAS FIBRAS DE MALVA

Os agricultores que fazem parte das cooperativas realizam um processo produtivo composto as etapas contidas na figura 3, de acordo com a Cooperativa Mista Agropecuária de Manacapuru – COOMAPEM (FERREIRA, 2009; SOARES, 2015).

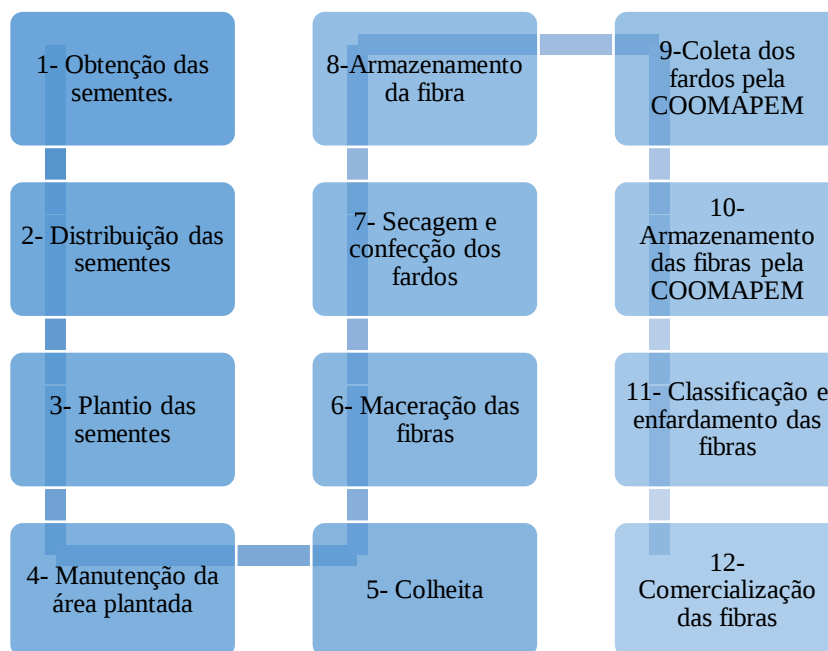


Figura 3: Processo produtivo da fibra de juta e malva.

As sementes são compradas pela COOMAPEM a partir de um convênio realizado pela cooperativa com a Secretaria de Produção Rural do Amazonas - SEPROR permitindo o financiamento das sementes a preços mais acessíveis possibilitando a aquisição das sementes diretamente com o produtor de sementes e sua distribuição aos cooperados tendo a fibra como garantia de pagamento das sementes. São compradores de sementes também o Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas - IDAM e empresas privadas (FAGUNDES, 2002).

Ambas as sementes são vindas do Estado do Pará, desde 1937, pois o Amazonas ainda não é autossuficiente na produção das mesmas. As sementes de juta são produzidas sob a coordenação da Embrapa da Amazônia Oriental no município de Alenquer- PA e as sementes de malva nos municípios de Capitão Poço e Bragança- PA, sob encomenda do Instituto de Fomento à Produção de Fibras Vegetais da Amazônia-IFIBRAM e são repassados aos produtores dos municípios de Parintins e Manacapuru. As sementes possuem o ciclo de desenvolvimento em torno de 8 meses, possibilitando a colheita a partir de julho e agosto. Em seguida, é realizado o beneficiamento das sementes em torno de 15 dias, transporte e posterior plantio no mês de dezembro no Amazonas (FAGUNDES, 2002). Atualmente o IDAM tem um projeto em parceria com a Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

que visa a criação de duas unidades de observação para a produção de sementes de malva com o intuito de minimizar a dependência das sementes de outros estados (IDAM, 2020).

Após a obtenção das sementes, a cooperativa as distribui levando-as até alguns cooperados e outros preferem buscá-las na própria cooperativa, de acordo com a proporcionalidade de sementes/ha (Fig.4).



Figura 4: Distribuição de sementes pela cooperativa. **Fonte:** COOMAPEM (2015)

O plantio é realizado às margens do Rio Solimões na vazante dos rios, no final de junho e julho à início de agosto e setembro, quando as terras de várzea estão enlameadas, e próprias para plantio, facilitando o trabalho dos agricultores que disporão de pouco trabalho para arar a terra e a época da colheita coincidirá com a enchente proporcionando uma colheita sem custos adicionais com pagamento de diárias, visto que não há pressa para o final da colheita. Geralmente a malva é plantada nos meses de agosto e outubro, por vezes devido às dificuldades de obtenção das sementes, conferindo mais trabalho para os agricultores diante de um terreno tomado por vegetação nativa tendo que capiná-lo e ará-lo, pois o solo está mais compacto. Diante de uma semeadura tardia, há também o risco de perda de parte da safra devido à colheita ocorrer na cheia em andamento podendo demandar mais mão de obra, muitas vezes paga e sem folga, devido a velocidade da cheia (FERREIRA, 2009). As sementes de juta são semeadas em terras baixas e as de malva, em terras altas, devido ao tempo de crescimento onde a juta leva 3 a 4 meses para atingir a altura adequada e a malva, 7 a 8 meses (SOARES, 2015) (Fig.5).



Figura 5:Semeio de malva na vazante do rio Solimões. **Fonte:** NUSEC (2008)

A manutenção da plantação é feita durante o seu desenvolvimento para a retirada de ervas daninhas e outras plantas que dificultam o crescimento das culturas (LIMA e SILVA, 2017). O corte é executado com o terçado, rente ao solo e a formação dos feixes é feita a partir de 20 a 30 hastes, caso a malva tenha atingido 3 a 4 metros de altura. No entanto, se por ventura, não houver o amadurecimento total das plantas por motivos diversos, como pragas ou até mesmo a velocidade da cheia, e não ultrapassar 2 metros de altura, os feixes podem conter até 100 hastes. Se as terras forem altas, há o processo de secagem ao sol para reduzir o peso dos feixes, mas se as terras forem baixas, não tem como executar a secagem prévia e os feixes são imediatamente imersos na água para a realização da maceração (FERREIRA, 2009) (Fig.6).



Figura 6: Malvicultor com feixes de malva recém cortada. **Fonte:** SOUZA (2010)

Segundo Lima e Silva (2017), a maceração ocorre a partir de bactérias anaeróbicas que atuam desprendendo as fibras do caule durante 15-21 dias. Para isso, é necessário a imersão completa dos feixes realizada com o auxílio do peso de galhos de árvores, troncos ou até mesmo de barro acrescentados por cima dos feixes para promover a imersão (Fig. 7).



Figura 7: Processo de maceração onde as fibras ficam imersas para o posterior desfibramento. **Fonte:** Arquivo pessoal (2018).

Após essa etapa, inicia-se o desfibramento onde as fibras são puxadas para serem removidas dos caules, separadas e lavadas para a retirada da goma deixando as fibras limpas, processo no qual os agricultores ficam parcialmente imersos em torno de 8 a 10 horas por dia sujeitos a diversos perigos naturais como animais peçonhentos, além das condições insalubres potencializarem o risco de aquisição de doenças diversas (CASTRO, 2015) (Fig. 8).



Figura 8: Processo de desfibramento onde os agricultores ficam imersos durante horas diariamente. **Fonte:** ARAÚJO (2015).

Após esse processo, as fibras são levadas a varais lisos para não dificultar a retirada destas, feitos normalmente de bambu ou açaí para secagem e posterior enfardamento (FERREIRA, 2009) (Fig.9). As fibras devem ser reviradas de tempos em tempos para que sequem uniformemente pelo sol (EMBRATER/EMBRAPA, 1980) e dependendo da intensidade dos raios solares, as fibras ficam secando em torno de 1 a 2 dias. A ventilação natural também é importante, pois ajuda nesse

processo e na eliminação dos odores da decomposição e das partículas que se desprendem ao longo do processo (FERREIRA, 2009; LIMA e SILVA, 2017).



Figura 9: Fibras secando ao sol e ar livre em varais. **Fonte:** FAPEAM (2019).

Após a secagem inicia-se o enfardamento manual com pesos variados, mas orientados pela COOMAPEM que tenham no máximo 60 kg para evitar problemas de saúde por excesso de peso, facilitar no transporte e pesagem dos fardos que por sua vez são guardados no paiol do agricultor, protegidos do sol e chuva (Fig. 10). Posteriormente os fardos são coletados pela cooperativa em embarcações (SOARES, 2015).



Figura 10: Fardos de fibra empilhadas no paiol do agricultor. **Fonte:** Arquivo pessoal (2018)

Na cooperativa, as fibras são classificadas pela textura, cor e qualidade por funcionários treinados que classificam as fibras em Tipo II, III, IV e IX baseados nas recomendações do CONAB. Em seguida são prensadas, enfardadas e padronizadas por peso através de uma máquina de prensagem para a

formação dos fardos (50 ou 200 kg) que são amarrados com cordas feitas com as próprias fibras, identificadas com as informações gerais do produto como: nome do produto, safra, tipo da fibra, número do fardo, peso líquido e identificação do prensador, para posterior armazenamento e comercialização no mercado nacional, não havendo exportação (SOARES, 2015) (Fig. 11).



Figura 11: Pesagem dos fardos de fibra. **Fonte:** COOMAPEM (2015)

2.4 COMPOSIÇÃO DOS LIGNOCELULÓSICOS

A parede celular dos vegetais em geral é formada pelos componentes poliméricos celulose (1,4- β -glucano), hemicelulose (heteropolímero de D-xilose, com ramificações), lignina (um composto polifenólico complexo) além de outros componentes como pectina, proteínas e cinzas (Fig. 12) variando conforme a origem, clima, amostras, etc. (BISWAS *et al.*, 2014; BHATIA *et al.*, 2020; HARINDINTWALI *et al.*, 2020). Dentro da estrutura da parede celular, estes constituintes interagem entre si através de ligações covalentes e não covalentes, com a xilana sendo encontrada na interface entre a lignina e a celulose (CHAUHAN, 2020). Acredita-se que essa característica seja importante para a coesão da fibra e a integridade da parede celular da planta aumentando a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos (COLLINS *et al.*, 2005, SÁNCHEZ, 2009).

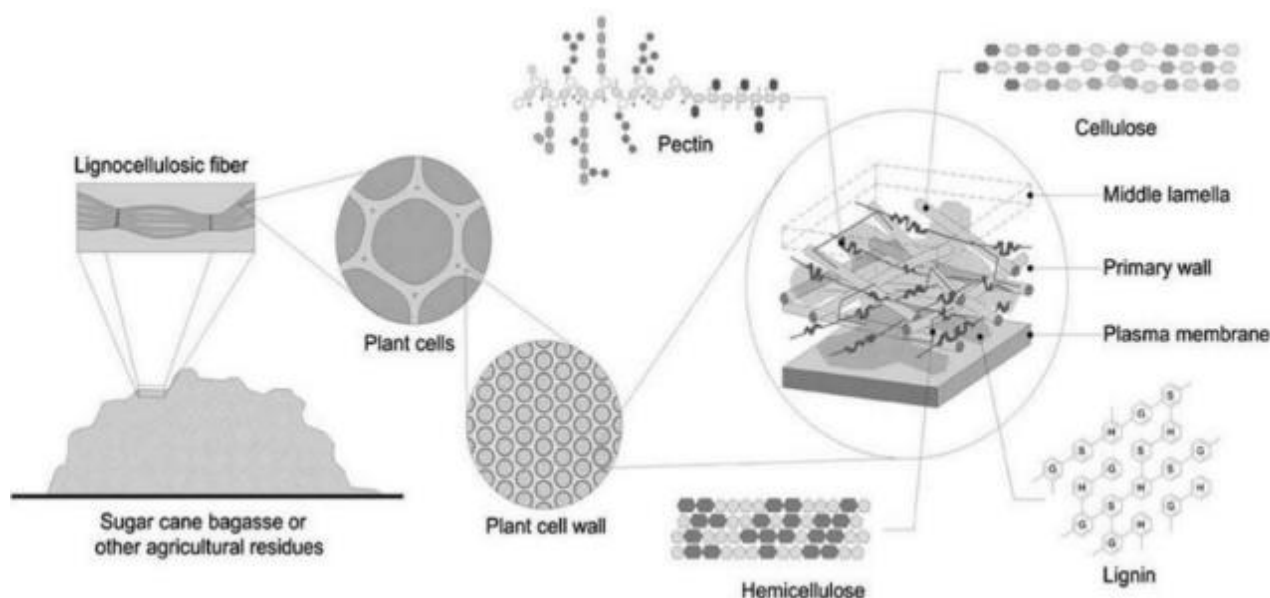


Figura 12: Estrutura da parede celular das células vegetais. **Fonte:** SIQUEIRA e FERREIRA FILHO (2010).

A celulose é um polímero linear composto de subunidades β -glicose onde os grupos $-\text{OH}$ são ligados às cadeias vizinhas por ligações de hidrogênio intracadeias resultando na formação de fibrilas, as quais apresentam regiões cristalinas e regiões amorfas. Estas características conferem à molécula de celulose resistência elevada à hidrólise ácida e enzimática (BON *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2021).

As hemiceluloses também conhecidas como polioses são o segundo polissacarídeo mais abundante de ocorrência natural. São heteropolímeros não celulósicos, geralmente constituídos por uma cadeia principal de D-xilose (ligações β -1,4) com várias ramificações de pentoses e hexoses D-arabinose, D-manose, D-galactose e etc., além de ácidos hexurônicos e deoxihexoses. A composição e estrutura da hemicelulose podem variar de acordo com a fonte vegetal (BAE *et al.* 2008; LADEIRA, 2013; ZHENG *et al.*, 2014; FARHAT *et al.*, 2017). A hemicelulose interage com a celulose por meio de ligações de hidrogênio enquanto que a hemicelulose interage com a lignina através de ligações covalentes conhecidas como complexos de lignina-carboidrato (LCC), dentre as quais se têm ligações fenil-glicosídeos, ésteres e éteres benzílicos (BALAKSHIN *et al.*, 2011; CHRISTOPHER, 2012).

As pectinas são heteropolissacarídeos formados por unidades de ácido galacturônico, unidas por ligação do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4) associadas a outros componentes variando a sua composição, peso molecular e estrutura tornando-o o polissacarídeo mais complexo estruturalmente encontrado na natureza. As pectinas estão associadas frequentemente aos demais componentes da parede celular dos vegetais (celulose, hemicelulose e lignina) e geralmente localizam-se na parede celular primária e na lamela média de muitas plantas onde encontra-se a maior concentração da mesma (SEYFRIED *et al.*, 2016; WUSIGALE *et al.*, 2020). As pectinases proporcionam a firmeza e estrutura do tecido vegetal

estando envolvidas no reforço da parede, na aderência intercelular, no controle da porosidade da parede, no controle do ambiente iônico da parede celular e alguns tipos de ligações pécticas tem importância também sobre o reforço da parede e no desenvolvimento das células vegetais proporcionando turgidez e resistência às baixas temperaturas (SOMERVILLE *et al.*, 2004; CANTERI *et al.*, 2012; LARA-ESPINOZA *et al.*, 2018).

A lignina é um polímero constituído de fenilpropano, apresentando uma conformação tridimensional e amorfa conferindo à parede celular sustentação mecânica, resistência a ataques microbiológicos e rigidez às plantas (ZHENG *et al.*, 2014; SHIN *et al.*, 2019; LOURENÇON e MAGALHÃES, 2020).

A fibra da malva assemelha-se na sua composição química, resistência e cor à fibra de juta (MARGEM, 2013) sendo fibras orgânicas formadas por 40-50% de celulose, 20-30% de hemicelulose e 20-30% de lignina além de outros componentes como pectinas, gomas, saponinas, resinas, graxas, entre outros (JAYARAMAN, 2003; MOHAN *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2020).

2.5 DIVERSIDADE MICROBIANA

Os microrganismos representam o agrupamento mais abundante em diversidade química e molecular na natureza, fornecendo a base para processos ecológicos, tais como ciclos biogeoquímicos e cadeias alimentares, além de manter inter-relações com outros organismos (HUNTER-CEVERA, 1998; JONES *et al.*, 2018). A diversidade microbiana é vasta, no entanto ainda há muito a se descobrir, pois apenas cerca de 0,1 a 10% das espécies são conhecidas e estima-se que aproximadamente 99% dos microrganismos não podem ser cultivados facilmente pelas técnicas laboratoriais atualmente conhecidas (GHAZANFAR *et al.*, 2010; LOCEY e LENNON, 2016).

A diversidade de microrganismos é primordial para o funcionamento dos ecossistemas, pois a partir deles é possível a decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, agregação do solo e controle de patógenos no ecossistema (PANIZZON *et al.*, 2015). Apresenta grande potencial genético inexplorado e uma grande gama gênica que poderia ser explorada para a recuperação de novos genes, biomoléculas para vias metabólicas e vários produtos de valor agregado (GHAZANFAR *et al.*, 2010).

Os microrganismos possuem um grande potencial biotecnológico e são utilizados na síntese de produtos químicos através de processos bioquímicos, tais como vitaminas, ácidos orgânicos, enzimas, alcoóis, aditivos alimentares, fármacos, incluindo os antibióticos (SOARES *et al.*, 2010; TORTORA, 2017).

2.5.1 Microrganismos endofíticos

Segundo Petrini (1991), Azevedo (2014) e Felber *et al.* (2016), endofíticos são microrganismos cultiváveis ou não cultiváveis que habitam harmoniosamente os espaços inter e intracelulares dos tecidos vegetais como folhas, raízes, flores, frutos e ramos durante todo ou parte do seu ciclo de vida sem causar danos aos seus hospedeiros. Podem ser divididos em dois grupos quanto ao seu modo de colonização no hospedeiro: os que não produzem estruturas externas a partir do hospedeiro e os que produzem estruturas externas, tais como os nódulos de bactérias simbióticas fixadoras de N₂ e fungos micorrízicos.

Os microrganismos endofíticos, como fungos e bactérias, desempenham papel importante em suas plantas hospedeiras, pois vivem em associação simbiótica conferindo benefícios como proteção às plantas hospedeiras, atuando contra predadores e patógenos, incluindo pragas (AZEVEDO, 2000; PAMPHILE *et al.*, 2017; EMBRAPA, 2019). Podem também aumentar a resistência das plantas contra estresses bióticos e abióticos e produzir hormônios de crescimento, antibióticos, enzimas, controle biológico de pragas e doenças de plantas, produção de vitaminas, drogas anticâncer e outros compostos de interesse biotecnológico (AZEVEDO, 2014). Dependendo das condições de crescimento, da espécie, do seu hospedeiro e de fatores genéticos, a produção de bioativos é variável, pois a genética controla o potencial de produção, mas os fatores ambientais regulam a sua produção (DANTAS *et al.*, 2021).

2.5.2 Microrganismos de solo

A microbiota do solo é numerosa e complexa habitando na rizosfera proteobactérias, bactérias fixadoras de nitrogênio, bactérias promotoras de crescimento de plantas e fungos micorrízicos (VILA, 2021). O conhecimento dessa microbiota, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que vivem ali, é uma fonte importante que pode conduzir à descoberta de processos metabólicos utilizados por tais microrganismos possibilitando o conhecimento de interações ecológicas e aplicações biotecnológicas (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004).

A microbiota dos solos tem função primordial para os ecossistemas, pois é responsável por transformações biogeoquímicas fundamentais dos ciclos, reciclagem de matéria orgânica, degradação de xenobióticos, fixação de N₂ atmosférico, está associada à formação e manutenção da estabilidade de agregados do solo, através da produção de proteínas e polissacarídeos extracelulares, entre outras transformações importantes (LAMBAIS *et al.*, 2005, TONELLI, *et al.*, 2020).

O interesse maior nesses grupos de microrganismos está relacionado à sua ampla distribuição em todos os ambientes terrestres, sua capacidade de colonização não somente de solos e substratos mas, também do sistema radicular de diversos tipos de plantas, além da produção de uma ampla gama

de substâncias de interesse biotecnológico, incluindo enzimas, antibióticos e outros compostos (LUCON, 2019).

2.5.3 Microrganismos de ambientes aquáticos

Ecossistemas de água doce são ricos em carbono fixo na forma de detritos lenhosos e herbáceos da zona ribeirinha. Este material é fonte de energia para os organismos heterótrofos, no entanto, não está diretamente disponível para a maioria dos invertebrados e bactérias de água doce que não possuem as enzimas necessárias para degradar compostos lignocelulósicos. Sendo assim, ascomicetos desempenham um papel importante na decomposição de material vegetal porque colonizam substratos das plantas submersas, produzem enzimas degradativas que decompõem a madeira que pode então ser consumida por invertebrados (SIMONIS, 2008; KRAUSS *et al.*, 2011; JONES e PANG 2012).

Fungos aquáticos são encontrados em uma variedade de habitats variando de ambientes salinos como o marinho, incluindo as águas hipersalinas do Mar Morto, para os habitats de água doce dos lagos e córregos (PEARMAN, TAYLOR e KINGHORN, 2010).

Os fungos presentes nos ambientes aquáticos variam daqueles que são adaptados para completar seus ciclos de vida em habitats aquáticos e não são encontrados fora do ambiente aquático (moradores) para aqueles que ocorrem na água carregados casualmente (transitórios) (SHEARER *et al.*, 2007).

Fungos pertencentes aos grupos dos basidiomicetos, zigomicetos e líquenes raramente ocorrem como fungos aquáticos, sendo encontrados com maior frequência os demais grupos de fungos incluindo oomicetos, quitridiomicetos e ascomicetos meiospóricos e anamórficos, (SHEARER *et al.*, 2007). O grupo dos ascomicetos é o mais prevalente em substrato de madeira em decomposição nos locais de água doce e estuarina (SHEARER *et al.*, 2009), pois produzem celulasas e pectinases, enzimas cruciais na decomposição da serapilheira (SIMONIS, 2008). Há, no entanto, algumas evidências de que basidiomicetos leveduriformes dominam comunidades de micoplâncton (JONES *et al.* 2009).

Além do conhecimento da sistemática, função e interação ecológica desses microrganismos, é importante descobrir o seu potencial biotecnológico na produção de antimicrobianos, enzimas e outras substâncias de interesse (CORTEZ, 2016).

2.6 FUNGOS PRODUTORES DE LIGNOCELULASES

Os organismos mais efetivos na biodegradação de materiais lignocelulósicos são os fungos da decomposição branca (*white-rot fungi*) que degradam todos os componentes da madeira

(celulose, hemicelulose e lignina) e os da decomposição parda ou marrom (*brown-rot fungi*) que degradam principalmente as frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose). A maioria desses microrganismos pertencem à classe Basidiomycota, sendo que ascomicetos e fungos mitospóricos geralmente são classificados como fungos da decomposição branda (*soft-rot fungi*) que podem degradar lignina e polissacarídeos, no entanto, em velocidades baixas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; CARVALHO *et al.*, 2009).

A biodegradação da biomassa lignocelulósica por fungos acontece através da ação de uma série de enzimas e compostos extracelulares de baixa massa molar. A biodegradação ocorre necessariamente de forma extracelular, pois os componentes dos lignocelulósicos precisam ser despolimerizados até compostos menores para que desta forma possam ser transportados à parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). As etapas da degradação da celulose por microrganismos ainda não estão totalmente esclarecidas, mas sabe-se que ocorre pela ação de três grupos de enzimas que atuam sinergicamente na hidrólise da celulose: as endoglucanases (hidrolisam aleatoriamente regiões internas da celulose amorfa produzindo oligossacarídeos), celobiohidrolases (degradam os terminais redutores e não redutores dos oligossacarídeos produzindo celobiose) e β -1,4-glicosidase (degradam a celobiose gerando monômeros de glicose) (DODDA *et al.*, 2018; MORAIS *et al.*, 2018).

A biodegradação realizada pela hemicelulases ocorre de modo semelhante a das celulasas, no entanto, necessita de mais enzimas para a degradação completa da hemicelulose. A heterogeneidade e complexidade natural das xilanas são acompanhadas por uma variedade de enzimas hemicelulolíticas e dentre estas estão as 1-4 β -endoxilanases que despolimerizam a xilana pela hidrólise aleatória do esqueleto principal, α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetil-xilana-esterases, que têm a função de desramificar a cadeia principal de xilana e, as β -xilosidases que clivam pequenos oligossacarídeos gerando a xilose (CARVALHO *et al.*, 2009; GOTTSCHALK, *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2019).

A biodegradação realizada pelas pectinases ocorre através hidrólise de ligações glicosídicas da cadeia principal formada por ácido galacturônico podendo ser enzimas despolimerizantes [poligalacturonase (PG), pectinialase (PL) e pectatoliase (PAL)] que clivam a molécula de pectina em monômeros de ácido galacturônico e as desesterificantes [pectinesterase (PE)] catalisam desesterificações de grupamentos metoxil na molécula de pectina (MARTOS *et al.*, 2013; BERGER, 2014).

A degradação da lignina ocorre através de um processo multienzimático de enzimas intra e extracelulares que desestabilizam as ligações que constituem a macromolécula ocasionando sua quebra (SANTOS *et al.*, 2011). As enzimas envolvidas na degradação da lignina podem ser divididas em duas categorias: enzimas que degradam a lignina [compostas principalmente por fenoloxidasas (lacase) e peroxidases (manganês peroxidase e lignina peroxidase) e enzimas auxiliares de degradação da lignina (compostas por éter β -arílico, fenil cumarano, superóxido dismutase, quinona redutases e peroxidase) (DASHTBAN *et al.*, 2010; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

A manganês peroxidase (MnP) oxida Mn^{+2} para Mn^{+3} na presença de H_2O_2 apresentando potencial de oxidação suficiente para atrair somente elétrons de estruturas fenólicas. É considerada uma das principais enzimas envolvidas no processo de degradação da lignina e compostos xenobióticos aromáticos (HATAKKA *et al.*, 2005; CHAUHAN, 2020).

A lignina peroxidase (LiP) possui um potencial de oxidação elevado que atrai elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais cátion, tendo a capacidade de mineralizar uma gama de compostos recalcitrantes aromáticos e oxidar vários compostos fenólicos, não-fenólicos e policíclicos aromáticos (DURÁN, 2004; WU, 2022).

Tanto a MnP quanto a LiP, são heme-proteínas, apresentando um ciclo catalítico semelhante às peroxidases de origem vegetal. (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; SANTOS *et al.*, 2011). Ao contrário das peroxidases, as lacases não precisam de H_2O_2 para completar o seu ciclo catalítico e possuem a capacidade de oxidar diversos substratos, podendo ser aumentada com a utilização de mediadores de baixo peso molecular (SAITO *et al.*, 2003).

As lacases atuam diretamente em estruturas fenólicas que por meio da oxidação dos fenóis retiram um elétron dessas estruturas reduzindo o Cu^{2+} à Cu^{1+} e O_2 à H_2O , permitindo a atuação cíclica da enzima. As lacases podem degradar inclusive estruturas aromáticas não fenólicas por intermédio de mediadores como ABTS. Neste caso, a enzima é capaz de oxidar alguns mediadores que, por sua vez, possuem potenciais de ionização mais elevados do que a própria enzima, sendo os mediadores mais estudados o ABTS, NHA e HBT (SANTOS *et al.*, 2011; MEHDI *et al.*, 2014; CHAUHAN, GORADIA e JHA, 2018).

2.7 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS E SUAS APLICAÇÕES

As enzimas são fundamentais para todos os organismos vivos pois, catalisam uma série de reações químicas nos seus metabolismos tendo como papel essencial a degradação da matéria orgânica bem como a invasão e infecção do hospedeiro (LEHNINGER, 1995).

A produção e o uso de enzimas de origem microbiana, de maneira controlada, são relativamente recentes, porém constituem atualmente o maior setor da indústria biotecnológica movimentando bilhões de dólares por ano, sendo uma área em constante expansão (VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.*, 2003; BORTOLAZZO, 2011). No ano de 2016, o mercado de enzimas com aplicação industrial foi avaliado em US \$ 4,61 bilhões, estimando-se um aumento desses valores para US \$6,30 bilhões no ano de 2022, o que configura uma taxa anual de crescimento de 5,8% (INDUSTRIAL ENZYMES MARKET, 2019). O Brasil possui grande potencial na produção de enzimas, diante da abundante geração de resíduos agroindustriais, que possibilita a utilização destes para produção de enzimas reduzindo assim o seu custo de produção (MUSSATO, FERNANDES e MILAGRES, 2007) e consequentemente barateando o custo de venda.

Na indústria de alimentos as celulasas são usadas para obtenção de sopas, cereais e vegetais desidratados com a finalidade de aumentar a rehidratabilidade dos produtos ao chegarem nos consumidores (BHAT, 2000), na fabricação de pães, bolos e biscoitos as celulasas melhoram a textura das massas pois, proporciona a hidrólise de gomas favorecendo a distribuição de aromas (TOLAN e FOODY, 1999), na indústria de sucos, as pectinases, celulasas e xilanases são utilizadas na extração, clarificação e estabilização de sucos de frutas, vegetais e vinhos, onde são aplicadas para reduzir a viscosidade dos sucos a partir da hidrólise parcial de componentes da parede celular dos frutos (UHLIG, 1998; BHAT, 2000; HAROS, ROSELL e BENEDITO, 2002) na produção de pão, as celulasas e hemicelulasas favorecem o aumento do volume do pão melhorando a porosidade do mesmo (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002). Estudos com xilanase termoestável isolada da bactéria *Thermotoga marítima* foram realizados por Jiang *et al.* (2008) no intuito de melhorar a qualidade no congelamento de pães assados, e verificou-se no estudo que tal enzima proporcionou um aumento na maciez e no volume dos pães, reduzindo a recristalização da amilopectina do pão assado parcialmente congelado.

Na produção de cerveja há a liberação de arabinoxilanas aumentando a viscosidade, gerando turbidez na bebida e as xilanases são aplicadas nesse processo para degradar essas longas cadeias em moléculas menores (oligossacarídeos) reduzindo assim a viscosidade e a turbidez gerando uma aparência mais límpida para a bebida (MOTTA *et al.*, 2013). Na fabricação de vinhos, as celulasas, hemicelulasas e pectinases são utilizadas para acelerar o processo de vinificação melhorando a qualidade do produto final (ROLDÁN *et al.*, 2006).

Na indústria de ração são adicionadas às reações celulasas e xilanases para promover a degradação de alimentos com alta concentração de celulose e hemicelulose, pois animais monogástricos são incapazes de digerir esse tipo de alimento. Desta forma, as xilanases juntamente

com as β -glucanases aumentam a digestibilidade das rações para ruminantes e monogástricos (CASTRO e PEREIRA JÚNIOR, 2010; SANTOS, 2011; SINGH *et al.*, 2016).

No setor têxtil as celulases promovem o aumento do brilho das peças, remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, bem como amenizar o desgaste das peças, evitando a formação de fiapos e pelotas após sucessivas lavagens (CASTRO e PEREIRA JÚNIOR, 2010), podem produzir a aparência de jeans desgastado, danificando menos as fibras quando comparada à pedra-pomes, também utilizada para essa finalidade (MUSSATO, FERNANDES e MILAGRES, 2007). Ao longo do processo de coloração de tecidos, aproximadamente 15% dos corantes utilizados no processo são liberados no meio ambiente e esses são altamente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (VALLS e RONCERO, 2009). As xilanases podem ser utilizadas nos processos de maceração do linho, da juta e do sisal facilitando a separação das fibras de celulose da matriz celular e remoção da lignina (MILAGRES e PRADE, 1994; PEREIRA, 2013). As enzimas oxirredutases (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) são utilizadas no tratamento destes corantes e de outros resíduos poluentes tanto industriais como domésticos, que contêm muitos produtos químicos tóxicos para o ser vivo e o ecossistema, degradando ou bioconvertendo produtos como compostos fenólicos, aminas aromáticas, compostos clorados e etc. em produtos inócuos (KARIGAR e RAO, 2011; LE ROES-HILL e PRINS, 2016). Além desta aplicação, são também utilizadas no biobranqueamento e descoloração do corante dos tecidos e no acabamento da lã (MOJSOV, 2011).

Na indústria de papel e polpa de celulose, as celulases e xilanases combinadas às técnicas de processamento, possibilitam a redução de cerca de 20-30% do uso de cloro, nos processos de pré-branqueamento da polpa craft diminuindo também em torno de 15-20% na taxa de adsorção destes compostos tóxicos e de difícil degradação nos efluentes, evitando desta forma, a emissão de substâncias organocloradas que são altamente tóxicas para o meio ambiente e potencialmente cancerígenas, resultando em um produto mais brilhante do que pode ser alcançado sem o tratamento enzimático, gerando cerca de 9% de alvura, sem ocasionar diferenças significativas na viscosidade da polpa (DAMASO, ANDRADE e PEREIRA JÚNIOR, 2002; NINAWA e KUHAD 2006; KHANDEPARKAR e BHOSLE 2007; MUSSATO, FERNANDES e MILAGRES, 2007). As lacases também podem ser utilizadas concorrendo com o hipoclorito na função de clareamento da polpa e papel, possibilitando a substituição do dióxido de cloro (ClO_2) nos moinhos de clareamento (ELEGIR *et al.*, 2005).

Na indústria de biocombustível, as xilanases são aplicadas juntamente com as celulases para converter o material vegetal rico em celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis no processo de sacarificação. Este processo é essencial para que haja a fermentação dos açúcares para a produção de etanol de segunda geração (BON *et al.*, 2008; GOMES, 2014). A xilose produzida pela

reação das xilanases, também pode ser utilizada na produção de etanol por meio de alguns microrganismos *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor pusillus* e a levedura *Pichia stipidis* que conseguem fermentar a xilose e gerar como produto da fermentação, o etanol (FALKOSKI *et al.*, 2011). Alguns estudos relatam o uso da xilose para a produção de biogás (TOLEDO, 2012).

No tratamento de efluentes as oxirredutases podem ser empregadas na remoção de compostos derivados de ácidos aminopolicarboxílicos como o EDTA, em efluentes municipais, na remoção de compostos fenólicos na indústria de extração de azeite de oliva, na remoção de corantes azo da indústria de alimentos e tinta na indústria têxtil, na remoção de pesticidas à base de uréia, etc. (MENDES *et al.*, 2005).

2.8 PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOTÍICAS DE ORIGEM MICROBIANA

Existem duas principais estratégias para obtenção de celulasas produzidas por microrganismos que são o cultivo submerso (CS) e o cultivo em estado sólido (CES). A principal diferença entre esses dois processos é o teor de água, onde no CES há a ausência total ou parcial de água livre (RAGHAVARAO, RANGANATHAN e KARANTH, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2010), de modo que a fonte de água é apenas a presente no próprio substrato ou de uma pequena quantidade absorvida também pelo substrato.

A água é extremamente importante para os sistemas biológicos pois, permite a difusão dos nutrientes no meio reacional proporcionando a absorção destes pelos microrganismos, promove a remoção de metabólitos e manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, tais como proteínas, nucleotídeos e carboidratos, além de conservar a permeabilidade da membrana plasmática. Quando se trata de cultivo de fungos filamentosos, a limitação de água pode gerar alguns problemas como a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células, resultando em um desequilíbrio nas vias, reduz a taxa de crescimento microbiano afetando processos vitais como a germinação, esporulação e formação de metabólitos (RAIMBAULT, 1998; GERVAIS e MOLIM, 2003). Processos que envolvem limitações no teor de água livre são evitados quando se tem como objetivo a obtenção de muitos produtos, principalmente em escalas maiores quando é necessário o uso de biorreatores (CASTRO e PEREIRA JÚNIOR, 2010). Diante disso, o CS é a técnica de produção enzimática mais empregada nos países ocidentais devido a possibilidade de controlar os parâmetros de cultivo tais como pH, temperatura e oxigenação favorecendo o crescimento de microrganismos nessas condições, além de facilitar a recuperação de enzimas extracelulares (FEITOSA, 2009). A tabela 1 relaciona as principais características da CES e CS.

Tabela 1. Diferentes características nos processos de cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso (CS).

CES	CS
Menos produtos obtidos e menos microrganismos aptos a crescer nessas condições.	Maior demanda energética associada à esterilização do meio e à remoção de produto do meio fermentado.
Menor possibilidade de contaminação, pela ausência de água livre no sistema.	A purificação dessas moléculas é facilitada pela ausência ou baixa concentração de partículas de substrato.
Menor disponibilidade de informações como fenômenos de transporte e cinéticas de crescimento e de produção enzimática.	O alto teor de água facilita o controle da temperatura de cultivo, reduzindo a degradação do produto, em especial enzimas com baixa termoestabilidade.
O extrato obtido é em geral de três a quatro vezes mais concentrado quando comparado a FS, sendo maiores a produtividade e a concentração final de produto na FES.	Quando há elevadas concentrações de substrato, podem ocorrer problemas reológicos no sistema.
Maior dificuldade no controle do processo e na adição de soluções desejadas.	O caráter homogêneo do sistema facilita processos de difusão e misturas.
Menor volume de resíduos líquidos gerado.	Tecnologias de monitoramento de variáveis on line são mais disponíveis.

Fonte: Castro e Pereira Júnior (2010); Orlandelli *et al.*, (2012) (Adaptado)

REFERÊNCIAS

AHMED, Z. e NIZAM, S. Jute - Microbiological and biochemical research. **Plant Tissue Cult. & Biotech**, 18 (2): 197-220, 2008.

ARAÚJO, K. S. **Avaliação de políticas setoriais para a cadeia produtiva de Jute e Malva no Estado do Amazonas**. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, 2012.

AZEVEDO, J. A. Endophytic fungi from brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: KHARWAR, RNet *al.* (eds.). **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**, Springer India, 17-22p, 2014.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic journal of Biotechnology**, v. 3, n.2, p. 40-65, 2000.

BAE, H. J.; KIM, H. J.; KIM, Y. S. Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. **Bioresource Technology**, 99, 3513- 3519, 2008.

BALAKSHIN, M.; CAPANEMA, E.; GRACZ, H.; CHANG, H.; JAMEEL, H. Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. **Planta**, 233, 1097–1110, 2011.

BENTES, J.G. **Influência do espaçamento na produtividade de sementes de Malva (*Urena lobata* L.) em terra firme no Amazonas**. 74 p. Dissertação de Mestrado (Agronomia tropical), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, 2015.

BENZZONI, P. **Compendio de botânica**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1973.

BERGER, M. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno pedagógico**, p. 130–139, 2014.

- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BHATIA, S.; JAGTAP, S.; BEDEKAR, A.; BHATIA, R.; PATEL, A.; PANT, D. *et al.* Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresour. Technol.**, 300, p. 122724, 2020.
- BISWAS, R.; PERSAD, A. e BISARIA, V.S. **Production of Cellulolytic Enzymes**. Bioprocess. Renew. Resour. to Commod. Bioprod. p. 105-132, 2014 .
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado** - Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- CHAUHAN, P.; GORADIA, B.; JHA, B. Optimization and up-scaling of ionic liquid tolerant, thermo-alkali stable extracellular laccase from marine *Staphylococcus arlettae* S1-20 using tea waste. **J Taiwan Inst Chem Eng**, 86, p. 1-8, 2018.
- CHAUHAN, P. Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 23, p. 101498, 2020.
- CANTERI, M. H.G; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. de P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros** 22 (2), 2012.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L. FERRAZ, A. MILAGRES A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**.v. 32, nº8, p. 2191-2195, 2009.
- CASTRO, A. M. e PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**, 33 (1), p. 181-188, 2010.
- CASTRO, A. P. D. **Análise sistêmica da cultura de malva: um estudo comparativo nas comunidades Nossa Senhora das Graças e Monte Sião no município de Manacapuru/Am**. p. 119. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais) Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Manaus, 2015.
- CHRISTOPHER, L. Adding value prior to pulping: bioproducts from hemicellulose. **Glob. Perspect. Sustain. For. Manag.** 225–246, 2012.
- COELHO, C. F. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da malva**. 43 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em agronomia tropical). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, 2017.
- COLLINS, T; GERDAY, C; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.
- CONAB. **Análise mensal de Juta-Malva e Sisal**. 2018. Disponível em: https://www.conab.gov.br/...fibras/.../22582_c625a2e446783a366275711d8d78f08d. Acesso em: 05 de Jun. de 2019.

- CORTEZ, A. C. A. **Influência da sazonalidade e do modo de coleta na diversidade de fungos decompositores de madeira submersa de ambientes aquáticos da Região Amazônica**. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Conservação), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2016.
- DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA JUNIOR, N. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* ioc-4145. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33. 333-338, 2002.
- DANTAS, S.B.S.; ALVES, F.A.M.; CHAPLA, V.M. Chemical, diversity and biotechnological potential of endophytic fungi isolated from Brazilian Cerrado plants. **Rev. Biota Neotropica**, v. 21, n. 2, p. 1-8, 2021.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignina. **Int J Biochem Mol Biol**, 1 (1), p. 36-50, 2010.
- DODDA, S.; AICH, A.; SARKAR, N.; JAIN, P.; JAIN, S.; MONDAL, S. *et al.* Structural and functional insights of b-glucosidases identified from the genome of *Aspergillus fumigatus*. **J. Mol. Struct.**, 1156, pp. 105-114, 2018.
- DURÁN, N. Enzimas lignolíticas. **In**: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). *Fungos –uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: UCS. 510 p. 2004.
- ELEGIR, G.; DAINA, S.; ZOIA, L.; BESTETTI, G.; ORLANDI, M. Laccase mediator system: Oxidation of recalcitrant lignin model structures present in residual kraft lignin. **Enzyme and Microbial Technology**, 37: 340-346, 2005.
- EMBRAPA. **Jornal do endofítico**. Disponível em <<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/resumo.html>> Acesso em 11 de Jun. de 2019.
- EMBRATER/EMBRAPA. Empresa Brasileira de Assistência Técnica e Extensão Rural/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistemas para produção de juta e malva**. (Revisão). Boletim nº195, Manaus, 1980.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.
- FAGUNDES, M. H. **Sementes de juta e malva: algumas observações**. 2002. Disponível em: <http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/Cen%C3%A1rios%20juta.pdf>. Acesso em: 07. Mai. 2019.
- FALKOSKI, D. L., **Enzimas lignocelulolíticas de fungos de podridão branca e fitopatógenos: produção, caracterização e aplicação em processos de sacarificação da biomassa**. 116 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- FARHAT, W.; VENDITTI, R.; QUICK, A.; TAHA, M; MIGNARD, N.; BECQUART, F. *et al.* Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p.370-377, 2017.
- FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. 104 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

FELBER, A.C.; ORLANDELLI, R. C.; RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; COSTA, A. T.; AZEVEDO, *et al.* Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, v. 66, p.765–775, 2016.

FERREIRA, A. S. **Trabalhadores da malva: (re) produção material e simbólica da vida no baixo rio Solimões**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação Sociedade e Cultura na Amazônia /UFAM. Manaus, 2009.

FRAXE, T.J.P. **Homens anfíbios: etnografia de um campesinato das águas**. São Paulo Annablume, 192p. 2000.

GERVAIS, P. e MOLIM, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** v13, p85-101, 2003.

GHAZANFAR, S.; AZIM, A.; GHAZANFAR, M. A.; ANJUM, M. I.; BEGUM, I. Metagenomics and its application in soil microbial community studies: biotechnological prospects. **Journal of Animal & Plant Sciences**, v.6, 2: 611- 622, 2010.

GOMES, K. S. **Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 72 p. Dissertação de mestrado. (Mestrado em Bioquímica agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

GONÇALVES, D.C.S; FREITAS, D.O; SOUTO, K.K.O; BARBOSA, R.X; FERREIRA, T.R. **Fibras celulósicas**. 24 p. Centro de Tecnologia, Universidade do Rio Grande do Norte, Natal, 2003.

GOTTSCHALK, L. M. F.; SILVA, J. P. L.; SOUZA, E. F. Produção de xilanase por duas cepas de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **In: Brazilian Seminar on Enzyme Technology – ENZITEC – Xth**, Outubro, Blumenau, SC, Brasil, 2012.

HARINDINTWALI, J. D.; ZHOU, J.; YU, X. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: a novel tool for environmental sustainability. **Environ. Sci. Technol.**, 715, p. 136912, 2020.

HAROS, M.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 215, n. 5, p. 425-430, 2002.

HATAKKA, A.; HAKALA, T.K.; LUNDELL, T.; GALKIN, S.; MAIJALA, P. *et al.* Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective White-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 461-468, 2005.

HOMA, A. K. A civilização da Juta na Amazônia: expansão e declínio. **In: Amazônia: meio ambiente e desenvolvimento agrícola**. Brasília: EMbrapa- SPI, 1998.

HOMA, A. K. Extrativismo, manejo e conservação dos recursos naturais na Amazônia. **In: MAY, P. H. (Ed.) Economia do meio ambiente: teoria e prática**. p.353-74. 2.ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2010.

HUANG, J.; XIA, T.; LI, G.; LI, Y.; WANG, Y.; WANG, Y. *et al.* Overproduction of native endo- β -1,4-glucanases leads to largely enhanced biomass saccharification and bioethanol production by specific modification of cellulose features in transgenic rice. **Biotechnol. Biofuels**, 12, p. 11, 2019.

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Curr Opin Microbiol**, 1(3): 278-85, 1998.

IDAM. **Em Manacapuru, Wilson Lima visita fábrica de juta e malva que terá produção valorizada.** Disponível em: <<http://www.idam.am.gov.br/em-manacapuru-wilson-lima-visita-fabrica-de-juta-e-malva-que-tera-producao-valorizada-com-pagamento-da-subvencao/>>. Acesso em 02 de Dez. 2020.

IDAM. **Governo do Amazonas investe na produção de sementes de malva com unidade de observação em Manacapuru.** Disponível em: <<http://www.idam.am.gov.br/governo-do-amazonas-investe-na-producao-de-sementes-de-malva-com-unidade-de-observacao-em-manacapuru/>>. Acesso em 30/11/2021a.

IDAM. **Relatório de Atividades 2020.** Manaus: 2020. 129p.: il. color. Disponível em: <http://www.idam.am.gov.br/wp-content/uploads/2021/09/RAIDAM2020_web_vfinal.pdf> Acesso em: 09/12/2021b.

INDUSTRIAL ENZYMES MARKET. **Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022.** Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html?gclid=Cj0KCQjwjMfoBRDDARIsAMUjNZqysE9TcXmL71kc0IA8sXFPTu_1ZzQ6eDF-H6s_JzGTOo64-IGrUU8aAvE2EALw_wcB>. Acesso em 25 de Jun. de 2019.

ISLAM, M.; UDDIN, M. A Revision on Urena Lobata L. **International Journal of Medicine**, v. 5, n. 1, p. 126, 1 maio 2017.

JAYARAMAN, K. Manufacturing sisal–polypropylene composites with minimum fibre degradation. **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 367-374, 2003.

JIANG, Z.; BAIL, A. L.; WU, A. Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. **Journal of Cereal Science**, 47, 172-179, 2008.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: 4 ed. Nacional, 1977.

JONES, E. B. G. e PANG, K. L. Tropical aquatic fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2403–2423, 2012.

JONES, E.B.G; SAKAYAROJ, J.; SUETRONG, S.; SOMRITHIPOL, S.; PANG, K.L. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. **Fungal Diversity**, 35, 1–187, 2009.

JONES, M.; BHAT, T; HUYNH, T.; KANDARE, E.; YUEN, R.; WANG, C. H. *et al.* Waste-derived low-cost mycelium composite construction materials with improved fire safety. **Fire and Materials**, 42, 816–825, 2018.

KRAUSS, G. J; SOL, M.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D.; WESENBERG, D.; BARLOCHER, F. Fungi in freshwaters: Ecology, physiology and biochemical potential. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. 620–651, 2011.

KARIGAR, C.S. e RAO, S S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme Research**, v. 2011, 11 p., 2011.

KHANDEPARKA, R. e BHOSLE, N. B. Application of thermoalkalophilic xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 in biobleaching of kraft pulp. **Bioresource Technology**. 98(4):897-903, 2007.

LADEIRA, S. A. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanases por espécies de *Bacillus* sp.** 139 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.

LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜL, R. C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciências do Solo**, 4:43-84, 2005.

LARA-ESPINOZA, C.; CARVAJAL-MILLÁN, E.; BALANDRÁN-QUINTANA, R.; LÓPEZ-FRANCO, Y.; RASCÓN-CHU, A. Pectin and Pectin-Based Composite Materials: Beyond Food Texture. **Molecules**, 23(4), 942, 2018.

LE ROES-HILL M. e PRINS, A. Biotechnological potential of oxidative enzymes from Actinobacteria. **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications**, 1-30, 2016.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIMA, M. V. de e SILVA, S. H.da. Gênero, trabalho e saúde da mulher: percepção das malvicultoras da Ilha do Valha-me Deus – Juruti/PA. **O Social em Questão**, nº 38, 2017.

LOCEY, K.J. e LENNON, J.T. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proc Natl Acad Sci**, 113:5970–5975, 2016.

LOURENÇON, T. V. e MAGALHÃES, W. L. E. **Lignina frente a fungos apodrecedores de madeira**. EMBRAPA- Comunicado Técnico, nº455, Colombo, PR, 2020.

LUCON, C. M. M. **Tecnologia sustentável *Trichoderma***. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/pdf/tecnologia_sustentavel/trichoderma.pdf> Acesso em: 11 de Jun. de 2019.

MACIEL, A.C. **Tendências do cultivo da malva (*Urena lobata* L.) por agricultores familiares em Manacapuru – Am.** Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical), Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2015.

MARGEM, J. I. **Estudo das características estruturais e propriedades de compósitos poliméricos reforçados com fibras de malva**. Tese (Doutorado em Engenharia) – Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2013.

MARTOS, M. A.; ZUBRESKI, E. R.; GARRO, O. A.; HOURS, R. A. Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels . **Biotechnology Research International**, v. 2013, n. April, p. 1–7, 2013.

MEDEIROS, C.M.; FRAXE, T.J.P. **Agroecologia, Extensão Rural e Sustentabilidade na Amazônia**. Editora da Universidade do Amazonas – EDUA, 2008.

MEHDI, M. e MOHAMMAD, A. Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds. **Adv. Synth. Catal.**, v. 356, ed. 5, p. 897-927, 2014.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MILAGRES, A.M.F.e PRADE, R.A. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. **Enzyme and Microbial Technology**, 16:627-632, 1994.

MOHAN, D.; PITTMAN JUNIOR, C.; TEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. **Energy Fuels**, v. 20, n. 3, p. 848-889, 2006.

MOJSOV, K. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. **Int J. Manage. IT Eng.** 2(10):583–609. ISSN 2249-0558, 2012.

MORAÏS, S.; BARAK, Y.; CASPI, J.; HADAR, Y.; LAMED, R.; SHOHAM, Y. *et al.* Cellulase-xylanase synergy in designer cellulosomes for enhanced degradation of a complex cellulosic substrate. **mBio**, 1, p. 5, 2018.

MOREIRA, S. E. **Estudo contábil para a inserção tecnológica na produção de fibras, a partir de malva e juta, na comunidade de Bom Jesus no Baixo Solimões.** Dissertação (Mestrado em Contabilidade e Controladoria). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

MOTTA, F.L; ANDRADE, C.C.P; SANTANA, M.H.A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. **In:**Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization. InTechOpen, New York, p 251–275, 2013.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa Ferramenta na Indústria. **Ciência Hoje**, v.41, nº 242, p. 28-33, 2007.

MWAIKAMBO, L. Y; ANSELL, P. M. Chemical Modification of Hemp, Sisal, Jute, and Kapok Fibers by Alkalization. **Journal of Applied Polymer Science**, v.84, 12, p. 2222–2234, 2002.

NINAWÉ, S. e KUHAD, R.C. Bleaching of wheat straw-rich soda pulp with xylanase from a thermoalkalophilic *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresource Technol.** 97, 2291–2295, 2006.

NRCS. **Natural Resources Conservation Service.** United States Departmente of agriculture. Disponível em: <<https://translate.google.com/translate?hl=pt-BR&sl=en&u=https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet%3Fsource%3Dprofile%26symbol%3DCOCA38%26display%3D31&prev=search>> Acesso em 04 de março de 2019.

OLIVEIRA, A. M.; OLIVEIRA, A. L. B.; SILVA, J. L. M.; MARQUES, M. G. S.; VASCONCELOS, R. V.; OLIVEIRA, D. R. C. Influência de tratamentos superficiais na absorção de água e na resistência à tração de fibras vegetais de *Urena lobata* Linn. **Tecnia**, v.5, n.1, 2020.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

- PAMPHILE, J. A.; COSTA, A. T.; ROSSETO, P.; POLONIO, J. C., PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Revista uninga**, v. 53, n. 1, jan. 2018. ISSN 2318-0579. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/1403>>. Acesso em: 07 Jun. 2019.
- PAN, N.C.; DAY, A.; MAHALANABIS, K.K. Properties of Jute. **Indian Textile J.** 110: 16, 2000.
- PANIZZON, J. P.; PILZ JÚNIOR, H. L.; KNAACK, N.; RAMOS, R. C.; ZIEGLER, D. R.; FIUZA, L. M.. Microbial Diversity: Relevance and Relationship Between Environmental Conservation And Human Health. **Braz. arch. biol. technol.** v.58 no.1, 2015.
- PASSETE FILHO, J.; MENEZES, M. Síntese de biodiesel empregando óleo de abacate. **Revista Analytica**, 68-78, 2009.
- PEARMAN, J. K; TAYLOR, J. E.; KINGHORN, J. R. Fungi in aquatic habitats near St Andrews in Scotland. **Mycosphere**, 1, 11 – 21, 2010.
- PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. **In:** Andrews, J.; Hirano, S. S. (Eds). **Microbial Ecology of Leaves**. New York. Springer Verlag. p.179-197. 1991.
- PIMENTEL, M.R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A.P.; MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. **Biotechnol Res Int.** 1-11, 2011.
- RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13, 127-135, 2003.
- RAIMBAULT, M.; General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic J. Biotechnol.** 1 (3), 174, 1998.
- RIO, J. C. del; RENCORET, J; MARQUES, G; LI, J; GELLERSTEDT, G; JIMÉNEZ-BARBERO, *et al.* Structural Characterization of the Lignin from Jute (*Corchorus capsularis*) Fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 57, 10271–10281, 2009.
- ROLDÁN, A.; PALACIOS, V.; PENATE, X.; BENITEZ, T.; PEREZ, L. Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of Palomino fino grapes in the sherry region. **Journal of Food Engineering**, n. 75, p. 375–382. 2006.
- ROSSELÓ-MORA, R. e AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.
- RUEGGER, M.J.S. e TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 27:205-211, 2004.
- SAITO, T.; HONG, P.; KATO, K.; OKAZAKI, M.; INAGAKI, H.; MAEDA, S. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 520–526, 2003.

SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, S.; VELASCO-AYALA, C.; LEAL-ISLA FLORES, P.; ROSTRO-ALANIS, M.; PARRA-SALDIVAR, R.; IQBAL, H. *et al.* Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **Int. J. Biol. Macromol.**, 161, p. 1099-1116, 2020.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**. v.27, 185-194 p., 2009.

SANTOS, A. da S., **Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante**. 94 p. Dissertação (Mestrado em ciências) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2011.

SANTOS, C.T; FILHO, G.A; ROCHA, T.J.O; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 87-96. 2011.

SEYFRIED, M.; SOLDERA-SILVA, A.; BOVO, F.; STEVAN-HANCKE, F.R.; MAURER, J.B.B.; ZAWADZKIBAGGIO, S.F. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.201-214, 2016.

SHEARER, C. A.; DESCALS, E.; KOHLMAYER, B.; KOHLMAYER, J.; MARVANOVÁ, L.; PADGETT, D. *et al.* Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**, 16(1), 49–67, 2007.

SHEARER, C. A.; RAJA, H. A.; MILLER, A. N.; NELSON, P.; TANAKA, K.; HIRAYAMA, K. *et al.* The molecular phylogeny of freshwater Dothideomycetes. **Studies in Mycology**, 64, 145–153, 2009.

SHIN, S.; KO, Y.; HYEON, J.; HAN, S. Studies of advanced lignin valorization based on various types of lignolytic enzymes and microbes. **Bioresour. Technol.**, 289, p. 121728, 2019.

SILVA, S. H.; e FRAXE, T. J. P. Processo produtivo da juta e malva na perspectiva do desenvolvimento sustentável. **Somanlu**, n. 1, 2012.

SIMONIS, J.L.; RAJA, H.A.; SHEARER, C.A. Extracellular enzymes and soft rot decay: Are ascomycetes important degraders in fresh water? **Fungal Diversity**. 31:135-146, 2008.

SINGH, R. KUMAN, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, 6:174, 2016.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial celulasas. **Enzyme Microb. Technol.** 46, 541, 2010.

SIQUEIRA, F.G.; FERREIRA FILHO, E. X. **Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications**. Enzymology Laboratory, Cellular Biology Department, University of Brasília, Brasília, DF, 2010.

SOARES, G. T. **Sustentabilidade Socioambiental: Um estudo de caso na cooperativa de fibras vegetais, malva e juta, de Manacapuru no Amazonas**. 110 p. Dissertação (Mestrado em Serviço Social) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P. *et al.* Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30(3): 700-705, 2010.

SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J. *et al.* Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. **Science** 306, 2004.

SOUZA, H.H. **Ambiente e sociedade: A cadeia produtiva da malva (*Urena lobata* L.) no médio Solimões: uma alternativa sustentável?** 109 p. Dissertação de Mestrado (Ciências do Ambiente e Sustentabilidade no Amazonas), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

SUDHA, V.; GOVINDARAJ, R; KATHIRVELU, B; AL-DHABI, N.A.; DURAI PANDIYAN, V. Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 59, 2016.

TOLAN, J.S. e FODDY, B. Cellulase from submerged fermentation. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. v. 65, p. 41-67. 1999.

TOLEDO K., **Etanol de segunda geração com biogás**. FAPESP. 2012. Disponível em < <http://agencia.fapesp.br/etanol-de-segunda-geracao-com-biogas/15120/> > Acesso em: 21 de Jun. de 2019.

TONELLI, M. L.; FIGUEREDO, M. S.; RODRÍGUEZ, J.; FABRA, A.; IBAÑEZ, F. Induced systemic resistance -like responses elicited by rhizobia. **Plant and Soil**, 448(1–2), 1–14, 2020.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

UHLIG, H. **Industrial Enzymes and their Applications**. John Wiley and Sons, Inc., New York, 435, 1998.

VALLS, C. e RONCERO, M. B. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. **Bioresource Technology**, 100, 2032-2039, 2009.

VILA, V.V.; REZENDE, R.; MALDONADO-SILVA, L.H.; NOCCHI, R.C. de F.; ANDREAN, A.F.B.; WENNECK, G.S. *et al.* Microbiota do solo na tolerância a doenças em plantas: Uma revisão. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 8, p. e25910817161, 2021.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; RÓMERO-GOMEZ, S.J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal** v.13 p.157– 67, 2003.

WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, volume 23, pages79–83, 2007.

WU, D.; WEI, Z.; MOHAMED, T. A.; ZHENG, G.; QU, F.; WANG, F. *et al.* Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. **Chemosphere**, 286, 131635, 2022.

WUSIGALE, LIANG, L. e LUO, Y. Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. **Trends in Food Science & Technology**, 97,391-403, 2020.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Prog. Energy Combust. Sci.**, 42, p. 35-53, 2014.

ZHOU, Z.; JU, X.; CHEN, J.; WANG, R.; ZHONG, Y.; LI, L. Charge-oriented strategies of tunable substrate affinity based on cellulase and biomass for improving in situ saccharification: a review. **Bioresour. Technol.**, 319, p. 124159, 2021.

CAPÍTULO I

BIODIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E DE AMBIENTES ASSOCIADOS A *Urena lobata* L., (1753) NA AMAZÔNIA

SANTIAGO, S.R.S.S.; SANTIAGO, P. A. L.; SOUZA, M. M. M.; OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, R.S.; BARBOSA, A. N.; SEVALHO, E.S.; OHSE, K. C.; SILVA, G. F.; CRUZ, J.C.; SOUZA, A. D. L.; SOUZA, A. Q. L. de

RESUMO

A malva (*U. lobata*) é uma planta oriunda de zonas tropicais que foi introduzida na região Amazônica por imigrantes japoneses. Atualmente diversas famílias de ribeirinhos têm seu sustento do cultivo desta planta para obtenção de fibra apresentando-se como uma boa alternativa para substituição ao cultivo da juta (*Corchorus capsularis*). Esta pesquisa investigou a diversidade fúngica de *U. lobata* e dos ambientes associados a esta cultura. Foram preservados 191 fungos de um total de 344 microrganismos isolados dos tecidos da malva *in natura*, macerada e dos ambientes associados. Posteriormente as linhagens foram agrupadas e 10% do total de cada grupo teve seu DNA total extraído e seqüenciado para obtenção da identificação molecular obtendo-se 24 espécies.

Palavras-chave: *Urena lobata*, Fungos endofíticos, Amazônia.

BIODIVERSITY OF ENDOPHYTIC FUNGI AND ENVIRONMENTS ASSOCIATED WITH *Urena lobata* L., (1753) IN THE AMAZON

ABSTRACT

Caesarweed (*U. lobata*) is a plant from tropical areas that was introduced in the Amazon region by Japanese immigrants. Currently, several riverine families have their livelihood from the cultivation of this plant to obtain fiber, presenting itself as a good alternative to replace the cultivation of jute. This research investigated the fungal diversity of *U. lobata* and the environments associated with this culture. A total of 191 fungi were preserved from a total of 344 microorganisms isolated from the tissues of caesarweed *in natura*, macerated and associated environments. Subsequently, the strains were grouped and 10% of the total of each group had their DNA extracted and sequenced to obtain molecular identification, obtaining 24 species with their respective biotechnological potentials mentioned in the literature.

Keywords: *Urena lobata*, Endophytic fungi, Amazon

1. INTRODUÇÃO

A *Urena lobata* (L., 1753), popularmente conhecida como malva é uma planta anual e perene, sem muitas exigências nutricionais, pertencente à família *Malvaceae* (BENZZONI, 1973). Adaptada a regiões quentes e úmidas, é encontrada amplamente nas zonas tropicais e temperadas dos continentes Americano, Asiático e Africano, onde possui intensos cultivos na Bacia do Congo, África Central, Brasil, Índia, Madagascar, entre outros países (ISLAM e UDDIN, 2017).

No Brasil, a cultura de malva tem importância no setor produtivo de fibras vegetais e as famílias ribeirinhas do baixo Amazonas detém boa parte do cultivo e produção (SILVA e FRAXE, 2012; MACIEL, 2015). A malva foi introduzida na Amazônia, em 1970, no estado do Pará e em 1971 no Amazonas paralelamente ao cultivo de juta (*Corchorus capsularis*, L., 1753). Semelhante à juta e com melhor germinação, agregou maior valor econômico à cultura de fibras vegetais, com aproximadamente 1.750 toneladas na sua primeira safra. Após doze anos, a produção de fibra de malva no Estado do Amazonas já era três vezes superior à fibra de juta alcançando, em 1988, aproximadamente 30.346 toneladas. Quando processada obtém-se: fibras longas, claras, brilhosas, flexíveis e resistentes, utilizadas na produção de inúmeros produtos artesanais e industriais (SOUZA, 2012). Por causa das inundações dos rios amazônicos, suas colheitas são realizadas precocemente nas áreas de várzeas (BENTES *et al.*, 2017). A população ribeirinha não resistiu aos efeitos econômicos da malva e impulsionou sua adaptação (MEDEIROS *et al.*, 2008; SOUZA, 2012). Devido ao seu caráter ruderal e contexto histórico de produção, além da inexistência de relatos da utilização dessa planta por parte dos indígenas locais em épocas coloniais, infere-se que a malva seja uma planta exótica (HOMA, 1998).

A adaptação de um vegetal depende basicamente de ecossistemas semelhantes e estabilidade simbiótica. No caso da malva, seu processo de adaptação à Amazônia se mostrou atrativo para fins de estudos ecológicos e biotecnológicos. A diversidade microbiana é primordial para o funcionamento dos ecossistemas (AZEVEDO, 2014; FELBER *et al.*, 2016). A microbiota da rizosfera bem como os microrganismos endofíticos que habitam harmoniosamente os tecidos vegetais (folhas, raízes, flores, frutos e ramos) desempenham papéis importantes pois lhes conferem inúmeros benefícios atuando contra predadores e patógenos, produzindo antibióticos, enzimas (AZEVEDO, 2000; PAMPHILE *et al.*, 2017; EMBRAPA, 2019), hormônios de crescimento, vitaminas, substâncias anticânceres e fixação de nutrientes (AZEVEDO, 2014; PANIZZON *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2010). As microbiotas terrestre e aquática, desempenham função importante na decomposição de material celulósico, liberando enzimas para o meio extracelular (SIMONIS, 2008).

O grande interesse nesses grupos está na ampla distribuição desses microrganismos em todos os ambientes (LUCON, 2019). O grupo dos ascomicetos é o mais prevalente em substrato de madeira em decomposição e nos locais de água doce e estuarina (SHEARER *et al.*, 2009), pois produzem celulases e pectinases, enzimas cruciais na decomposição da serrapilheira (SIMONIS, 2008; (LAMBAIS *et al.*, 2005). Estudos da diversidade microbiana terrestre, aquática e simbiótica são imprescindíveis para a indústria biotecnológica (CORTEZ, 2016) e para se entender as relações ecológicas entre os seres vivos que ocupam um determinado ecossistema.

A diversidade microbiana é rica em recursos genéticos, principalmente quando se estuda a Amazônia. Com os avanços tecnológicos na biologia molecular, é possível produzir e analisar grandes quantidades de dados genômicos por meio de análises filogenômicas e filogenéticas (WIBBERG *et al.*, 2021). Sem dúvidas, os fungos são onipresentes e um dos maiores grupos eucarióticos, com estimativas de aproximadamente 5,1 milhões, segundo Blackwell (2011). Segundo Cai e Druzhinina (2021) até 2020 foram reconhecidas aproximadamente 375 espécies de fungos do gênero *Trichoderma* de diferentes ambientes, usando sequências específicas de DNA micótico (18S *rDNA*, 5.8S *rDNA*, 28S *rDNA*), como marcadores moleculares (*ITS1-2* do *rDNA*, *TEF1* e *RPB2*) em estudos filogenéticos apresentando variabilidades específicas para inúmeras espécies. Os fungos são imprescindíveis na vida humana, biotecnologia, fisiopatologia e fitopatologia (HYDE *et al.*, 2019). Inúmeros gêneros são bem conhecidos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Xylaria*, entre outros do grupo Ascomycota (STEENWYK *et al.*, 2019), mas a maioria das espécies estão para serem descobertas e descritas devido à falta de pesquisas e as variabilidades inter e intraespecíficas.

Neste estudo, o objetivo foi identificar a diversidade fúngica de *U. lobata*, sua distribuição na hospedeira *in natura*, no processo de maceração, além dos ambientes associados ao seu plantio no Estado do Amazonas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE COLETA E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DA MALVA E SEU HABITAT

As amostras vegetais de *U. lobata* foram coletadas na Ilha do Marrecão, localizada no município de Manacapuru, Amazonas, Brasil (geolocalização S 3°22'42.7"W 60°43'06.8") e as sementes de malva foram gentilmente cedidas pelo Núcleo de Socioeconomia (NUSEC/UFAM). Além da malva *in natura* e imersa, foram coletadas, em tubos falcon de 50 mL estéreis, amostras dos ambientes associadas ao processo de obtenção da fibra da malva: solo de plantio (SP), solo alagado

da borda do lago de maceração (SAL), água de maceração (AM) e água do rio Solimões (ASO) (Figura 1).

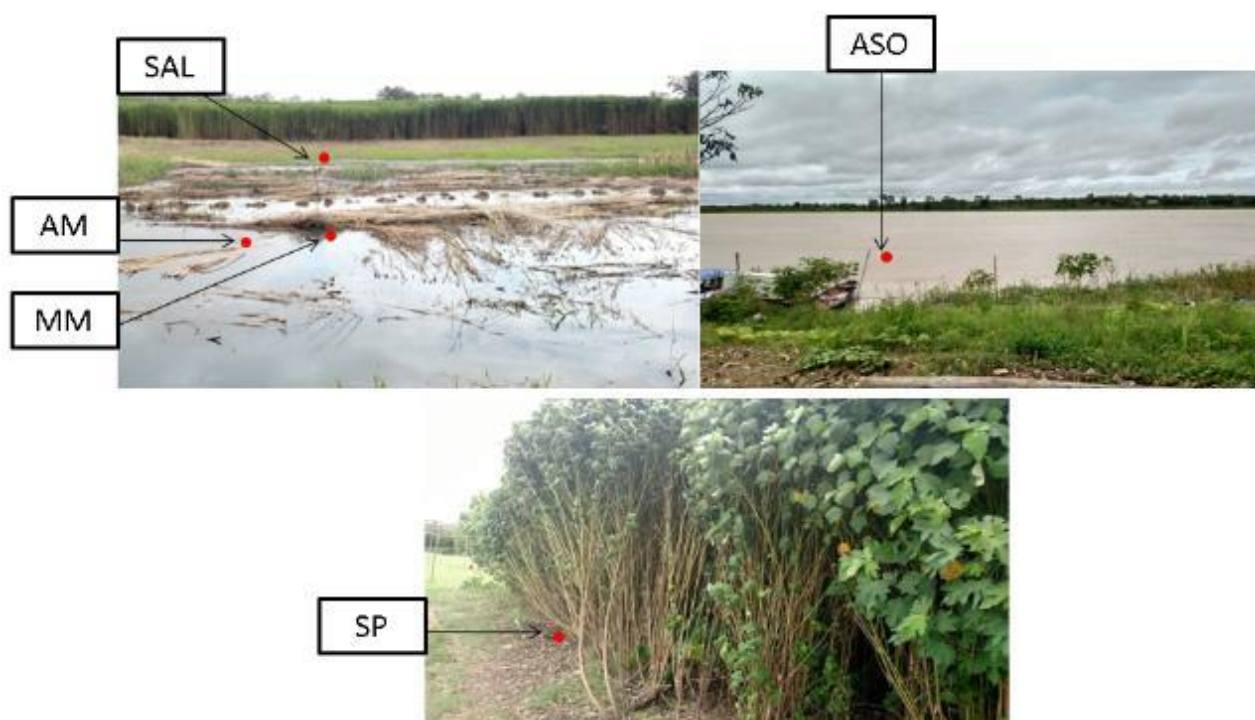


Figura 1: Ambientes associados ao cultivo da malva no Amazonas: SAL (solo alagado da borda do lago de maceração); AM (água de maceração); MM (malva em processo de maceração); SP (solo do plantio) e ASO (água do rio Solimões).

O material biológico foi submetido ao processo de assepsia com água corrente e sabão neutro. Para a obtenção dos endófitos utilizou-se a metodologia modificada de Pereira *et al.*, (1993). Em câmara de fluxo laminar o material vegetal foi imerso em etanol 70% durante 1 min., em hipoclorito de sódio 2% por 4 min. e em etanol 70% por 30 seg. Inoculou-se 360 fragmentos medindo aproximadamente 0,5 cm² numa matriz 2x2 dos tecidos da malva *in natura* tais como as folhas (MINF), casca (MINC) e lenho (MINL), da malva imersa, casca (MMC) e lenho (MML) e 36 sementes de malva (SM).

Para isolamentos das amostras do solo do plantio (SP) utilizou-se a metodologia modificada de Pinotti *et al.*, (2011). Homogeneizou-se em vórtex 1g de solo em 2 mL de Tween 80% a 0,02%, em seguida realizou-se uma diluição seriada, onde 100 µL dessa solução foi dispensada em 900 µL de água destilada estéril, seguindo as sucessivas diluições (até 10⁵). Plaqueou-se 100 µL da quinta, quarta e terceira diluições em triplicata.

Para o isolamento dos microrganismos presentes nas amostras de água (AM e ASO) executou-se também a diluição seriada e plaqueou-se 100 µL da quinta, quarta e terceira diluições, em triplicata. Os meios de cultura utilizados nos isolamentos citados acima foram BDA+L (batata-dextrose-água

enriquecido com 0,2% de extrato de levedura) acrescido de Fluconazol (100 µg/mL), BDA+L acrescido de ampicilina e tetraciclina (100 µg/mL) conforme Souza *et al.*, (2004) e ágar sabouraud acrescido de cloranfenicol (500 µg/mL). As amostras de sementes de malva, foram semeadas em BDA+L (20% água de batata, 2% dextrose, 0,2% extrato de levedura e 1,5% ágar), ágar-aveia (1% aveia, 2 % dextrose, 1,5% ágar, 0,4% extratos de levedura e 0,4% malte) e ISP2 (0,4% extratos de levedura, 1% malte, 2% dextrose, 1,5% ágar e 1% amido) ambos acrescidos de ampicilina e tetraciclina (100 µg/mL), e ágar-aveia e ISP2 acrescido de tetraciclina e cetoconazol (100 µg/mL). Todo o experimento foi incubado à 18° C, 28° C e 40° C em incubadora com demanda biológica de oxigênio (B.O.D) sequencialmente por oito dias a cada temperatura.

Para o controle, plaqueou-se 100 µL da água destilada do processo de assepsia dos tecidos nas mesmas condições de isolamento e cultivo. À medida que surgiam os microrganismos nas placas, repiques eram feitos para tubos de ensaio contendo os mesmos meios de cultura do isolamento inclinados para suas purificações posteriores.

A frequência relativa (FR) foi calculada através da razão entre o número total de isolados de um grupo e o número total de isolados multiplicado por 100. A frequência de colonização (FC) foi calculada através da razão entre o número de fragmentos com algum crescimento microbiano e o total de isolados multiplicado por 100 (PETRINI *et al.*, 1992, HUNG *et al.*, 2007).

2.2 PURIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Para purificar as linhagens mitospóricas utilizou-se a técnica de cultura monospórica para obter o isolamento a partir de um único indivíduo da espécie (FERNANDEZ, 1993) e para fungos meiospóricos e micélio esterilia utilizou-se a técnica de sucessivos repiques. Todos os fungos purificados foram conservados em duplicata em óleo mineral para mostruário (BUELL e WESTON, 1947) e em triplicata em criopreservação utilizando glicerol a 20% (COSTA *et al.*, 2009). Os fungos de reprodução assexuada foram também preservados em água destilada (CASTELLANI, 1939) e os de reprodução sexuada em palitos de madeira (BELOTI, 2015; BUENO, 2006). Todos os fungos preservados foram depositados na coleção de trabalho do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LABMICRA) na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

2.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR

Para caracterização taxonômica das espécies utilizou-se abordagem morfológica e molecular. Para caracterização morfológica, todas as linhagens foram crescidas em meio de cultura BDA, por 8 dias a 28° C das quais se registrou a frente e o dorso das placas de Petri por fotografias. Foram confeccionadas lâminas de microcultivo a fim de visualizar as estruturas vegetativas e de reprodução

que foram observadas em microscópio óptico com o aumento de 40 vezes. Os isolados foram agrupados, de acordo com as características vegetativas e reprodutivas semelhantes e comparados com a literatura específica à taxonomia de cada grupo (BARNETT e HUNTER, 1972; KIFFER, 1999; WATANABE, 2002).

Para a identificação molecular cultivou-se 10% de cada grupo (37 isolados) em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio BDL (batata, dextrose, extrato de levedura) por 24-48 horas, a 28 °C e 120 rpm. Após esse período, o cultivo foi filtrado à vácuo com papel de filtro, para obtenção da massa micelial. O DNA total foi extraído com o kit (Zymo Research) Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™, de acordo com o protocolo do fabricante e pequenas modificações (SILVA FILHO, 2021). A quantificação do DNA genômico foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific), e observou-se a integridade do DNA extraído em gel de agarose 0,8%. Um fragmento interno de aproximadamente 700 pb das regiões *ITS-1* a 2 do *rDNA* foi amplificado utilizando os primers *Its1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e *Its4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990).

Para as reações de PCR foi utilizado o kit illustra™ PuRe Taq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare), obtendo um volume final de 25 µL em termociclador (SuperCycler® Kyrtec) com ciclo inicial por 94° C por 4 min. e 35 ciclos de 94° C por 2 min. (desnaturação), 55° C por 2 min. (anelamento) e 72° C por 2 min. (amplificação), ao final o DNA foi mantido a 4° C por tempo indeterminado (SOUZA, 2006). O amplicom foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1%, coradas com GelRed™ e marcador Plus DNA Ladder de 1 Kb (Invitrogen®).

Os amplicons foram purificados com a enzima ExoSAP-IT (Ge Healthcare) quantificados e ajustados para a concentração de 10 ng/µL e posteriormente decodificados em sequenciador modelo 3500 (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA).

As sequências geradas durante o sequenciamento foram avaliadas quanto a qualidade através da ferramenta FastQC disponível na plataforma Galaxy. O programa BioEdit foi utilizado para remoção de pares de bases com baixa qualidades ($Q < 20$) presentes nas extremidades das sequências e montagem dos contigs através da ferramenta CAP. A identificação taxonômica foi realizada na plataforma online do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando a ferramenta BLASTn contra o banco de dados rRNA/ITS (ITS from Fungi type and reference material), considerando o resultado de maior SCORE. A análise filogenética foi realizada com uso do programa MEGA-X v10.2.5, onde os contigs foram alinhados com a ferramenta ClustalW enquanto a árvore filogenética foi construída pelo método de Máxima Parcimônia (MP) com busca heurística pelo algoritmo TBR ("Tree-Bisection-Reconnection"), considerado a maior eficiência e bootstrap de 1000 repetições.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 FREQUÊNCIAS DOS ISOLADOS

Dos fragmentos de partes da malva *in natura*, imersa, e ambientes associados foram isolados 344 microrganismos totais, sendo purificados e preservados 317 (92,2 %). Destes, 196 (57,0 %) foram isolados dos tecidos da malva *in natura*, 46 (13,4 %) da malva macerada e 75 (21,8%) de ambientes associados à malva (Figura 2).

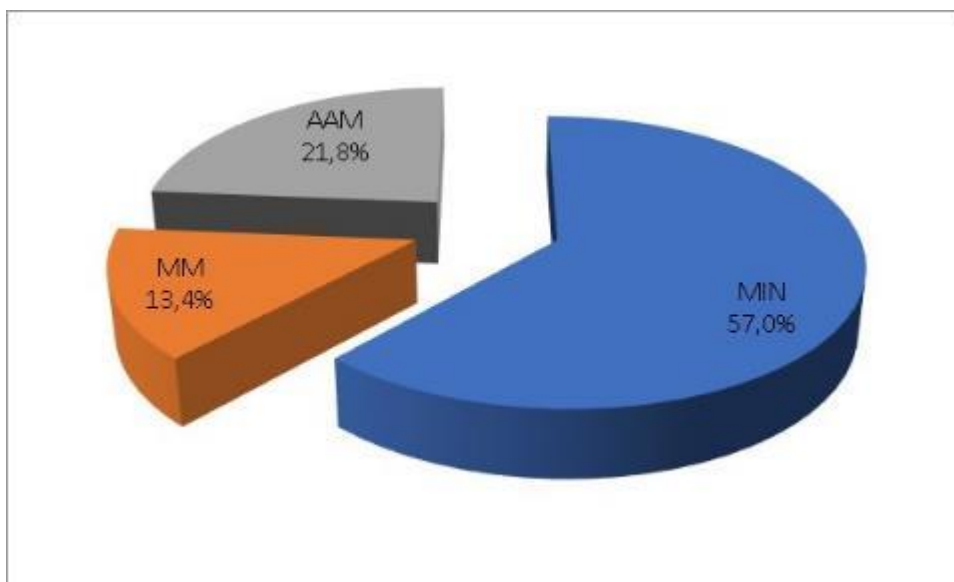


Figura 2. Gráfico das porcentagens de microrganismos totais conservados. MIN: partes totais da malva *in natura* (SM, MINF, MINC e MINL); MM: tecidos da malva macerada (MMC e MML); AAM: ambientes associados a malva (SP, SAL, ASO e AM).

Dentre os 317 preservados, 191 (55,8 %) são fungos filamentosos e os demais são bactérias, leveduras e actinomicetos (Tabela 1).

Tabela 1: Fungos filamentosos isolados de todos os tecidos e ambientes coletados.

	Amostra	Código	Fungos filamentosos	Total de isolados	FR%	FC%
Malva <i>in natura</i>	Folha	MINF	46	203	22,7	69,2
	Lenho	MINL	11		5,4	78,5
	Casca	MINC	70		34,5	43,9
	Semente	SM	34		16,7	17,0
Malva macerada	Lenho	MML	7	48	2,1	66,6
	Casca	MMC	1		14,6	58,3
Ambientes associados ao plantio de malva	Solo alagado da borda do lago de maceração	SAL	5	93	5,4	-
	Água de maceração	AM	2		2,2	-
	Água do rio Solimões	ASO	0		0	-
	Solo do plantio	SP	15		16,1	-
Total			191	344		

FR%: frequência relativa; FC%: Frequência de colonização.

As definições de endofítico, epifítico e patogênico dependem do comportamento dos microrganismos em relação ao hospedeiro. Segundo Peixoto-Neto *et al.*, (2002) um epifítico pode eventualmente ser encontrado dentro de tecidos vegetais, enquanto que o endofítico pode tornar-se patogênico diante de algumas condições desfavoráveis e um patógeno pode por algum motivo não afetar o hospedeiro e ser considerado um endofítico.

Após os agrupamentos dos microrganismos identificou-se 38 morfogrupos através das características fenotípicas de cada cepa e posteriormente com a identificação molecular verificou-se que alguns microrganismos pertenciam aos mesmos gêneros e foram reagrupados reduzindo-os para 18 grupos de fungos filamentosos (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição por grupos dos fungos conservados.

GP	Gênero	MINF	MINC	MINL	SM	MMC	MML	AM	ASO	SAL	SP	Total	FR%
1	<i>Diaporthe</i> spp.	2	47	1	0	0	0	0	0	0	0	50	26,2
2	<i>Fomitopsis</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,5
3	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	15	7,9
4	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	17	0	1	0	0	2	0	20	10,5
5	<i>Gelasinospora</i> spp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1,0
6	<i>Trichoderma</i> spp.	0	0	0	0	0	2	0	0	1	5	8	4,2
7	<i>Fusarium</i> spp.	9	12	5	1	0	0	0	0	0	2	29	15,2
8	<i>Talaromyces</i> spp.	1	1	1	0	0	0	2	0	0	6	11	5,8
9	<i>Lasiodiplodia</i> spp.	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	4	2,1
10	<i>Paecilomyces</i> sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0,5
11	<i>Westerdykella</i> spp.	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	3	1,6
12	<i>Humicola</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0,5
13	<i>Colletotrichum</i> spp.	22	8	0	0	0	2	0	0	0	1	33	17,3
14	<i>Corynespora</i> spp.	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	3,1
15	<i>Nigrospora</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5
16	<i>Rhizopus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,5
17	<i>Clonostachys</i> spp.	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1,0
18	<i>Pyrenochaetopsis</i> spp.	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1,6
Soma		46	70	11	34	1	7	2	0	5	15	191	

GP: grupos; FR%: frequência relativa; MINF: folha (*in natura*), MINL: lenho (*in natura*); MINC: casca (*in natura*); SM: semente; MML: lenho (macerado); MMC: caule (macerado); SAL (solo alagado da borda do lago de maceração); AM (água de maceração); SP (solo do plantio) e ASO (água do rio Solimões).

Os fungos que possuem frequências abaixo de 1% como apresentado nos grupos *Fomitopsis* sp., *Paecilomyces* spp., *Humicola* sp., *Nigrospora* sp. e *Rhizopus* sp., indicam gêneros não comuns nos tecidos da planta. Em alguns casos, podem não ser endófitos naturais, mas sim epífitos ou até mesmo fitopatógenos que tentam colonizar o tecido da planta transitoriamente (BANHOS, 2014). Os gêneros mais comuns encontrados em plantas cultivadas em solos brasileiros são *Ascochyta*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Mucor*, *Nodulisporium*, *Pestalotia*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Rhizopus* e *Xylaria* (PEIXOTO- NETO, AZEVEDO E ARAÚJO (2002).

3.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os 37 isolados fúngicos submetidos à identificação molecular estão divididos em 18 grupos e 24 espécies de fungos listados no dendograma da figura 3.

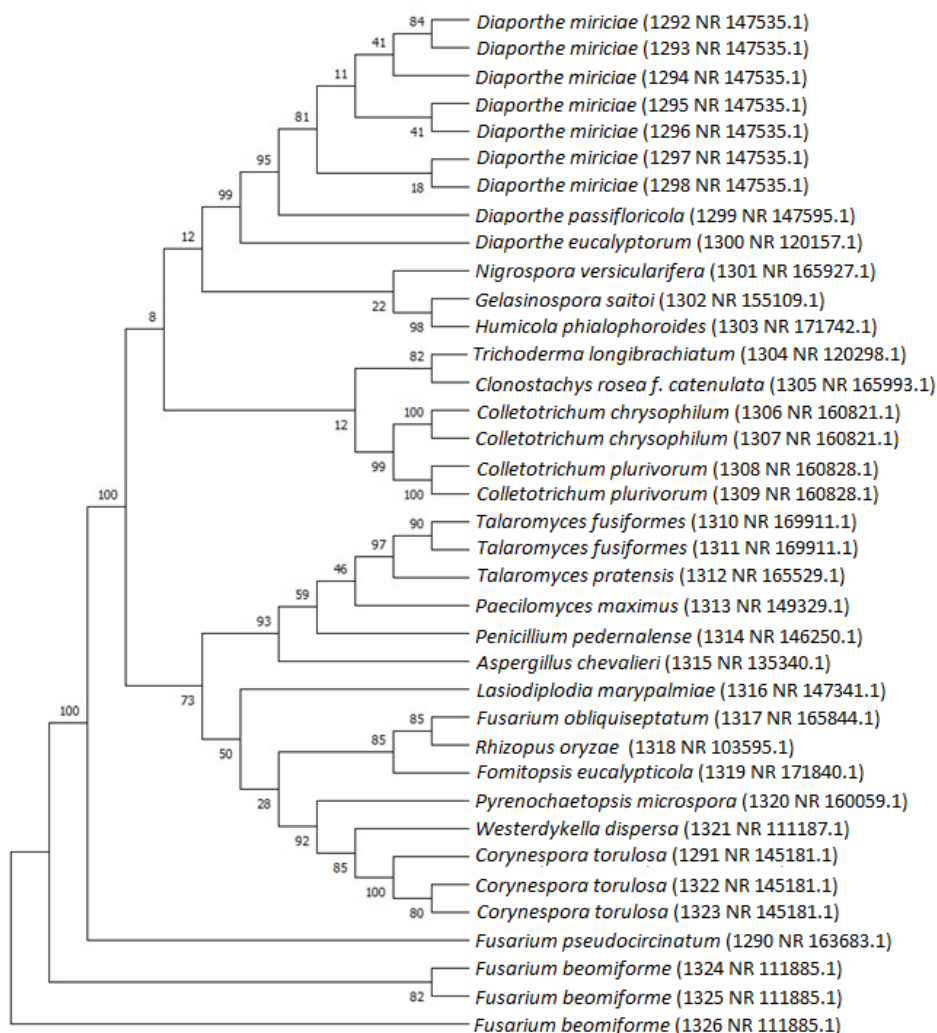
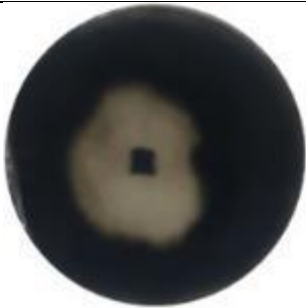
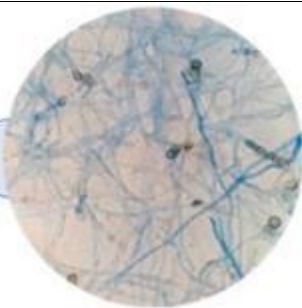


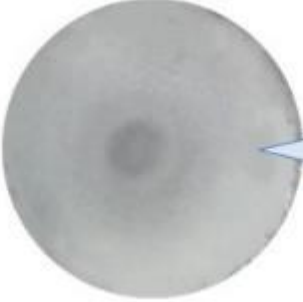
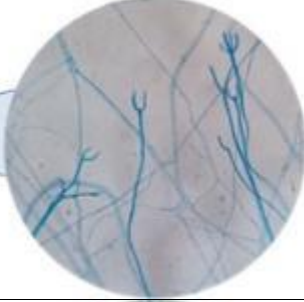
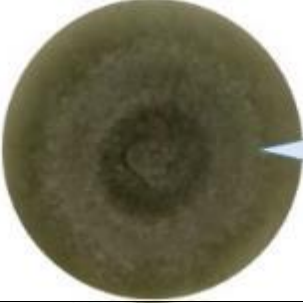
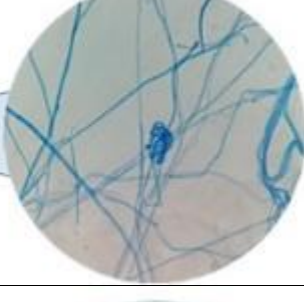
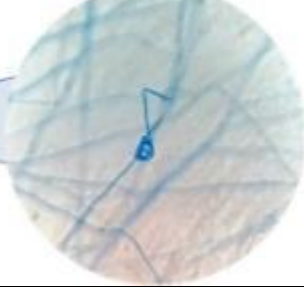
Figura 3 –Árvore filogenética da diversidade fúngica relacionada à malva no Amazonas. Árvore filogenética construída pelo método Maximum Like lihood (bootstrap 1000 replica) com o software MEGA (versão 5.2) a partir de marcadores de DNA de 700 pb das regiões ITS-1 a 2 do rDNA. Descrição da diversidade microbiana relacionada a malva no Amazonas.

As sementes e folhas de malva já foram alvo de estudo de fungos endofíticos por Ferreira *et al.*, (2018) onde encontrou-se linhagens de *Phomopsis* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. nas folhas e sementes de malva plantadas nos municípios de Manaus e Anori. Em folhas e sementes do município de Manaus obteve-se linhagens de *Pestalotiopsis* spp., e em sementes dos dois municípios citados anteriormente, obteve-se linhagens de *Curvularia* spp. Apenas nas folhas obtidas do município de Anori, encontrou-se *Cochliobolus* sp. As linhagens de *Colletotrichum* spp. foram encontradas predominantemente nas folhas, corroborando com os achados neste trabalho.

As linhagens 1308 e 1309, foram identificadas como *Colletotrichum plurivorum*, 1306 e 1307 como *Colletotrichum chrysophilum*, pertencentes á família Glomerellaceae (Tabela 3), contendo representantes do gênero isolados de MINF MINF, MINC, MML e SP. Este gênero é bem conhecido pela agronomia por abrigar inúmeros fitopatôgeno responsáveis por doenças de grandes impactos no setor agrícola como destaca Bhunjun *et al.*, (2021). O *C. chrysophilum* é conhecido como agente causador da anthracnose em bananais no México (FUENTES-ARAGÓN *et al.*, 2021). No estudo realizado por Veloso *et al.*, (2021) tal espécie faz parte de um consórcio de fitopatógenos que têm causado inúmeros prejuízos aos produtores de caju no Brasil. Na atualidade o *C. plurivorum* tem sido responsabilizado como agente causador da anthracnose em plantações de soja e lupino no Brasil, vegetais fontes de proteínas e óleos (WIRTZ *et al.*, 2021). Costa *et al.*, (2021) investigou um consórcio fúngico responsável por uma fitopatologia da cana-de-açúcar conhecida como podridão vermelha. Nele o *C. plurivorum* não foi considerado um dos responsáveis, porém sua presença como endófito não ficou esclarecida.

Tabela 3. Identificação molecular das linhagens 1306, 1307, 1308 e 1309.

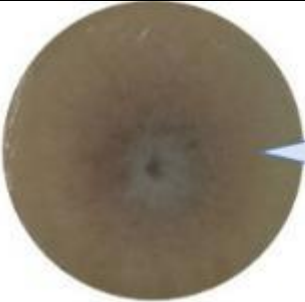
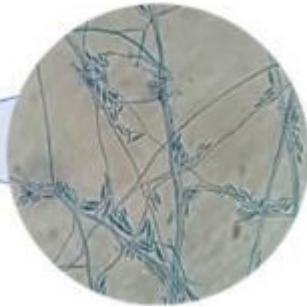
Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1306	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellales; Glomerellaceae; (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> species complex.)	99,41%	NR_160821.1			

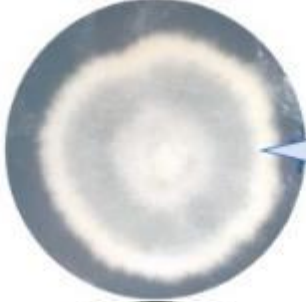
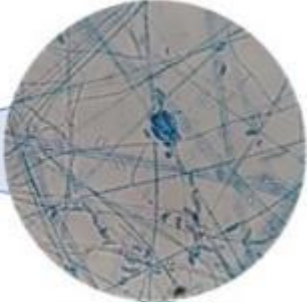
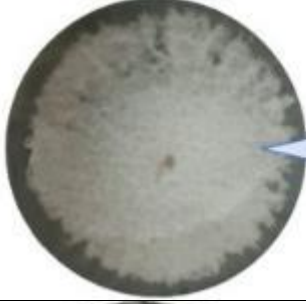
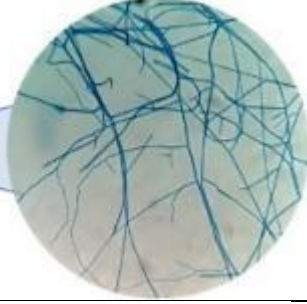
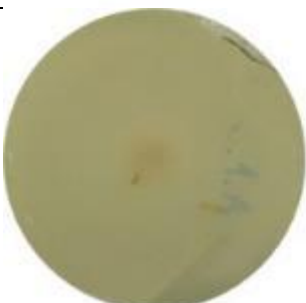
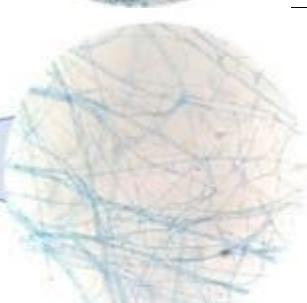
1307	<i>Colletotrichum chrysophilum</i>	99,42%				
1308	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellales; Glomerellaceae; (<i>Colletotrichum orchidearum</i> species complex.)	99,61%				
1309	<i>Colletotrichum plurivorum</i>	98,07%	NR_160828.1			

Ferreira *et al.*, (2018) encontraram *Fusarium* spp. predominantemente em semente, no entanto, neste trabalho obteve-se apenas um morfogrupo em SM e a maioria das linhagens encontradas neste trabalho estavam em MINC, no entanto houve representantes também em MINF, MINL e SP. As linhagens 1325, 1326, 1324 foram identificadas como *F. beomiforme* (*F. burgessii* species complex.), a cepa 1290 foi identificado como *F. pseudocircinatum* (*F. fujikuroi* species complex.) e a cepa 1317 foi identificada como *F. obliquiseptatum* (*F. solani* species complex.) pertencentes á família Nectriaceae (Tabela 4). As porcentagens de similaridade das linhagens 1324, 1325 e 1326 estão abaixo de 98%, sendo

necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. O gênero *Fusarium* contém patógenos, endófitos e fitopatógenos que tem frequência em diversos habitats, desde o solo até as inflorescências das plantas (KEE, ZAKARIA e MOHD, 2020), além de linhagens produtoras de micotoxinas e patógenos humanos (SUMMERELL, 2019). Este gênero é formado por uma grande diversidade genética distribuída nos mais diversos grupos de vegetais (AL-HATMI, MEIS e DE HOOG, 2016). O estudo realizado por García-López *et al.*, (2016) traz um dos primeiros relatos do *F. pseudocircinatum* como fitopatógeno causador da malformação de vegetais produtores de manga na Dinamarca e Liew *et al.*, (2016) relata a mesma fitopatologia na Austrália. Um estudo de diversidade fúngica realizado no México o responsabilizou pela malformação de pés de mogno de folhas grandes (SANTILLÁN-MENDOZA *et al.*, 2020). No estudo realizado por Nicolli *et al.*, (2020) esta espécie faz parte de um consócio fúngico fitopatogênico em plantações de arroz no Brasil. O *F. beomiforme* está relacionado à podridão da folha do *Aloe vera*, planta medicinal muito apreciada em todo mundo (*Aloe barbadensis* Miller), em Jabalpur, na Índia (KAURAV, AYACHIB e SHARMAA, 2019) e também afeta plantações de trigo na Argélia (LARABA *et al.*, 2017). Lynn *et al.*, (2020) cita o *F. obliquiseptatum* como um dos integrantes do consocio fúngico responsável pela fitopatologia em *Acácia crassicarpa*, em Riau, Indonésia.

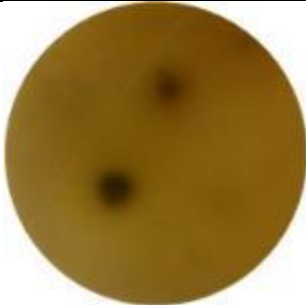
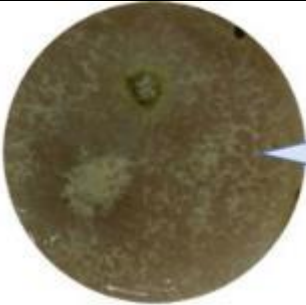
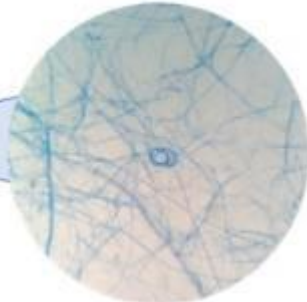
Tabela 4. Identificação molecular das linhagens 1290, 1317, 1324, 1325 e 1326.

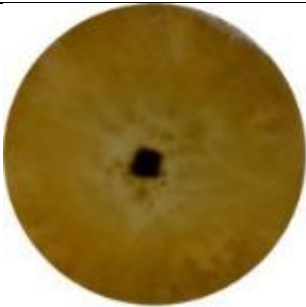
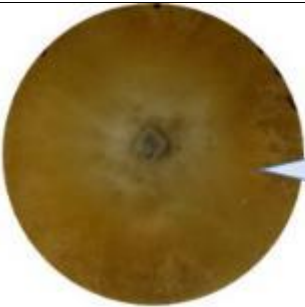
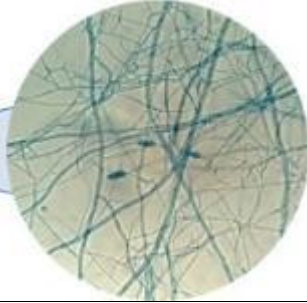
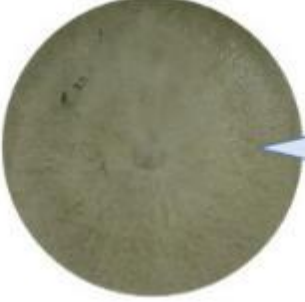
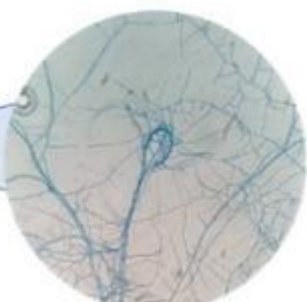
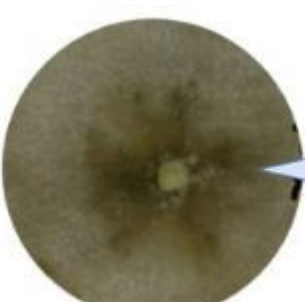
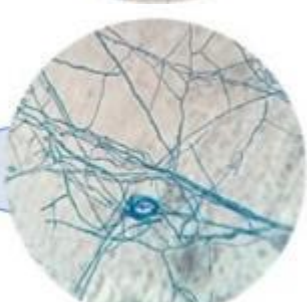
Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1290	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae; (<i>Fusarium fujikuroi</i> species complex.) <i>Fusarium pseudocircinatum</i>	99,58%	NR_163683.1			

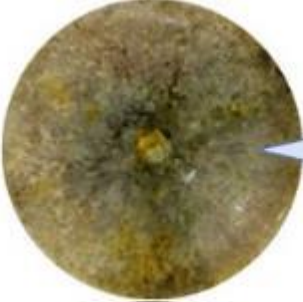
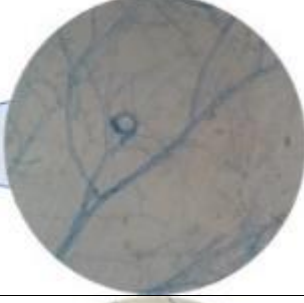
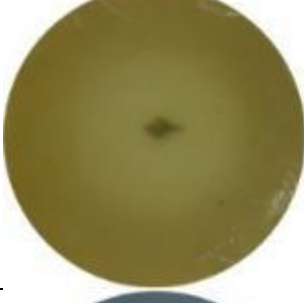
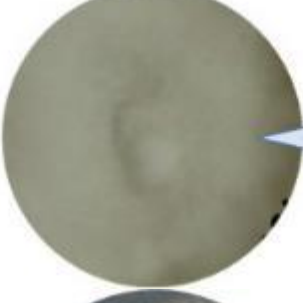
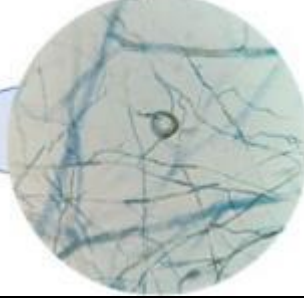
1317	Ascomycota; Pezizomycotina; ordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae; (<i>Fusarium solani</i> species complex.) <i>Fusarium obliquiseptatum</i>	100%	NR_165844.1			
1324		92,32%				
1325	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae; (<i>Fusarium burgessii</i> species complex.) <i>Fusarium beomiforme</i>	92,52%	NR_111885.1			
1326		92,28%				

As linhagens 1292, 1293, 1294, 1295, 1296, 1297, 1298 foram identificadas como *Diaporthe miriciae*, a cepa 1299 foi identificada como *D. passifloricola*, e a cepa 1300 foi identificada como *D. eucalyptorum* pertencentes à família Diaporthaceae (Tabela 5) contendo representantes do gênero isolados de MINF, MINC e MINL. As porcentagens de similaridade das linhagens 1293 e 1299 estão abaixo de 98%, sendo necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. Carvalho *et al.*, (2018) destaca a importância da espécie endofítica *D. miriciae* na produção de bioativos contra fitopatógenos isolada de copaíba (*Copaifera pubiflora*). Também foi isolada do girassol (*Helianthus annuus*), na Austrália (DISSANAYAKE *et al.*, 2017). No estudo realizado por Chaisiri *et al.*, (2021) *D. passifloricola* é considerado um patógeno de *Citrus reticulata* cv. Nanfengmiju, uma variedade de tangerina local economicamente importante para a China. No Brasil, é um endófito conhecido de maracujá silvestre (*Passiflora foetida*) vegetal de importância medicinal no tratamento de erisipela e inflamações dérmicas (SOARES *et al.*, 2011). O trabalho de Gao *et al.*, (2020) destaca *D. eucalyptorum* – endófito isolado de *Melia azedarach* na China – como uma importante produtora de relevantes bioativos de interesses agrônômicos.

Tabela 5. Identificação molecular das linhagens 1292, 1293, 1294, 1295, 1296, 1297, 1298, 1299, 1300.

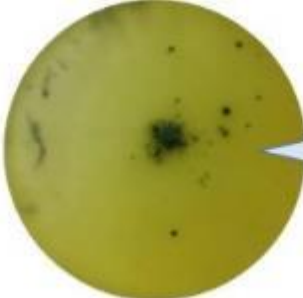
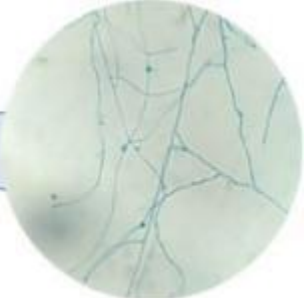
Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1292	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Sordariomycetidae; Diaporthales; Diaporthaceae; <i>Diaporthe miriciae</i>	99,25%	NR_147535.1			

1293	97,48%	  
1294	99,25%	  
1295	98,64%	  
1296	99,41%	  

1297		98,44%				
1298		98,64%				
1299	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Sordariomycetidae; Diaporthales; Diaporthaceae; <i>Diaporthe passifloricola</i>	96,94%	NR_147595.1			
1300	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Sordariomycetidae; Diaporthales; Diaporthaceae; <i>Diaporthe eucalyptorum</i>	99,41%	NR_120157.1			

A linhagem 1304 foi identificada como *Trichoderma longibrachiatum* pertencente à família Hypocreaceae (Tabela 6), tendo representantes do gênero isolados de MML, SAL e SP. Este gênero é bem conhecido na literatura e de grande relevância biotecnológica, principalmente para agronomia como destaca Machado *et al.*, (2012). Royer e Nakas (1989) há pouco mais de trinta anos já tinham observado que *T. longibrachiatum* é um importante produtor de enzimas xilanase e celulase para a indústria de celulose. Vicente *et al.*, (2001) verificou que esta espécie produz uma substância (Ergoconina A) que apresenta atividade contra *Aspergillus fumigatus*, agente etiológico da aspergilose, doença pulmonar que afeta seres humanos.

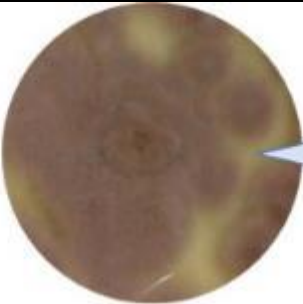
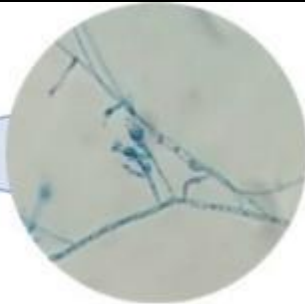
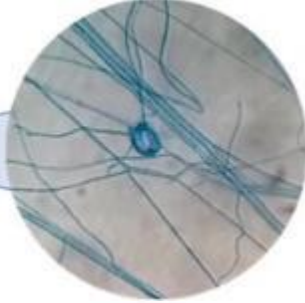
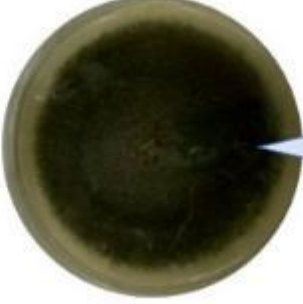
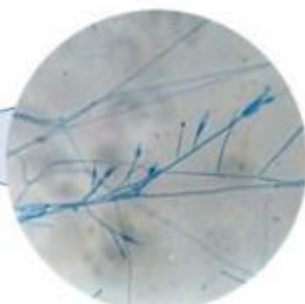
Tabela 6. Identificação molecular da linhagem 1304.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1304	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae; <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99,97%	NR_120298.1			

As linhagens 1310 e 1311 foram identificadas como *Talaromyces fusiformis* e a cepa 1312 foi identificada como *T. pratensis*, pertencentes à família Trichocomaceae (Tabela 7) contendo representantes do gênero isolados de MINF, MINC, MINL, AM e SP. A porcentagem de similaridade da linhagem 1310 está abaixo de 98%, sendo necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. Tal gênero é de grande relevância biotecnológica, apresentando integrantes fitopatogênicos e patógenos humanos (GUEVARA-SUAREZ *et al.*, 2017; TSANG *et al.*, 2018). *T. fusiformis* é uma espécie recentemente definida e tem potencial para causar infecções em seres humanos, porque se desenvolve bem a 37° C (CHEN *et al.*, 2016). Suas atividades ecológicas ainda não estão todas compreendidas (TSANG *et*

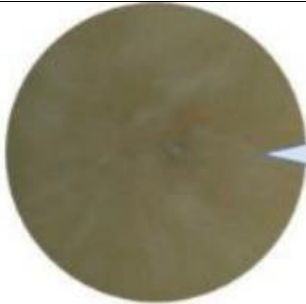
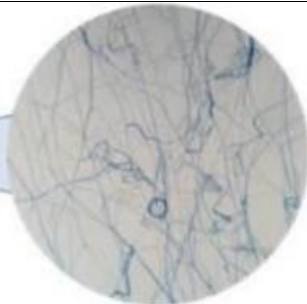
al., 2018). *T. pratensis* faz parte do complexo “*Talaromyces pinophilus*” e é uma espécie recentemente definida e pouco se sabe sobre suas funções ecológicas (PETERSON e JURJEVIĆ, 2019).

Tabela 7. Identificação molecular das linhagens 1310, 1311, 1312.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1310	Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae; <i>Talaromyces fusiformes</i>	95,46%	NR_169911.1			
1311		98,28%				
1312	Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae; <i>Talaromyces pratensis</i>	99,21%	NR_165529.1			

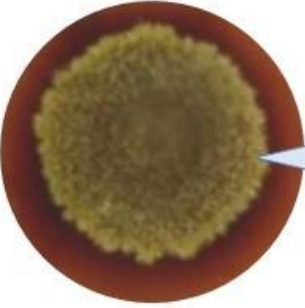
A linhagem 1303 foi identificada como *Humicola phialophoroides* pertencente á família Chaetomiaceae (Tabela 8) isolado de SAL. Ko *et al.*, (2011) estudando *H. phialophoroides* isolado de solo húmico verificou que este atua como agente de biocontrole contra fitopatógenos. Em seu estudo Yang *et al.*, (2014) enfatiza a mesma importância para tal espécie de solo onde verificou-se que esta espécie tem a capacidade de produzir bioativos que aumentam a resistência dos vegetais à pragas fúngicas. Uma aplicação interessante de *H. phialophoroides* é observada no estudo de Netpae *et al.*, (2017) onde observou-se que esta espécie tem potencial quelante em solos com excesso de Zinco (II).

Tabela 8. Identificação molecular da linhagem 1303.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1303	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Sordariomycetidae; Sordariales; Chaetomiaceae; <i>Humicola phialophoroides</i>	99,80%	NR_171742.1			

A linhagem 1315 foi identificada como *Aspergillus chevalieri* pertencente à família Aspergillaceae (tabela 9) contendo representantes isolados de SM. Calado *et al.*, (2021) apontaram atividade antioxidante e antibacteriana contra *Cutibacterium acnes*, dos extratos brutos de *A. chevalieri* endofítica, isolada de *Halopteris scoparia*, uma alga marinha coletada na costa oeste de Portugal. Lin *et al.*, (2021) descobriram atividade antioxidante e antibacteriana contra *Pseudomonas syringae* pv *actinidae* e *Bacillus cereus* a partir de metabólitos secundários obtidos do extrato de *A. chevalieri* endoliquênico isolado do líquen *Lepraria incana* coletado na montanha Qilian, Província de Qinghai, na China.

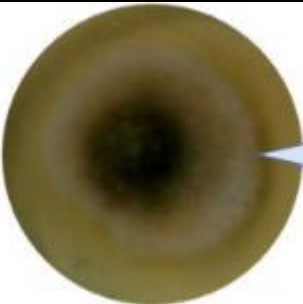
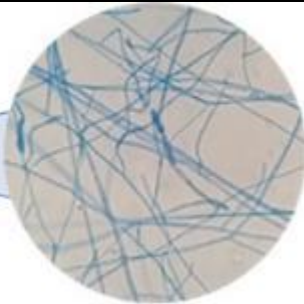
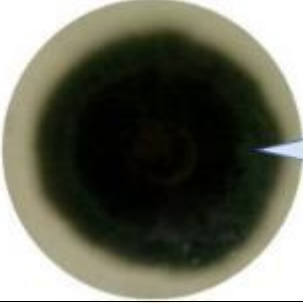
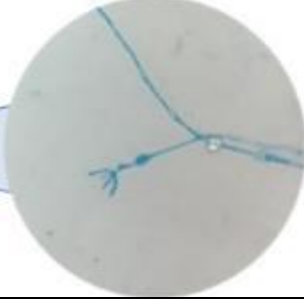
Tabela 9. Identificação molecular das linhagens 1315.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1315	Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae; <i>Aspergillus chevalieri</i>	99,59%	NR_135340			

As linhagens 1291, 1322, 1323 foram identificadas como *Corynespora torulosa* pertencentes à família Corynesporascaceae (tabela 10), contendo representantes isolados de MINF. As porcentagens de similaridade destas linhagens estão abaixo de 98%, sendo necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. *C. torulosa* foi relatado pela primeira vez como fitopatógeno do algodoeiro (*Gossypium herbaceum*) em 2018 causando mancha foliar nas safras localizadas em Maharashtra do Norte, na Índia (SHIRSATH e PATIL, 2018), no entanto seus sinônimos *Deightonella torulosa* e *Brachysporium torulosum* já foram citados anteriormente como fitopatógenos de bananeira (*Musa spp.*) no estado do Pará (TRINDADE, 2002), no México (CROUS *et al.*, 2013), na Geórgia (KONE *et al.*, 2008) e em Cuba (ALMANARÉS e PÉREZ-VICENTE, 2019) causando também manchas foliares nessas culturas e manchas pontiagudas no pecíolo dos frutos de

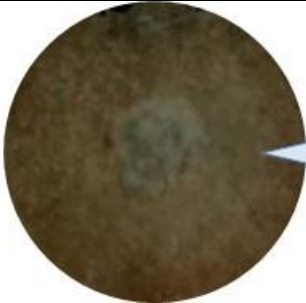
bananeira ‘grande naine’ (*Musa acuminata*) em Cuba (MORA *et al.*, 2013). *C. torulosa* também foi identificada como endofítico de cenoura (*Daucus carota*) na China (NAN *et al.*, 2018).

Tabela 10. Identificação molecular das linhagens 1291, 1322 e 1323.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1291		96,76%				
1322	Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Corynesporascaceae; <i>Corynespora torulosa</i>	96,59%	NR_145181.1			
1323		95,81%				

A linhagem 1301 foi identificada como *Nigrospora vesicularifera* pertencente à família Trichosphaeriaceae (tabela 11), isolado de MINF. Raza *et al.*, (2019) encontrou esta espécie endofítica de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), na China, no entanto há poucos relatos sobre a mesma na literatura. Ainda na China, há descritos de *Nigrospora* sp. endofítico de *Sinomenium acutum* (Wu *et al.*, 2009) e endofíticos isolados da raiz de *Moringa oleifera*, apresentando metabólitos como griseofulvina, declorogriseofulvina e meleína com atividade antifúngica contra oito fitopatógenos (Zhao *et al.*, 2012). No México obteve-se produção de Taxol através de *Nigrospora* sp. endofítico de um raro Teixo Mexicano (*Taxus globosa* Schlechtendahl) (RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2010) e no Brasil, *N. oryzae* associado a grãos de arroz irrigado no Rio Grande do Sul (FRANCO *et al.* 2001) e *N. sphaerica* endofítico de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), em São Paulo (LOPES e PUPO, 2011) e associado a sementes de Jangada Brava (*Heliocarpus americanos*) no Paraná (BERNARDI, *et al.*, 2021).

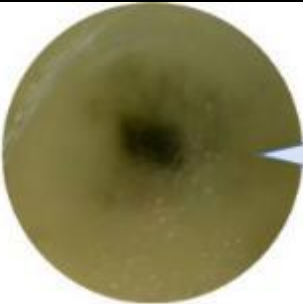
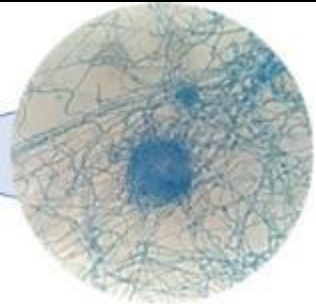
Tabela 11. Identificação molecular da linhagem 1301.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1301	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Sordariomycetes incertae sedis; Trichosphaeriales; Trichosphaeriaceae; <i>Nigrospora vesicularifera</i>	99,38%	NR_165927.1			

A linhagem 1302 foi identificada como *Gelasinospora saitoi* pertencente à família Sordariaceae (tabela 12), isolado de MINF. Esta espécie é pouco descrita na literatura, no entanto o gênero *Gelasinospora* é predominantemente terrícola sendo algumas espécies coprófilas (Cai, JEEWON e HYDE 2006). *Gelasinospora* spp. foram isolados de esterco de búfalo e vaca nas províncias de Surin e Suphan Buri, na Tailândia incluindo, *G. calospora*, *G. hippopotama*, *G. indica* e *G. stellata*. Todas as espécimes citadas tiveram atividade antagonista contra os fitopatógenos

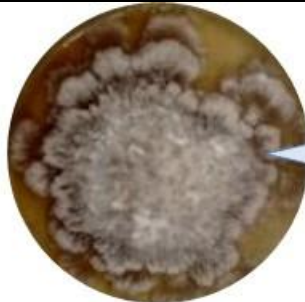
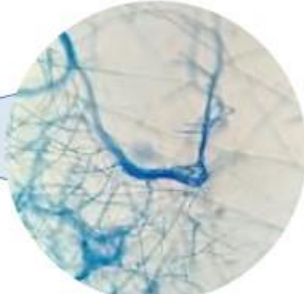
Phytophthora palmivora, *Colletotrichum capsici*, *Alternaria alternata* e *Curvularia Lunata* (PIASAI e SUDSANGUAN, 2018). Há espécies endofíticas, como relatado por Rybárik *et al.*, (2021) que isolou *Gelasinospora* sp. de uvas de vinhas localizadas na Eslováquia Central.

Tabela 12. Identificação molecular da linhagem 1302.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1302	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Sordariomycetidae; Sordariales; Sordariaceae; <i>Gelasinospora saitoi</i>	98,67%	NR_155109.1			

A linhagem 1305 foi identificada como *Clonostachys rosea* f. *catenulata* pertencente à família Bionectriaceae (tabela 13) contendo representantes isolados de MINL. A porcentagem de similaridade destas linhagens está abaixo de 98%, sendo necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. O gênero *Clonostachys* contém indivíduos micoparasitas destrutivos, que são comumente isolados como fungos do solo, saprófitos e endofíticos em regiões temperadas e tropicais (ABREU *et al.*, 2014; MOREIRA *et al.*, 2016). Estas cepas de *C. rosea* tem sido utilizadas como biocontroladores de várias doenças causadas por fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *Alternaria grandis* (COTA *et al.*, 2008; HUE *et al.*, 2009; KEYSER, JENSEN e MEYLING, 2016; SILVA *et al.*, 2021) além da ação antagonista encontrada contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* causador do apodrecimento da raiz e caule do pepino (*Cucumis sativus*) (WYLIE e PUNJA, 2021). Durante o micoparasitismo, cepas de *C. rosea* produzem e secretam metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, como peptaibols, e enzimas de degradação da parede celular, tais como quitinases e β -1,3 glucanases (CHATTERTON e PUNJA, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

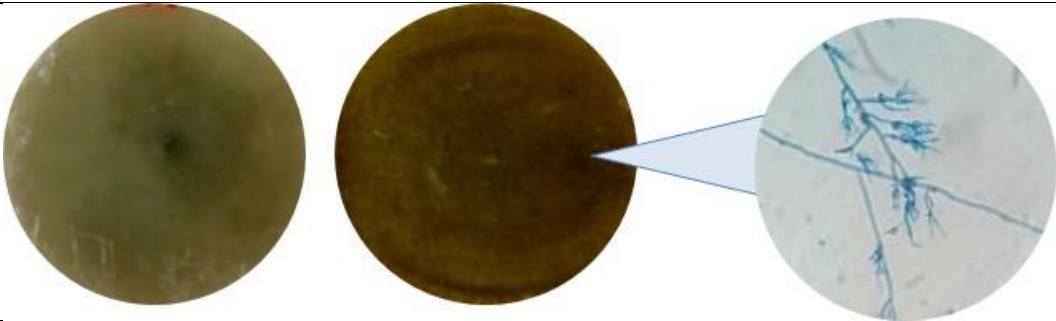
Tabela 13. Identificação molecular da linhagem 1305.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1305	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Bionectriaceae; <i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	94,49%	NR_165993.1			

A linhagem 1313 foi identificada como *Paecilomyces maximus* pertencente à família Thermoascaceae (tabela 14) isolado de MMC. A porcentagem de similaridade destas linhagens está abaixo de 98%, sendo necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. As espécies de *Paecilomyces* desempenham um papel importante como endófitos em várias plantas, proporcionando várias vantagens para o crescimento das mesmas. *P. maximus* antigamente conhecido como *P. formosus* é citado como endofítico da cana-de-açúcar (*S. officinarum*), no Brasil (LOPES *et al.*, 2016) e de pepino (*C. sativus*) havendo relato sobre a produção dos hormônios vegetais ácido indol 3-acético (IAA) e giberelina que estimulam o desenvolvimento das plantas (RIGOBELLO e BARON, 2021). Essa espécie também é agente causador da morte de Carvalhos (*Quercus branii*) no Irã (SABERNASAB, 2019) e possui potencial biocontrolador do nematóide *Meloidogyne incognita*, inibindo a eclosão de ovos e a sobrevivência de juvenis em vários graus em culturas de beringela (*Solanum melongena*). Este nematóide é dos principais parasitas que causam graves danos na produção de diversas culturas agrícolas e hortaliças economicamente importantes causando perda de aproximadamente 5% das colheitas em todo o mundo (BAAZEEM *et al.*, 2021).

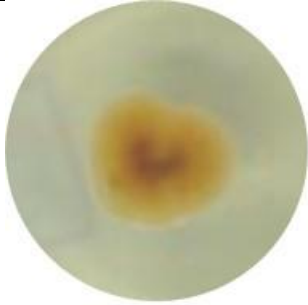
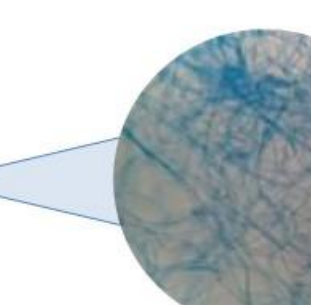
Tabela 14. Identificação molecular da linhagem 1313.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
--------------------	--------------------	------------	-----------------	-------	---------	--------

1313	Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Thermoascaceae; <i>Paecilomyces maximus</i>	95,91%	NR_149329.1	
------	---	--------	-------------	---

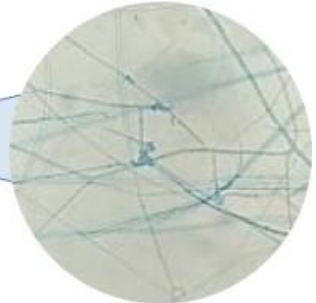
A linhagem 1314 foi identificada como *Penicillium pedernalense* pertencente à família Aspergillaceae (tabela 15) tendo representantes isolados de SM, MML e SAL. A porcentagem de similaridade destas linhagens está abaixo de 98%, sendo necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. As espécies do gênero *Penicillium* são conhecidas por serem ubíquas ambientais e saprófitas. Indivíduos de *P. pedernalense* foram isolados de solo ácido, na China (DIAO *et al.*, 2018) e em Pangandaran, na Indonésia onde constatou-se o seu potencial antimalárico uma vez que produz álcool gentisílico que inibe a enzima diidroorotato desidrogenase, essencial para a sobrevivência do parasita *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária, no sistema intraeritrocitário e fases hepáticas (PRAMISANDI *et al.*; 2021).

Tabela 15. Identificação molecular da linhagem 1314.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1314	Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae; <i>Penicillium pedernalense</i>	93,02%	NR_146250			

A linhagem 1316 foi identificada como *Lasiodiplodia marypalmiae* pertencente à família Botryosphaeriaceae (tabela 16) contendo representantes do gênero isolados de MINF, MINL e MINC. Nesta estão contidos indivíduos endófitos, sapróbios e fitopatógenos (DISSANAYAKE *et al.*, 2016). Há poucos relatos na literatura sobre esta espécie, no entanto, Amiri e Tibuhwa (2021) realizaram estudos na Tanzânia com extratos de fungos endofíticos isolados do cajueiro (*Anacardium occidentale*) e verificaram a atividade antifúngica de um extrato de *Lasiodiplodia* sp. contra *C. tropicalis*. Neste estudo, há conflitos quanto a identificação molecular do isolado apresentando 100% de similaridade com *L. parva*, *L. brasiliensis* e *L. marypalmiae*.

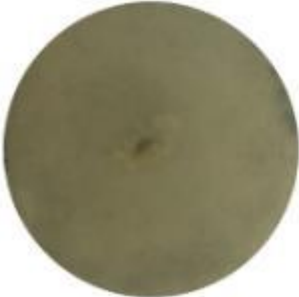
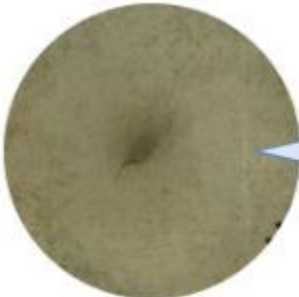
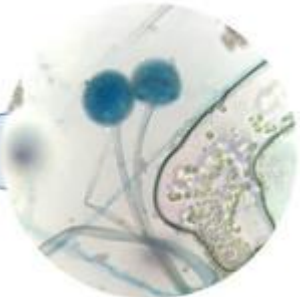
Tabela 16. Identificação molecular da linhagem 1316.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1316	Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Dothideomycetes Incertae sedis; Botryosphaeriales; Botryosphaeriaceae; <i>Lasiodiplodia marypalmiae</i>	99,16%	NR_147341.1			

A linhagem 1318 foi identificada como *Rhizopus oryzae* pertencente à família Rhizopodaceae (tabela 17), isolado do SP. A porcentagem de similaridade destas linhagens está abaixo de 98%, sendo necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. Os fungos pertencentes a ordem Mucorales são distribuídos mundialmente e são encontrados comumente em esterco animal, cereais armazenados, frutas, vegetais e solo, além de algumas espécies patogênicas facultativas de plantas, animais e fungos (HOFFMANN *et al.* 2013; RICHARDSON e RAUTEMAA-RICHARDSON, 2020; LIMA *et al.*, 2020). O gênero *Rhizopus* possui várias espécies utilizadas industrialmente para a produção de ácidos orgânicos (ácido lático, ácido fumárico) e enzimas (glucoamilases, celulases, tanases) (LONDOÑO-HERNÁNDEZ, 2017). *R. oryzae* possui potencial biocatalítico para a produção de açúcares fermentescíveis a partir de biomassa agroindustrial para a subsequente

produção de biocombustível. EZEILO, WAHAB e MAHAT (2019) constataram que *R. oryzae*, isolado de um cacho seco de dendezeiro em decomposição é um bom produtor de CMCase, FPase, β -glicosidase e xilanase para biotransformar a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, utilizando resíduo de dendezeiro para a produção das enzimas.

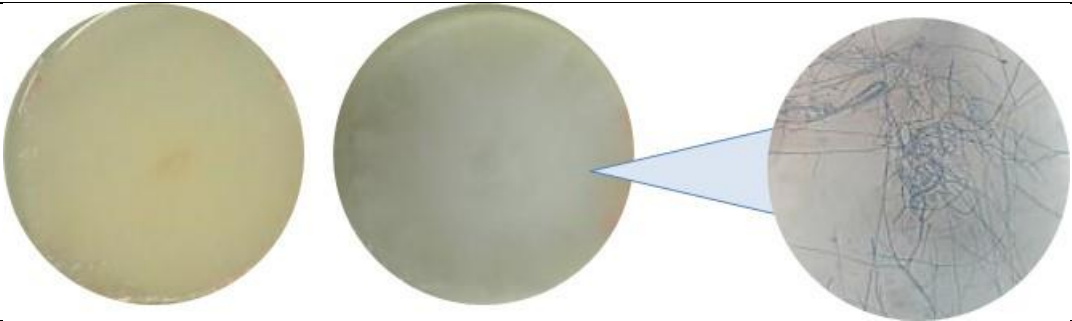
Tabela 17. Identificação molecular da linhagem 1318.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1318	Fungi incertae sedis; Mucoromycota; Mucoromycotina; Mucoromycetes; Mucorales; Mucorineae; Rhizopodaceae; <i>Rhizopus oryzae</i>	97,74%	NR_103595.1			

A linhagem 1319 foi identificada como *Fomitopsis eucalypticola* pertencente à família Fomitopsidaceae (tabela 18) isolado de SM. A porcentagem de similaridade destas linhagens está abaixo de 98%, sendo necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. O gênero *Fomitopsis* é cosmopolita e causador da podridão parda (LIU, SONG e CUI, 2019; HAN *et al.*, 2016) Estes são agentes importantíssimos na degradação de produtos de madeira e madeira morta no ecossistema florestal, uma vez que possuem a capacidade de degradar seletivamente a celulose e hemicelulose da madeira. Há um relato sobre a identificação molecular da espécie *F. eucalypticola*, coletado na Austrália (LIU, SONG e CUI, 2019) e na China (ZHOU *et al.*, 2021), ambos executando podridão parda. Caso seja confirmado a sua identificação como *F. eucalypticola*, este será o primeiro registro como endofítico.

Tabela 18. Identificação molecular da linhagem 1319.

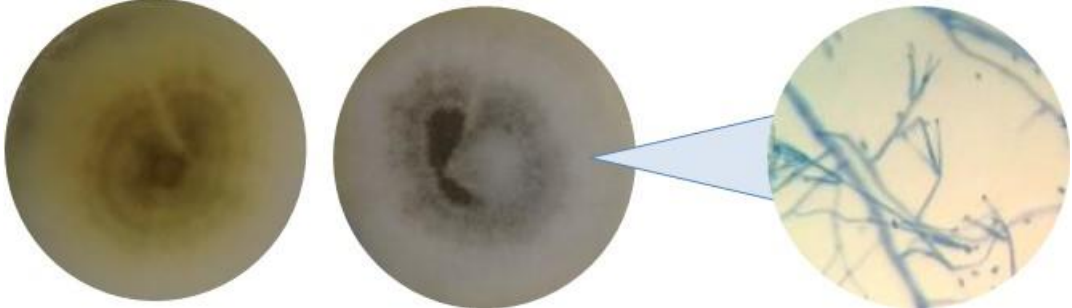
Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
--------------------	--------------------	------------	-----------------	-------	---------	--------

1319	Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Polyporales; Fomitopsidaceae; <i>Fomitopsis eucalypticola</i>	93,11%	NR_171840.1	
------	--	--------	-------------	---

A linhagem 1320 foi identificada como *Pyrenochaetopsis microspora* pertencente à família Pyrenochaetopsidaceae (tabela 19) contendo representantes do gênero isolados de MINF e MINL. Gruyter *et al.*, (2010) estabeleceram o gênero *Pyrenochaetopsis* para acomodar várias espécies dos gêneros *Phoma* e *Pyrenochaeta* que anteriormente eram colocadas em grupos polifiléticos e relataram a identificação *P. microspora* isolada de líquens na China. Três substâncias foram isoladas (Fomalevona A-C) a partir de extrato fúngico de um fungo isolado de galhos secos em decomposição no Havaí identificado como *Phoma levelillei* var. *microspora*, como era antigamente chamado o fungo *P. Microspora*. Fomalevona A teve atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, Fomalevona B teve atividade contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* e Phomalevone C (3) mostrou atividade potente contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* (SHIM *et al.*, 2011). Na identificação da linhagem houve uma similaridade 95 %, podendo ser uma nova espécie.

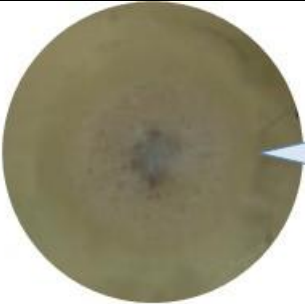
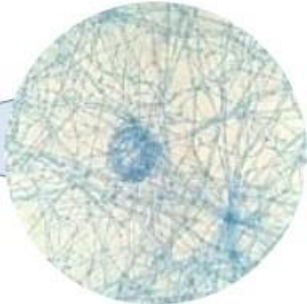
Tabela 19. Identificação molecular da linhagem 1320.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
--------------------	--------------------	------------	-----------------	-------	---------	--------

1320	Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae; Pyrenochaetopsidaceae; <i>Pyrenochaetopsis microspora</i>	99,15%	NR_160059.1	
------	--	--------	-------------	---

A linhagem 1321 foi identificada como *Westerdykella dispersa* pertencente à família Sporormiaceae (tabela 20) contendo representantes isolados de MML e SAL. A porcentagem de similaridade destas linhagens está abaixo de 98%, sendo necessário outros marcadores moleculares para definir com precisão a sua identificação molecular. O gênero *Westerdykella* é sapróbio e cosmopolita sendo encontrado em diversos substratos, incluindo solo, lama, esterco e material vegetal (EBEAD et al., 2012) é considerado também um patógeno oportunista animal e humano, uma vez que já foi encontrado causando infecção disseminada em cães (ARMENTANO, COOKE e WICKES, 2013) e a espécie *W. dispersa* foi encontrada causando infecção fúngica angioinvasiva (IFA) em paciente neutropênico (SUE et al., 2014) e não neutropênico (LIPOVY et al., (2018)). A partir de extratos fúngicos de *W. dispersa* isolado de sedimentos marinhos foram obtidos oito compostos alcalóides e dentre esses, o composto oito apresentou atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* e os compostos 5, 6 e 8 apresentaram atividade contra cinco linhagens celulares de câncer humano (XU et al., 2017).

Tabela 20. Identificação molecular da linhagem 1321.

Posição na coleção	Posição taxonômica	Identidade	Acesso (Origem)	Verso	Anverso	Lâmina
1321	Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Sporormiaceae; <i>a</i>	97,73%	NR_111187.1			

4. CONCLUSÃO

A *U. lobata* é uma planta bem adaptada a região Amazônica e no isolamento de fungos endofíticos e fungos associados ao ambiente de cultivo da malva e obtenção da fibra, obteve-se 24 espécies diferentes de fungos. No entanto, estas espécies não representam toda a composição fúngica desta planta, mas provavelmente as linhagens obtidas, são as mais facilmente cultiváveis sob condições laboratoriais. A maioria das linhagens são bem conhecidas na literatura e possuem grande potencial biotecnológico, enquanto outras são pouco descritas e precisam ser mais exploradas. Muitos são relatados como fitopatógenos de diversas culturas, no entanto estavam em uma relação mutualística com a malva, considerando que foram isolados de tecidos visivelmente saudáveis. O conhecimento sobre a diversidade fúngica da malva e o potencial biotecnológico das linhagens obtidas é de extrema importância para o desenvolvimento das pesquisas na área da microbiologia e biotecnologia vislumbrando avanços e melhorias para as próprias culturas de malva e malvicultores na região Amazônica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. M.; MOREIRA, G. M.; FERREIRA, D.; RODRIGUES-FILHO, E.; PFENNING, L. H. Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry. **Fungal Biology**, 118(12), 1004–1012, 2014.
- AFGAN, E.; BAKER, D.; BATUT, B.; VAN DEN BEEK, M.; BOUVIER, D.; CECH, M. *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nucleic Acids Res.** v. 46, n. W1, p. W537–44, 2018.
- AL-HATMI, A. M. S.; MEIS, J. F.; DE HOOG, G. SYBREN. *Fusarium*: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance. **Patógenos PLoS**, v. 12, n. 4, p. e1005464, 2016.
- ALMANARÉS, M. e PÉREZ-VICENTE, L. Speckle by *Corynespora torulosa* (Syd.) Crous: a preharvest fruit disease of *Musa* spp. in Cuba. **Revista de Protección Vegetal**, 34(3), 2019.
- AMIRI, N. e TIBUHWI, D. D. Antimicrobial Activities of Endophytic Fungal Crude Extracts Isolated from Cashew Tree (*Anacardium occidentale*). **Tanzania Journal of Science**, v. 47, n. 3, p. 1102-1113, 2021.
- ARMENTANO, R. A.; COOKE, K. L.; WICKES, B. L. Disseminated mycotic infection caused by *Westerdykella* species in a German Shepherd Dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 242(3), 381–387, 2013.
- BAAZEEM, A.; ALORABI, M.; MANIKANDAN, P.; ALOTAIBI, S. S.; ALMANEA, A.; ABDEL-HADI. *et al.* *Paecilomyces formosus* MD12, a biocontrol agent to treat meloidogyne incognita on brinjal in green house. **J Fungi (Basel)**, v. 7, n. 8, 632, 2021.
- BARATA, R. R. **Identificação e caracterização genômica dos micovírus de fungos obtidos em amostras de solo no Pará, Brasil**. Tese (Doutorado em Virologia) – Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, 2019.
- BENTES, J.; PEREIRA, H.; MENDES, A.; CASTRO, A.; CUNHA, A. Espaçamento para produção de sementes de malva (*Urena lobata* L.) em terra firme na região de Manaus-AM. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 60, n. 2, p. 141-146, 2017.
- BERNARDI, C.; BUSSO, C.; BORIN, R. C.; MAZARO, S. M.; SABURO, R. S. S. The first report of *Nigrospora sphaerica* associated with *Heliocarpus americanus* seeds in Brazil. **Floresta Ambient.**, v. 28, n 1, 2021
- BHUNJUN, C. S.; PHUKHAMSADDA, C.; JAYAWARDENA, R. S.; JEEWON, R.; PROMPUTTHA, I.; HYDE, K. D. Investigating species boundaries in *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 107, n. 1, p. 107-127, 2021.
- BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BRACARENSE, A. A. P. e J. A. TAKAHASHI. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 313-321, 2014.

- CAI, F. e DRUZHININA, I. S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. **Fungal Diversity**, v. 107, n. 1, p. 1-69, 2021.
- CAI, L.; JEEWON, R.; HYDE, K. D. Phylogenetic investigations of Sordariaceae based on multiple gene sequences and morphology. **Mycological research**, v. 110, n. 2, p. 137-150, 2006.
- CALADO, M. L.; SILVA, J.; ALVES, C.; SUSANO, P.; SANTOS, D.; ALVES, J. *et al.* endophytic fungi associated with *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau as producers of bioactive secondary metabolites with potential dermocosmetic application. **PloS One**, v. 16, n. 5, p. e0250954, 2021.
- CARVALHO, C.R.; FERREIRA-D'SILVA, A.; CANTRELL, C. C. L.; ROSA, L.H. Antifungal activities of cytochalasins produced by *Diaporthe miriciae*, an endophytic fungus associated with tropical medicinal plants. **Canadian journal of microbiology**, v. 64, n. 11, p. 835-843, 2018.
- CHAISIRI, C.; LIU, X.Y.; YIN, W.X.; LUO, C.X.; LIN, Y. Morphology characterization, molecular phylogeny, and pathogenicity of *Diaporthe passifloricola* on *Citrus reticulata* cv. Nanfengmiju in Jiangxi Province, China. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 218, 2021.
- CHATTERTON, S. e PUNJA, Z. K. Chitinase and b-1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. **Canadian Journal of Microbiology**, 55, 356–367, 2009.
- CHEN, A.J.; SUN, B.D.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; YILMAZ, N.; ZHOU, Y.G. *et al.* New Talaromyces species from indoor environments in China. **Studies in mycology**, v. 84, p. 119-144, 2016.
- COSTA, M.M.; SILVA, B.A.A.S.; MOREIRA, G.M.; PFENNING, L.H. *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium* species induce symptoms of red rot in sugarcane in Brazil. **Plant Pathology**. 2021.
- COTA, L. V.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S.; MACEDO, P. E.; ANTUNES, R. F. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological Control**, 46(3), 515–522, 2008.
- CROUS P.W.; WINGFIELD, M.J.; CHOOI, Y.-H.; GILCHRIST, C.L.M.; LACEY, E.; PITT, J.I. *et al.* Fungal planet description sheets: 154–213, **Persoonia: Mol Phylogeny Evol Fungi**, v.31, p.188–256, 2013.
- DIAO, Y.Z.; CHEN, Q.; JIANG, X.Z.; HOUBRAKEN, J.; BARBOSA, R. N.; CAI, L. *et al.* *Penicillium* section Lanata-divaricata from acidic soil. *Cladistics*, 1–36, 2018.
- DISSANAYAKE, A.J.; PHILLIPS, A.J.L.; LI X.H. e HYDE, K.D. Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species. **Mycosphere**, v. 7, n.7, 1001–1073, 2016.
- DISSANAYAKE, A. J., PHILLIPS, A.J.L., HYDE, K.D., YAN, J.Y. e LI, X.H. The current status of species in *Diaporthe*. **Mycosphere**, v. 8, n. 5, p. 1106-1156, 2017.
- EBEAD, G.A.; OVERY, D.P.; BERRUE, F.; KERR, R.G. *Westerdykella reniformis* sp. nov., producing the antibiotic metabolites melinacidin IV and chetracin B. **IMA Fungus**, 3:189–201, 2012.

EZEILO, U. R.; WAHAB, R. A.; MAHAT, N. A. Optimization studies on cellulase and xylanase production by *Rhizopus oryzae* UC2 using raw oil palm frond leaves as substrate under solid state fermentation. **Renewable Energy**, 2019.

FERNANDEZ, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. EMBRAPA-CNTF, Passo-fundo, 128 p.,1993.

FERREIRA, C. C.; PEREIRA, H. S.; CASTRO, A. P.; COSTA NETO, P. Q.; COELHO, K. W. S. A. Isolation and Identification of Endophytic Fungi of *Urena lobata* L. Cultivated in Amazon. **Journal of Agricultural Science**; v. 10, n. 10; 2018.

FRANCO, D. F.; RIBEIRO, A. S.; NUNES, C. D.; FERREIRA, E. Fungos associados a sementes de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 3, 2001.

FUENTES-ARAGÓN, D.; REBOLLAR-ALVITER, A.; OSNAYA-GONZÁLEZ, M.; ENCISO-MALDONADO, G. A.; GONZÁLEZ-REYES, H.; SILVA-ROJAS, H. V. Multilocus phylogenetic analyses suggest the presence of *Colletotrichum chrysophilum* causing banana anthracnose in Mexico. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 128, n. 2, p. 589-595, 2021.

GAO, Y.Q.; DU, S. T.; XIAO, J.; WANG, D. C.; HAN, W.B.; ZHANG, Q. *et al.* Isolation and characterization of antifungal metabolites from the *Melia azedarach*-associated fungus *Diaporthe eucalyptorum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 8, p. 2418-2425, 2020.

GARCÍA-LÓPEZ, E.; MORA-AGUILERA, J.A.; NAVA-DÍAZ, C.; VILLEGAS-MONTER, A.; TOVAR-PEDRAZA, J.M.; SERRA, C. *et al.* First report of *Fusarium pseudocircinatum* causing mango malformation disease in Dominican Republic. **Plant Disease**, v. 100, n. 7, p. 1501-1501, 2016.

GRUYTER, J.; WOUDEBERG, J. H.C.; AVESKAMP, M. M.; VERKLEY, G. J.M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. **Mycologia**, v. 102, n. 5, p. 1066-1081, 2010.

GUEVARA-SUAREZ, M.; SUTTON, D. A.; GENÉ, J.; GARCÍA, D.; WIEDERHOLD, N.; GUARRO, J. *et al.* Four new species of *Talaromyces* from clinical sources. **Mycoses**, v. 60, n. 10, p. 651-662, 2017.

HALL, T.A. 1999. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

HAN, M.L.; CHEN, Y.Y.; SHEN, L.L.; SONG, J.; VLASÁK, J.; DAI, Y.C. *et al.* Taxonomy and phylogeny of the brown-rot fungi: *Fomitopsis* and its related genera. **Fungal Diversity**, v. 80, n. 1, p. 343–373, 2016.

HOFFMANN K.; PAWŁOWSKA J.; WALTHER G.; WRZOSEK, M.; HOOG, G.S.; BENNY, G.L. *et al.* The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi** 30: 57-76, 2013.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 23: 1253–1263, 2007.

- HUE, A. G.; VOLDENG, H. D.; SAVARD, M. E.; FEDAK, G.; TIAN, X.; HSIANG, T. Biological control of fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 31 (2), 169–179, 2009.
- HYDE, K. D.; XU, J.; RAPIOR, S.; JEEWON, R.; LUMYONG, S.; NIEGO, A. G. T. *et al.* The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v. 97, n. 1, p. 1-136, 2019.
- JAHROMI, M. F.; LIANG, J. B.; HO, Y. W.; MOHAMAD, R.; GOH, Y. M.; SHOKRYAZDAN, P. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. **Journal of Biomedicine e Biotechnology**, 196264, 2012.
- KAURAV, S.; AYACHIB, A.; SHARMA, A. In vitro antifungal activity of non pathogenic fungi against the *Fusarium* spp. causing rot disease on *Aloe vera*. **IJRAR- International Journal of Research and Analytical Reviews**, v. 6, n.1, 2019.
- KEE, Y. J.; ZAKARIA, L.; MOHD, M. H. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* species from *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. **Plant Pathology**, 2020.
- KEYSER, C. A.; JENSEN, B.; MEYLING, N. V. Dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea* against an insect and a seed-borne pathogen in wheat. **Pest Management Science**, 72 (3), 517–526, 2016.
- KO, W. H.; YANG, C. H.; JU, L. M.; CHEN, C. Y.; TSOU, J. Y. *Humicola phialophoroides* sp. nov. from soil with potential for biological control of plant diseases. **Bot Stud**, v. 52, p. 197-202, 2011.
- KONE D.; JI P.; FONSAH G.E.; CSINOS A.S. First report of black leaf spot of banana caused by *Deightonella torulosa* in Georgia. **Plant Dis.** 92:1470, 2008.
- KUMAR S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol**, v. 35, n 6, p.1547-1549, 2018.
- LARABA, I.; KEDDAD, A.; BOUREGHDA, H.; ABDALLAH, N.; VAUGHAN, M. M.; PROCTOR, R. H. *et al.* *Fusarium algeriense*, sp. nov., a novel toxigenic crown rot pathogen of durum wheat from Algeria is nested in the *Fusarium burgessii* species complex. **Mycologia**, v. 109, n. 6, p. 935-950, 2017.
- LI, H. J.; HAN, M. L.; CUI, B. K. Two new *Fomitopsis* species from southern China based on morphological and molecular characters. **Mycological Progress**, v. 12, n. 4, p. 709–718, 2013.
- LIEW, E. C. Y.; LAURENCE, M. H.; PEARCE, C. A.; SHIVAS, R. G.; JOHNSON, G. I.; TAN, Y. P. *et al.* Review of *Fusarium* species isolated in association with mango malformation in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 6, p. 547-559, 2016.
- LIMA, C.L.; ORSI, R. B.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice. **Food Sci. Technol**, Campinas, v.20, n. 1, p.37-39, 2000.
- LIMA, D. X.; SOUZA-MOTTA, C. M.; LIMA, C. L. F.; SOUZA, C. A. F.; RIBEIRO, J. R.; SANTIAGO, A. L. C. M. A. Communities of Mucorales (phylum Mucoromycota) in different ecosystems of the Atlantic Forest. **Acta Bot. Bras.** v. 34, n. 4, 2020.

- LIN, L.B.; GAO, Y.Q.; HAN, R.; XIAO, J.; WANG, Y.M.; ZHANG, Q. *et al.* Alkylated salicyl aldehydes and prenylated indole alkaloids from the endolichenic fungus *Aspergillus chevalieri* and their bioactivities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2021.
- LIPOVY, B.; KOČMANOVA, I.; HOLOUBEK, J.; HANSLIANOVA, M.; BEZDICEK, M.; RIHOVA, H. *et al.* The first isolation of *Westerdykella dispersa* in a critically burned patient. **Folia microbiologica**, v. 63, n. 4, p. 479-482, 2018.
- LIU, S.; SONG, C.G.; CUI, B.K. Morphological characters and molecular data reveal three new species of Fomitopsis (Basidiomycota). **Mycological Progress**, v. 18, n. 11, p. 1317-1327, 2019.
- LONDOÑO-HERNÁNDEZ, L.; RAMÍREZ-TORO, C.; RUIZ, H. A.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; AGUILAR-GONZALEZ, M. A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. *et al.* *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. **International Journal of Food Microbiology**, 257, 110–127, 2017.
- LOPES A.A. e PUPO M.T. Biosynthesis of Aphidicolin Proceeds via the Mevalonate Pathway in the Endophytic Fungus *Nigrospora sphaerica*. **J Braz Chem Soc** v. 22, n 1, 80–85, 2011.
- LOPES, A. M.; VITORINO, L. C.; CASTRO, C. F. S. ; NASCIMENTO, J. P. L.; SOUCHIE, E. L. Primeiro relato da ocorrência de *Paecilomyces formosus* e *Paecilomyces parvisporus* no Brasil. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 14, n.4, p. 215-224, 2016.
- LYNN, K.M.T. ; WINGFIELD, M.J.; DURÁN, A. ; MARINCOWITZ, S. ; OLIVEIRA, L.S.S.; DE BEER, Z.W. *et al.* *Euwallacea perbrevis* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), a confirmed pest on *Acacia crassicarpa* in Riau, Indonesia, and a new fungal symbiont; *Fusarium rekanum* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 6, p. 803-823, 2020.
- MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- TRINDADE, D.R.; TABOSA, S. A.; LEITE, M. A. N.; POLTRONIERI, L. S.; DUARTE, M. L. R. **Doenças da Bananeira no Estado do Pará**. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Circular Técnica, 2002.
- MORA M.L.; CAPO Y.A.; SUAREZ M.A.; MARTIN M.C.; ROQUE B.; CARRERA K. *Deightonella torulosa* (Syd.) MB Ellis, causing leaf spot in acclimatized Grande naine (Musa, AAA) plants. **Rev Prot Veg.** 28:145–148, 2013.
- MOREIRA, G. M.; ABREU, L. M.; CARVALHO, V. G.; SCHROERS, H. J.; PFENNING, L. H. Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. **Mycological Progress**, 15(10-11), 1031–1039, 2016.
- NAN, L., WANG, K., PANG, B., ZHONG, Y., ZHANG, X., LI, Y. *et al.* Isolation and identification of endophytes from carrots. **AIP Conference Proceedings**. 2079, p. 020018-1–020018-18, 2019.
- NETPAE, T. Potential of *Humicola phialophoroides* biomass for zinc (II) removal from aqueous solution. **Environmental and Experimental Biology**, v. 15, n. 4, p. 233-238, 2017.

- NICOLLI, C.P.; HAIDUKOWSKI, M.; SUSCA, A.; GOMES, L.B.; LOGRIECO, A.; STEA, G. *et al.* *Fusarium fujikuroi* species complex in Brazilian rice: Unveiling increased phylogenetic diversity and toxigenic potential. **International Journal of Food Microbiology**, v. 330, p. 108667, 2020.
- PÉREZ-MORA, J. L.; MORA-ROMERO, G. A.; BELTRÁN-PEÑA, H.; GARCÍA-LEÓN, E.; LIMA, N. B.; CAMACHO-TAPIA, M. *et al.* First report of *Colletotrichum siamense* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose of *Citrus* spp. in Mexico. **Plant Disease**, v. 105, n. 2, p. 496-496, 2021.
- PETERSON, S. W. e JURJEVIĆ, Ž. The *Talaromyces pinophilus* species complex. **Fungal biology**, v. 123, n. 10, p. 745-762, 2019.
- PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, 60: 789-796, 1992.
- PIASAI, O. e SUDSANGUAN, M. Morphological study of *Gelasinospora* from dung and antagonistic effect against plant pathogenic fungi in vitro. **Agriculture and Natural Resources**, 2018.
- PINCIROLI, M.; GRIBALDO, A.; VIDAL, A.; BEZUS, R.; SISTERNA, M. Mycobiota evolution during storage of paddy, brown and milled rice in different genotypes. **Summa phytopathol**, v. 39, n. 3, 2013.
- PRAMISANDI, A.; KURNIA, K.; CHRISNAYANTI, E.; BERNAWATI, P.; DOBASHI, K.; MORI, M. *et al.* Gentisyl alcohol and homogentisic acid: *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors isolated from fungi. **J Gen Appl Microbiol.**, v. 67, n. 3, p. 114-117, 2021.
- RAZA, M.; ZHANG, Z. F.; HYDE, K. D.; DIAO, Y. Z.; CAI, L. Culturable plant pathogenic fungi associated with sugarcane in southern China. **Fungal Diversity**, 99, 1–104, 2019.
- RICHARDSON M.D. e RAUTEMAA-RICHARDSON R. Biotic environments supporting the persistence of clinically relevant Mucormycetes. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 2-14, 2020.
- RIGOBELLO, E. C. e BARON, N. C. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. **Mycology**, p. 1-17, 2021.
- RODRIGUEZ, M. A.; CABRERA, G.; GOZZO, F. C.; EBERLIN, M. N.; GODEAS, A. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. **Journal of Applied Microbiology**, 110, 1177–1186, 2011.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, 2011.
- ROYER, J. C. e NAKAS, J. P. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 7, p. 405-410, 1989.
- RYBÁRIK, L.; TANČINOVÁ, D.; FELŠÖCIOVÁ, S.; MAŠKOVÁ, Z.; CÍSAROVÁ, M.; KAČINOVÁ, J. Filamentous fungi on grapes in central slovak wine region. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 273-276, 2021.

RUIZ-SANCHEZ J.; FLORES-BUSTAMANTE Z.R.; DENDOOVEN L.; FAVELA-TORRES E.; SOCA-CHAFRE G.; GALINDER-MAYER J. *et al.* A comparative study of Taxol production in liquid and solid-state fermentation with *Nigrospora* sp a fungus isolated from *Taxus globosa*. **J Appl Microbiol**, v. 109, n 6, 2144–2150, 2010.

SABERNASAB, M.; JAMALI, S.; MAREFAT, A.; ABBASI, S. Molecular and pathogenic characteristics of *Paecilomyces formosus*, a new causal agent of oak tree dieback in Iran. **Forest Science**, v. 65, ed. 6, p. 743–750, 2019.

SANTILLÁN-MENDOZA, R.; MONTOYA-MARTÍNEZ, A. C.; PINEDA-VACA, D.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S. P.; MONTERO-CASTRO, J. C.; BENÍTEZ-MALVIDO, J. *et al.* Genetic diversity of *Fusarium pseudocircinatum* in the central western region of Mexico: the case of big-leaf mahogany malformation disease. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 9, p. 6599–6609, 2020.

SHIM, S. H.; BALTRUSAITIS, J.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Phomalevones A–C: Dimeric and Pseudodimeric Polyketides from a Fungicolous Hawaiian Isolate of *Phoma* sp. (Cucurbitariaceae). **Journal of Natural Products**, 74(3), 395–401, 2011.

SHIRSATH, L. P. e PATIL, U. K. First report of leaf spot disease caused by *Corynespora torulosa* MCC-1368 on cotton plant from India. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 51, n. 1-2, p. 95-102, 2018.

SILVA, C. J. A. e MALTA, D. J. N. A. importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências biológicas e da saúde**, Recife, v. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.

SILVA-FILHO, F. A.; SOUZA, M. M. M.; REZENDE, G. O.; SILVA, F. M. A.; CRUZ, J. C.; SILVA, G. F. *et al.* Screening of alkaloid-producing endophytic *Penicillium* strains from Amazon medicinal plants by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) and Principal Component Analysis (PCA). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 32, n. 9, 1832-1839, 2021.

SILVA, H. A. O.; TEIXEIRA, W. D.; BORGES, Á. V.; SILVA JUNIOR, A. L.; ALVES, K. S.; RODRIGUES JUNIOR, O. M. *et al.* Biocontrol of potato early blight and suppression of *Alternaria grandis* sporulation by *Clonostachys* spp. **Plant Pathology**, 2021.

SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO, P. A.; MEDEIROS, L. R. N. Caracterização de frutos e sementes em acessos de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, p. 569-573, 2011.

SOUZA, H. H. **Ambiente e sociedade: A cadeia produtiva da malva (*Urena lobata* L.) no médio Solimões: uma alternativa sustentável?** 108 p. Dissertação Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia – PPG-CASA, Universidade Federal do Amazonas, 2012.

STEENWYK, J.L.; SHEN, X.X.; LIND, A.L.; GOLDMAN, G.H.; ROKAS, A. A robust phylogenomic time tree for biotechnologically and medically important fungi in the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **MBio**, v. 10, n. 4, p. e00925-19, 2019.

SUE, P.K.; GURDA, G. T.; LEE, R.; WATKINS, T.; GREEN, R.; MEMON, W. *et al.* First report of *Westerdykella dispersa* as a cause of an angio invasive fungal infection in a neutropenic host. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4407-4411, 2014.

SUMMERELL, B. A. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. **Annual Review of Phytopathology**, v. 57, p. 323-339, 2019.

TSANG, C.C.; TANG, J.Y.M.; LAU, S.K.P.; WOO, P.C.Y. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era—Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 197-210, 2018.

VELOSO, J.S.; LIMA, W.G.; REIS, A.; DOYLE, V.P.; MICHEREFF, S.J.; CÂMARA, M.P.S. Factors influencing biological traits and aggressiveness of *Colletotrichum* species associated with cashew anthracnose in Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, n. 1, p. 167-180, 2021.

VICENTE, M. F.; CABELLO, A.; PLATAS, G.; BASILIO, A.; DÍEZ, M. T.; DREIKORN, S. *et al.* Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 5, p. 806-813, 2001.

VIEIRA, P. D. S.; SILVA, F. G.; SILVA, W. M. T.; CAVALCANTI, P. A.; LIMA, D. First report of endophytic fungi in leaves of *Ixora coccinea* L. in Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, 10(1), 1-4, 2012.

WIBBERG, D.; STADLER, M.; LAMBERT, C.; BUNK, B.; SPRÖER, C.; RÜCKERT, C. *et al.* High-quality genome sequences of thirteen Hypoxylaceae (Ascomycota) strengthen the phylogenetic family backbone and enable the discovery of new taxa. **Fungal Diversity**, v. 106, p. 7-28, 2021.

WIRTZ, L.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; CASTRO, R. R. L.; RUGE-WEHLING, B.; SCHAFFRATH, U.; LOEHRER, M. *Colletotrichum* spp. from soybean cause disease on lupin and can induce plant growth-promoting effects. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1130, 2021.

WYLIE, A. C. e PUNJA, Z. K. Assessing aerated vermicompost tea combined with microbial biological control agents for suppression of *Fusarium* and *Rhizoctonia*. **Phytopathology**, v. 111, n. 7, p. 1137-1151, 2021.

WU S.H.; CHEN Y.W.; SHAO S.C.; WANG L.D.; YU Y.; LI Z.Y. *et al.* Two New Solanapyrone Analogues from the Endophytic Fungus *Nigrospora* sp. YB-141 of *Azadirachta indica*. **Chem Biodivers**, v. 6, n 1, 79–85, 2009.

XU, D.; LUO, M.; LIU, F.; WANG, D.; PANG, X.; ZHAO, T. *et al.* Cytochalasan and tyrosine-derived alkaloids from the marine sediment-derived fungus *Westerdykella dispersa* and their bioactivities. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

YANG, C.H.; LIN, M.J.; SU, H.J.; KO, W.H. Multiple resistance-activating substances produced by *Humicola phialophoroides* isolated from soil for control of *Phytophthora* blight of pepper. **Botanical studies**, v. 55, n. 1, p. 1-10, 2014.

ZHAO, J. H.; ZHANG, Y. L.; WANG, L. W.; WANG, J. Y.; ZHANG, C. L. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2107-2112, 2012.

ZHOU, M.; WANG, C.G.; WU, Y.D.; LIU, S.; YUAN, Y. Two new brown rot polypores from tropical China. **Mycology**, v. 82, p. 173–197, 2021.

CAPÍTULO II

Research, Society and Development, v. 11, n. 2, e13211225325, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25325>

Evaluation of enzymatic production of hydrolases and oxyredutases by *Fusarium pseudocircinatum* and *Corynespora torulosa* isolated from caesarweed (*Urena lobata* L., 1753)

Avaliação da produção enzimática de hidrolases e oxirredutases por *Fusarium pseudocircinatum* e *Corynespora torulosa* isolados de malva (*Urena lobata* L., 1753)

Evaluación de la producción enzimática de hidrolasas y oxiredutasas por *Fusarium pseudocircinatum* y *Corynespora torulosa* aisladas de malva (*Urena lobata* L., 1753)

Received: 01/03/2022 | Reviewed: 01/08/2022 | Accept: 01/18/2022 | Published: 01/21/2022

Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6943-8436>

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPG-BIONORTE/UFAM, Brazil.

E-mail: srhaquel@gmail.com

Paulo Alexandre Lima Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1940-7447>

Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas - PPGQ/UFAM, Brazil.

E-mail: psantiago@uea.edu.br

Marta Rodrigues de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6065-7480>

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPG-BIONORTE/UFAM, Brazil.

E-mail: mro.dbb@uea.edu.br

Rafael de Souza Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3890-6970>

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPG-BIONORTE/UFAM, Brazil.

E-mail: rafaelsr.bio@gmail.com

Anderson Nogueira Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6112-6190>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

E-mail: anderson.nb6@gmail.com

Gilvan Ferreira da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2828-8299>

EMBRAPA Amazônia Ocidental, Brazil

E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Jeferson Chagas da Cruz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7718-2127>

EMBRAPA Amazônia Ocidental, Brazil

E-mail: jeferson.cruz@embrapa.br

Afonso Duarte Leão de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7007-3991>

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPG-BIONORTE/UFAM, Brazil.

Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas - DQ/UFAM, Brazil.

Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas - CA - CAM/UFAM, Brazil.

E-mail: souzadq@ufam.edu.br

Antonia Queiroz Lima de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5602-8617>

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPG-BIONORTE/UFAM, Brazil.

Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas - FCA/UFAM, Brazil.

E-mail: antoniaqueiroz@ufam.edu.br

Abstract

This work evaluates the enzymatic production of hydrolases and oxiredutases by endophytic fungi isolated from leaves of the caesar weed (*Urena lobata* L.), which is a perennial plant that is well adapted to the Amazon floodplains region, being and is widely used in the production of hessian sacks and other products of natural fiber. Fungi strains *Fusarium* sp. (1290) and *Corynespora* sp. (1291) were reactivated, and had their DNA extracted and sequenced to

obtain molecular identification. For enzymatic production, dried and ground caesar weed was used as a substrate in the mineral salt solutions Manachini and GLBN 40 over during 10 days of submerged cultivation (CS) under agitation. The CA was vacuum filtered daily with a 0.22 μm Millipore membrane to obtain enzymatic extracts, from which the activities of FPase, xylanase, CMCase, β -glycosidase, pectinase, laccase, manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) were evaluated. Lines strains 1290 and 1291 were identified as *F. pseudocircinatum* and *C. torulosa*, respectively, the latter being the best producer of laccase (8,691 U/L), MnP (5,353 U/L), β -glycosidase (0.328 U/mL) and CMCase (0.351 U/mL) and the fungus *F. pseudocircinatum* was the best producer of FPase (1.294 U/mL), xylanase (12.052 U/mL) and pectinase (0.183 U/mL). No LiP activity was detected for either of the strains. The results showed that the strains used are promising for the production of seven of the eight quantified enzymes, and these enzymes are of interest to several industrial sectors.

Keywords: *Urena lobata*; Endophytic fungi; Hydrolases; Oxidoreductases.

Resumo

Este trabalho avaliou a produção enzimática de hidrolases e oxirredutases por fungos endofíticos isolados da folha da malva (*Urena lobata* L.), a qual é uma planta perene bem adaptada à região da várzea na Amazônia e é muito utilizada na produção de sacarias e outros produtos de fibra natural. Os fungos *Fusarium* sp. (1290) e *Corynespora* sp. (1291) foram reativados, e tiveram seus DNAs extraídos e sequenciados para obter a identificação molecular. Para a produção enzimática utilizou-se a malva seca e triturada como substrato nas soluções de sais minerais Manachini e GLBN 40 ao longo de 10 dias de cultivo submerso (CS) sob agitação. O CS foi filtrado à vácuo diariamente com uma membrana Millipore 0,22 μm para a obtenção dos extratos enzimáticos, dos quais foram avaliadas as atividades de FPase, xilanase, CMCase, β -glicosidase, pectinase, lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP). As linhagens 1290 e 1291 foram identificadas como *F. pseudocircinatum* e *C. torulosa*, respectivamente, sendo este último o melhor produtor de lacase (8.691 U/L), MnP (5.353 U/L), β -glicosidase (0,328 U/mL) e CMCase (0,351 U/mL) e o *F. pseudocircinatum* foi o melhor produtor de FPase (1,294 U/mL), xilanase (12,052 U/mL) e pectinase (0,183 U/mL). Nenhuma das linhagens apresentou atividade de LiP. Os resultados demonstraram que as linhagens utilizadas são promissoras para a produção de sete das oito enzimas quantificadas, sendo estas enzimas de interesse para diversos setores industriais.

Palavras-chaves: *Urena lobata*; Fungos endofíticos; Hidrolases; Oxirredutases.

Resumen

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la producción enzimática de hidrolasas y oxiredutases por hongos endofíticos aislados de la hoja de malva (*Urena lobata* L.), que es una planta perenne bien adaptada a la región de la llanura aluvial amazónica, siendo ampliamente utilizada en la producción de sacos y otros productos de fibra natural. Se reactivaron los hongos *Fusarium* sp. (1290) y *Corynespora* sp. (1291), se extrajo su ADN y se secuenciaron para obtener la identificación molecular. Para la producción enzimática, se utilizó malva seca y molida como sustrato en las soluciones de sales minerales Manachini y GLBN 40 durante 10 días de cultivo sumergido (CS) bajo agitación. Se realizaron filtraciones a vacío diariamente con una membrana Millipore 0.22 μm para obtener extractos enzimáticos que fueron evaluados de acuerdo a la actividad FPasa, xilanasa, CMCase, β -glicosidasa, pectinasa, lacase, peroxidasa de manganeso (MnP) y peroxidasa de lignina (LiP). Los linajes 1290 y 1291 fueron identificadas como *F. pseudocircinatum* y *C. torulosa*, respectivamente, siendo esta última la mejor productora de lacasa (8.691 U/L), MnP (5.353 U/L), β -glicosidasa (0,3285 U/mL) y CMCase (0,351 U/mL) y el hongo *F. pseudocircinatum* fue el mejor productor de FPasa (1,294 U/mL), xilanasa (12,052 U/mL) y pectinasa (0,183 U/mL). Ambos linajes no tenían actividad de LiP detectada. Los resultados mostraron que los linajes utilizados son prometedores para la producción de siete de las ocho enzimas cuantificadas, y estas enzimas son de interés para varios sectores industriales.

Palabras clave: *Urena lobata*; Hongos endofíticos; Hidrolasas; Oxidorredutases.

1. Introduction

Urena lobata L., 1753 (Malvaceae), which is popularly known as caesarweed, is an agricultural crop that is the raw material used in the production of screens, ropes, book covers, and sacks used in the exports of agricultural products, such as coffee (Cao et al., 2020; Cunha et al., 2021). In the Amazonas state, Brazil, caesarweed has adapted to the floodplain areas of whitewater rivers, mainly in the channels of the Solimões and Amazon Rivers, and is concentrated in the municipalities of Anamã, Anori, Beruri, Caapiranga, Coari, Codajás, Iranduba, Itacoatiara, Manacapuru and Parintins. The total cultivated area is 7,684 hectares, and production in the Amazonas state reached 6,770 tons in 2018, with Manacapuru being the largest producer in the state, with 4,042 tons (Cunha et al., 2021; Maciel, Fraxe and Castro, 2019).

Since it is an important crop in the Amazon, there is interest in the study of its microbial diversity in order to find promising microorganisms for bioprocesses, in this case, producers of enzymes and secondary metabolites. The microorganisms of greatest interest are the endophytes, which live in symbiotic association and confer mutual benefits in this interaction, i.e., the plant offers protection and nutrients and the endophytes produce metabolites that help in the plant's growth as well as providing protection against pests and diseases (Deng and Cao, 2017).

Research involving enzymes has intensified and this is due to their recognized catalytic capacity, which is applied in the optimization of industrial processes. Enzymes are active and versatile, and perform reactions quickly, especially under mild reaction conditions (Sharma et al., 2020). Hydrolases and oxyreductases are the classes of enzymes that have the greatest potential in various industries such as those of food, textile, cellulose, in addition to use in effluent treatment (Naik, Abrar and Krishnappa, 2019).

Endophytic species of *Trichoderma reesei*, *Penicillium oxalic* and *Aspergillus niger* are among the main producers of cellulases used in the hydrolysis of cellulose and sugar production (Li et al., 2021). Divided into endoglucanases (which act on the inner region of the cellulose fiber that produce oligosaccharides formed by glucose units), exoglucanases (which act on the ends of the fiber that release cellobiose, and formed by two glucose units) and β -glycosidases (which act on the cellobioses that release glucose molecules) (Marques et al., 2018; Gaete, Teodoro and Martinazo, 2020).

Xylanase enzymes are important bioconverters of lignocellulosic compounds into sugars, and hydrolyze β -(1,4) bonds of the xylan molecule. These enzymes are widely used in paper bleaching, in the production of bread, juices, as well as being used as an additive in animal feed, and in the production of xylitol and ethanol (Amobonye et al., 2021).

Pectinases form a group of enzymes that promote the decomposition of polysaccharides that form pectic substances. They are also used to reduce excessive bitterness in citrus peels, restore aroma lost during drying and improve the firmness of peaches and processed pickles. The fungus *A. niger* is the most widely used for the industrial production of pectinases (Patidar et al., 2018; Noguchi et al., 2020).

Ligninases are enzymes of the oxyreductase group that can alter the properties of lignin and partially remove it from biomass by facilitating the hydrolysis process. They play a fundamental role in the degradation and detoxification of industrial waste and in the treatment of xenobiotics and colorants, as well as being also used in bioremediation of soil and water (Garcia, 2018; Kumar and Chandra, 2020).

In this regard, the application of enzymes of microbial origin in various sectors of modern society has stimulated the market for enzymes, and has made the continuous and extensive bio-prospection of new enzymes and/or selection of more efficient processes, thus contributing to the discovery of efficient biocatalysts. In this context, the present study proposes to evaluate the enzymatic production of hydrolases and oxyreductases by endophytic fungi isolated from caesar weed.

2. Methodology

2.1 Microorganisms

In this study, we used the strains *Fusarium* sp. (1290) and *Corynespora* sp. (1291), which were both isolated from the leaves of *U. lobata* and are deposited in the fungi collection at the Laboratory of Microorganisms and Bioassays of the Amazon (LABMICRA), at the Federal University of Amazonas (UFAM) registered in SisGen A91107E. The fungi were reactivated in PDA for 8 days at 28 °C, then a conidial suspension was prepared for the 1290 strain (anamorphic form), scraping the conidia were scraped and covered inserted in sterile cryogenic tubes with 20% glycerol, at the concentration No. 6 of the McFarland turbidity scale. The suspensions were then frozen at -20° C for later use. For the 1291 strain, the inoculum is described in item 2.3.

2.2 Morphological and molecular identification

The strains were identified from macro and micromorphological observations of characteristics such as the color of the surface and the back of the colonies, as well their texture and pigment. To discriminate the vegetative and reproductive structures of the strains, microcultures were incubated for 48 hours at 28 °C and then stained with lactophenol blue and the results obtained were compared with the specific literature (Barnett and Hunter, 1972; Kiffer and Morelet, 1999; Watanabe, 2002).

2.2.1 DNA extraction

Fungi were grown in 125 mL Erlenmeyer flasks, containing 50 mL of BDY medium according to Souza et al. (2004). The cultures were subjected to incubation at 28 °C for 24-48 hours, under an agitation of 120 rpm. Mycelial masses were obtained through vacuum filtration and the fungal DNA extraction procedure followed the protocol of the Zymo Research Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ kit, with adjustments (Silva-Filho et al. 2021). At the end, the extracted product was quantified in a spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Scientific), and the integrity of the extracted product was evaluated by electrophoresis using 0.8% agarose gel. All the extracted material was then stored at -20 °C.

From the total DNA, an internal fragment of approximately 700 bp was amplified from the *Its*-1 and 2 regions of the *rDNA* using the primers *Its*1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and *Its*4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) and the PCR Kit (Illustra™ PuReTaq Ready-to-Go™ PCR beads, GE Healthcare) with a final volume of 25 µL [19 µL of H₂O milli-Q, 2 µL of DNA and 2 µL of each primer (10 pmol/µL) in a thermocycler (SuperCycler®, Kyratrec)]. An initial cycle of 94 °C for 4 minutes and 35 cycles of 94 °C for 2 minutes (denaturation); 55 °C for 2 minutes (annealing) and 72 °C for 2 minutes (amplification), which was maintained at 4 °C for an undetermined period at the end of amplification (Souza, 2006). The PCR product was verified using electrophoresis in 1% agarose gel stained with GelRed™ (Invitrogen® plus) using the Plus DNA Ladder marker (Invitrogen®) of 1 Kb.

2.2.2 Bioinformatics sequencing and analysis

The PCR products were purified with the enzyme ExoSAP-IT (GE Healthcare) and adjusted to the concentration of 10 ng/µL. The BigDye Terminator kit (Applied Biosystems) was used for sequencing. Taxonomic identification was performed using the online tool BLASTn, considering the result of the highest score, against the rRNA/ITS (ITS from fungi type and reference material) database, which is available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). For the phylogenetic analysis, the MEGA-X v10.2.5 program was used, and the sequences were aligned using ClustalW, while the phylogenetic tree was constructed using the maximum parsimony (MP) method, with a heuristic search using the TBR ("tree-bisection-reconnection") algorithm, which considered the most efficient MP method and with a bootstrap of 1000 repetitions.

2.3 Submerged cultivation and obtaining of enzyme extracts

An enzyme production curve was performed in triplicate using 5% caesar weed (previously dried at 40 °C and ground) in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Manachini solution (Manachini, Fortina and Parini et al., 1987), pH 4.5 and solution GLBN 40, pH 5 autoclaved for 20 minutes at 121 °C.

Five fragments of approximately 1 cm² of strain 1291 (grown for 8 days) and 25 µl of the conidia suspension of strain 1290 were used as the inoculum. The assay was subjected to shaking in a shaker incubator at a temperature of 28 °C for 10 days. Filtration was performed daily in a vacuum filtration system with a 0.22 µ membrane (Millipore) and the enzymatic extracts were stored in 50 mL Falcon® tubes at a temperature of -20 °C.

2.4 Determination of enzymatic activities

2.4.1 Determination of total cellulase activity (FPase)

The activity of total cellulases (FPase) covers exo- and endoglucanases, and is determined from the degradation of the paper filter. This dosage was based on the methodology of Ghose (1987) and Miller (1959), with modifications. An aliquot of 20 μL of enzyme extract, a 0.6 cm diameter circle of Whatman No. 1 filter paper and 40 μL of sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) was added to a PCR plate, and left for 60 minutes at 50 °C. This was performed in triplicate.

To control the enzyme, the paper circle was removed, while the other reagents remained. To control the substrate, 60 μL of sodium citrate buffer and a circle of filter paper were added, and for the blank, only 60 μL of sodium citrate buffer were added. After the reaction time, 120 μL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) were added to the samples that were subjected to boiling bath for 15 minutes. Then, the samples were cooled and 20 μL of this reaction mixture was transferred to a 96-well plate (ELISA) containing 180 μL of ultrapure water. The samples were read using a UV spectrophotometer at 540 nm. A standard curve was constructed with a 1 mg/ml glucose solution. One U equals the quantity necessary to release 1 μmol of glucose/min.

2.4.2 Determination of β -glycosidase (BGL) activity

The quantification of β -glycosidase activity was carried out using the methodology of Silva (2013) with some modifications. In a PCR plate, 25 μL of 1% cellobiose substrate was homogenized in sodium citrate buffer (50 mM, pH 5) and 25 μL of enzyme extract heated for 30 minutes at 50 °C. An aliquot of 10 μL was transferred to microtubes containing 1,000 μL of the enzyme reagent (RGT) of the Glucose Liquicolor kit (In Vitro Diagnóstica) and left to reacting for 5 minutes at 37 °C.

For the control of the substrate, the enzyme extract was replaced, and for the control of the enzyme, the substrate was replaced, both with ultrapure water. For the blank, 10 μL of ultrapure water was added to 1,000 μL of the RGT and, for the standard, 10 μL of the glucose standard (STD) contained in the kit was added to 1,000 μL of the RGT. The samples were read using a UV spectrophotometer at 500 nm. One U equals the quantity necessary to release 1 μmol of glucose/min.

2.4.3 Determination of the enzymatic activity of xylanase and CMCase

The quantification of xylanase/CMCase was carried out using the methodology of Ghose (1987) and Miller (1959), with modifications. A total of 90 μL of the substrate (birchwood xylan/carboxymethylcellulose) was added to 1% in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) and 10 μL of enzyme extract in a PCR plate, which was heated for 10 minutes at 50 °C. An aliquot of 100 μL of DNS was added and the samples were subjected to a boiling bath for 5 minutes and then cooled in an ice bath. Then, 40 μL of the reaction mixture was transferred to an ELISA plate and 160 μL of ultrapure water was added.

For the control, first, the DNS was added and, last, the enzymatic extract and, for the blank, 200 μL of distilled water and 200 μL of DNS were added. The samples were read using a UV spectrophotometer (540 nm). A standard curve was constructed to correlate the absorbance values with the amount of product formed, using a solution of D-xylose 1 mg/ml. One U equals the quantity necessary to release 1 μmol of D-xylose/min.

2.4.4 Determination of pectinase activity

The quantification of pectinase was carried out using the methodology of Stock (2013) with some modifications. In a PCR plate, 25 μL of the substrate citrus pectin (D-galacturonic acid) to 1% sodium acetate buffer (50 mM, pH 5) and 25 μL of the enzyme extract was added and then left for 10 minutes, at 40 °C. An aliquot of 50 μL of DNS was added to the samples, which were then subjected to a boiling bath with boiling water for 5 min. The plate was cooled in an ice bath and 40 μL of the solution was transferred to an ELISA plate containing 160 μL of distilled water.

For the control, the enzyme extract was added after the DNS. Only 50 μL of distilled water and 50 μL of DNS were added to the blank. The samples were read using a UV spectrophotometer (540 nm), and a standard curve was constructed correlating the absorbance values with the amount of product formed, using a solution of D-galacturonic acid 1 mg/ml. One U equals the quantity necessary to release 1 $\mu\text{mol/mL}$ of D-galacturonic acid/min.

The calculation of the enzymatic activity of the hydrolases was carried out using the equation of Inforsato and Porto (2016) shown below:

$$U/mL = \frac{D \times C (\mu\text{mol. mL}^{-1}) \times V_t (\text{mL})}{T (\text{min}) \times V_e (\text{mL})}$$

Where:

D - Dilution (performed when it was necessary to dilute the enzyme solution)

C - Concentration determined from DNS method

V_t - Total reaction Volume

T - Reaction time in minutes

V_e - Volume of enzyme solution

U = Enzyme Unit ($\mu\text{mol/min}$)

2.4.5 Determination of enzymatic activity of laccase

The quantification of the laccase activity was carried out using the methodology of Bourbonnais et al. (1998) with some modifications. In a PCR plate, 60 μL of citrate-phosphate buffer (50 mM, pH 5), 20 μL of ultrapure water, 20 μL of ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (1 mM) and 100 μL of the enzyme extract were added and the plate was left for 10 minutes, at 30 °C.

For the control (Abs_i), the extract, which had been boiled for 10 minutes in order to degrade the enzymes, was used and, for the blank, the enzyme extract was replaced with ultrapure water. The sample readings were performed in UV spectrophotometer at 420 nm after 10 minutes of reaction (Abs_f). One U equals the quantity necessary to oxidize 1 μmol ABTS/min.

2.4.6 Determination of manganese peroxidase (MnP) enzymatic activity

The quantification of MnP was carried out based on the methodology of Khindaria, Grover and Aust (1994) with some modifications. To a PCR plate, we added 60 μL of phosphate-citrate buffer (50 mM, pH 4.5), 60 μL of sodium lactate (50 mM), 20 μL of MnSO_4 (1.0 mM), 20 μL of phenol red (0.1%), 10 μL of bovine albumin (1.8%), 10 μL of H_2O_2 (2.0 mM) and 20 μL of enzyme extract, which was left for 10 minutes at 35 °C. After the reaction time, 13 μL of NaOH (6.5 M) were added.

For the control (Abs_i), the degraded enzyme extract, which had been boiled for 10 minutes, was used. For the blank, the sample was replaced with ultrapure water. The readings were performed in a UV spectrophotometer at 610 nm after the interruption of the reaction (Abs_f). One U of enzyme equals the quantity necessary to form 1 μmol of oxidized phenol red/min.

2.4.7 Determination of lignin peroxidase (LiP) enzyme activity

The quantification of LiP activity was carried out based on the methodology of Kirk and Farrell (1986) with some modifications. 80 μL of sodium tartrate buffer (100 mM, pH 3), 10 μL of veratrylic alcohol (10 mM), 10 μL of freshly prepared H_2O_2 solution (0.1 μmol) and 100 μL of the enzyme extract were added to the PCR plate, which was left for 10 minutes in a water bath at 40 °C.

For the control (Abs_i), the degraded enzyme extract, which had been boiled for 10 minutes, and ultrapure water was added to replace the sample. The readings were performed in a UV spectrophotometer at 310 nm after 10 minutes of reaction (Abs_f). One U equals the quantity necessary to form 1 μ mol of veratraldehyde/min.

The calculation of lignolytic activity was carried out according to Aguiar Filho (2008) and Fernandes (2013), as described below:

$$U/L = \left(\frac{\Delta Abs}{\epsilon x V_a x t_r} \right) x Fd x 10^6$$

Where:

$\Delta Abs = Abs_f - Abs_i$

ϵ = Molar extinction coefficient of the formed product ($M^{-1}cm^{-1}$)

V_a = Sample volume in L

t_r = Reaction time in minutes

Fd = Sample dilution factor

10^6 = Conversion factor from M to μ mol

U = Enzyme Unit (μ mol/min)

Molar extinction coefficient:

Laccase (420 nm) = 36,000 $M^{-1}cm^{-1}$

LiP (310 nm) = 9,300 $M^{-1}cm^{-1}$

MnP (610 nm) = 22,000 $M^{-1}cm^{-1}$

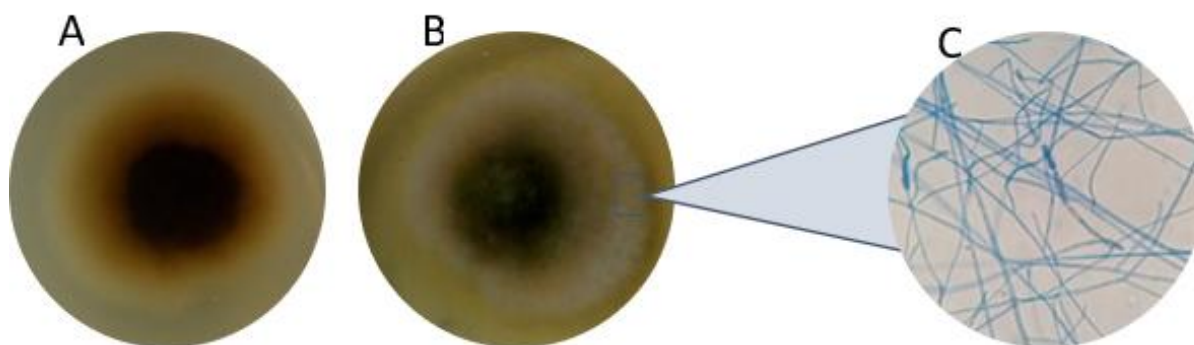
3. Results and discussion

3.1 Molecular identification

After the assembly of the contigs, the strains were identified through the *ITS* regions of the *rDNA* on the NCBI platform. Fungal strain 1291 was classified as *Corynespora torulosa* (NR 145181.1), order Pleosporales, family Corynesporascaceae with 96.76% similarity, which is slightly below our cut-off line, and which means that in future studies more sequenced genes or even revealing of the genome will be necessary. This species formerly known as *Deightoniella torulosa* is reported in the literature as a phytopathogen that attacks the leaves and causes diseases in more than 70 species of plants, among these cotton plants (Shirsath and Patil, 2018) and banana trees (Almenares and Pérez-Vicente, 2019). It is also known as black spot and Deightoniella's mark. In the northern region of Brazil, it also causes diseases in tomato, cucumber, eggplant and papaya crops (Bentes et al., 2018).

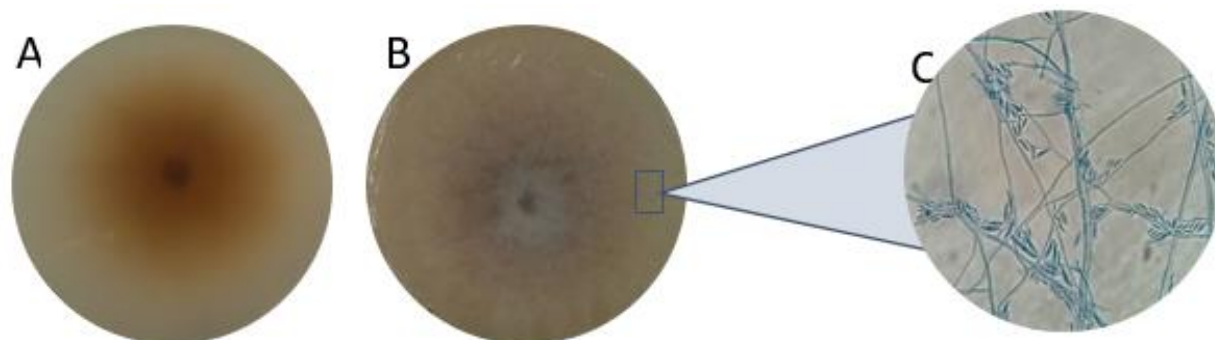
In Figure 1, the front (B) shows the culture with a gradual coloring of gray, beige and white, from the center to the edges and, on the back (A), the culture presented a gradual coloring of dark brown, orange and white. Its conidia are long, straight to slightly curved, cylindrical, tapering at the tips, corroborating the description made by Shirsath and Patil (2018).

Figure 1. Strain 1291, *Corynespora torulosa* - A: back, B: front, C: Microculture observed under 40x magnification.



Strain 1290 was classified as *Fusarium pseudocircinatum* with 99.58% similarity (NR_163683.1) Hypocreales order, Nectriaceae family and belonging to the *F. fujikuroi* species complex (FFSC), which has approximately 50 species (Figure 2).

Figure 2. Strain 1290, *Fusarium pseudocircinatum* - A: back, B: front, C: microculture observed under 40x magnification.



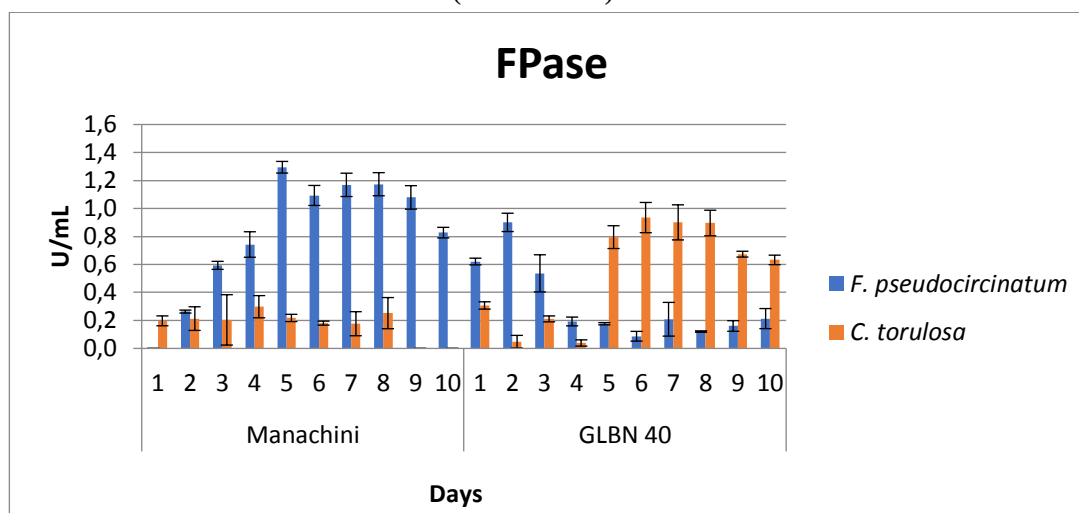
Fungi of the *Fusarium* genus are cosmopolitan and can have a systemic distribution in plants. These species produce mycotoxins, such as fumonisin, fusaric acid, moniliformin, among others, that contaminate foods such as rice and corn, cause chronic and acute toxicity to humans and livestock, and thus generating a risk to food security (Leslie et al., 2005; O'Donnell et al., 2013, Nicollia, 2020, Qiu et al., 2020), in addition to being phytopathogens of *Sansevieria trifasciata*, which is an ornamental plant known as mother-in-law's tongue, and causing leaf scorch (Kee, Zakaria and Mohd, 2020). They are also phytopathogens of the mango (*Mangifera indica*) and have been reported to cause malformation in the fruits and dwarf leaves in Mexico (Freeman et al., 2014). It was confirmed that the production of extracellular enzymes, such as catalase, laccase, cellulase, caseinase, amylase, protease, lipase and pectinases, play an important role in the invasive potential of pathogenic species, as observed by Mezzomo et al. (2019) in yerba mate seedlings contaminated with *F. solani* and *F. oxysporum*, resulting in infection and death of the seedlings. On the front, the colony has an orange coloration in the center and on the back, a pink coloration with hyaline macroconidia, which are straight or slightly sickle-shaped, tapering at the ends, thus corroborating with the description by Farias (2020).

3.2 Determination of enzymatic activity

3.2.1 Determination of activity of total cellulases (FPase)

FPase activity was detected from the second day of cultivation for *F. pseudocircinatum* in Manachini solution, with its peak on the fifth day (1.294 U/mL), though there was a slight drop in production on the sixth day, with no sudden changes until the ninth day of cultivation. The fungus *C. torulosa* had its peak production on the sixth day (0.934 U/mL); however, from the fifth to the eighth day, there were no sudden changes in production in the GLBN 40 solution (Figure 3).

Figure 3. FPase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (*Urena lobata*) in the State of Amazonas – Brazil.

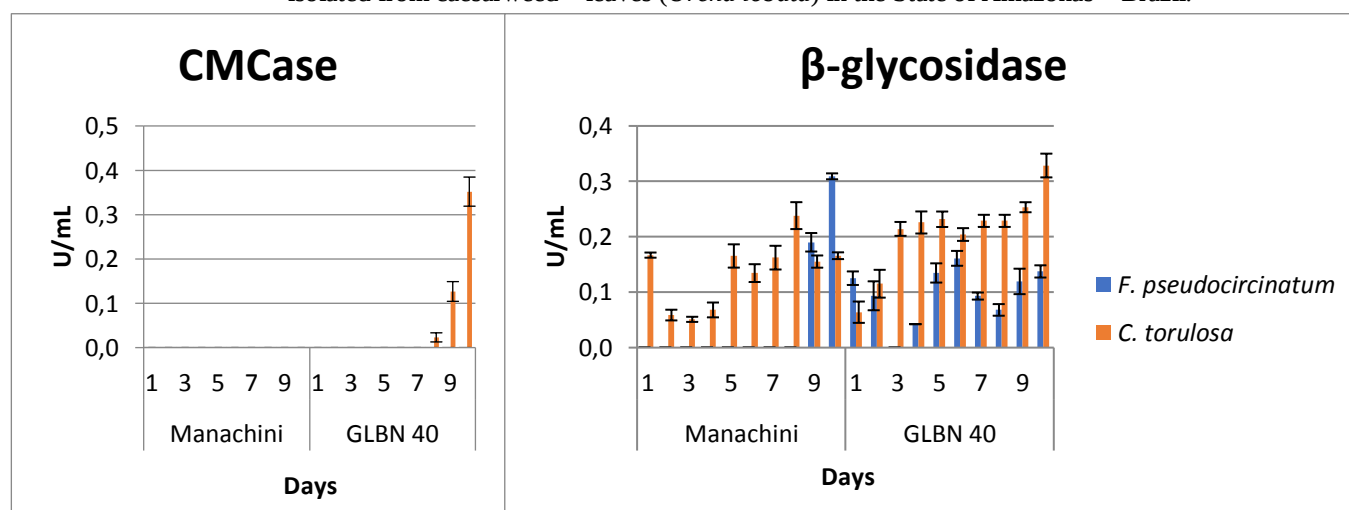


While studying FPase produced by *Fusarium* sp., Faheina Junior (2012) obtained a maximum production of 0.006 U/mL in a mineral medium supplemented with microcrystalline cellulose, which occurred over 72 h. Nascimento (2015) evaluated the production of FPase by *Fusarium* sp. in submerged culture, using a cake of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) pulp as the substrate and, on the fourth day of cultivation, production was approximately 0.012 U/mL. The current study presented higher values than those previously mentioned. The production of cellulases is influenced by the concentration of cellulose in the composition of the substrate used (Vilela, 2013) and caesarweed has 76% cellulose in its fiber, according to Agopyan (2005).

3.2.2 Determination of the enzymatic activity of CMCase and β -glycosidase

Only *C. torulosa* produced CMCase from the eighth day of cultivation and, on the tenth day, its peak production was witnessed (0.351 U/mL). No CMCase production was noted for *F. pseudocircinatum* in either of the solutions. There was production of β -glycosidase in the two solutions for *C. torulosa*, which presented a peak on the tenth day (0.328 U/mL) in the GLBN 40 solution; however, for *F. pseudocircinatum*, the production occurred during the 10 days, except on the third day, in the GLBN 40 solution, while, in the Manachini solution, the production occurred only on the ninth and tenth day of cultivation when the peak production was obtained (0.309 U/mL) (Figure 4).

Figure 4. CMCase and β -glycosidase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (*Urena lobata*) in the State of Amazonas – Brazil.

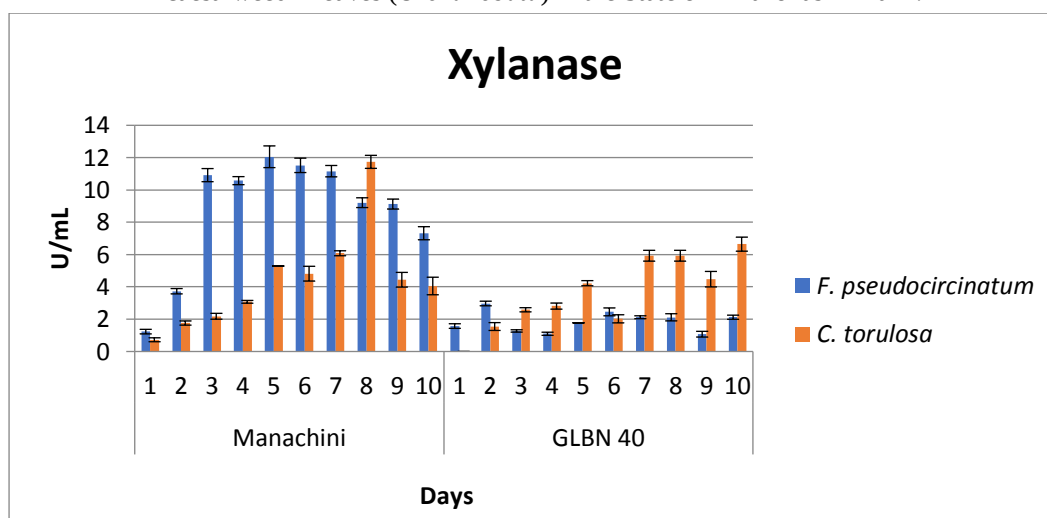


Although CMCase and β -glycosidase work in synergy, CMCase is an endoglucanase and acts by randomly hydrolysing the internal β -(1,4) glycosidic bonds of amorphous cellulose, while exoglucanases act at the terminals of crystalline cellulose releasing cellobiose, which in turn is the substrate used by β -glycosidase (Farinas, 2011). Based on the obstacle model (Eriksson, Karlsson and Tjerneld, 2002), the hydrolysis provided by exoglucanase is blocked due to an obstacle, which may be an isolated cellulose chain, masking the chain to be degraded and preventing the action of the exoglucanase. Given this necessity, the production of endoglucanase occurs to remove this obstacle, degrading it and partially reducing its fiber, thus enabling the resumption of exoglucanase action, and reducing the likelihood of it being trapped again by the same obstacle and releasing cellobiose molecules to be degraded by β -glycosidase (Ogeta and Petri, 2010).

3.2.3 Determination of xylanase enzyme activity

Enzymatic production occurred in the two saline solutions; however, xylanase production was superior in the Manachini solution, in which the strains had similar production peaks. The fungus *F. pseudocircinatum* maintained enzymatic production without major changes between the third and seventh day; however, the peak production was on the fifth day (12.052 U/mL). The peak production of *C. torulosa* was on the eighth day (11.738 U/mL) (Figure 5).

Figure 5. Xylanase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (*Urena lobata*) in the State of Amazonas – Brazil.

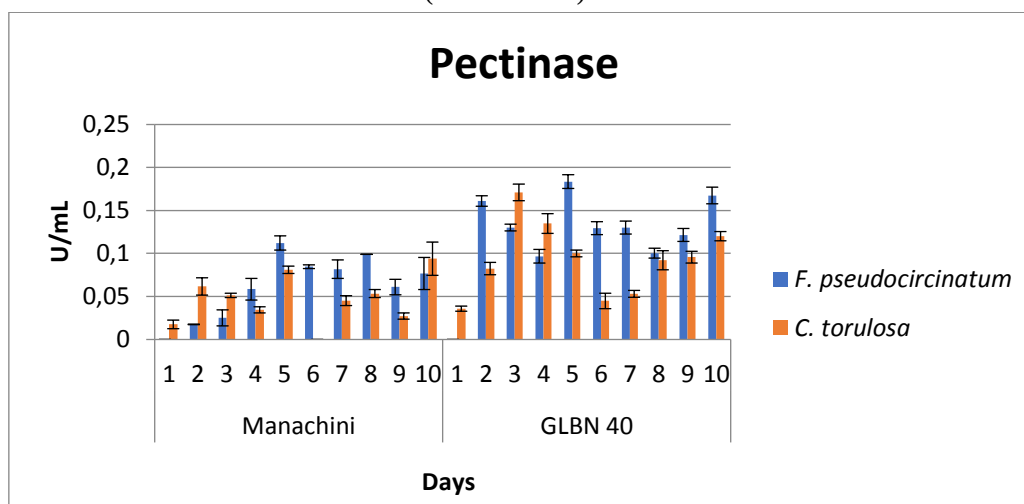


Nogueira (2021) used a *Fusarium* sp. to produce xylanase via submerged fermentation with wheat bran, orange peel, cassava peel, pumpkin peel and potato peel, and obtained approximate values of 0.8 U/mL, 0.17 U/mL, 0.08 U/mL, 0.15 U/mL and 0.3 U/mL, respectively, which are higher than the values obtained in this work. Xylanase production is most often induced by the presence of xylan (Fernández-Espinar et al., 1994), which is one of the main constituents of hemicellulose. A study by Bueno and Brienza (2020) found that, as an inducer of xylanase production, wheat bran has the same efficiency when compared to commercial xylan, due to the concentration of xylan in its composition.

3.2.4 Determination of pectinase activity

Enzymatic production occurred in both saline solutions; however, pectinase production was greater in GLBN 40 solution for both fungi. The fungus *F. pseudocircinatum* had its peak production on the fifth day (0.183 U/mL). For *C. torulosa*, the peak production was on the third day (0.171 U/mL) (Figure 6).

Figure 6. Pectinase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (*Urena lobata*) in the State of Amazonas – Brazil.

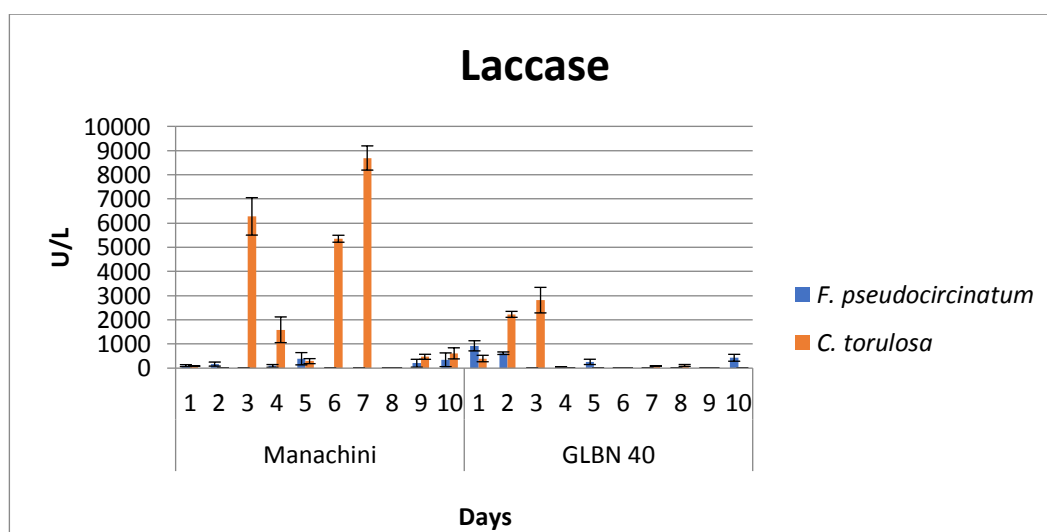


According to Ahmed et al. (2016), various fungal species, such as *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* and *Fusarium*, are used in the production of pectinase. The low production of pectinase by *F. pseudocircinatum* can be explained by the substrate used in the submerged culture. Caesarweed is a shrub plant that has amounts of pectin that are close to 0% (Oliveira and Agopyan, 1993) and, according to Sandhya and Kurup (2013), low fructose indices affect the production of pectinase. Fructose is found in large quantities in fruits and honey; it is a simple sugar and the pectinase-producing microorganism uses simple sugars more efficiently when compared to more complex sugars such as starch and galacturonic acid (Abdullah et al., 2018).

3.2.5 Determination of enzymatic activity of laccase

In the production of laccase, the fungus *C. torulosa* was the best producer on the seventh day of cultivation in the Manachini solution (8,691 U/L). The fungus *F. pseudocircinatum* did not show good production of laccase and production remained low or non-existent in a few days in both of the two solutions (Figure 7).

Figure 7. Laccase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (*Urena lobata*) in the State of Amazonas – Brazil.

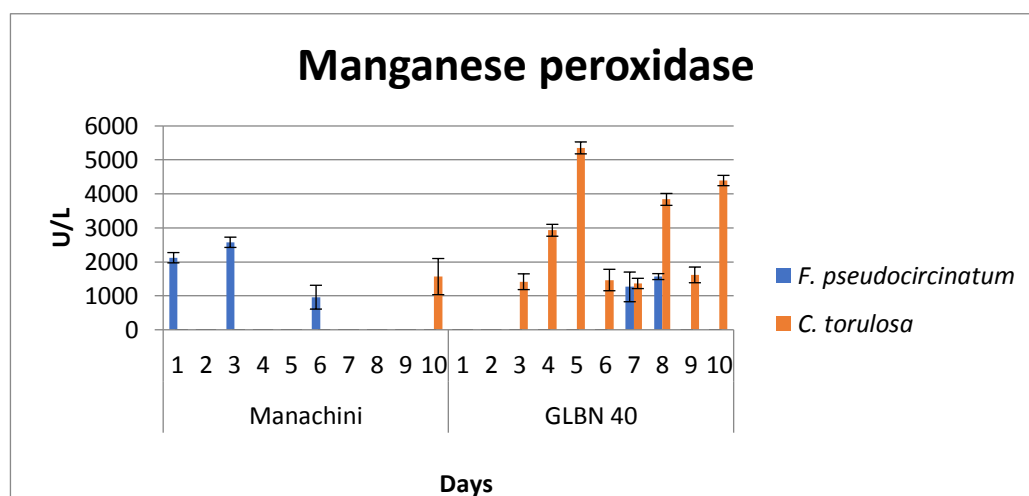


Carvalho, Fonseca and Silva (2017) obtained a peak production of laccase of 38 U/L on the ninth day of cultivation using Brazil nut shells as the substrate and *Trametes elegans* as the producer, and the results obtained in this work were more than 228 times higher than theirs. Souza (2018) used tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) peels to produce laccase by *Pleurotus ostreatus* and, under optimized conditions, the author obtained a peak of 4,000 U/L on the tenth day, which is lower than that found in our study. These values can be improved, since simpler carbon sources, such as glucose, mannitol and cellobiose, can favor a greater production of laccase when compared to more complex sources such as cellulose and lignocellulosic material (Majeau et al., 2010).

3.2.6 Determination of enzymatic activity of MnP

In the production of MnP, the fungus *C. torulosa* was the best producer (5,353 U/L) on the fifth day of cultivation in the solution GLBN 40, and maintained its production between the third and tenth day of cultivation. The fungus *F. pseudocircinatum* did not present a constant production in either solution; however, the peak in Manachini solution was obtained on the third day (2,575 U/L) (Figure 8).

Figure 8. Manganese peroxidase production during 10 days in the different solutions for two endophytic fungi isolated from caesarweed leaves (*Urena lobata*) in the State of Amazonas – Brazil.



Carvalho, Vilar and Romanholo, (2016) evaluated the MnP activity produced by *P. sajor-caju* with stillage (58.295 U/L). Santos and Kamida (2017) obtained 151.12 U/L on the twenty-first day of cultivation using as a substrate the residue of bracts of *Syagrus coronata* and *P. sajor-caju* as the producer. Both values were much lower than those found in our work. On the tenth day, Silva (2014) obtained 2,417 U/L MnP by *P. ostreatus* using empty palm clusters as substrate, approximately half the value found in our work. Studies indicate that the production of MnP is controlled by the concentration of Mn^{2+} and its higher concentration favors the production of MnP, and lower concentrations favor the production of laccase (Perez and Jeffries, 1992; Swamy and Ramsay, 1999), similar to the results obtained in our work.

3.2.7 Determination of LiP enzymatic activity

LiP activity was not detected in the two strains tested. For the production of this enzyme, the conditions vary according to the species of fungi, in addition to the carbon source and nitrogen availability. Studies indicate that some fungi, such as *Ceriporiopsis subvermispora* and *P. ostreatus*, operate producing MnP and laccase without expressing LiP activity (Rajakumar et al., 1996; Santoyo et al., 2008), thus indicating synergism between such enzymes (Silva, 2014). Another possibility is that LiP

can be produced, though detection is hindered either by being in very low concentrations or by substances that interfere with detection, particularly those in woody substrates (Rajakumar et al., 1996).

4. Conclusion

The enzymatic production by *C. torulosa* and *F. pseudocircinatum* were different in the two solutions of mineral salts and between themselves. The strain *C. torulosa* was better at producing CMCase, β -glycosidase, laccase, and MnP when using caesarweed as substrate when compared to *F. pseudocircinatum*, which was a better producer of FPase, xylanase, and pectinase. Both strains had no detected LiP activity. The results presented demonstrate that the strains used in this study have potential for enzymatic production. As a result, enzymes with the ability to depolymerize the components of the cell wall of plants are of great interest to the biotechnology sector, since their performance and their products can favor several industrial sectors such as those of biofuels, food, and paper, among others. Further studies should be conducted to evaluate other conditions and substrates.

Acknowledgments

We would like to thank the Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology – PPG-BIONORTE, for Sarah R. S. Santiago's thesis opportunity, as also the Embrapa Western Amazon/EMBRAPA, Master's Degree in Biotechnology and Amazon Natural Resources - MBT/UEA and LabMicrA laboratory of the Central Analítica – CAM/ UFAM, for the necessary spaces and equipment to the development of the work.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001, by the project Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade (process number 23038.009442/2013-12) and FAPEAM. This study is part of the doctoral thesis of Sarah R. S. S. Santiago (Universidade Federal do Amazonas).

References

- Abdullah, R., Jafer, A., Nisar, K., Kaleem, A., Iqtedar, M., Iftikhar, T., Saleem, F. and Naz, S., (2008). Process optimization for pectinase production by locally isolated fungal strain using submerged fermentation. *Biosci. J.*, 34 (4), 1025-1032.
- Agopyan, V., Savastano, H., John, V. M., and Cincotto, M. A. (2005). Developments on vegetable fibre–cement based materials in São Paulo, Brazil: an overview. *Cement and Concrete Composites*, 27(5), 527–536.
- Aguiar Filho, J.M.M. (2008). *Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Ahmed, I., Zia, M. A., Hussain, M. A., Akram, Z., Naveed, M. T., and Nowrouzi, A. (2016). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2), 148-154.
- Almenares, M. and Pérez-Vicente, L. (2019). Speckle by *Corynespora torulosa* (Syd.) Crous: a preharvest fruit disease of Musa spp. in Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 34(3), 1-6.
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., and Pillai, S. (2021). Enhanced xylanase and endoglucanase production from *Beauveria bassiana* SAN01, an entomopathogenic fungal endophyte. *Fungal Biology*, 125(1), 39-48.
- Bentes, J. L. S., Sousa, F. M. G., Lopes, M. T. G., Valente, M. S. F., Almeida, F. V., and Demosthenes, L. C. R. (2018). Genetic variability of *Corynespora cassiicola* isolates from Amazonas, Brazil. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 85(0).
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minneapolis: Burgess publishing company.
- Bourbonnais, M.; Leech, D. and Paice, M.G. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochemistry and Biophysic. ACTA-General Subjects*, 1379(3), 381-390.
- Bueno, D. and Brienzo, M. (2020). Xylan solubilization and use as carbon source/inductor for microbial xylanase production. *Brasilian Journal of Development*, 6(10), 78426-78433.
- Cao, D. M., Vu, P. T. B., Hoang, M. T. T., Bui, A. L., and Quach, P. N. D. (2020). Developing a Sufficient Protocol for the Enhancement of α -Glucosidase Inhibitory Activity by *Urena lobata* L. Aeroponic Hairy Roots Using Exogenous Factors, a Precursor, and an Elicitor. *Plants*, 9(4), 548.
- Carvalho, W.O.; Fonseca, N.F. and Silva, J.R. (2017). *Produção de lacase por uma linhagem de Trametes elegans coletada no Município de Alvarães-Amazonas*. Diversidade Microbiana da Amazônia, Editora INPA.
- Cunha, J. dos S. C., de Oliveira Neto, H. E., Giacon, V. M., Manzato, L., and da Silva, C. G. (2021). Study on mechanical and thermal properties of amazon fibers on the polymeric biocomposites: malva and tucum. *Fibers and Polymers*, 22, 3203–3211.

- Deng, Z. and Cao, L. (2017). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: a review. *Chemosphere*, 168, 1100-1106.
- Eriksson, T.; Karlsson, J and Tjerneld, F (2002). A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with Cellobiohydrolase I (Cel7A) and Endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 101(1), 41-60.
- Faheina Júnior, G.S. (2012). *Produção de celulases por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Farias, O.R. (2020). *Fusarium spp. associado a sementes de girassol*. Tese (Doutorado em agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba.
- Farinas, C.S. (2011). *A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação*. Embrapa Instrumentação, São Carlos, São Paulo.
- Fernandes, S.M. (2013). *Prospecção de micro-organismos lignolíticos da microbiota amazônica para a produção de biocombustível de segunda geração e compostagem*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- Fernández-Espinar, M., Pinaga, F., de Graaff, L.H., Visser, J., Ramon, D., Valles, S. (1994). Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Biochemical Engineering*, 42, 555-562.
- Freeman, S., Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Maymon, M., Ploetz, R.C., Aoki, T. and O'Donnell, K. (2014). First Report of Mango Malformation Disease Caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. *The American Phytopathological Society*, 98(11).
- Gaete, A.V., Teodoro, C.E.S. and Martinazo, A.P. (2020) Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. *Research, Society and Development*, 9(8).
- Garcia, F.S. (2018). *Enzimas oxidoredutases produzidas por fungos filamentosos*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59(2), 257-268.
- Inforsato F.J. and Porto A.L.M. (2016). Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. *Revista Brasileira de Energias renováveis*, 5(4), 444-465.
- Kee, Y.J., Zakaria, L., and Mohd, M.H. (2020). Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* species from *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Plant Pathology*, 69(3), 442-454.
- Khindaria, A., Grover, T.A. and Aust, S.D. (1994). Oxalate-dependent reductive activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of biochemistry and biophys.*, 314(2), 301-306.
- Kiffer, E. and Morelet, M. (1999). *The Deuteromycetes, mitosporic fungi: Classification and generic keys*. Estados Unidos: Taylor & Francis Inc.
- Kirk, T.K. and Farrell, R.L. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu. Ver. Microbiol.* 41(1), 465-505.
- Kumar, A. and Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, 6(2), 1-18.
- Leslie, J.F., Zeller, K.A., Lamprecht, S.C., Rheeder, J.P., and Marasas, W.F.O. (2005). Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation IF Five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95(3), 275-283.
- Li, H., Dou, M., Wang, X., Guo, N., Kou, P., Jiao, J., and Fu, Y. (2021). Optimization of Cellulase Production by a Novel Endophytic Fungus *Penicillium oxalicum* R4 Isolated from *Taxus cuspidata*. *Sustainability*, 13(11), 6006.
- Maciel, A.C.; Fraxe, T.J.P. and Castro, A.P. (2019). Agricultura familiar e o cultivo da malva na Amazônia. *Scientia Naturalis*, 1(5), 92-107.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., and Tyagi, R.D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101(7), 2331-2350.
- Manachini, P.L.; Fortina, M.G. and Parini, C. (1987). Purification and properties of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*, 9(3), 219-224.
- Marques, N.P., Pereira, J.C., Gomes, E., Silva, R., Araújo, A.R., Ferreira, H., Rodrigues, A., Dussán, K.J. and Bocchini, A. (2018). Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugar cane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 122, 66-75.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Naik, B.S., Abrar, S. and Krishnappa, M. (2019). Industrially important enzymes from fungal endophytes. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*, 263-280.
- Nascimento, C.S. (2015). *Otimização da Produção de Lipase e Celulase por Fermentação Submersa Utilizando a Torta da Polpa e Fungos Isolados do Fruto da Macaúba (Acrocomia aculeata)*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Nicolli, C. P., Haidukowski, M., Susca, A., Gomes, L. B., Logrieco, A., Stea, G., del Ponte, E.M., Moretti, A and Pfenning, L.H. (2020). *Fusarium fujikuroi* species complex in Brazilian rice: Unveiling increased phylogenetic diversity and toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology*, 330, 108667.
- Noguchi, M., Hasegawa, Y., Suzuki, S., Nakazawa, M., Ueda, M., and Sakamoto, T. (2020). Determination of chemical structure of pea pectin by using pectinolytic enzymes. *Carbohydrate polymers*, 231, 115738.
- Nogueira, E.A., Oliveira, T.M.F.S., Amorim, I.C.S., Oliveira, T.B., Nelson, D.L., Benassi, V.M. (2021). Otimização das condições de cultivo do fungo filamentosso *Fusarium sp.* EA 1.3.7 para a produção de xilanases. *Biotemas*, 34(1), 1-16.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Nirenberg, H.I. (1998). Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 465-493.
- Ogeta, T.L. and Petri, D.F.S. (2010). Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Quím. Nova*, 33(7), 1549-1558.
- Oliveira, M.J. and Agopyan, V. (1993). *Materiais reforçados com fibras vegetais*. In: Simpósio internacional sobre materiais reforçados com fibras para construção civil. EPUSP, São Paulo.

- Oliveira, A.M., Oliveira, A.L.B., Silva, J.L.M., Marques, M.G.S., Vasconcelos, R.V. and Oliveira, D.R.C. (2020). Influência de tratamentos superficiais na absorção de água e na resistência à tração de fibras vegetais de *Ureana lobata* Linn. *Tecnia*, 5(1), 119-152.
- Patidar, M. K., Nighojkar, S., Kumar, A., and Nighojkar, A. (2018). Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. *3 Biotech*, 8 (4), 1-24.
- Perez J. and Jeffries, T.W. (1992). Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 58(8), 2402–2409.
- Qiu, J., Lu, Y., He, D., Lee, Y.-W., Ji, F., Xu, J., and Shi, J. (2020). *Fusarium fujikuroi* species complex associated with rice, maize, and soybean from Jiangsu Province, China: phylogenetic, pathogenic, and toxigenic analysis. *Plant Disease*, 104(8), 2193–2201.
- Rajakumar, S., Gaskell, J., Cullen, D., Lobos, S. Karahanian, E. and Vicuna, R. (1996). Lip-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispora*, white rot fungi with no detectable lignin peroxidase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2660- 2663.
- Sandhya, R. and Kurup, G. (2013). Screening and isolation of pectinase from fruit and vegetable wastes and the use of orange waste as a substrate for pectinase production. *International Research Journal Biologlcal Science*, 2(9), 34-39.
- Santos, J.S. and Kamida, H.M. (2017). Otimização da produção das enzimas lacase e manganês peroxidase por *Pleurotus sajor-caju* em resíduo de *Syagrus coronata*. In: Anais XXI Seminário de Iniciação Científica.
- Santoyo, F., González, A. E., Terrón, M. C., Ramírez, L., and Pisabarro, A. G. (2008). Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 137-143.
- Sharma, S., Rani, V., Saini, R. and Verma, M. L. (2020). Bioprospecting and biotechnological applications of microbial endophytes. *Microbial Technology for Health and Environment*, 22, 191-228.
- Shirsath, L.P. and Patil, U.K. (2018). First report of leaf spot disease caused by *Corynespora torulosa* MCC-1368 on cotton plant from India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(1-2), 95-102.
- Silva, A.S. (2013). *Avaliação da produção de celulasas e xilanase pela degradação de resíduos agrícolas regionais por fungos da Amazônia*. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- Silva-Filho, F. A., Souza, M. M. M., Rezende, G. O., Silva, F. M. A., Cruz, J. C., Silva, G. F., Souza, A. D. L. and Souza, A. Q. L. (2021). Screening of alkaloid-producing endophytic *Penicillium* strains from Amazon medicinal plants by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) and Principal Component Analysis (PCA). *J. Braz. Chem. Soc.*, 32(9), 1832-1839.
- Silva, G.T. (2014). *Desenvolvimento do processo de biopolpação dos resíduos da palma (Elaeisguineensis) e produção de enzimas ligninolíticas por fermentação no estado sólido*. Dissertação (Engenharia de bioprocessos e biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- Souza, A.Q.L., Souza, A. D. L., Astolfi-Filho, S., Pinheiro, M. L. B., Sarquis, M. I. M. and Pereira, J. O. (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. *Acta Amazônica*, 34(2), 2004.
- Souza, A.Q.L. (2006). *Potencial genético e químico dos endófitos de Murraya paniculata* L. (Jack). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.
- Souza, T.J.S.M. (2018). *Casca de Astrocaryum aculeatum Meyer como substrato para produção de lacase por Pleurotus ostreatus LM 6226 para remoção de composto recalcitrante*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e recursos naturais da Amazônia) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- Stock, D. (2013). *Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido*. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- Swamy, J. and Ramsay J.A. (1999). Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51(3), 391–396.
- Vilela, E.D.S (2013). *Análise da produção de celulasas e beta glicosidase produzidas por Streptomyces sp.* Dissertação (Mestrado em biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.
- Watanabe, T. (2002). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC Press.
- White, T.J., Bruns, T. D., Lee, S. B., and Taylor, J. W. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press.

CAPÍTULO III

DESFIBRAMENTO DA MALVA (*Urena lobata* L., 1753) POR ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NA AMAZONIA BRASILEIRA

SANTIAGO, S.R.S.S.; SANTIAGO, P. A. L.; CASTRO, A.P.; SOUZA, A. D. L.;
SOUZA, A. Q. L. de

RESUMO

A produção de pectinase por *Fusarium pseudocircinatum*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Talaromyces pratensis* isolados da malva (*Urena lobata*) e ambientes associados ao seu plantio no Amazonas/BR, variando a temperatura (28, 30 e 32° C), pH (4, 5 e 6) e tempo de cultivo (3, 4 e 5 dias) utilizando malva seca (5%) como substrato em cultivo submerso foi avaliada. O *F. pseudocircinatum* apresentou o maior pico de produção de pectinase (0,2261 U/mL) nas condições de ensaio 28° C, pH 6, no 4° dia de cultivo. Nestas condições, 23 espécies fúngicas foram avaliadas quanto à produção de pectinase e as três melhores linhagens [*F. pseudocircinatum* (1290) 0,2261 U/mL, *Westerdykella dispersa*, (1321) 0,2113 U/mL) e *Diaporthe eucalyptorum*, (1300) 0,1981 U/mL] foram submetidos à quantificação de xilanase [1290 (4,6113 U/mL), 1321 (2,7388 U/mL) e 1300 não apresentou atividade] e CMCase [1300 (0,1003 U/mL), 1321 (0,0887 U/mL) e 1290 não apresentou atividade]. As linhagens 1290 e 1321 foram selecionadas para a produção das enzimas pectinase e xilanase em escala maior e para o ensaio de desfibramento. Talos de malva com 10 cm foram submersos na solução enzimática nas concentrações 50, 100 e 200 mg/mL, temperatura de 40 e 50° C e retirados com 3, 5 e 7 dias. Ambos os extratos enzimáticos promoveram o amolecimento da fibra e o desfibramento. A linhagem de *F. pseudocircinatum* (1290), temperatura de 40° C, 200 mg/mL e 7 dias de incubação foi mais eficiente. Portanto, os extratos enzimáticos *in natura* contendo de pectinase e xilanase são eficientes no desfibramento de malva possibilitando a redução do tempo de maceração desta.

Palavras-chaves: Pectinase, Xilanase, CMCase, Amazônia.

RETTING OF MALVA (*Urena lobata* L., 1753) BY PECTINOLYTIC AND XYLANOLYTIC ENZYMES FROM ENDOPHYTIC FUNGI IN THE BRAZILIAN AMAZON

ABSTRACT

The production of pectinase by *Fusarium pseudocircinatum*, *Trichoderma longibrachiatum* and *Talaromyces pratensis* isolated from caesarweed (*Urena lobata*) and environments associated with its planting in Amazonas/BR, varying the temperature (28, 30 and 32 °C), pH (4, 5 and 6) and cultivation time (3, 4 and 5 days) using dry caesarweed (5%) as substrate in submerged cultivation was evaluated. *F. pseudocircinatum* showed the highest peak of pectinase production (0.2261 U/mL) under test conditions 28 °C, pH 6, on the 4th day of cultivation. Under these conditions, 18 fungal specimens were evaluated for pectinase production and the three best strains [*F. pseudocircinatum* (1290) 0.2261 U/mL, *Westerdykella dispersa*, (1321) 0.2113 U/mL) and *Diaporthe eucalyptorum*, (1300) 0.1981 U/mL] were subjected to xylanase quantification [1290 (4.6113 U/mL), 1321 (2.7388 U/mL) and 1300 showed no activity] and CMCase [1300 (0.1003 U/mL), 1321 (0.0887 U/mL) and 1290 showed no activity). Strains 1290 and 1321 were selected for the production of pectinase and xylanase enzymes on a larger scale and for the shredding assay. Caesarweed stalks measuring 10 cm were submerged in the enzymatic solution at concentrations of 50, 100 and 200 mg/mL, temperature of 40 and 50 °C and removed after 3, 5 and 7 days. Both enzymatic extracts promoted fiber softening and defibration. The strain of *F. pseudocircinatum* (1290), temperature of 40 °C, 200 mg/mL and 7 days of incubation was more efficient. Therefore,

the in natura enzymatic extracts containing pectinase and xylanase are efficient in the defibration of caesarweed , allowing the reduction of its maceration time.

Keywords: Pectinase, Xylanase, CMCase, Amazon.

1. INTRODUÇÃO

A extração de juta e malva foi a principal fonte de renda para ribeirinhos nas décadas de 1960 à 1980 na região Amazônica e diante do apelo sustentável, retornou a ter destaque na última década, uma vez que suas fibras são biodegradáveis e o seu cultivo e a obtenção da fibra envolve o trabalho da agricultura familiar, encaixando-se no critério da sustentabilidade (FRAXE, 2018). As biofibras têm ganhado notoriedade sobretudo para o desenvolvimento de materiais sustentáveis, uma vez que possuem vantagens sobre as fibras sintéticas, tais como leveza, baixo custo, alta disponibilidade, baixo consumo de energia e biodegradabilidade, além das possíveis aplicações dessas fibras em compósitos no setor de embalagens, automotivo, construção, isolamento acústico e térmico sendo utilizada principalmente como fibra de reforço (DICKER *et al.*, 2014; FROLLINI *et al.*, 2015; SISTI *et al.*, 2017).

O processo produtivo das fibras é basicamente artesanal desde os primórdios da agricultura e para a obtenção destas, os amazônidas aproveitam os lagos que se formam durante a cheia dos rios na Amazônia onde imergem a malva durante 15-21 dias, para a maceração do caule. Nesta etapa, os malvicultores ficam parcialmente imersos na água de 8 a 10 h por dia e dependendo da cheia, podem ficar com água na altura do pescoço expondo-se aos perigos naturais das regiões de várzea, como ataques de animais peçonhentos (cobras, aranhas e escorpiões), arraias, formigas, poraquês, jacarés, lacraias e outros animais (CASTRO, 2015). Outra problemática é que devido à exposição às condições de extração da fibra, os trabalhadores podem adquirir algumas doenças tais como reumatismos, dores musculares, problemas oftalmológicos devido à exposição ao sol, micoses nas unhas das mãos e pés, dermatites e dermatofitoses. Na etapa de secagem das fibras, a ventilação possibilita a eliminação de odores e também de partículas provindas da própria decomposição da matéria orgânica que são altamente alergênicas e irritantes aos olhos e mucosas causando desconfortos e irritações na pele (FERREIRA, 2009).

As fibras vegetais são classificadas pela parte da planta das quais são obtidas, tais como as fibras liberianas que são obtidas da camada externa chamada floema (líber) que circunda o caule da planta (TAHIR *et al.*, 2011, SISTI *et al.*, 2017, SADRMANESH e CHEN (2018). As fibras localizadas no floema formam feixes de fibras conectadas individualmente pela lamela média composta principalmente por pectina que atua como uma cola. Cada fibra é construída por uma parede primária, uma parede secundária e um lúmen oco sendo a parede primária construída por uma rede de hemicelulose, pectina e glicoproteínas que protegem as microfibrilas de celulose (LEE

et al., 2020). A principal atividade da maceração é remover esses componentes de colagem a partir da separação, dissolução e decomposição de pectinas, gomas e outras substâncias mucilaginosas para liberar as fibras da fixação do feixe (PALLESEN 1996, TERZOPOULOU *et al.*, 2015).

A produção de fibras longas é um desafio no processamento de fibras liberianas e mesmo que as águas de maceração tenham qualidade, fatores como o tempo, variação da água de local pra local interfere na sua qualidade físico-química, microbiana e bioquímicas afetam o resultado esperado tornando esta técnica inconveniente (DAS 2003; DAS 2010; TAHIR *et al.*, 2011). Assim, as enzimas pectinases e xilanases de origem microbiana têm atraído o interesse das indústrias têxteis uma vez que podem ser aplicadas na maceração e na desgomagem de fibras naturais onde as pectinases removem as pectinas presentes entre as lamelas das fibras e as xilanases removem seletivamente as fibras de hemicelulose tornando as fibras mais macias, sem afetar sua resistência (SALEEM *et al.*, 2008, CHILIVERI *et al.*, 2016, HASAN *et al.*, 2020).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi proporcionar a redução do tempo de desfibramento da malva a partir da utilização de extratos enzimáticos de fungos isolados da própria malva (*U. lobata*), e tendo a malva como substrato indutor visando melhorar as condições de trabalho dos malvicultores na Amazônia, reduzindo sua exposição aos riscos ambientais anteriormente descritos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

As 23 linhagens utilizadas foram isoladas de *U. lobata* e estão depositadas na coleção de microrganismos do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LABMICRA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Tais linhagens foram reativadas em BDA (15 g/L de ágar, 200 g/L de batata e 20 g/L de dextrose) e cultivadas a 28° C durante 8 dias. Os números das linhagens de acordo com a ordem da coleção, bem como os tecidos e locais de isolamento e identificação realizada anteriormente por aspectos macro e micromorfológicos e pelo sequenciamento das regiões *ITS 1* a *ITS 2* do *rDNA* (capítulo 1) estão na tabela 1.

Tabela 1. Linhagens utilizadas na produção enzimática de pectinase isoladas de *U. lobata* e o ambiente associado.

Posição na Coleção do LabMicra	Local de isolamento	Identificação
1290	MINF	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>
1291	MINF	<i>Corynespora torulosa</i>
1295	MINC	<i>Diaporthe miriciae</i>
1299	MINC	<i>D. passifloricola</i>
1300	MINC	<i>D. eucalyptorum</i>
1301	MINF	<i>Nigrospora versicularifera</i>
1302	MINF	<i>Gelasinospora saitoi</i>
1303	SAL	<i>Humicola phialophoroides</i>
1304	MML	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
1305	MINL	<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>
1306	MINC	<i>Colletotrichum chrysophilum</i>
1308	MINC	<i>C. plurivorum</i>
1310	SP	<i>Talaromyces fusiformes</i>
1312	SP	<i>T. pratensis</i>
1313	MMC	<i>Paecilomyces maximus</i>
1315	SM	<i>Aspergillus chevalieri</i>
1316	MINF	<i>Lasiodiplodia marypalmiae</i>
1317	MINC	<i>F. obliquiseptatum</i>
1318	SP	<i>Rhizopus oryzae</i>
1319	SM	<i>Fomitopsis eucalypticola</i>
1320	MINF	<i>Pyrenochaetopsis microspora</i>
1321	MML	<i>Westerdykella dispersa</i>
1324	MINC	<i>F. beomiforme</i>

MINF: Folha (*in natura*), MINL: Lenho (*in natura*); MINC: Casca (*in natura*); SM: Semente; MML: Lenho (Macerado); MMC: Caule (Macerado); SAL (Solo alagado da borda do lago de maceração); SP (Solo do plantio da malva).

2.2 PADRONIZAÇÃO CULTIVO SUBMERSO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Inicialmente selecionou-se as linhagens 1290 (*F. pseudocircinatu*), 1304 (*T. longibrachiatum*) e 1312 (*T. pratensis*) por pertencerem a gêneros que possuem vastas informações a respeito do seu potencial enzimático de pectinase, xilanase e CMCase e pela diversidade inter específica, (ROBL *et al.*, 2013, SHAHID *et al.*, 2016, PECCANARO *et al.*, 2017; EL ATY, 2018; PEIXOTO, 2019), para nortear os padrões de produção de pectinase para as demais linhagens. O piloto foi feito em triplicata inoculando 25 µL de suspensão de conídios, n. 06 da escala Mc Farland em 50 mL da solução de Manachini (MANACHINI *et al.*, 1987), com as

variações de temperatura (28° C, 30° C e 32° C), pH (4, 5 e 6) e tempo de cultivo (3, 4 e 5 dias) utilizando 5% da malva seca e triturada como substrato. Os extratos foram obtidos através de sistema de filtração a vácuo com membrana Millipore (0,22 µm) e armazenados em tubos falcon de 50 mL à temperatura de - 20° C. Após a determinação dos parâmetros adequados, foi realizada a produção enzimática para as demais linhagens, exercendo o mesmo procedimento citado acima, exceto quando a linhagem era teleomórfica pois, inoculou-se 5 fragmentos de micélio de 1 cm².

2.3 QUANTIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Após a verificação das três linhagens que apresentaram maior atividade de pectinase, quantificou-se as atividades de xilanase e CMCase também, selecionando-se as duas linhagens para a produção enzimática em escala maior.

2.3.1 Determinação da atividade de Poligalacturonase

Para a determinação da atividade pectinolítica utilizou-se a metodologia de Stock (2013) com modificações. Adicionou-se em uma placa de PCR 25 µL do substrato pectina cítrica (ácido D-galacturônico) a 1% em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5) e 25 µL do extrato enzimático para reagir durante 10 min, 40° C. Após o tempo reacional, adicionou-se 50 µL de DNS (MILLER, 1959) nas amostras e foram submetidas ao banho fervente por 5 min. A placa foi resfriada em banho gelado e transferiu-se 40 µL da solução para uma placa de Elisa contendo 160 µL de água destilada. Para o controle alterou-se a ordem dos reagentes onde o extrato enzimático foi acrescentado depois do DNS. Para o branco adicionou-se apenas 50 µL de água destilada e 50 µL de DNS. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de UV a 540 nm (Espectrofotômetro Spectra Max Plus 384). Construiu-se uma curva padrão correlacionando os valores de absorbância com a quantidade de produto formado, através de uma solução de ácido D-galacturônico 1 mg/ml. Uma unidade de enzima (U) é a quantidade necessária para liberar 1 µmol de ácido D-galacturônico/min.

2.3.2 Determinação da atividade enzimática de Xilanase

Para a determinação da atividade de xilanase utilizou-se a metodologia de Ghose (1987) com modificações e Miller (1959) para a dosagem de açúcares redutores utilizando como agente oxidante o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Adicionou-se em placa de PCR 90 µL do substrato xilana de madeira de bétula (1%) em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) e 10 µL de extrato enzimático para reagir durante 10 min em banho-maria, 50° C. Após o tempo reacional, adicionou-se 100 µL de DNS às amostras que foram submetidas a banho fervente por 5 min. Em seguida, foram resfriadas em banho gelado, transferiu-se 40 µL da mistura reacional para placa de Elisa e

acrescentou-se 160 μ L de água ultrapura. Para os controles executou-se o procedimento semelhante ao citado no item 2.3.1. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de UV no comprimento de onda 540 nm. Construiu-se uma curva padrão correlacionando os valores de absorbância com a quantidade de produto formado, através de uma solução de D-xilose 1 mg/ml. Uma unidade de enzima (U) é a quantidade necessária para liberar 1 μ mol de D-xilose/min.

2.3.3 Determinação da atividade enzimática de CMCase

A quantificação de CMCase foi realizada de acordo com o método descrito no item 2.3.2, no entanto, utilizou-se a carboximetilcelulose (CMC) como substrato. Construiu-se uma curva padrão correlacionando os valores de absorbância com a quantidade de produto formado, através de uma solução de D-glicose 1 mg/ml. Uma unidade de enzima (U) é a quantidade necessária para liberar 1 μ mol de D-glicose/min.

2.4 ESCALA MAIOR DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A escala maior foi produzida a partir das cepas 1290 e 1321 com 30 erlenmeyers de 250 mL para cada cultivo contendo 50 mL solução de Manachini, 5% de malva seca e triturada, pH 6, 28° C, sendo filtrados conforme citado no item 2.1 no 4° dia de cultivo, embasado no resultado obtido a partir do item 2.2. Após a filtração a vácuo, os extratos enzimáticos foram submetidos à liofilização. Após esta etapa, os extratos secos foram pesados e ajustados nas concentrações 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL, ressuspensos em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) e centrifugados a 4.000 rpm/min, 4° C, durante 10 min. Os sobrenadantes tiveram suas concentrações enzimáticas conferidas e estes foram utilizados na etapa de desfibramento.

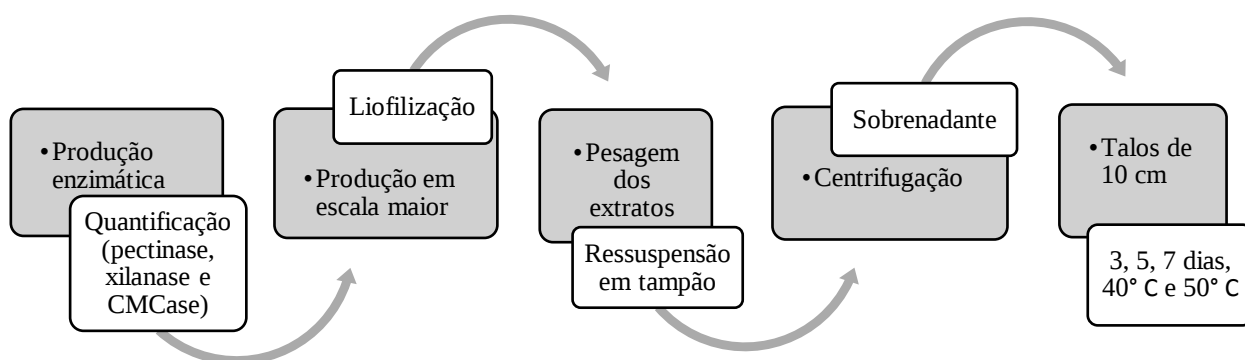
2.5 TESTE DE DESFIBRAMENTO

A maceração enzimática foi realizada segundo a metodologia de Chiliveri (2016) com algumas modificações. Utilizou-se bastões de 10 cm de comprimento do caule da malva seca e posteriormente autoclavados (121° C, 1 atm, por 15 min) totalmente submersos em tubos falcon de 15 mL contendo 10 mL do sobrenadante resultante da etapa citada no item 2.4. Este ensaio foi realizado de forma estática em estufa nas temperaturas 40° C e 50° C com retirada no 3°, 5° e 7° dias. Como controle substituiu-se o extrato enzimático ativo pelo extrato enzimático inativo, fervido por 15 min. Nos dias de retirada dos experimentos, a solução enzimática foi desprezada e acrescentados 10 mL de água aquecida a 100° C aos tubos e os bastões foram agitados vigorosamente por 1 min em vórtex. Posteriormente a água quente foi dispensada e o Grau de Separação das Fibras (GSF) foi verificado com auxílio de uma pinça para verificar o grau de amolecimento das fibras visualmente graduadas numa escala de 0 a 6 (0 - nenhuma fibra foi

liberada, 1 – 1 a 10 mm, 2 - 10 a 25 mm, 3 - 25 a 50 mm, 4 - 50 a 75 mm, 5 - > 75 mm e 6 - todas as fibras foram liberadas dos 10 cm de comprimento) (ZHANG *et al.*, 2003). A pontuação média de cada incubação foi considerada como o grau de separação das fibras.

As etapas utilizadas no protocolo de desfibramento estão demonstradas na figura 3.

Figura 1. Protocolo de desfibramento de malva.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CULTIVO SUBMERSO DA PRADRONIZAÇÃO

Dentre as linhagens testadas, a 1290 (*F. pseudocircinatum*) apresentou o maior pico de produção de pectinase (0,2261 U/mL) nas condições de ensaio 28° C, pH 6, no 4° dia de cultivo (Figura 1) seguido da linhagem 1312 (*Ta. pratensis*) com 0,1445 U/mL e da 1304 (*T. longibrachiatum*) com 0,1169 U/mL, ambos nas condições de ensaio 32° C, pH 3, 4° dia de cultivo.

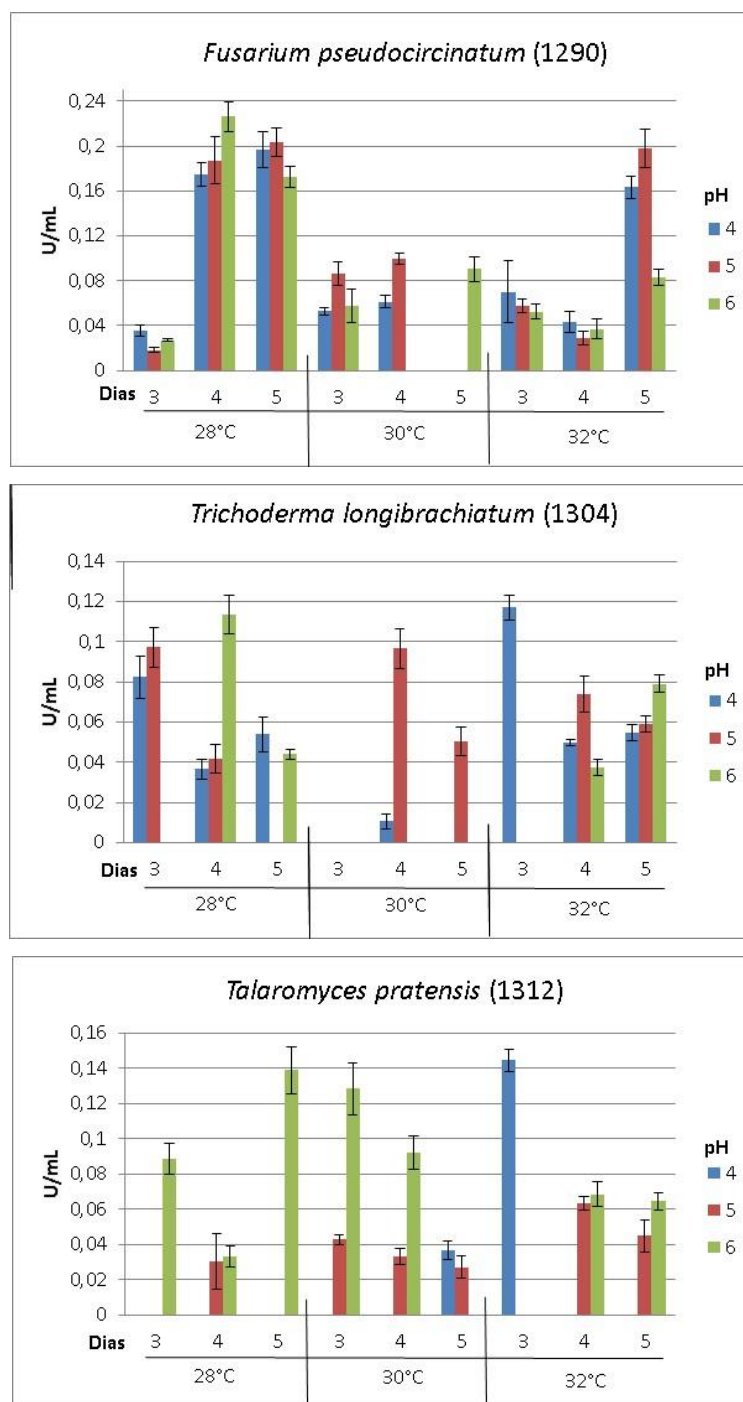


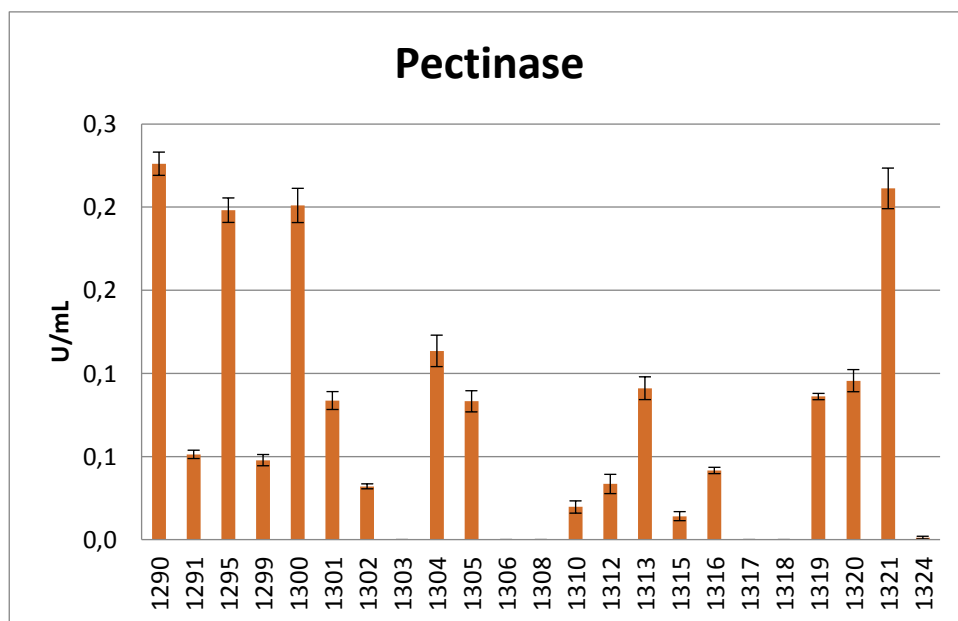
Figura 2. Gráfico de padronização da produção de pectinase com as variações de temperatura, pH e dias de cultivo.

Chiliveri *et al.*, (2016) realizaram um estudo de produção de pectinase a partir de *Bacillus tequilensis* utilizando farelo de trigo como substrato alterando diferentes variáveis, dentre elas o pH (6, 6.5, 7, 7.5 e 8). Obteve-se o pH 6 como o pH ótimo de produção de pectinase corroborando com o resultado obtido neste trabalho, entretanto vale ressaltar que nossos isolados eram fungos. Yu e Yu (2007) realizaram um estudo de maceração a partir de inóculos de uma linhagem fúngica isolada do rio onde o kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) era macerado. O pH do meio de cultura foi

testado entre pH 2-11 e verificou-se que em pH 6 foi removido 91,3% da pectina da fibra liberiana de kenaf descortada em 21 horas de maceração e que o pH 5,5-6 reduziu o teor de goma residual, indicando que esta faixa de pH é o ideal para o crescimento adequado do fungo pois, influencia na ionização do nutriente facilitando a absorção de nutrientes pelo fungo e influenciando na maceração.

Após a determinação dos parâmetros de pH, temperatura e tempo de cultivo, realizou-se a produção de pectinase para as demais linhagens onde as atividades estão determinadas na figura 2.

Figura 3. Produção de pectinase por diferentes fungos, isolados de *U. lobata* e ambientes associado a essa planta, em cultivo submerso na solução de Manachini, 28° C, pH 6, filtrado no 4° dia de cultivo.



1290 (*Fusarium pseudocircinatum*), 1291 (*Corynespora torulosa*), 1295 (*Diaporthe miriciae*), 1299 (*D. passifloricola*), 1300 (*D. eucalyptorum*), 1301 (*Nigrospora versicularifera*), 1302 (*Gelasinospora saitoi*), 1303 (*Humicola phialophoroides*), 1304 (*T. longibrachiatum*), 1305 (*Clonostachys rosea f. catenulata*), 1306 (*Colletotrichum chrysophilum*), 1308 (*C. plurivorum*), 1310 (*Talaromyces fusiformes*), 1312 (*T. pratensis*), 1313 (*Paecilomyces maximus*), 1315 (*Aspergillus chevalieri*), 1316 (*Lasioidiplodia marypalmiae*), 1317 (*F. obliquiseptatum*), 1318 (*Rhizopus oryzae*), 1319 (*Fomitopsis eucalypticola*), 1320 (*Pyrenochaetopsis microspora*), 1321 (*Westerdykella dispersa*), 1324 (*F. beomiforme*).

Dentre os fungos mais citados na literatura como bons produtores de pectinases, estão os fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, e espécimes *Trichoderma viride*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum*, *F. asiaticum*, *Mucor racemosus* e *M. hiemalis* (BANU *et al.*, 2010; IRSHAD *et al.*, 2014; AMIN *et al.*, 2017; REBELLO *et al.*, 2017, PATIDAR *et al.*, 2018). Apesar dos picos de atividade pectinásica produzidos por fungos filamentosos serem comumente obtidos após longos períodos de cultivo (superior a 96 h), não há uma faixa ideal de tempo de cultivo uma vez que o perfil de crescimento e atividade metabólica varia de espécime para espécime devido a

fatores genéticos (SARAIVA, 2020) e ambientais. Alencar (2018) obteve atividade pectinolítica máxima produzida por *T. asperellum* com 72 h de cultivo utilizando casca de maracujá como substrato, que por sua vez é rico em pectina. Khodaverdi *et al.*, (2013) avaliou a produção de pectinase por *T. viridi* utilizando casca de laranja como substrato, outro substrato rico em pectina, e obteve o pico de produção com 96 h, semelhantemente Fawole e Odunfa (2003) avaliaram a produção de pectinase por *A. niger* ao longo de 7 dias, utilizando pectina de maçã como substrato e verificaram que o pico de produção de endo-poligalacturonase (END-PG) e pectinametilesterase (PME) ocorreram com com 96 h. A temperatura empregada nos cultivos submersos para a produção de enzimas pectinolíticas varia entre 20-30° C, segundo Reginatto (2016), no entanto há vários estudos que obtiveram produção de pectinases em diferentes temperaturas, indicando a variação intra específica de algumas espécies avaliadas. Fawole e Odunfa (2003), avaliaram a variação da faixa de temperatura de produção de pectinase entre 20° C e 45° C e obteve-se o melhor resultado em 40° C.

O fungo *F. pseudocircinatum* (1290) apresentou a maior produção de pectinase (0,2261 U/mL) seguido de *W. dispersa* (1321) (0,2113 U/mL) e *D. eucalyptorum* (1300) (0,1981 U/mL). Para estes espécimes foram quantificadas também a xilanase e CMCase (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação enzimática de xilanase, pectinase e CMCase por fungos associados à malva na Amazônia.

Posição na coleção	Identificação molecular	Xilanase		Pectinase		CMCase	
		U/mL		U/mL		U/mL	
1321	<i>W. dispersa</i>	2,7388	± 0,0478	0,2113	± 0,0122	0,0887	± 0,0085
1300	<i>D. eucalyptorum</i>	0	0	0,2010	± 0,0103	0,1003	± 0,0102
1290	<i>F. pseudocircinatum</i>	4,6113	± 0,1361	0,2261	± 0,0211	0	0

O fungo *F. pseudocircinatum* também apresentou maior produção de xilanase (4,6113 U/mL), seguido de *W. dispersa* (2,7388 U/mL) e não foi detectada atividade em *D. eucalyptorum*. Dentre os fungos mais utilizados pela indústria para a produção de xilanase destacam-se o *Aspergillus* spp., *T. longibrachiatum*, *Ta. emersonii*, *Humicola* spp., *Alternaria alternata* (BEG *et al.*, 2001; POLIZELI *et al.*, 2005, ROBL *et al.*, 2013). Em estudo avaliativo sobre produção de xilanase a partir de vários fungos filamentosos, utilizando cana-de-açúcar e farelo de soja como substrato, Robl *et al.*, (2013) obteve o pico de produção com 96 h de cultivo. Semelhantemente, Nogueira *et al.*, (2021) estudando a produção de xilanase por fungos filamentosos utilizando farelo de trigo como substrato, a linhagem EA 1.3.7 (*Fusarium* sp.) obteve o melhor resultado com 96 h de cultivo. Diante disso, quantificou-se a concentração de CMCase para essas três linhagens, considerando que a ausência ou a baixa atividade celulolítica é benéfica para as fibras liberianas

(HASAN *et al.*, 2020). A linhagem *F. pseudocircinatum* foi capaz de produzir em maior quantidade pectinase e xilanase e apresentou atividade CMCásica indetectável, e *W. dispersa* (1321) apresentou a produção mais baixa de CMCase (0,0887 U/mL), a 2º melhor produção de xilanase e pectinase e, por isso, ambas foram selecionadas para os testes de desfibramento.

3.2 TESTE DE DESFIBRAMENTO

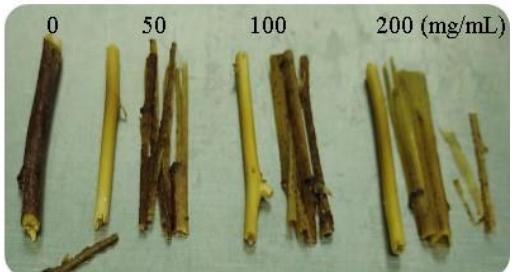
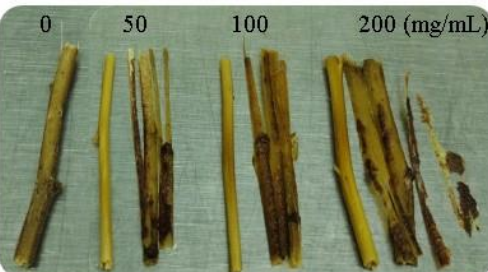
Os extratos enzimáticos liofilizados foram ressuspensos e tiveram suas concentrações enzimáticas estabelecidas e demonstradas na tabela 3.

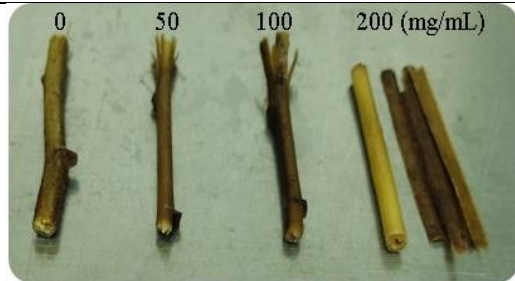
Tabela 3. Quantificação enzimática dos extratos concentrados.

Linhagens	Concentração	Pectinase		Xilanase		CMCase	
		U/mL		U/mL		U/mL	
<i>F. pseudocircinatum</i>	50 mg/mL	0,4366	±0,0151	1,2037	±0,0326	0	0
	100 mg/mL	0,7509	±0,0736	2,6401	±0,1846	0	0
	200 mg/mL	1,1130	±0,0927	4,8912	±0,1855	0	0
<i>W. dispersa</i>	50 mg/mL	0,0728	±0,0154	1,0655	±0,1660	0,1579	±0,0691
	100 mg/mL	0,2754	±0,0050	2,0423	±0,0739	0,3355	±0,0421
	200 mg/mL	0,9322	±0,0151	4,3904	±0,1422	0,7022	±0,0222

No 3º dia de maceração dos caules, na concentração de 50 mg/mL, iniciou-se o amolecimento das fibras onde o extrato enzimático da linhagem *F. pseudocircinatum* apresentou um melhor GSF 3,8 (40° C) e 3,1 (50° C) enquanto que o extrato enzimático da linhagem *W. dispersa* proporcionou um GSF 2,6, (40° C) e 1,3 (50° C) (Tabela 4). Na concentração de 100 mg/mL *F. pseudocircinatum* apresentou GSF 4,2 (40 °C) e 4,3 (50° C) enquanto *W. dispersa* apresentou GSF 3,6 (40° C) e 2,0 (50°C). No 5º dia de maceração, a fibra havia amolecido por completo com o extrato de *F. pseudocircinatum* em todas as concentrações e temperaturas testadas, enquanto que os talos testados com extrato de *W. dispersa* em 40° C tiveram um GSF 4,2 (50 mg/mL) e 4,4 (100 mg/mL). Aos 7 dias de maceração com o extrato de *F. pseudocircinatum* houve o amolecimento dos feixes de fibra, em todas as temperaturas e concentrações testadas, destaca-se que na concentração de 200 mg/mL, ocorreu a liberação da cutícula durante a agitação no vórtex. Infere-se que este resultado se deve a maior concentração da blenda destas enzimas.

Tabela 4. Resultados do teste de desfibramento de acordo com o grau de separação das fibras.

(40°C)					
<i>W. dispersa</i>			<i>F. pseudocircinatum</i>		
Tempo	(mg/mL)	GSF	Registro Fotográfico	GSF	Registro Fotográfico
3 dias	0	0		0	
	50	2,6		3,8	
	100	3,6		4,2	
	200	6 *		6 +	
5 dias	0	0		0	
	50	4,2		6	
	100	4,4		6+	
	200	6 + DE		6++ DE	
7 dias	0	0		0	
	50	6		6 +	
	100	6 +		6 ++	
	200	6 + DEV		6++ DEV	

(50°C)													
<i>W. dispersa</i>							<i>F. pseudocircinatum</i>						
Tempo	(mg/mL)	GSF	Registro Fotográfico				GSF	Registro Fotográfico					
3 dias	0	0		50	100	200 (mg/mL)	0		50	100	200 (mg/mL)		
	50	1,3					3,1						
	100	2					4,3						
	200	6*					6 *						
5 dias	0	0		50	100	200 (mg/mL)	0		50	100	200 (mg/mL)		
	50	6 *					6						
	100	6 *					6 +						
	200	6 + DE					6+ DE						
7 dias	0	0		50	100	200 (mg/mL)	0		50	100	200 (mg/mL)		
	50	6*					6 +						
	100	6+					6 ++						
	200	6+ DEV					6++ DEV						

GSF: Grau de separação das fibras: .0 - nenhuma fibra foi liberada, 1 – 1 a 10 mm, 2 - 10 a 25 mm, 3 - 25 a 50 mm, 4 - 50 a 75 mm, 5 - > 75 mm e 6 - todas as fibras foram liberadas dos 10 cm de comprimento), *:Com certa resistência; +: Com facilidade; ++: Com mais facilidade, DE: desligamento da epiderme, DEV: desligamento da epiderme durante a agitação no vórtex.

Observou-se também que ambas as temperaturas empregadas (40 e 50° C) proporcionaram o desfibramento, mas na temperatura de 40° C, onde as pectinases atuam, houve uma maior facilidade na soltura dos feixes do lenho. Na temperatura de 50° C, ideal para a atuação de xilanase, observou-se maior facilidade na liberação das fibras entre si. Segundo Hasan *et al.*, (2020) a xilanase promove a remoção parcial da hemicelulose tornando a fibra mais macia e assim uma fiação mais fina. As concentrações enzimáticas certamente são determinantes para esse desfibramento, visto que os talos foram submetidos às mesmas condições, no entanto, os talos tratados com extratos com maior concentração de enzima, apresentaram melhores resultados.

Os autores Chiliveri *et al.*, (2016) desenvolveram um estudo sobre o desfibramento e desengomagem de kenaff que também pertence à família Malvaceae e clotária (*Crotalaria juncea*) pertencente à família Fabaceae. Neste estudo, a separação completa das fibras aconteceu em 24 h com 400 U, enquanto a separação parcial (> 75%) das fibras de clotária aconteceu em 36 h. No presente trabalho, os extratos com 200 mg/mL apresentaram 1,1130 U/mL e 0,9321 U/mL de pectinase e 4,8912 U/mL e 4,3904 U/mL de xilanase das cepas *F. pseudocircinatum* e *W. dispersa*, respectivamente. Das *et al.*, (2012) realizaram um estudo com diferentes consórcios bacterianos produtores de pectinase que foram inoculados em tanques de maceração plásticos com juta (*Corchorus olitorius*) crua descorticada. Os dois melhores consórcios foram o C1 (quatro linhagens diferentes de *Bacillus pumilus*) com 46,61 UI/g, 61,98 U/mL, 0,78 U/mL e 0,100 U/mL poligalacturonase, pectina liase, xilanase e CMCase, respectivamente e C2 (duas linhagens diferentes de *B. pumilus* e uma linhagem de *Bacillus* sp.) com 37,56 UI/g, 57,68 U/mL, 0,840 U/mL e 0,153 U/mL de poligalacturonase, pectina liase, xilanase e CMCase, respectivamente, proporcionando a redução do tempo de maceração de 19 para 11 dias. Esses estudos apontam que maiores concentrações de pectinase, favorecem um desfibramento mais acelerado.

Um estudo feito em Bangladesh por Hasan *et al.*, (2020) promoveu o desfibramento de juta a partir do consórcio C-67 (*Enterobacter tabaci*, *Aeromonas jandaei*, *Kosakonia oryzae*, *Bacillus cereus*, *B. xiamenensis* e *B. koreensis*) que produziu uma concentração de pectinase, xilanase e CMCase de 31,5 U/mL, 30,5 U/mL e 20,0 U/mL, respectivamente, obtendo o desfibramento em 10 dias. Constatou-se que houve também melhora de 9% na força de torção e 20% na resistência e brilho da fibra, em comparação com o controle.

No processo de desfibramento, a temperatura de amolecimento da lignina do caule é de 100° C, o que proporciona também a degradação térmica das proteínas da parede celular (SALMÉN 1984; LIU, 2016) sendo vantajosa a autoclavagem dos talos de malva para utilização no desfibramento. Desta forma, as pectinases promovem a despolimerização da pectina presente nas lamelas médias das fibras com mais facilidade, enquanto que a ausência de celulase é benéfica para a fibra, uma vez que a fibra liberiana é composta basicamente por celulose, o que resultaria no enfraquecimento da fibra (HASAN *et al.*, 2020, MURAD e AZZAZ 2011). Sendo assim, o fungo *F. pseudocircinatum* é qualificado como uma boa linhagem para a promoção do desfibramento, uma vez que possui atividade pectinolítica, xilanolítica e ausência de atividade de CMCase reduzindo o tempo de desfibramento de 20-25 dias para 7 dias nas condições aqui observadas, entretanto vale ressaltar que esses resultados podem ser melhorados com o aumento destas enzimas.

4. CONCLUSÃO

Os extratos enzimáticos contendo pectinase e xilanase de ambos os fungos utilizados foram eficientes para promover o amolecimento e desfibramento da malva. No entanto, o extrato de *F. pseudocircinatum* foi superior na soltura da fibra do caule e entre si, mesmo com baixa concentração de unidades de enzima de pectinase (1,1130 U/mL) e xilanase (4,8912 U/mL) o que sugere que o aumento dessas unidades pode reduzir ainda mais o tempo de desfibramento. Para a produção industrial, novos substratos podem ser testados e novas condições podem ser empregadas para aumentar e otimizar a produção de ambas as enzimas. Desta forma, é possível projetar melhores condições de trabalho para os malvicultores que não precisarão aguardar 20-25 dias, nem mesmo ficar imersos várias horas por dia para a obtenção das fibras de malva, pois é possível um desfibramento em 7 dias em condições controladas conforme obtidas neste trabalho. Ensaio em campo em condições naturais são necessários para verificação da eficiência dos extratos enzimáticos e para verificar a eficácia de inóculos a partir destas linhagens fúngicas e/ou bacterianas que foram isoladas durante o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABD EL ATY, A.A.; SALEH, S.A.A.; EID, B.M.; IBRAHIM, N.A.; MOSTAFA, F.A. Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 14, 129-137, 2018.
- AMIN, F.; BHATTI, H.N.; BILAL, M.; ASGHER, M. Purificação, características cinéticas e termodinâmicas de uma exo-poligalacturonase de *Penicillium notatum* com perspectiva industrial. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 183 (1): 426–443, 2017.
- BANU, A. R.; DEVI, M. K.; GNANAPRABHAL, G. R.; PRADEEP, B. V.; PALANISWAMY, M. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. **Indian Journal of Science and Technology**, 3 (4): 377–381, 2010.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their applications: a review. **Applied microbiology and Biotechnology**, 56: 326- 338, 2001.
- CASTRO, A. P. D. **Análise sistêmica da cultura de malva: um estudo comparativo nas comunidades Nossa Senhora das Graças e Monte Sião no município de Manacapuru/Am.** p. 119. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais) Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Manaus, 2015.
- CHILIVERI, S. R.; KOTI, S.; LINGA, V. R. Retting and degumming of natural fibers by pectinolytic enzymes produced from *Bacillus tequilensis* SV11-UV37 using solid state fermentation. **SpringerPlus** 5:559, 2016.
- DAS, B.; CHAKRABARTI, K.; GHOSH, S.; CHAKRABORTY, A.; SAHA, M. N. Assessment of changes in community level physiological profile and molecular diversity of bacterial communities in diferent stages of jute retting. **Pak. J. Biol. Sci.** 16, 1722–1727, 2013.
- DAS, B.; CHAKRABARTI, K.; GHOSH, S.; MAJUMDAR, B.; TRIPATHI, S.; CHAKRABORTY, A. Effect of efficient pectinolytic bacterial isolates on retting and fibre quality of jute. **Industrial Crops and Products**, 36(1), 415–419, 2012.
- DAS, B.; CHAKRABORTY, A.; MAJUMDER, B.; CHAKRABORTI, A. Studies on physic-chemical and microbial parameters of jute growing soil, retting water and jute fibre quality. **Bangladesh J. Agric. Environ.** 6, 1–13, 2010.
- DICKER, M.P.M.; DUCKWORTH, P.F.; BAKER, A.B.; FRANÇOIS, G.; HAZZARD, M.K.; WEAVER, P.M. Green composites: A review of material attributes and complementary applications. Composites Part A: **Applied Science and Manufacturing**, 56, 280–289, 2014.
- FAWOLE, O.B. e ODUNFA, S.A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **Int. Biodeter. Biodegr.** 52: 223-227, 2003.

FRAXE, T. J. P., e FERREIRA, A. S. Nova técnica para extração de fibras de juta e malva em processo a seco no Estado do Amazonas: o resgate da utopia. **Inclusão Social**, 12(1), 2018.

FROLLINI E.; BARTOLUCCI N.; SISTI L.; CELLI A. Biocomposites based on poly (butylene succinate) and curaua: mechanical and morphological properties. **Polym Test** 45:168–173, 2015.

HASAN, R.; AKTAR, N.; KABIR, S. M. T.; HONI, U.; HALIM, A.; ISLAM, R. *et al.* Pectinolytic Bacterial Consortia Reduce Jute Retting Period and Improve Fibre Quality. *Scientific Reports*, 10(1), 2020.

IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; MAHMOOD, Z.; AQIL, T.; MEHMMOD, S.; NAWAZ, H. Bio-processing of agro-industrial waste orange peel for induced production of pectinase by *Trichoderma viridi*; its purification and characterization. **Turkish Journal of Biochemistry**, 39(1): 9–18, 2014.

LEE, C.H.; KHALINA, A.; LEE, S. H.; LIU, M. A. Comprehensive review on bast fibre retting process for optimal performance in fibre-reinforced polymer composites. **Advances in Materials Science and Engineering**, 2020: 1-27, 2020.

LIU, M.; SILVA, D. A. S.; FERNANDO, D.; MEYER, A. S.; MADSEN, B.; DANIEL, G. *et al.* Controlled retting of hemp fibres: Effect of hydrothermal pre-treatment and enzymatic retting on the mechanical properties of unidirectional hemp/epoxy composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 88, 253–262, 2016.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, 9:21-224. 1987.

MURAD H.Á. e AZZAZ H.H. Microbial pectinases and ruminant nutrition. **Res J Microbiol** 6:246–269, 2011.

NOGUEIRA, E. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; AMORIM, I. C. S.; OLIVEIRA, T. B.; NELSON, D. L.; BENASSI, V. M. Otimização das condições de cultivo do fungo filamentoso *Fusarium* sp. EA 1.3.7 para a produção de xilanases. **Biotemas**, 34 (1): 1-16, 2021.

PACCANARO, M.C.; SELLA, L.; CASTIGLIONI, C.; GIACOMELLO, F.; MARTÍNEZ-ROCHA, A.L.; D'OVIDIO, R. *et al.* Synergistic Effect of Different Plant Cell Wall–Degrading Enzymes Is Important for Virulence of *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 30(11), 886–895, 2017.

PALLESEN B.E. The quality of combine-harvested fibre flax for industrial purposes depends on the degree of retting. **Industrial Crops and Products**, 5:65–78, 1996.

PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. **3 Biotech**, 8(4), 2018.

PEIXOTO, J. S. G. **Bioprospecção de fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas e identificação de novas proteínas auxiliares para aplicação na conversão de**

biomassa lignocelulósica. 175 p. Tese (doutorado)—Universidade de Brasília, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica, 2019.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZALTI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties e industrial applications. **Applied microbiology and Biotechnology**, 67: 577-591, 2005.

REBELLO, S.; ANJU, M.; ANEESH, E. M.; SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, 16(3): 381–394, 2017.

REGINATTO, C. **Produção e caracterização parcial de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em processo submerso**. 90 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.

ROBL, D.; DELABONA, P. S.; MERGEL, C. M.; ROJAS, J. D.; COSTA, P. S.; PIMENTEL, I. C. *et al.* The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, 13(1), 94, 2013.

SADRMANESH, V. e CHEN, Y. Bast fibres: structure, processing, properties, and applications. **International Materials Reviews**, 34:1–26, 2018.

SALEEM, Z.; RENNEBAUM, H.; PUDEL, F.; GRIMM, E. Treating bast fibres with pectinase improves mechanical characteristics of reinforced thermoplastic composites. **Compos Sci Technol** 68:471–476, 2008.

SALMÉN, L. Viscoelastic properties of in situ lignin under water-saturated conditions. **J Mater Sci** ;19(9):3090–3096, 1984.

SARAIVA, A. L. R. F. **Otimização da produção de pectinases fúngicas via fermentação submersa**. 142 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2020.

SHAHID, M.; MOHAMMAD, F.; CHEN, G.; TANG, R.-C.; XING, T. Enzymatic processing of natural fibres: white biotechnology for sustainable development. **Green Chemistry**, 18 (8), 2256–2281, 2016.

SISTI, L.; TOTARO, G.; VANNINI, M.; CELLI, A. Retting Process as a Pretreatment of Natural Fibers for the Development of Polymer Composites. **Lignocellulosic Composite Materials**, 97–135, 2017.

TAHIR, P.M.D.; AHMED, A.B.; SAIFULAZRY, S.O.A.; AHMED, Z. Retting process of some bast plant fibres and its effect on fibre quality: A review. **BioResources** 6 (4), 5260–5281, 2011.

TERZOPOULOU, Z. N.; PAPAGEORGIOU, G. Z.; PAPADOPOULOU, E.; ATHANASSIADOU, E.; ALEXOPOULOU, E.; BIKIARIS, D. N. Green composites prepared from aliphatic polyesters and bast fibers. **Industrial Crops and Products**, 68: 60–79, 2015.

YU, H., e YU, C. Study on microbe retting of kenaf fiber. **Enzyme and Microbial Technology**, 40(7), 1806–1809, 2007.

ZHANG, J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, B.; AKIN, D.E.; FOULK, J.A.; KHALILI, S. *et al.* Effects of acidic media preincubation on flax enzyme retting efficiency. **Text Res J** 73:263–267, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da investigação da diversidade fúngica de endofíticos da malva e de fungos associados ao ambiente de cultivo e obtenção da fibra na região Amazônica, obteve-se 24 espécimes de fungos e dentre estes, 15 precisam ter seus genomas investigados pois, podem ser espécies novas.

O fungo *C. torulosa* (1291) apresentou melhor produção de CMCase, β -glicosidase, lacase e manganês peroxidase e o fungo *F. pseudocircinatum* (1290) produziu melhor as enzimas FPase, xilanase e pectinase, nas produções enzimáticas utilizando a malva como indutor. Ambas as espécies não tiveram atividade enzimática detectada para lignina peroxidase.

Dentre os 23 espécimes testados para a produção de pectinase, os três melhores produtores foram os fungos *F. pseudocircinatum* (0,2261 U/mL), *W. dispersa* (0,2113 U/mL) e *D. eucalyptorum* (0,1981 U/mL). Destes também foi quantificada xilanase onde o maior produtor foi *F. pseudocircinatum* (4,6113 U/mL) e o mesmo não teve produção de CMCase. O segundo melhor produtor de xilanase foi *W. dispersa* (2,7388U/mL) apresentando também atividade de CMCase (0,0887 U/mL).

Ambos os extratos enzimáticos de pectinase e xilanase produzidos por *F. pseudocircinatum* e *W. dispersa* foram eficientes para promover o amolecimento e desfibramento da malva. No entanto, o extrato de *F. pseudocircinatum* teve uma superioridade na soltura da fibra do caule e das fibras entre si, além de não ter a presença de CMCase, que favorece a qualidade da fibra reduzindo o tempo de maceração de 21 dias para 7 dias, em condições controladas.

PERSPECTIVAS

Para estudos posteriores, pretende-se:

- 1- Verificar a eficácia do extrato enzimático de *F. pseudocircinatum* no desfibramento de talos de malva *in natura*, seguindo-se o mesmo protocolo utilizado neste trabalho.
- 2- Aumentar a escala laboratorial e realizar o processo de desfibramento em tanques de plástico em condições encontradas em campo.
- 3- Avaliar a produção de pectinase, xilanase e CMCase a partir da utilização de resíduos agrícolas como indutores para obter maiores quantidades das enzimas de interesse.
- 4- Produzir inóculo a partir de um fungo não patogênico para o agricultor trabalhar em campo.
- 5- Avaliar o potencial de bactérias associadas ao cultivo de malva quanto à maceração da mesma.