

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS
DE AMBIENTE MARINHO**

Fernanda Brocca de Matos

Bióloga – ULBRA

Maio, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS
DE AMBIENTE MARINHO**

Fernanda Brocca de Matos

Bióloga – ULBRA

Dissertação apresentada como
requisito para obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente Orientador: Dr. José Carlos
Germani

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Maio, 2012

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, me conceder sabedoria e a oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor José Carlos Gemani pela paciência, orientação e a constante confiança no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos colegas de laboratório, em especial á Jeanine dos Santos Goulart e Indianara Amaral e aos Professores Walter de Nisa e Castro Neto, Diego Antonio Viana Gomes e Daniel Bedinote da Rocha pelo incentivo, aprendizado, apoio e amizade durante o mestrado.

À minha mãe e meu pai, que sempre me incentivaram mesmo nos momentos mais difíceis, com atenção e carinho.

Ao Ruan Beckel, pelo companheirismo e paciência nesta reta final do Mestrado.

E a todos que de alguma maneira participaram da realização deste sonho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE AMBIENTE MARINHO

Autor: Fernanda Brocca de Matos

Orientador: Dr. José Carlos Germani

RESUMO

Os oceanos constituem 71% da superfície da Terra e muitos microrganismos que provêm deste ambiente podem secretar enzimas de alto interesse biotecnológico. As enzimas produzidas por microrganismos marinhos podem ser mais estáveis, devido à alta complexidade deste ambiente. Por este motivo, objetivou-se isolar e identificar os fungos presentes no sedimento marinho e verificar a atividade enzimática da amilase, celulase, lipase e protease dos mesmos em diferentes temperaturas (15°C, 20°C, 25°C e 30°C). As amostras de sedimento foram coletadas com auxílio de seringas estéreis à 10 metros de profundidade, e transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas. Após o crescimento, fragmentos de micélio foram repicados no centro de placa de petri para isolamento das amostras. Diferentes substratos foram utilizados para avaliar a atividade da amilase, celulase, lipase e protease dos isolados. A capacidade de hidrolisar os substratos foi verificada em diferentes temperaturas (15°C, 20°C, 25°C e 30°C). Foram isoladas 22 cepas fúngicas, de 14 diferentes espécies, pertencentes a nove gêneros, dentre eles *Helicosporium*, *Helicomycetes*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Chaetomium*, *Geotrichum*, duas espécies de *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium aurantiogriseum*. O maior índice de positividade enzimática ocorreu na temperatura de 25°C, na qual 71% dos isolados hidrolisaram o substrato lipídico, seguido de protease com 50%, celulase 43% e amilase 36%. Todos os isolados produziram no mínimo um tipo de enzima, nas temperaturas testadas, ficando evidente a que o ambiente marinho é para descoberta de novas enzimas.

¹ Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (65 p.) Maio, 2012.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FILAMENTOUS FUNGI FROM THE MARINE ENVIRONMENT

Author: Fernanda Brocca de Matos

Advisor: Dr. José Carlos Germani

ABSTRACT

Oceans constitute 71% of the Earth's surface, and many microorganisms from this environment may secrete enzymes of high biotechnological interest. Enzymes produced by marine microorganisms might be more stable due to the great complexity of this environment. Therefore, we aimed at isolating and identifying the fungi present in marine sediment and at verifying the corresponding enzymatic activities of amylase, cellulase, lipase, and protease. Sediment samples were collected with sterile syringes at a depth of 10 meters and transported to the laboratory in cool boxes. After their growth, mycelial fragments were sub-cultured and inoculated in the center of Petri dishes for isolating the samples. Different substrates were used to evaluate the activity of amylase, cellulase, lipase and protease. The ability to hydrolyse the substrates was observed at different temperatures (15°C, 20°C, 25°C e 30°C). Twenty-two fungal strains were isolated from 14 different species belonging to nine genera, including *Helicosporium*, *Helicomycetes*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Chaetomium*, *Geotrichum*, two different types of *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Penicillium chrysogenum*, and *Penicillium aurantiogriseum*. The highest enzymatic production rate was found for lipase, produced by 71% of the isolated fungi, followed by protease (50%), cellulase (43%), and amylase (36%). All isolates produced at least one type of enzyme, evidencing that the sea is a environment for discovering new enzymes.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
RELAÇÃO DE TABELAS	vii
RELAÇÃO DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 O Ambiente Marinho e os Microrganismos	4
2.2 ENZIMAS	7
2.2.1 AMILASE.....	10
2.2.2 CELULASE	11
2.2.3 LIPASE.....	13
2.2.4 PROTEASE.....	14
2.3 FUNGOS E ENZIMAS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Coleta das amostras	18
3.2 Período da amostragem.....	19
3.3 Identificação das amostras.....	19
3.4 Análise da produção enzimática	20
3.4.1 Hidrólise do amido	20
3.4.2 Avaliação da capacidade celulolítica.....	20
3.4.3 Avaliação da atividade lipolítica	20
3.4.4 Avaliação da protease.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Isolamento e identificação morfológica	22
4.2 Avaliação da atividade enzimática dos fungos filamentosos.....	32
4.2.1 Atividade da amilase	33
4.2.2 Atividade da celulase	36
4.2.3 Atividade da lipase	39
4.2.4 Atividade da protease	41
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS.....	45

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Principais aplicações das enzimas comercializadas.....	8
Tabela 2: Identificação dos isolados.....	22
Tabela 3: Fontes de isolamento de espécies do gênero <i>Cladosporium</i> provenientes do ambiente marinho	25
Tabela 4: Fontes marinhas nas quais o gênero <i>Penicillium</i> foi isolado	28
Tabela 5: Produção de amilases em diferentes temperaturas	34
Tabela 6: Atividade da celulase em diferentes temperaturas.....	38
Tabela 7: Atividade de lipases dos isolados, em diferentes temperaturas	40
Tabela 8: Atividade de proteases dos isolados, em diferentes temperaturas.....	42

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Beneficiamento químico da indústria têxtil e as enzimas aplicadas.....	9
Figura 2: Processo resumido de fabricação do etanol	11
Figura 3: Coleta de sedimento marinho com auxílio de uma seringa estéril	18
Figura 4: Obtenção das amostras puras	23
Figura 5: Técnica do microcultivo.....	24
Figura 6: Microscopia de <i>Paecilomyces</i> sp.	26
Figura 7: Microscopia de duas espécies do gênero <i>Penicillium</i>	27
Figura 08: Visualização do halo de degradação da celulose	36
Figura 9: (a) Visualização do halo de atividade lipolítica. (a seta indica o halo de degradação). (b) Ausência de halo (atividade negativa da lipase).....	39

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo o homem vem utilizando enzimas produzidas por microrganismos para catalisar diversas reações (Spier, 2005). Embora não se conhecesse o modo como ocorriam as reações, a ação das enzimas produzidas por microrganismos era utilizada na produção de vinhos e pães desde os tempos bíblico.

As enzimas são catalisadores biológicos proteicos que agem em substratos específicos, efetuando diversos processos metabólicos na célula viva. Todos os organismos vivos produzem algum tipo de enzima, regulando seus processos químicos (Lehninger *et al.*, 2002).

Atualmente as enzimas estão sendo utilizadas em larga escala na indústria. As amilases, lipases, proteases, pectinases e celulases estão dentre as mais importantes enzimas de interesse industrial. Na indústria de alimentos as amilases estão sendo amplamente utilizadas na panificação, cervejarias, na produção de antibióticos (Gomes, 2007). As lipases são utilizadas na produção de detergentes, síntese de biosurfactantes, indústria de laticínios e em processos de biorremediação (Fernandes, 2007). As celulases são usadas na indústria de alimentos, de papel, de tecidos, na produção de alguns fármacos e cosméticos (Calado *et al.*, 2007).

As pectinases são utilizadas na clarificação de sucos eliminando a turbidez e diminuindo a viscosidade. As proteases são utilizadas na indústria de alimentos, no tratamento de couros e peles, na produção de detergentes e no processamento de carnes, conservas e peixes (Guimarães *et al.*, 2006).

Os microrganismos são responsáveis por produzir diversas enzimas com interesse industrial, e dentre eles os fungos filamentosos são de grande importância. Esses organismos são definidos como seres eucarióticos, aclorofilados, que possuem parede celular, não realizam fotossíntese, são aeróbios em sua maioria, mas alguns são anaeróbios facultativos. Eles obtêm seus nutrientes através de absorção, secretando enzimas sobre a fonte nutricional para absorver pequenas moléculas (Tortora, 2006).

São encontrados em todos os ambientes e possuindo um incrível arsenal enzimático, crescem sobre os mais diversos substratos. Suas enzimas podem ser utilizadas na industrialização de inúmeros compostos. Alguns gêneros são capazes de produzir antibióticos, substâncias que inibem os processos vitais de vários microrganismos (Raven, 2001).

Praticamente todos os grupos de fungos são encontrados neste ambiente, mesmo em condições ambientais extremas de alta salinidade e pH diverso da neutralidade (Ricklefs, 2003). Estima-se que existam 1.500 espécies de fungos no ambiente marinho, um número baixo quando comparado a estimativa terrestre, que é de 250.000. É importante registrar que menos de 500 fungos filamentosos marinhos foram descritos, sendo que 79 estão associados às algas, como parasitas ou simbiotes e 18 associados aos

hospedeiros animais. Por este motivo, estima-se que há inúmeros compostos bioativos a serem descobertos (Tarman *et al.*, 2011).

Neste trabalho objetivou-se isolar e identificar os fungos presentes no sedimento marinho e verificar as respectivas atividades enzimáticas da amilase, celulase, lipase e protease, com a finalidade de caracterizar esse microrganismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Ambiente Marinho e os Microrganismos

Os oceanos constituem 71% da superfície da Terra e muitos microrganismos que provém deste ambiente podem secretar enzimas de alto interesse biotecnológico. As enzimas produzidas por microrganismos marinhos podem ser mais estáveis, devido a alta complexidade deste ambiente, como a alta salinidade, que pode chegar a 33 e 35 ppt, elevada pressão osmótica, baixas temperaturas e grandes diferenças de pH. Estas variações químicas e físicas afetam grandemente os grupos de organismos que ali vivem, conferindo as células destes organismos propriedades únicas (Raghukumar, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Zhang & Kim, 2010).

Nos últimos anos, os pesquisadores isolaram uma variedade de actinomicetos, bactérias, fungos e outros microorganismos provenientes do ambiente marinho, mostrando que o mesmo pode ser fonte economicamente explorável para a descoberta de novas enzimas de interesse industrial (Raghukumar, 2008).

As enzimas podem ser obtidas de inúmeros organismos vegetais e animais, entretanto, os microrganismos estão tornando-se a fonte mais comum destes catalisadores biológicos. Isto se deve à sua ampla diversidade

bioquímica, fácil manipulação genética e a viabilidade de cultivo (Zhang & Kim, 2010).

Mbata (2008) isolou e identificou fungos filamentosos de águas marinhas profundas e hiper salinas, entres eles, *Gymnascella*, *Eurotium* sp., *Chaetomiun globosum*, *Aspergillus versicolor*, *Hortaea werneckii* e *Aureobasidium pullulans*. Fungos endofíticos marinhos também foram isolados, como *Penicillium critinum* e *Apiospora montagnei* associados a algas vermelhas e *Fusarium* sp., associado a algas verdes (Raghukumar, 2008).

No ambiente marinho, os fungos também podem estar associados a animais, na condição saprofítica ou simbiônica. Algumas espécies de fungos saprofíticos foram isoladas de pepino do mar (Pivkin, 2000). Fungos do gênero *Phoma* foram isolados das cascas de caranguejos do gênero *Chionoecetes opilio*. *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium fellutanum* foram isolados do trato gastrointestinal de peixes marinhos capturados na costa do Japão. Destes fungos, foram isolados três derivados de quinazolina e peptídeos lipofílicos. *Ostracoblabe implexa* um fungo endofítico, foi isolado da concha da ostra *Crassostrea cucullata* na costa de Goa na Índia. As pesquisas realizadas demonstraram que este fungo produz moléculas bioativas contra artrópodes e novos estudos estão comprovando sua eficácia contra ácaros (Raghukumar, 2008).

Wang *et al.* (2011) isolou do coral *Echinogorgia rebekka* no sul da China, 18 isolados diferentes de fungos filamentosos. Entre eles, *Penicillium chrysogenum*, *Nigrospora* sp., *Alternaria alternata*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus* sp., *Nectria haematococca*, *Cladosporium* sp., *Hypocrea lixii*,

Cladosporium sphaerospermum, *A. flavipes*, *C. uredinicola*, *P. polonicum*, *A. westerdijkiae*, *C. cladosporioides*, *C. curcimerinum*, *P. crustosum* e *P. glabrum*. Esses isolados foram submetidos a testes de produção de antimicrobianos, sendo constatado que *Penicillium* e *Cladosporium* inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus tetragenus*, demonstrando que o ambiente marinho pode ser importante fonte de novos compostos bioativos.

Fungos do gênero *Aspergillus* também foram isolados do coral *Dichotella gemmacea*, e produziram cinco diferentes sesquiterpenos, três dos quais apresentaram alguma atividade antibacteriana (Wei *et al.*, 2010).

Algas vermelhas das espécies *Kappaphycus alvarezii*, *Kappaphycus cottonii*, *Eucheuma edule* e *Gracilaria* também foram estudadas e delas foram isoladas fungos do gênero *Aspergillus* e espécies tais como, *Lasiodiplodia theobromae*, *Xylaria psidii*, *Epicoccum nigrum* e *Coniothyrium* sp. (Tarman, 2011).

Yu *et al.* (2010) isolou *Penicillium aurantiogriseum* do lodo marinho no Mar de Bohai, na costa nordeste da China. Este revelou-se produtor de dois compostos, o verrucosidinol e o acetato de verrucosidinol, que apresentam estruturas similares a micotoxina verrucosidina, compostos estes com bioatividade ainda não explorada.

Gutiérrez *et al.* (2010) isolou da coluna da água e do sedimento marinho inúmeros fungos filamentosos, demonstrando pela primeira vez a distribuição vertical de biomassa fúngica no ecossistema marinho,

evidenciando que a camada superficial do sedimento marinho possui uma alta diversidade biológica.

2.2 ENZIMAS

Payen & Persoz em 1833, fizeram a primeira descoberta de enzima, quando isolaram no precipitado alcoólico, uma substância termolável que desdobrava o amido, mais tarde denominada amilase. A primeira teoria foi publicada por Berzelius em 1835, e Pasteur em 1860, postulou que as enzimas estão associadas à estrutura e a vida da célula. Em 1897, Buchner obteve sucesso na extração de enzimas a partir de células de levedura, que catalisavam a fermentação alcoólica. Este fato demonstrou que as enzimas catalisavam a maioria das vias metabólicas energéticas, permanecendo ativas mesmo quando removidas de células vivas. A uréase foi a primeira enzima isolada, na forma cristalina, mas isto foi compreendido melhor quando Summer em 1926 a isolou e evidenciou que todas as enzimas são proteínas. Atualmente, muitas e diferentes enzimas são conhecidas, algumas isoladas na forma pura homogeneizada e outras na forma cristalizada (Bon *et al.*, 2008).

As enzimas são catalisadores biológicos extraordinariamente efetivos, apresentando um grau de especificidade muito alto com os substratos (Lehninger *et al.* 2002).

Certamente, as enzimas e os antibióticos constituem o mais importante grupo de produtos biológicos. Várias etapas industriais utilizam as enzimas em seu processamento. Aproximadamente 4000 enzimas são conhecidas e destas 200 são comercializadas, sendo os microrganismos

responsáveis por produzirem cerca de 50% das enzimas com aplicações industriais (Fernandes, 2007).

O uso de enzimas nas mais diversas indústrias vem crescendo (TABELA 1), sendo que 60% da produção é oriunda da comunidade Européia. Apenas a indústria de alimentos dos Estados Unidos no ano de 2003 consumiu mais do que US\$142 milhões em produtos enzimáticos (Sharma *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Principais aplicações das enzimas comercializadas.

Enzimas	Aplicações
Alfa-amilase, amilo-glicosidase e beta-amilase	Sacarificação do amido, em panificação ou produção de xarope
Catalase	Eliminação da água oxigenada
Celulases, beta-glicanases, alfa-amilases, peptidases, amilases maltogênicas	Liquefação, clarificação e suplementação das enzimas do malte para produção da cerveja
Lipases	Desdobramento de óleos e gorduras na produção de laticínios, produção de detergentes
Glicose isomerase	Produção de isoglicose
Hemicelulase ou xilanases	Hidrólise da hemicelulose no uso de resíduos celulósicos
Invertase	Inversão da sacarose
Lactase	Hidrólise da lactose
Renina ou coalho microbiano	Produção de queijos
Naringinase	Remoção do sabor amargo dos cítricos
Pectinase	Fermentação do cacau, clarificação e extração de sucos e vinhos, maceração de polpas e extração de óleos vegetais
Celulases	Produção de açúcares, extração de óleos vegetais, indústria têxtil.
Peptidases, tripsina, aminopeptidase	Maturação de queijos cura de carnes, hidrólise de vários produtos a base de proteína

Fonte: Adaptado de Bon et al. *Enzimas: aplicações em biotecnologia, produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro. Interciência: UFRJ:CAPES, 2008. 506p.

Existe, portanto, uma grande demanda industrial e inúmeras possibilidades a serem exploradas, que podem propiciar o aparecimento de novos produtos a partir de matérias primas tradicionais.

Além do uso intenso na indústria de alimentos, as enzimas são largamente utilizadas na indústria têxtil. Entre suas vantagens, está a realização de processos mais econômicos e menor geração de poluentes (Bon *et al.*, 2008). A FIGURA 1 mostra os principais processos do beneficiamento químico das fibras têxteis e as enzimas que são utilizadas em cada etapa.



Figura 1 – Beneficiamento químico da indústria têxtil e as enzimas aplicadas. Fonte: Adaptado de Bajpai, 1998, Freitas 2002 & Bon, 2008.

Outro ramo da indústria que movimenta enormemente a economia mundial e que depende diretamente do uso de enzimas é a de polpa e papel. Há bastante tempo a biotecnologia tem sido empregada na sua produção, principalmente na preparação da matéria-prima, polpação, branqueamento, entre outros (Bajpai, 1999). Na etapa de branqueamento são utilizadas xilanases, o que demonstra o quão eficientes são as enzimas e que podem ser introduzidas nas instalações existentes. Outras enzimas aplicadas na indústria de polpa e papel são as amilases, peptidases, lipases, pectinases, peroxidases e lacases (Bajpai *et al.*, 1994).

Na produção de etanol também ocorre o uso de enzimas, assim como na indústria de detergentes, na indústria farmacêutica, indústria de cosméticos, nas agroindústrias, indústria de rações, no tratamento de efluentes e na produção de biodiesel (Bon *et al.*, 2008).

Diante de inúmeras aplicações, verificar a atividade enzimática de fungos isolados do sedimento marinho torna-se uma alternativa para o descobrimento de enzimas com características únicas, pois a complexidade deste ambiente, como temperatura, salinidade, pH e pressão osmótica podem conferir as enzimas maior estabilidade, podendo ser utilizadas nos mais diversos ramos da indústria.

2.2.1 AMILASE

As amilases são enzimas conversoras de amido pertencentes à classe das hidrolases, e que formam dois grupos: as endoamilases e as exoamilases. As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4, como a β -amilase ou ambas as ligações α -1,4 e α -1,6, como amiloglicosidase e glicosidase. As endoamilases catalisam hidrólises de forma aleatória no interior da molécula do amido, originando cadeias de vários comprimentos. Estas enzimas são produzidas por uma diversa gama de organismos; entre esses, bactérias, fungos e plantas são importantes produtores deste catalisador biológico (Spier, 2005).

Por décadas as amilases eram aplicadas restritamente nos processos de panificação, mas nos últimos anos, essas enzimas têm sido extensivamente estudadas e em consequência encontram diferentes

aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica, têxteis e de papel (Bon *et al.*, 2008).

Na indústria têxtil, as amilases são utilizadas na desengomagem de tecidos, que são previamente engomados. Esta enzima é muito importante neste processo, pois é capaz de degradar rapidamente o amido a açúcares solúveis. Este catalizador é também utilizado na produção de etanol, permitindo o uso de matérias-primas amiláceas em sua fabricação (FIGURA 2) (Bon *et al.*, 2008).

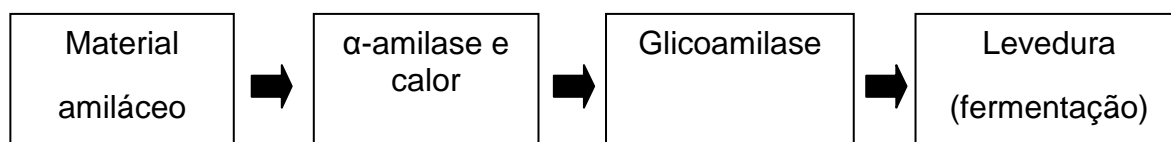


Figura 2 – Processo resumido de fabricação do etanol. Fonte: Bon *et al.*, 2008.

A amilase é amplamente utilizada na indústria de cosméticos, com diversas finalidades. O uso de enzimas como a amilase na indústria cosmética é chamada de enzimocosmética, onde são utilizadas para seborréia capilar, prevenção da placa bacteriana e colutórios bucais (Fregolente, 2010).

2.2.2 CELULASE

As celulasas ocupam o terceiro lugar no *ranking* mundial das enzimas produzidas industrialmente. Esta posição se deve às suas amplas aplicações biotecnológicas, como no processamento de algodão, na reciclagem de papel, na extração de sucos, em detergentes enzimáticos e como aditivos para alimentação animal.

Estas enzimas podem ser produzidas por uma ampla diversidade de microrganismos, os quais incluem bactérias, plantas, actinomicetos, animais e fungos filamentosos (Lynd *et al.*, 2002; Palomer *et al.*, 2004).

As celulasas produzidas por microrganismos aeróbios são facilmente secretadas na forma de molécula livre, e os fungos filamentosos são os mais utilizados na produção de celulasas, principalmente os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete* (Singhania *et al.*, 2010).

Na indústria alimentícia, as celulasas são usadas em vários processos, principalmente na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja, do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (Castro *et al.*, 2010).

As celulasas podem ser empregadas também nas formulações de detergentes domésticos e industriais, pigmentos, essências, alcaloides e amido, produtos estimuladores de ensilagem, produção de sucos, extração de óleos, preparação de alimentos infantis, no tratamento de lixo orgânico, rações animais, produtos dermatológicos, produtos estimulantes de digestão e adjuvante para o malte da cerveja, e no amaciamento de tecidos e no descolorimento dos mesmos (Kubicek *et al.*, 1993).

2.2.3 LIPASE

As lípases são biocatalizadores que agem na hidrólise de ligações éster-carboxílicos, liberando ácidos e álcoois orgânicos. Estas enzimas têm uma posição de destaque, pois agem em meios orgânicos com baixo teor de água (Baron, 2005).

As lipases podem ser produzidas por vegetais como a canola e a mamona, no pâncreas dos animais e por diversos microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Estes últimos são os produtores com maior potencial, devido ao seu rápido tempo de geração e alto rendimento de produto (Durli, 2007).

Economicamente, as lipases podem ser empregadas em diferentes ramos industriais. Na indústria farmacêutica na síntese de atenolol, medicamento utilizado no controle da hipertensão; em drogas anti-inflamatórias como naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen; na indústria de alimentos para a síntese de aromas e maturação do queijo e no melhoramento da qualidade de aroma, na remoção de excesso de gorduras na fabricação de maionese, cremes e molhos (Fregolente, 2010).

Outras aplicações industriais das lipases incluem a produção de biodiesel, produção de cosméticos para o tratamento da seborréia, a fabricação de produtos que auxiliam no tratamento da celulite e da acne e sais de banho. Ainda, para melhorar o aroma, a digestibilidade e a textura de alimentos e bebidas; na fabricação de emulsificantes e detergentes; na indústria papelreira, utilizada para remover produtos hidrofóbicos da madeira e no tratamento de efluentes (Bon *et al.*, 2008; Barron, 2005; Durli, 2007).

2.2.4 PROTEASE

As enzimas proteolíticas, tradicionalmente conhecidas como proteases ou peptidases, são capazes de hidrolisar pequenos peptídeos. Estas enzimas são amplamente utilizadas na indústria de detergentes, pois elas têm melhor desempenho na remoção de manchas e não afetam a cor dos tecidos (Castro *et al.*, 2004). As peptidases estão deixando de ser um aditivo nas formulações de detergentes, passando a ser um ingrediente chave e por este motivo seu uso tem grande importância neste ramo da indústria (Bon *et al.*, 2008).

Na indústria de alimentos as enzimas proteolíticas são utilizadas para melhorar o sabor, aroma, textura, funcionalidade e a qualidade nutricional. Proteases são especialmente utilizadas na fabricação de aromatizantes para sopas e molhos. Além destes ramos da indústria, as proteases são utilizadas na obtenção de aspartame, encefalina, dinorfina e angiotensina (Kumar & Bhalla, 2005).

Na indústria farmacêutica, as proteases são também utilizadas na fabricação das aspártico-peptidases, inibidores que possuem funções importantes em diferentes patologias, como no tratamento quimioterápico da AIDS; na produção da catepsina D para o tratamento do câncer de mama, para a produção de β -secretase utilizada na doença de Alzheimer e nas diferentes infecções por *Candida* e da plasmepsina no tratamento da malária. Outros potentes inibidores, as serina – peptidases são usadas no tratamento de patologias como asma, inflamação, trombose, infarto coronariano e coágulo

vascular. As cisteína-peptidases, produzidas por protozoários são alvos para a produção de novos fármacos (Bon *et al.*, 2008).

O conhecimento de como agem as proteases vem sendo muito estudado, pois despertam o interesse de muitos grupos de pesquisa. Entretanto, há muito a se descobrir, tanto do ponto de vista biotecnológico, quanto da caracterização química desta enzima.

2.3 FUNGOS E ENZIMAS

Os fungos têm a capacidade de utilizar os mais diversos recursos nutricionais, pois produzem inúmeras enzimas, as quais podem ser utilizadas na industrialização de diferentes compostos (Putzke & Putzke, 2002).

Os fungos filamentosos estão sendo utilizados há muitas décadas na produção de alimentos, bebidas e até mesmo de fármacos. Entretanto, a exploração dessas capacidades só se tornou viável com o estudo da sua fisiologia, genética e bioquímica (Bon *et al.*, 2008).

Assim, inúmeras espécies de fungos são excelentes produtores de enzimas de interesse industrial. Algumas espécies de *Trichoderma* sp. são produtoras de celulases que podem ser usadas em vários processos, como na extração de proteína de soja, componentes do chá verde, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do Agar, na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (Gomes, 2007).

Os gêneros *Aspergillus* e *Cryptococcus* são ótimos produtores de amilases, podendo ser usadas na indústria de bebidas, ração animal e fermentos.

As espécies de *Mucor* spp. já foram citadas como importantes produtores de enzimas como amilases, lipases, pectinases e proteases. Deste modo, *M. racemosus*, *M. bacilliformis*, *Mucor hiemalis*, *M. miehei*, este último apresentando diversos estudos sobre a atividade lipolítica. Segundo Fernandes (2007) o fungo *Macrophomina phaseolina* causador da podridão cinzenta do caule de vegetais e um dos principais patógenos de sementes, apresentou que habilidades na produção de amilases, tendo como fontes o amido e a farinha de arroz.

Rueggier & Tauk-Tornisielo, (2004) isolou fungos de solo e da água, testou a atividade das celulasas e constatou que 45% dos isolados produziram estes compostos catalíticos. As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também são citadas como ótimas produtoras dessas enzimas, assim como as linhagens de *Trichoderma*, que são amplamente utilizadas na indústria.

Fernandes (2007) avaliou o potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diversos substratos. Registrou que *P. roqueforti*, *P. verrucosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *P. brevicopactum*, estes apresentaram ótimos índices enzimáticos a produção de amilases. Em relação a celulase, constatou que todas as linhagens isoladas apresentaram variação quanto ao potencial de produção da enzima.

Penicillium chrysogenum, isolado de algas vermelhas do gênero *Laurencia*, vem chamando a atenção pela produção de metabólicos ativos contra o fungo patogênico *Alternaria brassicae* (Gao et al, 2011).

Chi *et al.* (2007) isolaram *Aureobasidium pullulas* das águas salinas do Mar Amarelo na China, sendo importante produtor de proteases alcalinas e amilases..

Aspergillus niger isolados do ambiente marinho, mostraram alta atividade de xinalase alcalina. Espécies de *Penicillium* isolados do mar amarelo da China também apresentaram alta capacidade de secretar esta enzima (Zhang & Kim 2010).

Mucor sp. isolado por Mohapatra (1998) associado a esponjas do gênero *Spirastrella* sp. apresentou um novo tipo de amilase.

Tendo em vista a crescente demanda por complexos enzimáticos com potencial biotecnológico, os fungos filamentosos têm atraído atenção de diversas indústrias em vários ramos econômicos, pois o custo da produção de enzimas por esses microrganismos é relativamente baixo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

As amostras de sedimento marinho foram coletadas a 10 metros de profundidade, próximo à Ilha do Arvoredo, em Santa Catarina (23°58'S, 46°09'O) com auxílio de seringas estéreis (FIGURA 3) e transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas com gelo. O desenvolvimento das amostras deu-se com a inoculação em Ágar Sabouraud, acrescido de 20% de água do mar, buscando suprir os micronutrientes encontrados neste ambiente (Gomes, 2009), e incubados a 28°C por até 15 dias (Lacaz, 2002). Após o crescimento, fragmentos de micélio foram repicados para o meio de cultivo no centro de placa de Petri para isolamento das amostras.



Figura 3 – Coleta de sedimento marinho com auxílio de uma seringa estéril. Fonte: O autor

3.2 Período da amostragem

As amostras de sedimento foram coletadas em quatro sazonalidades delimitadas pelas estações do ano (outono, inverno, primavera, verão), referentes às diferenças existentes nas correntes marinhas que alteram a constituição dos nutrientes, temperatura e salinidade do oceano (Gomes, 2009).

3.3 Identificação das amostras

A análise das características morfológicas microscópicas foi realizada pela técnica do microcultivo. Nesta técnica, as placas de Petri esterilizadas continham em seu interior duas hastes de vidro, uma lâmina, uma lamínula e algodão estéril umedecido. Após, o Agar de cultivo acrescido de água do mar foi colocado sobre a lâmina e nele realizada a inoculação da amostra. O fungo foi inoculado nas quatro extremidades do ágar e coberto por uma lamínula estéril. O período de incubação variou de 7 a 15 dias, à 28°C (Lacaz, 2002). Após a lamínula foi retirada com pinça estéril e colocada sobre uma lâmina com 2 gotas de azul de lactofenol. Esse procedimento permitiu visualizar os esporos e hifas de fungos hialinos.

As características morfológicas macroscópicas foram analisadas através da observação de itens como a textura, a pigmentação da superfície e do verso, a superfície, a cor da colônia, o aspecto, pigmento difundido no meio e sua cor, o tempo de crescimento e o diâmetro da colônia (Lacaz, 2002).

3.4 Análise da produção enzimática

3.4.1 Hidrólise do amido

A produção das amilases foi determinada em placa de Petri com Ágar amido acrescido de 20% água do mar, ao qual, após a incubação por sete dias em diferentes temperaturas (15°C, 20°C, 25°C e 30°C), foi adicionado 10 ml de Lugol. A área amarelada ao redor da colônia em contraste com o meio azulado indica a atividade amilolítica (MacFaddin 2000).

3.4.2 Avaliação da capacidade celulolítica

Os isolados fúngicos foram inoculados em placas de Petri com meio mínimo de sais (sulfato de amônia 1,0g; fosfato de potássio 2,0g; sulfato de magnésio 0,1g; cloreto de potássio 3,8g; citrato de sódio 10Mm; extrato de malte 0,6g; carboximetilcelulose 10,0g; ágar 15g e água destilada 800ml, água do mar 200 ml) segundo Tuncer *et al.*, 2004, e incubados em 4 temperaturas, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C, durante 4 dias. Para a visualização da produção de celulase através da formação de halos de hidrólise, as placas foram submetidas por 16h à 50°C, coradas com vermelho congo 0,1% por 30 minutos e descoradas com uma solução de NaCl (Neirottl & Azevedo, 1988).

3.4.3 Avaliação da atividade lipolítica

A produção de lipase pelos isolados foi verificada em placas de Petri com ágar nutriente acrescido de 20% água do mar (peptona 15g, extrato de levedura 2g, extrato de carne 3g, NaCl 5g, ágar 13g) contendo Rodamina b 1ml e óleo de oliva, 7,5 ml. A incubação das amostras ocorreu em 4 temperaturas distintas, 15°C, 20°C, 25°C e 30 °C por sete dias. A indicação de

produção de lipase deu-se com a presença de um halo claro formado entorno da colônia visível sobre a luz ultravioleta (Fernandes, 2007).

3.4.4 Avaliação da protease

As proteases foram detectadas a partir de um meio contendo gelatina como substrato (ágar, gelatina 4%, pH 6,0). Após sete dias de incubação nas 4 temperaturas testadas (15°C, 20°C, 25°C e 30 °C), as amostras foram refrigeradas a 8°C, por 30 minutos. O resultado foi considerado positivo quando as amostras semisólidas tornaram-se líquidas (MacFaddin, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação morfológica

Das amostras coletadas do sedimento marinho, foram obtidos 22 isolados fúngicos, de 14 diferentes espécies pertencentes a nove gêneros TABELA 2, as quais foram identificadas através das análises da micromorfologia pela técnica do microcultivo e macromorfologia pela observação do aspecto das colônias. Sete isolados fúngicos não se desenvolveram no segundo repique e, portanto não puderam ser testados nem identificados.

Tabela 2. Identificação dos isolados

Identificação das amostras	
<i>Aspergillus</i> sp.1	<i>Paecilomyces</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sp.2	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Cladosporium</i> sp.1	<i>Penicillium</i> sp.1
<i>Cladosporium</i> sp.2	<i>Penicillium</i> sp.2
<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.
<i>Helicomyces</i> sp	.
<i>Helicosporium</i> sp.	

A identificação iniciou com o isolamento das amostras para verificar a pureza das colônias FIGURA 4. As colônias puras obtidas foram submetidas à técnica de microcultivo em lâmina FIGURA 5, onde as estruturas permaneceram íntegras, facilitando a observação das características microscópicas, tais como o tipo de hifa (hialina ou demáceas, septada ou cenocítica) e a disposição dos esporos.

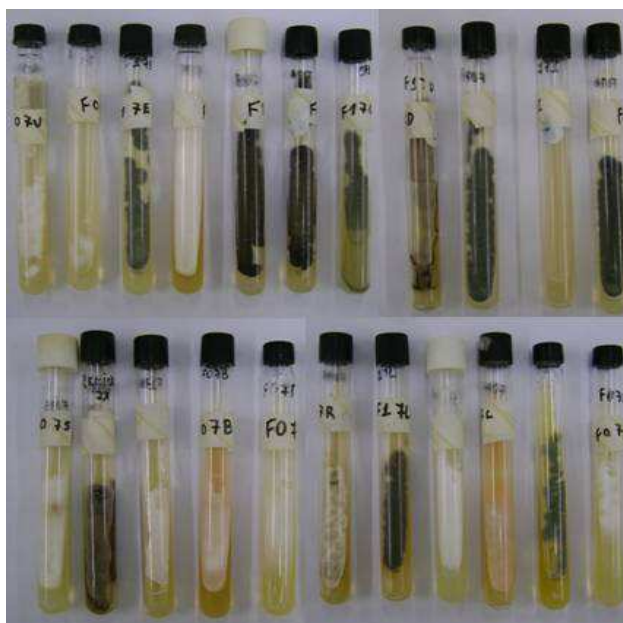


Figura 4. Obtenção das amostras puras. Fonte: O autor

As espécies *Helicosporium* e *Helicomycetes* são fungos pertencentes aos helicosporos, grupo morfológicamente interessante porque as principais características que definem as espécies são as estruturas reprodutivas em forma helicoidal (Zhao *et al.*, 2007). Estes fungos podem ser encontrados nos mais diversos substratos, como madeiras em decomposição, no solo e na água. Eles já foram isolados de lagos de água doce e são comumente chamados de espécies aero - aquáticas, pois exploram folhas em

decomposição a beira de riachos e lagos, sendo encontrados em folhas submersas.

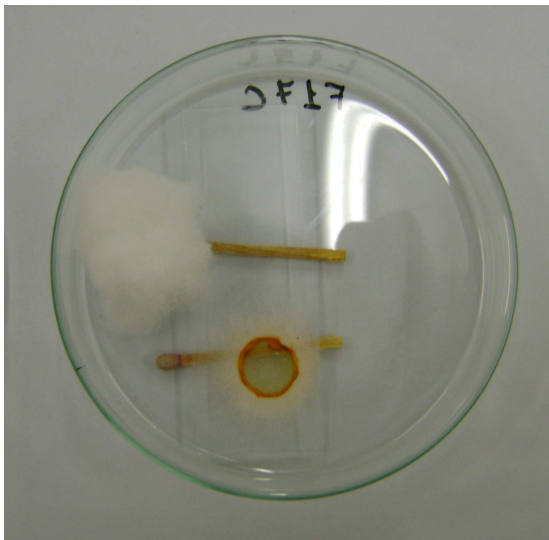


Figura 5 – Técnica do microcultivo. Fonte: O autor

No ambiente marinho, espécies de *Helicosporium sp.* foram isoladas de algas marrons (Suryanarayanan, 2012). Suas estruturas de esporulação só são visíveis quando o organismo entra em contato com atmosfera ou quando o substrato flutua na água (Zhao *et al.*, 2007). Vários isolados aquáticos foram capazes de produzir celulases e xilanases (Yuen *et al.*, 1998; Bucher *et al.*, 2004), o que faz este gênero ter interesse biotecnológico. A principal característica que define esta espécie são as estruturas reprodutivas em forma helicoidal. Este é o primeiro registro de *Helicosporium sp.* e *Helicomycetes sp.* derivados do ambiente marinho no Brasil.

Os fungos do gênero *Cladosporium sp.* apresentam distribuição mundial e podem ser isolados de diversos substratos, como plantas em decomposição, solo e ambientes aquáticos. A TABELA 3 apresenta a relação

das fontes onde já foram isoladas espécies do gênero *Cladosporium* provenientes do ambiente marinho.

Tabela 3- Fontes de isolamento de espécies do gênero *Cladosporium* provenientes do ambiente marinho.

Fonte	Referência
Água do mar, na busca de antibióticos e anti-incrustantes	Xiong <i>et al.</i> (2009)
Algas	Suryanarayanan (2012). Ding <i>et al.</i> (2008).
Áreas de cultivos de mariscos	Sallenave-Namont <i>et al.</i> (2001).
Derivados de corais e algas marrons	Wang <i>et al.</i> (2011). Shigemori <i>et al.</i> (2004).
Esponjas	Gao <i>et al.</i> , (2008).
Fontes hipersalinas	Zalar <i>et al.</i> (2007).
Sedimentos das praias brasileiras “Casa Caiada” e “Bairro Novo”	Gomes <i>et al.</i> (2008).

O gênero *Paecilomyces* sp. também isolado do sedimento marinho neste trabalho é muito semelhante ao gênero *Penicillium* sp., mas difere por apresentar fiálides longas e finas FIGURA 6. Suas colônias são de crescimento rápido, com coloração amarelo-marrom, lilás ou castanho, mas nunca verde ou azul-verde como em *Penicillium*.

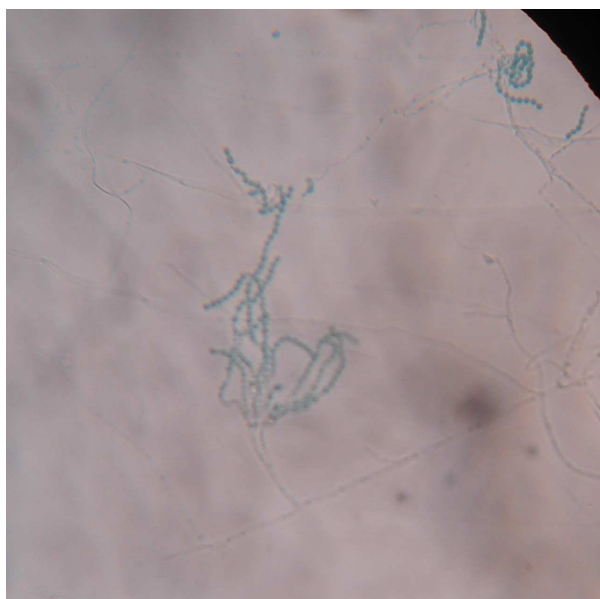


Figura 6 – Microscopia de *Paecilomyces* sp. Fonte: O autor

O gênero *Paecilomyces* é cosmopolita, podendo ser isolado de diversos substratos, incluindo solos, florestas, ovos de nematóides, desertos, lamas e inclusive de derivados marinhos. *Paecilomyces* sp. já foi relatado associado a peixes e de esponjas do gênero *Petrosia* no sul da Coréia (Elbandy *et al.*, 2009; Mountfort & Rodes., 1991).

No Brasil, este fungo foi isolado das areias da Praia de Ipanema/RJ, e de duas outras praias em Pernambuco (Sarquis *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2006). Marante *et al.* (2012) isolaram uma nova estirpe de *Paecilomyces variotii* do ambiente marinho e comprovaram que esta era capaz de produzir compostos bioativos, sendo o primeiro trabalho a propor o uso destes compostos na indústria de alimentos.

Paecilomyces variotii também foi isolado de um invertebrado marinho, uma medusa da espécie *Nemopilema nomurai*, sendo capaz de produzir quatro diferentes tipos de policetídeos. Estes compostos

demonstraram capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente e *Vibrio parahaemolyticus* multirresistente, evidenciando que o ambiente marinho é fonte para a descoberta de novas substâncias bioativas (Liu *et al.*, 2011).

Paecilomyces variotti também já foi isolado da superfície e das profundezas do Mar Morto e a espécie *Paecilomyces lilacinus* foi isolada do coral *Goniastrea australensis*, à 20m de profundidade na Austrália. (Molitoris *et al.*, 2000). Esses dados indicam que esta espécie é altamente tolerante a diferentes concentrações de sais.

As espécies do gênero *Penicillium* sp. apresentam colônias na cor verde ou raramente brancas, geralmente de crescimento rápido. Em *Penicillium* sp., as fiáldes podem ser produzidas individualmente ou em grupos ou ainda, a partir de métulas ramificadas, apresentando uma aparência tipo escova (FIGURA 7) (Lacaz *et al.*, 2002).

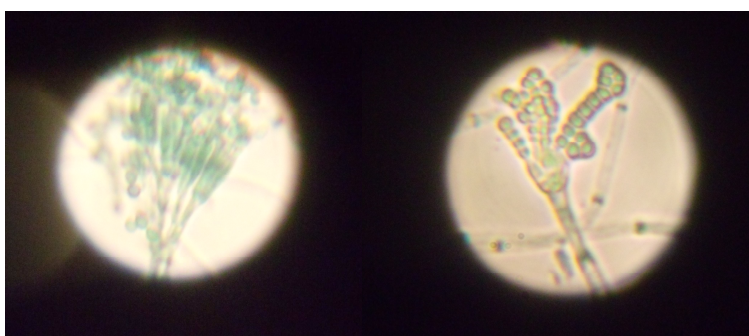


Figura 7 - Microscopia de duas espécies do gênero *Penicillium*.

Fonte: O autor

No ambiente marinho estes fungos já foram descritos por diversos autores, assim como relatado neste trabalho. A TABELA 4 apresenta as fontes marinhas nas quais esse gênero foi isolado.

Tabela 4 - Fontes marinhas nas quais o gênero *Penicillium* foi isolado.

Fonte	Referências
Águas de cultivos de mariscos marinhos	Sallenave-Namont <i>et al.</i> , (2000)
Algas vermelhas	Gao <i>et al.</i> (2011)
Corais no Sul da China	Wang <i>et al.</i> (2011)
Mar de Bohai	Yu <i>et al.</i> (2010) Chai <i>et al.</i> , (2012)
Mar do Japão e amostras de água e de esponjas em uma enseada na ilha de Oahu, Havai.	Gao <i>et al.</i> , (2008) Khudyakova, <i>et al.</i> (2000).
Mar Morto	Molitoris <i>et al.</i> , (2000)
Sedimento marinho a 5.115 metros de profundidade,	Li <i>et al.</i> (2012).

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam conidióforos simples, hialinos ou pigmentados, que em seu ápice, dilatam-se em uma vesícula com formas variadas.

No ambiente marinho este fungo já foi isolado por Mbata, (2008) do sedimento do Mar Morto, representando 44,1% dos isolados por ele identificados. Na Indonésia foi isolado a partir de algas vermelhas e no sul da China associado ao coral *Dichotella gemmacea*, o qual produziu cinco diferentes sesquiterpenóides (Tarmam *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2010).

Wang *et al.*, (2011) isolou espécies do gênero *Aspergillus* do sedimento de uma salina marinha na Província da China. A partir destes

isolados, três novos compostos com atividade antibacteriana foram identificados e purificados. Um deles apresentou alta toxicidade ao vírus influenza H1N1 e baixa citotoxicidade, sendo um candidato promissor para produção de drogas antiviral. *Aspergillus* foi também isolado de águas de criação de mariscos e das cascas destes bivalves (Sallenave-Namont *et al.*, 2000).

A partir de *Aspergillus* sp. isolados da esponja *Xestospongia testudinaria* coletada no Mar da China Meridional, quatro compostos apresentaram atividade antibacteriana contra quatro de bactérias patogênicas e duas patogênicas marinhas (Li *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado nas areias e nas águas das praias de Pernambuco, foram isoladas e identificadas 57 espécies correspondentes a 20 gêneros fúngicos. *Aspergillus* e *Penicillium* foram prevalentes no solo e na água, com um total de 11 e 19 espécies, respectivamente (Gomes *et al.*, 2007).

No sul da Índia foram coletadas amostras de água, moluscos, corais, sedimento e algas, nos ecossistemas marinhos. Diferentes espécies de *Aspergillus* foram identificadas, entre eles, *Aspergillus clavatus*, *A. flavus*, *A. funiculosus*, *A. fumigatus*, *A. luchensis*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. quercinus*, *A. sachari*, *A. sulphureus*, *A. terreus*, *A. terricola* e *Aspergillus* sp. (Babu *et al.*, 2010).

O gênero *Phoma* também isolado neste trabalho apresenta colônias marrons acinzentadas, aveludadas ou pulverulentas, conídios pequenos, hialinos, ovóides ou alongados. Cosmopolita, apresenta algumas espécies fitopatogênicas, mas raramente envolvido em doenças humanas.

Yamaguchi *et al.* (2002), isolou este gênero das areias de uma praia no Japão e comprovou que este produzia uma substância bioativa. Este fungo também foi isolado das areias das praias no Egito, algas e sedimento marinho. (Migahed, 2003 e Raghukumar, 2008).

Na Província de Fukui, no Japão, *Phoma sp.* foi isolado de cascas de caranguejos e demonstrou ser produtor de uma nova substância bioativa, Phomactina A, uma antagonista da atividade plaquetária (Sugano *et al.*, 1991).

Yang *et al.*, (2005) investigou a produção de um novo polissacarídeo isolado a partir de *Phoma sp.* derivado do ambiente marinho. Constatou que este era capaz de aumentar a atividade fagocítica em ratos, *in vivo* e *in vitro*, indicando que este composto poderá ser usado como um imunomodulador potente para ativar macrófagos.

Espécies de *Phoma* derivados do ambiente marinho tem produzido inúmeros compostos bioativos nunca antes identificados, como antifúngicos, diferentes tipos de phomactinas, antimicrobianos e enzimas (Nagai *et al.* , 2003; Zhuravleca *et al.*, 2004; Goldring & Pattenden, 2004; Koyama *et al.*, 2004; Nenkep *et al.*, 2010).

Chaetomium sp. são fungos cosmopolitas, comuns em todos os ambientes, suas colônias apresentam crescimento rápido, de coloração variando entre cinza e verde oliva, possuem peritécios superficiais, esféricos, subglobosos ou alongados.

No ambiente marinho, este fungo já foi isolado do sedimento no Mar Morto, associado ao peixe *Mugil cephalus*, no qual esta estirpe produziu um novo composto bioativo (Yasuhide *et al.*, 2008; Mbata, 2008; Abdel-Lateff, 2008).

Pontius *et al.* (2008), verificou que *Chaetomium sp*, derivado do ambiente marinho, foi capaz de produzir substâncias antiparasíticas. Burtseva *et al.* (2003) isolou noventa linhagens fúngicas do ambiente marinho, testou a capacidade em produzir enzimas extracelulares, e *Chaetomium indicum* apresentou a melhor atividade enzimática.

Quatro diferentes espécies de *Chaetomium indicum* foram isoladas a partir de madeiras a deriva no Mar Amarelo, que banha o leste da República Popular da China. Após a determinação de suas condições ótimas de crescimento, concluiu-se que 15°C e 20 °C são as temperaturas ideais e que a falta de luz também é benéfica para o desenvolvimento deste fungo (Li *et al.*,2008).

No Brasil, *Chaetomium sp* foi isolado das areias e das águas das praias “Casa caiada” e “Bairro Novo” em Pernambuco, confirmando a sua presença no ambiente costeiro brasileiro (Gomes *et al.*, 2008).

Geotrichum por sua vez, apresenta colônias de crescimento rápido, lisas, com coloração que varia do branco ao creme, com aparência coriácea a camurça. Suas hifas são hialinas, septadas e dividem-se em artroconídios, característica essa, que o difere do gênero *Trichosporon*, que produz

blastocónidios. São fungos cosmopolitas e podem ser patogênicos para humanos (Lacaz *et al.*, 2002).

Um estudo realizado em tartarugas marinhas que apresentavam necroses na cabeça e no pescoço, indicou que *Geotrichum sp.* era um dos agentes causadores da doença, mostrando que a virulência deste fungo abrange também o ambiente marinho (Sisson *et al.*, 1990).

Esse gênero foi isolado do sedimento à 88m de profundidade, na Baía da Conceição no Chile, e produziu três compostos bioativos (San-Matín *et al.*, 2008). Substâncias antimicrobianas produzidas por este fungo derivado do mar em Tamilnadu, Índia, foram relatadas por Samuel *et al.*,(2011).

Huang *et al.*, (2004) purificou e caracterizou uma lipase produzida por *Geotrichum sp.* de origem marinha, sendo este o primeiro relato de ocorrência na costa marinha brasileira. Todos estes relatos demonstram inequivocamente que o ambiente marinho é fonte muito promissora para a pesquisa e aplicação de novos compostos bioativos.

4.2 Avaliação da atividade enzimática dos fungos filamentosos

Diferentes substratos foram utilizados para avaliar a atividade enzimática dos isolados fúngicos. A capacidade de hidrolisar os substratos foi verificada em quatro diferentes temperaturas (15°C, 20°C, 25°C e 30°C) e concluiu-se que a temperatura de incubação interferiu na produção das enzimas.

Sabe-se que existe uma estreita relação entre o ambiente ocupado pelos microrganismos e a produção de suas enzimas. Necessita-se, portanto, levar em consideração que os isolados fúngicos do ambiente marinho são mesófilos, cujas temperaturas de crescimento variam de 10 a 50 °C, e que sua temperatura ótima se situa entre 25 °C e 40°C (Gomes *et al.*, 2007).

4.2.1 Atividade da amilase

A atividade da amilase foi caracterizada pela inoculação da amostra em um meio contendo amido. A presença de um halo entorno da colônia após a adição de lugol, revelou a atividade positiva.

Das amostras testadas, a temperatura de 25°C foi a que mais favoreceu a produção da enzima, seguida de 30°C e 20°C, diminuindo consideravelmente quando incubados a 15 °C.

Segundo Spier (2005) a faixa de temperatura ótima para a produção de amilases por fungos pode variar entre 25 e 37°C, o que está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho.

Os gêneros produtores de amilases foram *Chaetomium*, *Helicosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, (TABELA 5). Estes fungos isolados de diversos ambientes produzem diversas enzimas extracelulares que podem ter muitas aplicações biotecnológicas (Souza *et al.*, 2010). *Aspergillus* sp. foi o único que produziu amilases em todas as temperaturas testadas. Este gênero apresenta melhor produção de amilases a 30°C, mas a atividade enzimática varia muito entre as espécies (Spier, 2005).

Tabela 5. Produção de amilases em diferentes temperaturas.

Identificação das amostras	Atividade da Amilase			
	15°C	20°C	25°C	30°C
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	-
<i>Helicosporium</i> sp.	-	+	+	+
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	+	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	+
<i>Geotrichum</i> sp.	-	-	-	-
<i>Helicomycetes</i> sp.	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i> sp.	-	-	-	+
<i>Aspergillus</i> sp.	+	+	+	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	+	+	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	-
<i>Phoma</i> sp.	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	+	-

(+) atividade positiva da enzima (-) não produção da enzima

Silva (2009) constatou que *Aspergillus niveus* apresentou habilidade em produzir amilases nas temperaturas entre 25 °C e 45 °C, que a temperatura ótima de produção foi de 40°C e que temperaturas superiores inibiam a atividade da enzima. A temperatura na qual a enzima é expressa está diretamente ligada ao local de onde o microrganismo foi isolado, a capacidade do microrganismo de sintetizar a enzima e as condições de cultivo.

Chaetomium sp. apresentou atividade positiva para amilase somente a 30°C. Outros trabalhos já relataram a produção de glicoamilases e α -amilase por este fungo em temperaturas superiores (Chen *et al.*, 2005 & Sharma, 2008). Polizeli, *et al.*(2006) também reportou a atividade amilásica por fungos deste gênero, assim como para espécies de *Aspergillus* e *Paecilomyces*.

Paecilomyces sp. produziu a enzima quando incubado a 25°C. Michelin *et al.*, (2010) caracterizou e purificou uma amilase produzida por *Paecilomyces variotii*, assim como Gaur *et al.* (1993), que estudou as amilases produzidas por *Paecilomyces* sp. Guimarães *et al.* (2006), em seu trabalho de seleção de fungos com potencial biotecnológico, evidenciou que *Paecilomyces variotii* é um ótimo produtor de amilase.

As espécies de *Penicillium* produziram amilase a 30°C e 25°C. Mishra & Dadhich (2010), verificaram a produção de amilases por diversos fungos e constataram a produção por três espécies de *Penicillium* e cinco espécies de *Aspergillus*. Alva *et al.* (2007) também reporta atividade positiva para amilase por *Aspergillus* sp., assim como Prabakaran *et al.* (2009), que além de *Aspergillus* sp., cita também *Penicillium chrysogenum* como bom produtor.

Cladosporium sp. produziu amilase nas temperaturas de 20 e 25°C. Outros autores confirmam a produção desta enzima por algumas espécies deste gênero. Assim, *Cladosporium gossypiicola* ATCC 38026 produziu a enzima a 25 °C, bem como *Cladosporium sphaerospermum* isolado de uma salina que produziu a enzima a 30 °C e *Cladosporium cladosporioides* isolado do solo, apresentou a atividade a 28°C (Karlekar *et al.*, 1985; Quigley *et al.*, 1998; Silva, *et al.*, 2011).

Silva *et al.* (2011) cita como produtores de amilases *Penicillium chrysogenum*, *P. decumbens*, *P. janthinelum*, *Aspergillus clavatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. niveus*. Evidenciou que estes gêneros são importantes produtores de enzimas com aplicações biotecnológicas.

Helicosporium sp. produziu amilase nas temperaturas de 30°C, 20°C e 25°C, não havendo na literatura consultada, registro da produção de amilases por este gênero. Este fato demonstra que são necessários mais estudos sobre a biodiversidade fúngica no ambiente marinho e que este é sem dúvida fonte relevante a ser explorada para obtenção de novas enzimas.

4.2.2 Atividade da celulase

As celulasas são responsáveis por inúmeros processos industriais. Os fungos filamentosos são relatados como sendo excelentes produtores de celulase, fato que demonstra a capacidade destes microrganismos de utilizarem uma ampla variedade de fontes de carbono e as condições ótimas de temperatura, pH e substratos adequados são amplamente estudadas

A atividade positiva da celulase foi verificada em um meio contendo carboximetilcelulose (CMC), através de formação um halo entorno da colônia (FIGURA 8). Entre os isolados testados 43% apresentaram atividade positiva para celulase a 25°C e 30°C, 36% à 20°C e 14% a 15°C.

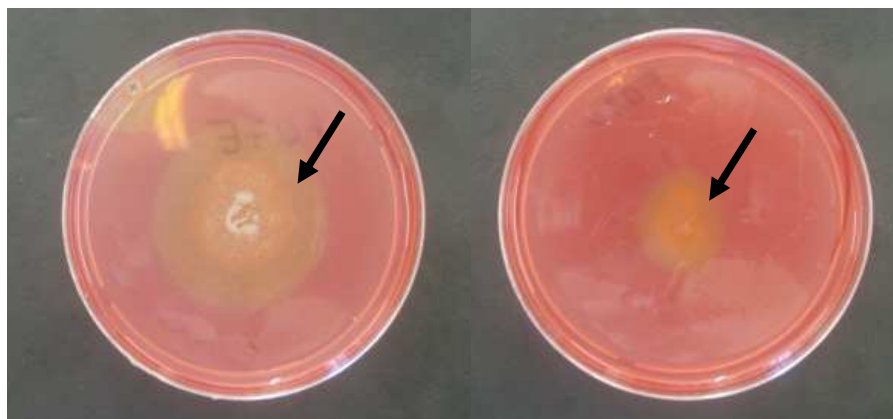


Figura 08 - Visualização do halo de degradação da celulose. (a seta indica o halo de degradação da celulose). Fonte: O autor

Ruegger *et al.* (2004) isolou fungos de solo e água, testou a atividade das celulases e constatou que 45% dos isolados produziram este catalisador. Silva (2011), também isolou diversos fungos do ambiente marinho com atividade da celulase. Raghukumar *et al.*, (2008), em seu trabalho de revisão cita fungos isolados de algas marinhas, capazes de produzir celulases e Molitoris *et al.* (2000) isolou do Mar Morto diversos fungos filamentosos com capacidade celulolítica.

Raghukumar *et al.* (1994) investigaram a produção de enzimas por fungos isolados de detritos de folhas do mangue e relataram que celulases foram produzidas por todas as espécies testadas. Esses dados demonstram e comprovam a importância da exploração de novas fontes para o descobrimento de substâncias bioativas. Os fungos isolados e suas respostas à atividade enzimática encontram-se na TABELA 6.

Gomes (2007) isolou de sedimento de mangue, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp* e *Phoma sp.*, os quais, assim como encontrado neste estudo, apresentaram atividade celulolítica. Zhang & Kim (2010) também relatou que *Aspergillus*, *Penicillium* e *Phoma* são potenciais produtores de celulase.

Tabela 6 – Atividade da celulase em diferentes temperaturas.

Identificação das amostras	Atividade da Celulase			
	15°C	20°C	25°C	30°C
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	-
<i>Helicosporium</i> sp.	-	+	+	+
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	+	+	+
<i>Geotrichum</i> sp.	-	+	+	+
<i>Helicomycetes</i> sp.	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i> sp.	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	+	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	-
<i>Phoma</i> sp.	-	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	+	+	+

(+) atividade positiva da enzima (-) não produção da enzima

Leite (2009) verificou a produção de celulases por fungos isolados do lodo de esgoto e obteve resultado diverso ao deste trabalho, pois neste estudo o gênero *Penicillium* produziu a enzima em três temperaturas testadas conforme explicitado na Tabela 4, sendo que dois isolados do lodo não produziram a enzima a 28°C e nem a 35°C. Já para o gênero *Aspergillus* a produção de celulase foi positiva, assim como registrado neste trabalho.

Helicosporium sp. e *Geotrichum* sp., foram produtores de celulases, apresentando atividade nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C.

De acordo com Lynd *et al.* (2002) *Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., têm recebido grande atenção a respeito da produção da enzima celulase, assim como *Helicosporium* sp. reportado em um trabalho desenvolvido por Yuen *et al.* (1998).

4.2.3 Atividade da lipase

As lipases agem hidrolisando ligações éster-carboxílico liberando ácidos e álcoois orgânicos. Estas enzimas são utilizadas na produção de detergentes, na síntese de biosurfactantes, na indústria de laticínios e em processos de biorremediação. Um meio de cultivo contendo óleo de oliva foi utilizado para verificar a atividade da enzima e a visualização de halo entorno da colônia sob luz ultravioleta indicou a atividade positiva (FIGURA 9).

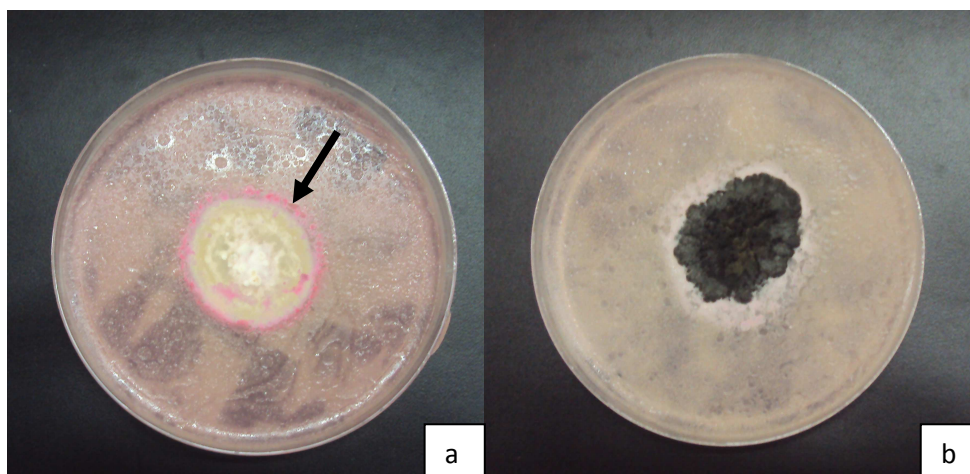


Figura 9 – (a) Visualização do halo de atividade lipolítica. (a seta indica o halo de degradação). (b) Ausência de halo (atividade negativa da lipase). Fonte: O autor

As espécies com melhor potencial de produzir lipases pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* (Colen, 2006).

De acordo com a TABELA 7, os gêneros acima citados apresentam atividade positiva para a lipase em mais de uma temperatura testada, comprovando assim sua alta capacidade em produzir a enzima.

Miura & Yamane (1997) e Sharma *et al.* (2005) citam inúmeras cepas fúngicas como boas produtoras de lipases, entre elas *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*.

Duas espécies de *Cladosporium sp.* apresentaram atividade positiva para a produção de lipase, em mais de uma temperatura testada.

Tabela 7– Atividade de lipases dos isolados, em diferentes temperaturas

Identificação das amostras	Atividade da Lipase			
	15°C	20°C	25°C	30°C
<i>Cladosporium sp.</i>	-	+	+	+
<i>Helicosporium sp.</i>	+	+	+	+
<i>Paecilomyces sp.</i>	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	-	-	+	+
<i>Geotrichum sp.</i>	-	-	+	+
<i>Helicomycetes sp.</i>	-	+	-	-
<i>Chaetomium sp.</i>	-	-	+	-
<i>Aspergillus sp.</i>	-	+	+	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	-	-
<i>Cladosporium sp.</i>	-	+	+	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	+	-
<i>Phoma sp.</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	+	-
<i>Penicillium sp.</i>	+	-	+	-

(+) atividade positiva da enzima (-) não produção da enzima

Fernandes (2007) isolou fungos de diversas fontes e destacaram-se como produtores de lipases, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*, concluindo que a mesma espécie isolada de fontes diferentes apresenta variação na produção de lipase.

Chaetomium sp. já foi isolado do ambiente marinho por diversos autores e avaliada sua capacidade de produzir substâncias bioativas. Entre as substâncias já avaliadas estão, antiparasitários; a chaetominediona, um inibidor da tirosina quinase e algumas enzimas, como o-Glicosil Hidrolase e β -1,3-Glucanase. No trabalho desenvolvido por Ohtsuki *et al.* (2004), *Chaetomium sp.*, não apresentou atividade enzimática para lipase, protease, lacase e

peroxidase, diferentemente do resultado encontrado para o isolado do ambiente marinho, que apresentou esta atividade a 25°C.

Na literatura não foi encontrado registro para a produção de lipases por *Chaetomium sp.*, *Helicomyces sp.* e *Helicoporium sp.*, que neste trabalho apresentaram produção de lipase. No Brasil e no mundo existem ainda diversas fontes não exploradas, o que justifica a busca de fontes alternativas para identificação de microrganismos com potencial biotecnológico.

4.2.4 Atividade da protease

Os isolados testados apresentaram variação quanto ao potencial de produção da enzima. Assim, 50% dos isolados fúngicos hidrolisaram a gelatina à temperatura de 25°C, seguido de 43% a 30°C. A atividade da protease reduziu-se drasticamente com a diminuição da temperatura, com índices de 14% a 20°C e apenas 7% a 15°C.

Conforme os dados da TABELA 8, *Aspergillus sp.* destacou-se pela produção da enzima nas 4 temperaturas testadas. Silva *et al.*, constataram que *Aspergillus sp.*, apresentou o pico de produção de proteases na temperatura de 28°C. Este fungo tem sido amplamente utilizado para fins biotecnológicos.

Tabela 8 – Atividade de proteases dos isolados, em diferentes temperaturas.

Identificação das amostras	Atividade da Protease			
	15°C	20°C	25°C	30°C
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	+	-
<i>Helicosporium</i> sp.	-	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	+	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	-
<i>Geotrichum</i> sp.	-	-	-	+
<i>Helicomycetes</i> sp.	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i> sp.	-	-	+	-
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	-
<i>Phoma</i> sp.	-	-	+	+
<i>Aspergillus</i> sp.	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp.	-	+	+	-

(+) atividade positiva da enzima (-) não produção da enzima

Teixeira (1994) constatou que os maiores atividades enzimáticas para proteases foram produzidos *A. flavus*, *A. zonatus*, *A. oryzae* e *A. sydowii*.

Uma protease produzida por *A. oryzae* foi caracterizada por Man (2006) e sua temperatura ótima de produção foi de 50°C, e, além disto, foi muito tolerante a alta salinidade. Chutmanop *et al.*, 2008, também avaliou a produção de protease por este fungo, e obteve como temperatura ótima 30°C, comprovando que a origem do isolado é um fator extremamente importante para a atividade enzimática.

Os gêneros que obtiveram atividade positiva para protease à temperatura de 25°C foram *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Phoma* e *Penicillium*. *Phoma* e *Penicillium* produziram a enzima também a 30°C, e *Geotrichum* sp. somente apresentou atividade positiva a 30°C.

Penicillium sp., *Cladosporium* sp., foram positivos para produção de proteases em um estudo realizado por Silva *et al.* (2011). O único registro de

produção de proteases pelo gênero *Phoma sp.* foi descrito por Charya & Reddy (1982).

El-Diasty & Salem (2007) testaram a atividade proteolítica de 89 isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Cladosporium*, e *Penicillium*, relatando que a produção de proteases variou entre fraca e forte. *Penicillium chrysogenum* foi isolado do mar de Huanghai, China, e produziu uma protease alcalina com tolerância a temperaturas baixas (Zhu *et al.*, 2009). Benito *et al.* (2002) purificou e caracterizou uma protease produzida por *Penicillium*, evidenciando que este gênero pode ter grande aplicabilidade industrial.

Paecilomyces sp., isolado por Khan (2003) produziu três tipos diferentes de proteases. Bonants *et al.* (1995) e Liang *et al.* (2010) selecionaram uma protease produzida por *Paecilomyces lilacinus*, para empregá-las no controle biológico de nematóides obtendo sucesso.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram identificados 14 diferentes isolados de fungos filamentosos derivados do ambiente marinho, pertencentes a nove gêneros: *Helicosporium* sp., *Helicomycetes* sp., *Paecilomyces* sp., *Phoma* sp., *Chaetomium* sp., *Geotrichum* sp., duas diferentes espécies de *Cladosporium* sp., duas diferentes espécies de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium aurantiogriseum*.

A lipase foi positiva por 71% dos isolados fúngicos, seguindo-se a protease produzida por 50% dos isolados, a celulase produzida por 43% e a amilase produzida por 36% dos isolados.

Todos os isolados fúngicos produziram ao menos uma enzima nas temperaturas testadas, evidenciando que o ambiente marinho é relevante para a descoberta de novos compostos bioativos.

O conhecimento da capacidade enzimática de fungos do sedimento marinho mostra-se importante para a obtenção de amostras de grande potencial biotecnológico.

O isolamento de fungos filamentosos derivados de ambientes naturais, como o marinho, permite determinar o grau de diversidade biológica deste ambiente.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-LATEF, A. Chaetominedione, a new tyrosine kinase inhibitor isolated from the algicolous marine fungus *Chaetomium* sp. **Tetrahedron Letters**. v. 49, p. 6398–6400. 2008.

ALKER, A.P.; SMITH, G.W.; KIM, K. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. **Hydrobiologia**. v. 460, p. 105–111, 2001.

ALVA, S., ANUPAMA, J., SAVLA, J., CHIU, Y. Y., VYSHALI, P., SHRUTI, M., YOGEEETHA, B. S., BHAVYA D., PURVI, J., RUCHI, K., KUMUDINI, B. S. AND VARALAKSHMI, K. N. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **African J. Biotechnol.** v. 6, n.5, p. 576-581, 2007.

ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. Módulo VII. 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod 7 2004.pdf>. Acesso em: Março 2010.

BABU, R; VARADHARAJAN, P; SOUNDARAPANDIAN D; BALASUBRAMANIAN R. Fungi Diversity in Different Coastal Marine Ecosystem along South East Coast of India. **Microbiol Research**. v.1, n. 3, p. 175-178, 2010.

BAJPAI, P.; BHARDWAJ, N.K.; BAJPAI, P.K.; JAUHARI, M.B. The impact of xylanases on bleaching of eucalyptus Kraft pulp. **Journal of Biotechnology**. V.38, p. 1-6, 1994.

BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnol. Progr.**, v.15, v. 2, p.147-157,1999.

BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M.; BAIGORÍ, M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.**, v. 34, p. 35-32, 2005.

BENITO, M.J; RODRÍGUEZ, M.; NUNEZ, F.; ASENSIO, M.A.; BERMUDEZ, M.E.; CORDOBA, J.J. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 Active against Meat Proteins. **Appl Environ Microbiol.** v.68, n.7, p. 3532–3536, 2002.

BERNAN, V.S.; GREENSTEIN, M.; MAIESE, W.M. Marine micro-organisms as a source of new natural products. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.43, p. 57–89, 1997.

BON ET AL. *Enzimas: aplicações em biotecnologia, produção, aplicações e mercado.* Rio de Janeiro. Interciência: UFRJ:CAPES, 2008. 506p.

BONANTS, P.J.M.; FITTERS, P.F.L.; THIJIS, H.;BELDER, E.; WAALWIJK, C.; . HENFLINGS, J.W.D.M. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology.** v. 141, p.775-784, 1995.

BUCHER VVC, POINTING SB, HYDE KD, REDDY CA. Production of wood decay enzymes, loss of mass, and lignin solubilization in woody, diverse tropical freshwater fungi. **Microb. Ecol.** v. 48, p.331–337, 2004.

BURTSEVA Y.V.; VERIGINA N.S; SOVA V.V; PIVKIN M.V; ZVYAGINTSEVA TN. Filamentous marine fungi as producers of O-glycosylhydrolases: beta-1,3-glucanase from *Chaetomium indicum*. **Mar. Biotechnol.** (NY).v.5, n.4, p.349-359, 2003.

BURTSEVA Y.V.; SOVA V.V.; PIVKIN M.V.; ZVYAGINTSEVA T.N. Enzymes of carbohydrate metabolism of mycelial fungi from marine environments. beta-1,3-glucanase of the marine fungus *Chaetomium indicum*. **Biochemistry (Mosc).** v.65, n.10, p.1175-83, 2000.

CALADO, V.M.M. DILLON, A.J.P., SALGUEIRO, A.A. Produção de celulases por linhagens de *Humicola grisea* sob cultivo submerso. **Revista de Ciências e Tecnologia.** v.1 p.1-6, 2007

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 1-12, 2010.

CHAI, Y.J; CUI, C.B; LI, C.W; WU, C.J.; TIAN, C.K.; HUA, W. Activation of the Dormant Secondary Metabolite Production by Introducing Gentamicin-Resistance in a Marine-Derived *Penicillium purpurogenum* G59. **Mar. Drugs**, v.10,p. 559-582, 2012.

CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A.; KOKARE, C.; MAHADIK, K.; CHOPADE, B. Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. **J. Mol. Catal. B-Enzym**, v.58,p. 17–23, 2009.

CHARYA,M.A.S; REDDY,S.M. Production of proteolytic enzymes by three seed-borne fungi. **Acta Bot. Indica**. v.1,n.1, p. 296-299.1982.

CHEN, J., LI, D.C.; ZHANG, Y.Q.; ZHOU, Q.X. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v.51,p. 175–181, 2005.

CHI, Z.M.; MA, C.; WANG, P.; LI, H.F. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresour. Technol.**,v. 98, p. 534–538, 2007.

CHUTMANOP,J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y., SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** vol. 83, p.1012–1018, 2008.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 2006. 206 p. TESE (Doutorado em Ciências de alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. 2006.

DAVID, K. Lipase Production by *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus flavus*. **Bot. Gaz** .v. 97, n.2,p. 321-333,1935.

DING, L.; QI, S.; LI, F.; CHI, X.; LAATSCH, H. Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. Associated with red alga *Porphyria yezoensis*. **Curr. Microbiol.** v 56, p. 229-235, 2008.

DURLI, E; Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11. 2007. 111 p. Dissertação de Mestrado (Curso de em Química) - Universidade Federal do Paraná. 2007.

ELBANDY, M.; SHINDE, A.P.B.; HONG, A.J.; BAE, K.S.; KIM, M.A.; LEE, S. M.; JUNG, J.H. α -Pyrones and Yellow Pigments from the Sponge-Derived Fungus *Paecilomyces lilacinus*. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 30, n.1, p. 188-192, 2009.

EL-DIASTY, E.M & SALEM, R.M. Incidence of Lipolytic and Proteolytic Fungi in Some Milk Products and Their Public Health Significance. **Appl. Sci.** v. 3,n. 12.p. 1684 -1688, 2007.

FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. 2007. 120 p. Tese de Doutorado (Curso de Pós-graduação em Química) - Universidade Federal do Paraná. 2007.

FREGOLENTE, P.B.L. Obtenção de monoacilglicerol de alta concentração através de glicerólise enzimática e destilação molecular. 2010. 172. Tese (Doutor em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química. Campinas 2010.

GAO, Z; LI, B; ZHENG, C; WANG, G. Molecular Detection of Fungal Communities in the Hawaiian Marine Sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, n.19, p. 6091–6101, 2008.

GAO, S.S.; LI, X.M.; DU, F.Y.; LI, C.S.; PROKSCH, P. Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Mar. Drugs**, v. 9, p 59-70, 2011.

GARDINER, S.M. Dominant fungi from Australian coral reefs. **Fungal Diversity**. v.9, p.105-121, 2002.

GAUR, R.; GARG, S.K.; SINGH, S.P.; VERMA, S. A comparative study of the production of amylase from *Humicola* and *Paecilomyces* species. **Bioresource Technology**. v.46, 3, p. 213–216, 1993.

GHOSH, D.; SAHA, M.; SANA, B.; MUKHERJEE, J. Marine Enzymes. **Adv. Biochem. Eng. Biot.**, v.96, p. 189–218. 2005.

GOLDRING, W.P.D & PATTENDEN, G. Total synthesis of (\pm)-phomactin G, a platelet activating factor antagonist from the marine fungus *Phoma* sp. **Org. Biomol. Chem.** v. 2, p. 466-473, 2004.

GOMES, D.A.V. Identificação de microrganismos presentes nos pescados e nos compartimentos de armazenamento de embarcações. 2009, 80p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UFRGS. 2009.

GOMES, D.N.F. Biodiversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal barra das jangadas, jaboatão dos guararapes, Pernambuco. 2007, 94p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) Universidade de Pernambuco. 2007.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p.136-145, 2007.

GOMES, D.N.F.; CAVALCANTI, M.A.Q., FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M.; PASSAVANTE, J.Z.O. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. **Braz. J. Biol.** v.68, n.3, p. 577-582, 2008.

GUIMARÃES, L. H. S., NOGUEIRA, S. C. P., MICHELIN, M., RIZZATTI, A. C. S., SANDRIM, V. C., ZANOELO, F. F., AQUINO, A. C. M. M., JUNIOR, A. B.,

Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Braz. J. Microbiol**, v. 37, p.474-480, 2006.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biotechnol.**, v.38, p. 1599-1616, 2003.

GUTIÉRREZ, M.; PANTOJA, S., QUIÑONES, R., GONZÁLEZ, R. First record of filamentous fungi in the coastal upwelling ecosystem off central Chile. **Gayana** . v.74, n.1, p. 66-73, 2010

HUANG, Y.; LOCY, R.; WEETE, J.D. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Geotrichum marinum*. **LIPIDS**. p. 251-258, 2004.

KARLEKAR, K., PAREKH, T.K.; CHHATPAR, H. S. Salt mediated changes in some enzymes of carbohydrate metabolism in halotolerant *Cladosporium sphaerospermum*. **J. Biosci.**, v. 9, n. 3 & 4, p. 197–201,1985.

KHUDYAKOVA, Y. V.; PIVKIN, M. V.; KUZNETSOVA, T. A.; SVETASHEV, V.I. Fungi in sediments of the sea of Japan and their biologically active metabolites. **Microbiology** v. 69, n 5, 608-611, 2000.

KIN, S.L. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 9, p. 245–251, 2009.

KOYAMA, K.; ISHINO, M.; TAKATORI, K.; SUGITA, T.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K. Phomactin H, a Novel Diterpene from an Unidentified Marine-Derived Fungus. **Tetrahedron Letters**.v. 45, n.37, p. 6947-6948, 2004.

KUBICEK, C.P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R.L.E.; KUBICEK-PRANZ, E.M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enz Microbial Technol**, v.15, p.90-99, 1993.

KUMAR, S. R.; RAMANATHAN, G.; SUBHAKARAN, M.; INBANESON, S.J. Antimicrobial compounds from marine halophytes for silkworm disease treatment. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**. v.1,n.5, p. 184-191, 2009.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINZ_VACCARI E.M., MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9.ed., São Paulo: Sarvier. 2002.

LEITE, M.V. Fungos filamentosos do lodo de esgoto: Impacto na microbiota fúngica e potencial enzimático. 2009. 66p. Dissertação (Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco. 2009.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 3.ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

LI, H.F.; CHI, Z.M.; WANG, X.H.; MA, C.L. Amylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d. **J. Ocean. Univ. Chin.**, v. 6, p.61–66, 2007.

LI G.F.; JIN J.; CHEN J.; WANG Y., LIU F. Biological characteristics of four marine Chaetomium isolates. **Journal of Fungal Research. v.1. 2008.**

LI, Z. Advances in Marine Microbial Symbionts in the China Sea and Related Pharmaceutical Metabolites. **Mar. Drugs.** v.7, p.113-129, 2009.

LI, D. Xu , Y; Shao, C.L.; Yang , R.Y; Zheng, C.J; Chen , Y.Y; Fu, X.M.; Qian, P.Y.; She, Z.; Nicole, Z.G.; Voogd, J., Wang, C.Y. Antibacterial Bisabolane-Type Sesquiterpenoids from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus* sp. **Mar. Drugs.** v 10, p.234-241, 2012.

LI, Y; YE, D; SHAO, Z; CUI , C; CHE, Y. A Sterol and Spiroditerpenoids from a *Penicillium* sp. Isolated from a Deep Sea Sediment Sample. **Mar. Drugs.** v. 10, p. 497-508, 2012.

LIANG, L.; MENG, Z.; YE, F.; YANG, J.; LIU, S.; SUN, Y.; GUO, Y.; MI, Q.; HUANG, X.; ZOU, C.; RAO, Z.; LOU, Z.; ZHAN, K.Q. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. **FASEB (Fed Am Soc Exp Biol) J.** v. 24, p.1391-1400, 2010.

LIU, J., LI, F.; KIM, E.L.; LI,J.L.; HONG, J.; BAE,K.S.; CHUNG, H.Y.; KIM,H.S.; JUNG, J.H. Antibacterial Polyketides from the Jellyfish-Derived Fungus *Paecilomyces varioti*. **J. Nat. Prod.** v. 74, n.8, p. 1826–1829, 2011.

LORENZ, R.; MOLITORIS, H. P. Combined influence of salinity and temperature (*Phoma*-pattern) on growth of marine fungi. **Canadian Journal of Botany.** v. 70, n.10, p. 2111-2115, 1992.

LYND, L.R.; WEIMER, W.H.; VAN ZYL, I.S.; PRETORIUS. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev,** v.66, p. 506-577, 2002.

MACFADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincot Williams & Wilkins, Baltimore, 2000. 912p.

MAN,L.V.V.; TUYET, T.T.A. Characterization of protease from *Aspergillus oryzae* surface culture and application in fish sauce processing. **Sci. Technol. Dev.**, v. 9, n5, p. 53-58. 2006

MARANTE, F.J.T.; MIOSO, R.; BARRERA, J.B.; GONZÁLEZ, J.E.G.; RODRIGUEZ, J.J.S.; LAGUNA, H.B. Structural characterization and metabolite

profiling of the facultative marine fungus *Paecilomyces variotii*. **Ann Microbiol.** v. 62, n1. 2012.

MBATA T.I. Isolation of fungi in hyper saline Dead Sea water. **Sudanese Journal of Public Health.** v. 3, p. 170-172, 2008.

MICHELIN M, SILVA T.M, BENASSI V.M, PEIXOTO-NOGUEIRA S.C, MORAES L.A, LEÃO J.M, JORGE J.A, TERENCE H.F, POLIZELI M.D.E.L. Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. **Carbohydr. Res.** v. 2, n.16, p. 2348-53, 2010.

MIGAHED, F.F. Distribution of Fungi in the Sandy Soil of Egyptian Beaches. **Mycobiology.** v. 31,n. 2, p. 61-67, 2003.

MISHRA, B.K.; DADHICH, S.K. Production of Amylase and Xylanase Enzymes from Soil Fungi of Rajasthan. **J. Adv. Dev. Res.**, v.1, n.1, 2010.

MIURA, T.; YAMANE, T. Screening for fungi that have high lipolytic and acidolytic activities in biomass support particles. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 61, n. 8, p.1252-1257, 1997.

MO, S.J.; KIM, J.H.; CHO, K.W. Enzymatic Properties of an Extracellular Phospholipase C Purified from a Marine *Streptomyces*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 73, p. 2136–2137, 2009.

MOHAPATRA, B.R.; BANERJEE, U.C.; BAPUJI, M. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. **J. Biotechnol.**v. 60, p.113–117, 1998.

MOLITORIS, H.P., BUCHALO, A.S.; KURCHENKO, NEVO, E.; RAWAL, B.S.; WASSER S.P.; OREN A. Physiological diversity of the first filamentous fungi isolated from the hypersaline Dead Sea. **Fungal Diversity** .v. 5, p. 55-70, 2000.

MOUNTFORT, D.& RHODES, L.L. Anaerobic Growth and Fermentation Characteristics of *Paecilomyces lilacinus* isolated from Mullet Gut. **Appl Environ Microbiol.**, v. 57, n.7, p. 1963-1968, 1991.

NAGAI K, KAMIGIRI K, MATSUMOTO H, KAWANO Y, YAMAOKA M, SHIMOI H, WATANABE M, SUZUKI K. YM-202204, a new antifungal antibiotic produced by marine fungus *Phoma* sp. **J. Antibiot. (Tokyo)**.v. 55, n.12, p. 1036-41, 2003.

NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J.L. Técnica semiquantitativa de avaliação de produção de celulase em *Humicola* sp. **Revista de Microbiologia.** v.19, p. 78-81, 1988.

NENKEP VN, YUN K, LI Y, CHOI HD, KANG JS, SON BW. New production of haloquinones, romochlorogentisylquinones A and B, by a halide salt from a

marine isolate of the fungus *Phoma herbarum*. **J. Antibiot.**v.63, n.4, p. 199-201, 2010.

OHTSUKI, T.; SUYANTO, S.; YAZAKI, S.; MIMURA, A. Production of large multienzyme complex by aerobic thermophilic fungus *Chaetomium* sp. nov. MS-017 grown on palm oil mill fibre. **Appl Microbiol**, v. 40, p.111–116. 2005.

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

PEREIRA, R.C.; GOMES, A.S.. *Biologia Marinha*, Rio de Janeiro, Brasil Interciência, 2.ed. 2009. 631p.

PIVKIN, M.V. Filamentous fungi associated with holothurians from the Sea of Japan, off the Primorye Coast of Russia. **Biological Bulletin**, v.198, p. 101-109, 2000.

POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Braz. J. Microbiol**, v. 37, p.474-480, 2006.

PONTIUS, A.; KRICK, A.; KEHRAUS, S.; BRUN, R.; KONIG, G;M. Antiprotozoal Activities of Heterocyclic-Substituted Xanthenes from the Marine-Derived Fungus *Chaetomium* sp. **J. Nat. Prod**. v. 71, p. 1579–1584, 2008.

PRABAKARAN, M.; THENNARASU, V.; MANGALA, A.R.; BHARATHIDASAN, R; CHANDRAKALA, N.; MOHAN, N. Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane Field. **Indian J. Sci Technol**, v.2, n. 11, 2009.

PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L. 2002. *Os Reinos dos Fungos*, v. 2, Edunisc, Santa Cruz do Sul, Brasil

QUIGLEY, T.A.; KELLY, C. T.; DOYLE, E. M.; FOGARTY, W. M. Patterns of raw starch digestion by the glucoamylase of *Cladosporium gossypiiicola* ATCC 38026. **Process Biochemistry**. v. 33, n.6, p. 677-681. 1998.

RAGHUKUMAR C.; MURALEEDHARAN, U.; GAUD V.R.; MISHRA R. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**. v.31, p. 433–441, 2004.

RAGHUKUMAR, S. Marine microbial eukaryotic diversity, with particular reference to fungi: Lessons from prokaryotes. **Indian J. Mar. Sci**. v. 35, n.4, p. 388-398, 2006.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19-35, 2008.

RAGHUKUMAR, C.; DAMARE, S.R., SINGH,P. A Review on Deep-sea Fungi: Occurrence, Diversity and Adaptations. **Botanica Marina**, v.53, n.6, p. 479-492. 2010.

RASMUSSEN, R.S.; Morrissey, M.T. Marine biotechnology for production of food ingredients. **Adv. Food Nutr. Res.**, v.52, p. 237–292, 2007.

RAVEN, P.R.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E..Biologia Vegetal, 6.ed., Rio de Janeiro, Brasil. Guanabara Koogan, 2001, 906p.

RICKLEFS, R. A economia da Natureza. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Kogan. 2003. 470p.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M., COLLA, L.M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.30, n.1, p. 126-131, 2010.

RUEGGER, M.J.S. & TAU-K-TORNISIELO, S.M.. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 27, p. 205-211. 2004.

SALLENAVE-NAMONT C, POUCHUS YF, ROBIU DU PONT T, LASSUS P, VERBIST JF. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. **Mycopathologia**. v. 149, n.1, p. 21-5, 2000.

SAMUEL, P., PRINCE; L; PRABAKARAN, P. Antibacterial Activity of Marine derived Fungi Collected from South East Coast of Tamilnadu, India. **J. Microbiol. Biotech. Res.** v.1, n.4, p. 86-94, 2011.

SAN-MARTÍN, A.; OREJARENA, S.; GALLARDO, C.; SILVA, M.; BECERRA, J.; REINOSO, R.; CHAMY, M.C.; VERGARA, K.; ROVISORA, J. Steroids from the marine fungus *Geotrichum sp.* **J. Chil. Chem. Soc.** v.53, n.1, 2008.

SARQUIS, MIM; OLIVEIRA, PC. Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil. **J. Basic. Microbiol.**, v. 36, n. 1, p. 51-58, 1996.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. v. 19, n.8, p. 627-662, 2005.

SHARMA, D.; SHUKLA, A.K. Starch hydrolyses an α -amilase activity of *Aspergillus* and *Chaetomium*. **Asian J Biochem**. v. 3, n.5, p.284-289, 2008.

SHARMAM R.; CHISTI,Y.; BANERJEE,U.C.; Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biothecnol. Adv.** v.29, n.8, p.627-662, 2001.

SHIGEMORI, H.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; TSUDA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Sporiolides A and B, New Cytotoxic Twelve-Membered Macrolides from a Marine-Derived Fungus *Cladosporium* Species. **Mar. Drugs**. v. 2, p.164-169, 2004.

SILVA, D.C.V.; TIAGO, V.P.; MATTOS, J.L.S.; PAIVA, L.M. SOUZA-MOTTA, C.M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasil. Bot.**, v.34, n.4, p.607-610, 2011.

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 cellulases. **Enz Microbial Technol**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SISON, T. M.; PADILLA, M. A.; VIZMANOS, M. C.; FOLLOSCO, M. Isolation and identification of fungi found in necrotic skin lesions of captive marine turtles (*Eretmochelys imbricata*). **Philippine J. Vet. Med.** v.27, n.2, p. 35-36, 1990.

SIVICHAJ, S., LONES, E.B.G. AND HYWEL-LONES, N.L. Fungal colonisation of wood in a freshwater stream at Khao Yai National Park, Thailand. **Fungal Diversity** v. 5, p 71-88, 2000.

SOUZA, H.Q.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciênc. Technol. Aliment.**, v.28, p.116-124, 2008.

SPIER, M.R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no Estado sólido. 2005, 178p. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná. 2005.

SUGANO, M.; SATO, A.; IJIMA, Y.; OSHIMA, T.; FURUYA, K.; KUWANO, H.; HATA, T.; HANZAWA, H. Phomactin A; a novel PAF antagonist from a marine fungus *Phoma* sp. **J. Am. Chem. Soc.** v. 113, n.14, p. 5463–5464, 1991.

SURYANARAYANAN, T. S. Fungal Endosymbionts of Seaweeds. **Biology of Marine Fungi**. v. 53, p. 53-69, 2012.

TARMAN, K; LINDEQUIST, U; WENDE, K; PORZEL, A; ARNOLD, N; WESSJOHANN, L.A Isolation of a New Natural Product and Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Extracts from Fungi of Indonesian Marine. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 294-306, 2011.

TEIXEIRA, M. F. S. Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. 1994. 85p. (Dissertação na área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus. 1994.

TIUNOVA N.A, RODIONOVA N.A, MARTINOVICH L.I, GOGOLEV M.N. Preparation of cellulolytic enzymes from *Geotrichum candidum*. **Prikl. Biokhim. Mikrobiol.** v.16, n.2, p.185-90, 1980.

TORTORA, G.J.; et al. Microbiologia. Porto Alegre, Brasil. 10.ed. ArtMed., 2006, 894p.

VASCONCELOS, W.E. RIOS, M.S. SOUSA, A.H. MEDEIROS, E.V. SILVA, G.M.C. MARACAJÁ, P.B. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.** v.3, 2003.

YAMADA, T., MUROGA, Y.; TANAKA R. New Azaphilones, Seco-Chaetomugilins A and D, Produced by a Marine-Fish-Derived *Chaetomium globosum*. **Mar. Drugs**, v.7, p. 249-257, 2009.

YAMGUCHI, Y.; MASSUMA, R.; UCHIDA, R. *Phoma* sp. FOM-8108, a producer of gentisylquinones, isolated from sea sand. **Mycoscience.** v 43, p. 127-133, 2002.

YANG, X.B.; GAO, X.D.; HAN, F.; XU, B.S. ; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Purification, characterization and enzymatic degradation of YCP, a polysaccharide from marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108. **Biochimie.** v. 87, n.8, p. 747–754, 2005.

YASUHIDE, M.; YAMADA, T.; NUMATA, A.; TANAKA, R. Chaetomugilins, New Selectively Cytotoxic Metabolites, Produced by a Marine Fish-derived *Chaetomium* species. **J. Antibiot.** v. 61, p. 615–622, 2008.

YU, K.; REN, B.; WEI, J.; CHEN, C.; SUN, J.; SONG, F.; DAI, H.; ZHANG, L. Verrucosidinol and Verrucosidinol Acetate, Two Pyrone-Type Polyketides Isolated from a Marine Derived Fungus, *Penicillium aurantiogriseum*. **Mar. Drugs**, v.8, p.2744-2754, 2010.

YUEN TK, HYDE KD, HODGKISS IJ. Physiological growth parameters and enzyme production in tropical freshwater fungi. **Mater. Org.** v..32, p. 1–16, 1998.

WANG, L.; CHI, Z.M.; WANG, X.H.; LIU, Z.Q.; LI, J. Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. **Ann. Microbiol.** v.57, p. 495–501, 2007.

WANG, Y.N.; SHAO, C.L. ZHENG, C.J.; CHEN, Y.Y.; WANG, C.Y. Diversity and Antibacterial Activities of Fungi Derived from the Gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea. **Mar. Drugs**. v. 9, p. 1379-1390, 2011.

WEI, M.Y.; WANG, C.Y.; LIU, Q.A.; SHAO, C.L.; SHE, Z.G.; LIN, Y.C. Five sesquiterpenoids from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. isolated from a gorgonian *Dichotella gemmacea*. **Mar. Drugs**. v.8, p. 941–949, 2010.

XIONG,, H.; QI, S.; XU, Y; MIAO, L.; QIAN,P.Y. Antibiotic and antifouling compound production by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. F14. **Journal of Hydro-environment Research** v. 2, p. 264-270, 2009.

ZALAR, P.; HOOG, G.S; SCHROERS, H.J.; CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; GUNDE-CIMERMAN, N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. **Studies in Mycology**. v. 58, p. 157–183, 2007.

ZHANG, C.; KIM, S.K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes:Status and Prospects. **Mar. Drugs**. v.8, p.1920-1934, 2010.

ZHAO, G.Z., LIU, X.Z, AND WU, W.P. Helicosporous hyphomycetes from China. **Fungal Diversity** v.26, p. 313-524, 2007.

ZHU, H.Y.; TIAN, Y. HOU, Y.H.; WANG, T. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. **Mol. Biol. Rep.** v.36, p.2169–2174, 2009.

ZHURAVLEVA N.V.; LUK'IANOV P.A.; PIVKIN M.V. N-acetyl-beta-D-hexosaminidase secreted by the marine fungus *Phoma glomerata*. **Appl Biochem Microbiol**. v. 40, n.5, p. 520-6, 2004.