

**INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ**  
**JOÃO VITOR DA SILVA**

**ANÁLISE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE BASIDIOMICETOS E  
POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D  
(ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO)**

**IVAIPORÃ**  
**2023**

**JOÃO VITOR DA SILVA**

**ANÁLISE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE BASIDIOMICETOS E  
POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D  
(ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia Agrônoma, do Instituto Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Agrônoma.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Jaqueline da Silva Coelho  
Moreira

**IVAIPORÃ**

2023

## FOLHA DE APROVAÇÃO

João Vitor da Silva

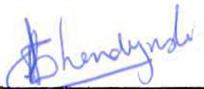
### ANÁLISE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE BASIDIOMICETOS E POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D (ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO)

O presente trabalho em nível de graduação foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:



---

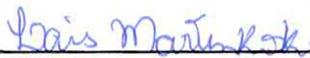
Prof. Dr. Denis Santiago da Costa  
Instituto Federal do Paraná



---

Prof.ª Dr.ª Leticia Thaís Chendynski  
Instituto Federal do Paraná

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Engenharia Agrônoma pelo Instituto Federal do Paraná, Campus Ivaiporã.



---

Coordenação do Curso Engenharia Agrônoma  
Prof.ª Me. Laís Martinkoski  
Siape: 1227192



---

Prof.ª Dr.ª Jaqueline da Silva Coelho Moreira  
Orientadora  
Siape: 1400001

Ivaiporã, 2023

Dedico esse trabalho à minha mãe e aos meu avós,  
minha família.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre ter apoiado meus estudos.

À minha mãe, Ana Lúcia, por sempre ter batalhado o máximo possível para que eu pudesse aproveitar as melhores oportunidades e, assim, chegasse onde ela não conseguiu.

Ao meu avô, José Luiz, por ter sido meu verdadeiro pai e o exemplo de homem que sempre quis me tornar.

À minha avó, por todo o apoio à minha mãe durante minha criação, e por ter cuidado muito bem do meu avô durante seus últimos momentos de vida.

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Jaqueline da Silva Coelho Moreira, pela paciência, pelo auxílio, incentivo e por todo o conhecimento a mim cedido.

À Fundação Araucária, pela bolsa a mim ofertada durante a realização do projeto de pesquisa.

Ao meu amigo e colega de turma, João Paulo, e ao seu pai, por terem me doado a quantidade necessária do herbicida 2,4-D, assim possibilitando a realização desse estudo.

Às técnicas de laboratório do Instituto Federal do Paraná, Fernanda e, principalmente, à Thaís, por toda a assistência durante as etapas laboratoriais do nosso trabalho.

A todos os bons professores que tive até o momento, por terem possibilitado a minha chegada nessa etapa tão importante.

Aos meus amigos, pelo apoio, por todos os bons momentos que tivemos durante o período de graduação e por serem meus amigos.

“Sem laboratórios, homens da ciência são como soldados sem armas.”

Louis Pasteur

## RESUMO

Os basidiomicetos são fungos filamentosos responsáveis pela degradação de matéria orgânica na natureza, processo que ocorre por meio da síntese e liberação de determinadas enzimas. Essas enzimas, além de degradarem moléculas orgânicas naturais, possuem potencial para a biorremediação de diversas moléculas químicas sintéticas, entre estas, as presentes em efluentes liberados pela indústria têxtil, farmacêutica ou em resíduos de agrotóxicos, como o herbicida 2,4-D, amplamente utilizado na agricultura. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo primário avaliar o potencial de produção de fenol-oxidases, lipases e celulasas por cinco basidiomicetos (FB1, FB2, FB3, FB4 e FB5) coletados no município de Ivaiporã - PR, assim detectando possíveis usos biotecnológicos dessas cepas na biodegradação de poluentes ambientais e em outros processos biotecnológicos. Após as análises de produção enzimática, as cepas isoladas foram submetidas a um teste de tolerância ao 2,4-D nas proporções de 3 e 5 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido do herbicida. Com exceção do isolado FB4, que não apresentou atividade fenol-oxidativa, as demais cepas foram capazes de liberar fenol-oxidases, lipases e celulasas nas condições de cultivo impostas. Os isolados FB4 e FB5 destacaram-se na produção de celulasas, enquanto a cepa FB3 foi responsável pela maior ação lipolítica. Nenhum dos fungos demonstrou tolerância ao 2,4-D na proporção de 5 g L<sup>-1</sup>, enquanto que somente a cepa FB1 foi tolerante à proporção de 3 g L<sup>-1</sup> do herbicida.

**Palavras-chave:** Fungos, Basidiomicetos, Enzimas, Biotecnologia, Biorremediação.

## ABSTRACT

Basidiomycetes are filamentous fungi responsible for the degradation of organic matter in nature, a process that occurs through the synthesis and release of certain enzymes. These enzymes, in addition to degrading natural organic molecules, have the potential for the bioremediation of several synthetic chemical molecules, including those present in effluents released by the textile and pharmaceutical industries or in pesticide residues, such as the herbicide 2,4-D, widely used in agriculture. In this context, the present study had as its primary objective to evaluate the production potential of phenol-oxidases, lipases and cellulases by five basidiomycetes (FB1, FB2, FB3, FB4 and FB5) collected in the municipality of Ivaiporã - PR, thus detecting possible biotechnological uses of these strains in the biodegradation of environmental pollutants and other biotechnological processes. After enzyme production analyses, the isolated strains were submitted to a 2,4-D tolerance test in the proportions of 3 and 5 g L<sup>-1</sup> of the acid equivalent of the herbicide. Except for isolate FB4, which did not show phenol-oxidative activity, the other strains were able to release phenol-oxidases, lipases and cellulases under the imposed culture conditions. The FB4 and FB5 isolates stood out in cellulase production, while the FB3 strain was responsible for the greater lipolytic action. None of the fungi showed tolerance to 2,4-D in the proportion of 5 g L<sup>-1</sup>, while only the FB1 strain was tolerant to the proportion of 3 g L<sup>-1</sup> of the herbicide.

**Keywords:** Fungi, Basidiomycete, Enzymes, Biotechnology, Bioremediation.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
2.1. ISOLAMENTO DOS FUNGOS .....	13
2.2. PURIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS .....	13
2.3. SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE ENZIMAS .....	13
2.3.1. Seleção das cepas produtoras de fenol-oxidases .....	13
2.3.2. Seleção das cepas produtoras de lipases.....	14
2.3.3. Seleção das cepas produtoras de celulases .....	14
2.4. CÁLCULO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO .....	14
2.5. ANÁLISE DE TOLERÂNCIA DAS CEPAS ISOLADAS AO 2,4-D.....	14
2.6. OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....	15
2.7. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 2,4-D APÓS ADIÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....	15
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>16</b>
3.1. SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE FENOL-OXIDASES, CELULASES E LIPASES .....	16
3.2. ANÁLISE DE TOLERÂNCIA DAS CEPAS ISOLADAS AO 2,4-D.....	18
3.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 2,4-D APÓS ADIÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....	19
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>5. AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>20</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>20</b>

## Análise enzimática de isolados de basidiomicetos e potencial de biorremediação do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético)

João Vitor da Silva<sup>1</sup>, Jaqueline da Silva Coelho Moreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal do Paraná (IFPR), Campus Ivaiporã, Paraná.

*Histórico do Artigo:* Submetido em: 00/00/2023 – Revisado em: 00/00/00 – Aceito em: 00/00/00

### RESUMO

Os basidiomicetos são fungos filamentosos responsáveis pela degradação de matéria orgânica na natureza, processo que ocorre por meio da síntese e liberação de determinadas enzimas. Essas enzimas, além de degradarem moléculas orgânicas naturais, possuem potencial para a biorremediação de diversas moléculas químicas sintéticas, entre estas, as presentes em efluentes liberados pela indústria têxtil, farmacêutica ou em resíduos de agrotóxicos, como o herbicida 2,4-D, amplamente utilizado na agricultura. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo primário avaliar o potencial de produção de fenol-oxidases, lipases e celulases por cinco basidiomicetos (FB1, FB2, FB3, FB4 e FB5) coletados no município de Ivaiporã - PR, assim detectando possíveis usos biotecnológicos dessas cepas na biodegradação de poluentes ambientais e em outros processos biotecnológicos. Após as análises de produção enzimática, as cepas isoladas foram submetidas a um teste de tolerância ao 2,4-D nas proporções de 3 e 5 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido do herbicida. Com exceção do isolado FB4, que não apresentou atividade fenol-oxidativa, as demais cepas foram capazes de liberar fenol-oxidases, lipases e celulases nas condições de cultivo impostas. Os isolados FB4 e FB5 destacaram-se na produção de celulases, enquanto a cepa FB3 foi responsável pela maior ação lipolítica. Nenhum dos fungos demonstrou tolerância ao 2,4-D na proporção de 5 g L<sup>-1</sup>, enquanto que somente a cepa FB1 foi tolerante à proporção de 3 g L<sup>-1</sup> do herbicida.

**Palavras-Chave:** Fungos, Basidiomicetos, Enzimas, Biotecnologia, Biorremediação.

## Enzymatic analysis of basidiomycete isolates and bioremediation potential of the herbicide 2,4-D (2,4- Dichlorophenoxyacetic acid)

### ABSTRACT

Basidiomycetes are filamentous fungi responsible for the degradation of organic matter in nature, a process that occurs through the synthesis and release of certain enzymes. These enzymes, in addition to degrading natural organic molecules, have the potential for the bioremediation of several synthetic chemical molecules, including those present in effluents released by the textile and pharmaceutical industries or in pesticide residues, such as the herbicide 2,4-D, widely used in agriculture. In this context, the present study had as its primary objective to evaluate the production potential of phenol-oxidases, lipases and cellulases by five basidiomycetes (FB1, FB2, FB3, FB4 and FB5) collected in the municipality of Ivaiporã - PR, thus detecting possible biotechnological uses of these strains in the biodegradation of environmental pollutants and other biotechnological processes. After enzyme production analyses, the isolated strains were submitted to a 2,4-D tolerance test in the proportions of 3 and 5 g L<sup>-1</sup> of the acid equivalent of the herbicide. Except for isolate FB4, which did not show phenol-oxidative activity, the other strains were able to release phenol-oxidases, lipases and cellulases under the imposed culture conditions. The FB4 and FB5 isolates stood out in cellulase production, while the FB3 strain was responsible for the greater lipolytic action. None of the fungi showed tolerance to 2,4-D in the proportion of 5 g L<sup>-1</sup>, while only the FB1 strain was tolerant to the proportion of 3 g L<sup>-1</sup> of the herbicide.

**Keywords:** Fungi, Basidiomycete, Enzymes, Biotechnology, Bioremediation.

Silva, J. V., Moreira, J. S. C. (2023). Análise enzimática de isolados de basidiomicetos e potencial de biorremediação do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético). *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, v.x, n.x, p.xx-xx.

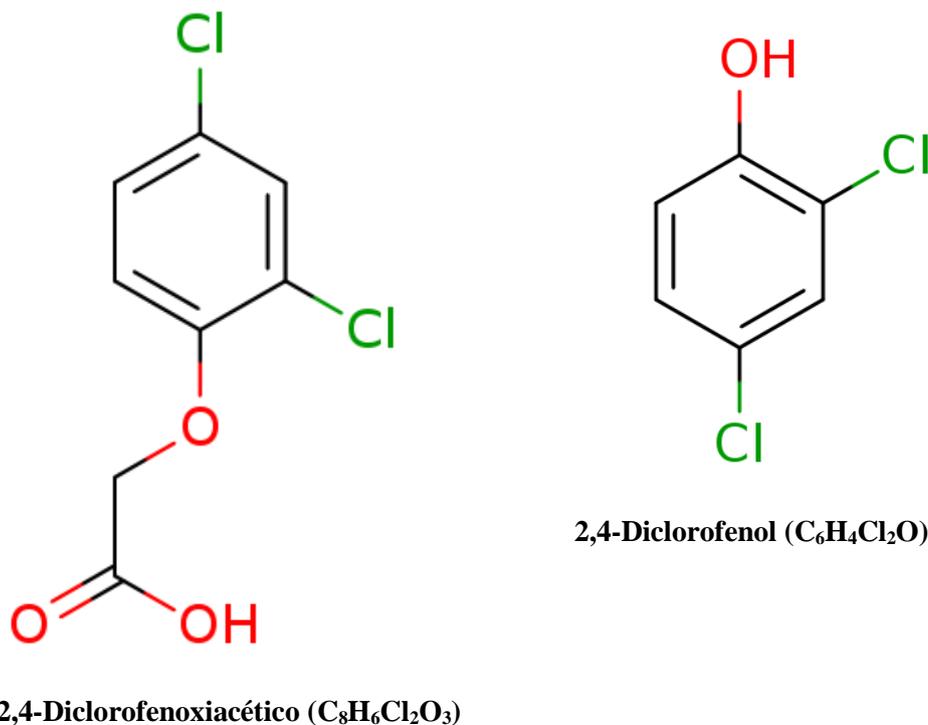


## 1. Introdução

A aplicação de pesticidas é umas das principais práticas responsáveis pela poluição do ambiente, fato que vem aumentando graças ao aumento populacional e consequente maior demanda por alimentos. Entre esses, o destaque fica com os herbicidas, que muitas vezes são aplicados em excesso ou de forma indevida, podendo ser retidos no solo e/ou lixiviados, contaminando mananciais de água e afetando organismos não-alvo (Chowdhury et al., 2008).

O ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (Figura 1), sintetizado em 1941, foi o primeiro composto orgânico utilizado como herbicida seletivo para o controle de dicotiledôneas, já que espécies gramíneas, de forma geral, toleram aplicações desse composto (Oliveira-Júnior, 2011).

**Figura 1** – Estruturas químicas do ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2,4-Diclorofenol (2,4-DCP).  
Figure 1 - Chemical structures of 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) acid and 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP).



**Fonte:** eMolecules.  
Source: eMolecules.

Enquadrado como ingrediente ativo extremamente tóxico (Classe I) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o 2,4-D foi classificado como possível cancerígeno pela Organização Mundial da Saúde em 2015 (INCA, 2023). Ainda assim, os resultados de estudos sobre os efeitos cancerígenos desse herbicida sobre seres humanos são inconclusivos (Loomis et al., 2015). Segundo a Portaria GM/MS N° 888, de 4 de maio de 2021, o teor aceitável de 2,4-D na água para consumo no Brasil é de 30 µg L<sup>-1</sup>, enquanto que na União Europeia esse limite é de apenas 0,1 µg L<sup>-1</sup> para cada pesticida e de 0,5 µg L<sup>-1</sup> para o total de pesticidas na água para consumo, como especificado pela Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2020 sobre a qualidade da água destinada ao consumo humano (Brasil, 2021; UE, 2021).

A partir dos dados coletados por meio da avaliação de amostras de água de mananciais superficiais e subterrâneos e também de água tratada em diferentes municípios do Paraná entre os anos de 2017 e 2019, foi possível notar que o 2,4-D foi um dos ingredientes ativos mais preocupantes para a qualidade da água tratada no período de avaliação, por apresentar maior quantidade de resíduos e em maiores concentrações (variando de 0,17 a 0,64% do valor máximo tolerado) que, apesar de baixas, devem ser consideradas, uma vez que os efeitos crônicos a longo prazo causados pela molécula ainda não são conhecidos (Secretaria da Saúde do Paraná, 2019). Entre 2015 e 2016, em regiões do estado de São Paulo, doses desse herbicida que excedem os valores permitidos pela legislação para a proteção da vida aquática foram detectadas em amostras de água subterrânea e superficial (CETESB, 2019).

Estudos apontam que a exposição ao 2,4-D é capaz de causar efeitos letais em animais, principalmente em vertebrados aquáticos nas fases larval e adulta (Silva et al., 2022). A concentração de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  desse herbicida foi capaz de causar mudanças comportamentais, além de provocar lesões no epitélio branquial de peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos (Oliveira, 2020). Além de animais aquáticos, a mesma concentração afetou o desenvolvimento de embriões de frangos (*Gallus gallus domesticus*) por meio de alterações morfológicas (Pinto, 2020).

Biodegradação é o processo natural de decomposição de determinadas moléculas que alguns microrganismos são capazes de realizar por meio de certos mecanismos fisiológicos. A biorremediação é um conjunto de técnicas que tira proveito de tais mecanismos para a remoção ou diminuição da quantidade de compostos tóxicos presentes no ambiente. Uma dessas técnicas é a utilização de extratos enzimáticos brutos ou parcialmente purificados, que baseia-se na atividade catalítica de enzimas extracelulares, dessa forma não havendo a necessidade do desenvolvimento dos microrganismos no ambiente, vantagem importante em condições em que há ausência de nutrientes. Essa técnica é segura e econômica, sendo uma alternativa a métodos físico-químicos mais caros (Lima & Sales, 2022).

Os basidiomicetos são fungos filamentosos entre os quais se encontra o grupo dos fungos da podridão branca, responsáveis pela degradação de matéria orgânica (biopolímeros) na natureza; processo que ocorre por meio da síntese e liberação de determinadas enzimas (Boddy et al., 2008). Essas enzimas, além de quebrarem moléculas orgânicas naturais, possuem potencial para a degradação de diversas moléculas químicas sintéticas (Lundell, 2010). Uma vasta gama de estudos apresenta resultados positivos quanto aplicação de fungos da podridão branca na degradação de agrotóxicos, entre os quais estão o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), o TCDD (2, 3, 7, 8-Tetraclorodibenzo-P-Dioxina), o benzo(a)pireno, as PCBs (bifenilas policloradas), o Lindano (1,2,3,4,5,6-Hexaclorociclohexano) e diversos outros xenobióticos (Aust, 1990).

Os fungos da podridão branca crescem muito facilmente em substratos economicamente viáveis, como resíduos agrícolas, por exemplo. Por conta da ampla especificidade e alto potencial oxidante das enzimas extracelulares, essas podem ser empregadas na biorremediação de vários compostos distintos, liberando compostos pouco ou nada tóxicos, sendo passíveis à degradação por outros microrganismos. O sistema enzimático extracelular, além de não necessitar de uma fase aclimação, é capaz de atuar em substratos insolúveis ou complexados ao solo, características que os tornam pouco acessíveis a ação de degradação proveniente de bactérias (Aust, 1990; Eerd, 2003).

Entre os grupos enzimáticos ligados a processos biotecnológicos estão as fenol-oxidases, lipases (EC 3.1.1.3) e celulasas (EC 3.2.1.4), utilizados na produção de detergentes, medicamentos, alimentos, têxteis, papéis, biosensores, cosméticos, biocombustíveis e no tratamento de efluentes (Kango et al., 2019; Kunamneni et al., 2008; Messias et al., 2011). As fenol-oxidases são as enzimas mais ativas na degradação de organoclorados, sendo que lacases (EC 1.10.3.2) e peroxidases (EC 1.11.1.7) liberadas por basidiomicetos foram capazes de atuar na degradação do 2,4-diclorofenol (Figura 1), o metabólito primário proveniente da transformação do 2,4-D (Rodriguez et al., 2004; Tsujiyama et al., 2013).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos avaliar o potencial de produção de fenol-oxidases, lipases e celulasas por basidiomicetos encontrados no município de Ivaiporã - PR, bem como analisar

a tolerância das cepas isoladas ao herbicida 2,4-D e, por fim, averiguar a biorremediação desse agrotóxico por um extrato bruto enzimático obtido através de uma das colônias, dessa forma, detectando possíveis usos biotecnológicos desses fungos.

## 2. Material e Métodos

As etapas experimentais foram conduzidas no laboratório de Microbiologia e Fitopatologia do Instituto Federal do Paraná (IFPR) - Campus Ivaiporã. Para as análises laboratoriais, foi empregado o delineamento inteiramente casualizado (DIC).

### 2.1. Isolamento dos basidiomicetos

Para a formação de inóculo, foram coletadas cinco amostras de fungos basidiomicetos classificados como fungos da podridão branca, em diferentes localidades do município de Ivaiporã - Pr. A partir das amostras coletadas, recolheu-se três seguimentos do basidiocarpo de cada um dos cinco fungos. Estes passaram por uma etapa de desinfecção superficial, sendo mergulhados em álcool 70% por 30 segundos, em solução de hipoclorito de sódio 2% por 30 segundos e, posteriormente, lavados com água destilada autoclavada.

Em seguida, os segmentos de basidiocarpo foram depositados em placas de Petri contendo meio Ágar Dicloran Rosa Bengala (DRBC), previamente autoclavado a 121 °C por 15 minutos. As cepas foram catalogadas segundo os seguintes códigos: FB1, FB2, FB3, FB4 e FB5. As placas foram mantidas em local sem iluminação à temperatura ambiente até que fosse observado o desenvolvimento dos micélios.

### 2.2. Purificação e armazenamento das culturas

Após o período de incubação, o micélio visível de cada fungo foi repicado, de forma em que as contaminações fossem evitadas. Posteriormente, as amostras repicadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA) autoclavado a 121 °C por 15 minutos, permanecendo em estufa bacteriológica à temperatura de 28 °C até o desenvolvimento do micélio. As repicagens seguiram sendo repetidas até que obtiveram-se culturas puras, que passaram a ser armazenadas à temperatura de aproximadamente 4 °C.

### 2.3. Seleção das cepas produtoras de enzimas

Todos os meios de cultura utilizados para a avaliação da atividade enzimática dos isolados foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121 °C por 15 minutos. Um disco micelial de aproximadamente 5 mm de diâmetro, obtido das colônias purificadas em meio BDA, foi utilizado como inóculo em cada uma das placas contendo os respectivos meios de cultura. Os testes foram realizados em triplicata para cada uma das cinco cepas isoladas anteriormente. As placas foram acomodadas em estufa bacteriológica a 28 °C, onde permaneceram por cinco dias. Após esse período, foram efetuadas medições dos diâmetros da colônia e do halo enzimático.

#### 2.3.1. Seleção das cepas produtoras de fenol-oxidases

Para avaliar a produção de fenol-oxidases, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultivo composto por: 15 g L<sup>-1</sup> de ágar-ágar, 15 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5 g L<sup>-1</sup> de glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). No momento

do plaqueamento adicionou-se ácido gálico ( $C_7H_6O_5$ ) autoclavado, à proporção de 0,5% m/V (Davidson et al., 1938).

### 2.3.2. Seleção das cepas produtoras de lipases

Para avaliar a atividade lipolítica, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultivo composto por: 20 g L<sup>-1</sup> de ágar-ágar, 5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio (NaCl), 10 g L<sup>-1</sup> de peptona e 0,5 g L<sup>-1</sup> de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). No momento do plaqueamento diluiu-se Tween<sup>®</sup> 80 (polissorbato) autoclavado, à proporção de 0,5 % m/V (Sierra, 1957).

### 2.3.3. Seleção das cepas produtoras de celulases

Para avaliar a produção de celulases, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultivo composto por: 20 g L<sup>-1</sup> de ágar-ágar, 10 g L<sup>-1</sup> de carboximetilcelulose (CMC), 3 g L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), 1 g L<sup>-1</sup> de fosfato dipotássico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,5 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e 0,5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (KCl). Após o período de incubação, foram vertidos 10 mL de solução corante de vermelho congo 0,1% sobre as culturas, que permaneceram por 15 minutos em repouso. Em seguida, acrescentou-se solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,5 M até que fossem totalmente cobertas, mantendo-as assim por 15 minutos, para que o excesso de corante fosse retirado. Em sequência à lavagem dos meios, as medições da colônia e halo enzimático foram efetuadas (Teather & Wood, 1982).

## 2.4. Cálculo do índice enzimático

Seguindo a metodologia proposta por Hankin e Anagnostakis (1975), a partir dos valores obtidos pelos diâmetros médios dos halos de degradação dos substratos enzimáticos, bem como das colônias, calculou-se o Índice enzimático (IE) para cada uma das cepas nos diferentes tratamentos da seguinte forma (Equação 1):

$$\text{Índice Enzimático (IE)} = \frac{\text{Diâmetro do halo enzimático}}{\text{Diâmetro do micélio da colônia}} \quad (1)$$

## 2.5. Análise de tolerância das cepas isoladas ao 2,4-D

Com objetivo de selecionar as cepas tolerantes ao 2,4-D, utilizou-se um meio de cultura a base de extrato de bagaço de malte a 3% contendo os seguintes componentes: 3 g L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), 1 g L<sup>-1</sup> de fosfato dipotássico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,5 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), 0,5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (KCl), 10 g L<sup>-1</sup> de glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar-ágar.

Após a autoclavagem do meio a 121 °C por 15 minutos, foram adicionadas as alíquotas de 5 g L<sup>-1</sup> e de 3 g L<sup>-1</sup> do ingrediente ativo presente na solução estoque de 2,4-D, que foi previamente filtrada por membrana de filtração com poros de 0,45 µm. Além disso, para o tratamento testemunha, o mesmo meio foi preparado sem a adição de 2,4-D.

Em seguida, os meios foram plaqueados e, então, foi adicionado um disco de micélio de uma das cinco cepas aferidas ao centro de cada placa. Os três tratamentos foram realizados em triplicata, mantendo-se as placas em estufa bacteriológica a temperatura de 28 °C e realizando medições do diâmetro médio do micélio das colônias diariamente até 40 dias após a inoculação.

A taxa diária de crescimento fúngico (TDC) foi calculada para cada colônia usando a equação proposta por Venâncio et al. (2017) (Equação 2):

$$TDC_{ab} = \frac{D_b - D_a}{(t_b - t_a)} \quad (2)$$

Onde:

$D_b$  = média dos três diâmetros medidos no final do ensaio;

$D_a$  = diâmetro do disco no início do ensaio (5 mm);

$t_b - t_a$  = intervalo de tempo de exposição (em dias).

## 2.6. Obtenção do extrato enzimático bruto

O extrato bruto enzimático foi obtido a partir do cultivo de amostras da cepa FB1 em um Erlenmeyer de 500 mL contendo 30 g de bagaço de malte e 120 mL da solução nutritiva (3 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> e 0,5 g L<sup>-1</sup> de KCl), para que assim fosse obtida uma umidade de 80%. Após a autoclavagem do meio a 121 °C por 15 minutos, foram inoculados quatro discos miceliais de aproximadamente 13 mm sobre o meio sólido. O frasco permaneceu em estufa bacteriológica a 28 °C, até que o micélio tomasse toda a superfície do meio. Nesse momento, interrompeu-se o cultivo por meio da adição de 100 mL de água destilada gelada. A solução foi mantida à temperatura de 4 °C por uma hora e, em seguida, foi filtrada.

## 2.7. Avaliação da toxicidade do 2,4-D após adição do extrato enzimático bruto

Seguindo a metodologia adaptada de Sobrero & Ronco (2004), em Erlenmeyers cobertos por papel alumínio, foram adicionados 60 mL do extrato bruto enzimático e a mesma proporção de 2,4-D utilizada nos testes de tolerância (3 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido). Os Erlenmeyers foram mantidos em banho-maria a 30 °C por 24 horas. Após isso, o filtrado foi subdividido e diluído em água destilada nas proporções de 10%, 20%, 50%, 80% e 100%.

Em sequência, 20 sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram posicionadas em placas de Petri contendo uma camada dupla de papel filtro saturado por 4 mL das diferentes diluições da amostra (10, 20, 50, 80 e 100%) ou água (controle). Após cinco dias em BOD à temperatura de 22 ± 2 °C e sem iluminação, as sementes germinadas (radícula > 1 mm) foram contadas e os comprimentos de radícula e hipocótilo foram medidos com auxílio de régua milimetrada.

Os dados foram representados como porcentagem absoluta de germinação e crescimento relativo em comparação com o controle da seguinte forma (Equações 3 e 4):

$$\text{Germinação absoluta}(\%) = \frac{GS}{TS} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

GS = número de sementes germinadas;

TS = número de sementes totais.

$$\text{Crescimento relativo da radícula/hipocótilo}(\%) = \frac{LS}{LC} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

LS = comprimento médio da amostra;

LC = comprimento médio do controle.

## 2.8. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA One-Way) e as médias alcançadas foram comparadas por meio do teste Tukey a nível de significância de 5 % ( $P < 0,05$ ). Essas análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism®.

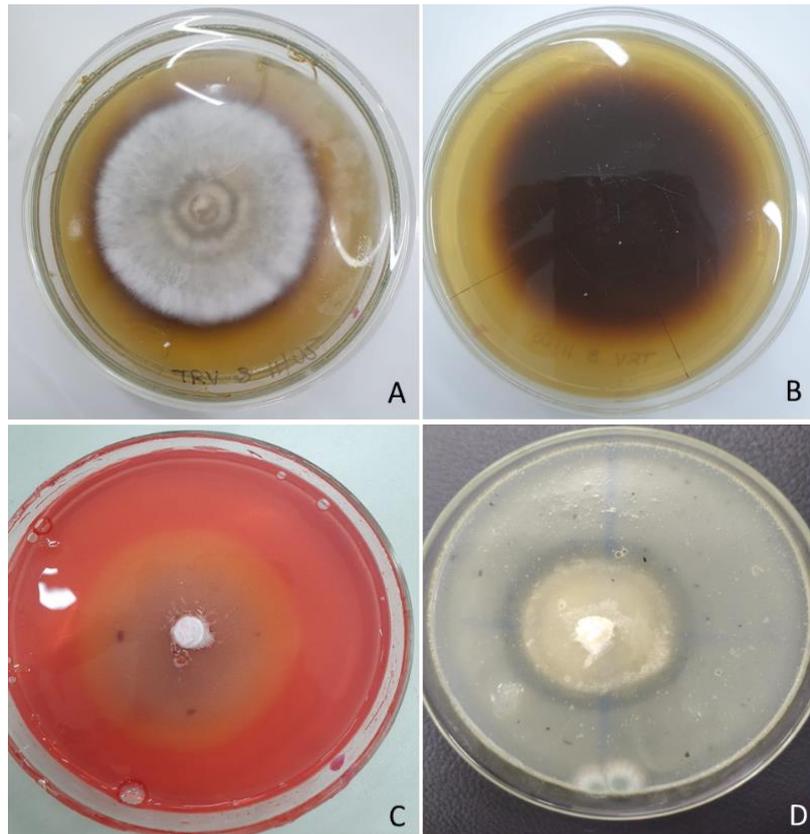
## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Seleção das cepas produtoras de fenol-oxidases, celulases e lipases

Pôde-se observar a produção das enzimas extracelulares em questão por meio da formação de halos enzimáticos ao redor do micélio das colônias aferidas (Figura 2).

**Figura 2** – Visualização do micélio e halos enzimáticos após período de incubação. A (superfície da placa) e B (inferior da placa): cepa FB5 na presença de ácido gálico; C: cepa FB5 na presença de carboximetilcelulose; e D: cepa FB2 na presença de Tween® 80.

Figure 2 - Visualization of mycelia and enzymatic halo after the incubation period. A (plate surface) and B (plate bottom): FB5 strain in gallic acid presence; C: FB5 strain in carboxymethylcellulose presence; and D: FB2 strain in Tween® 80 presence.



**Fonte:** Os autores.  
Source: The authors.

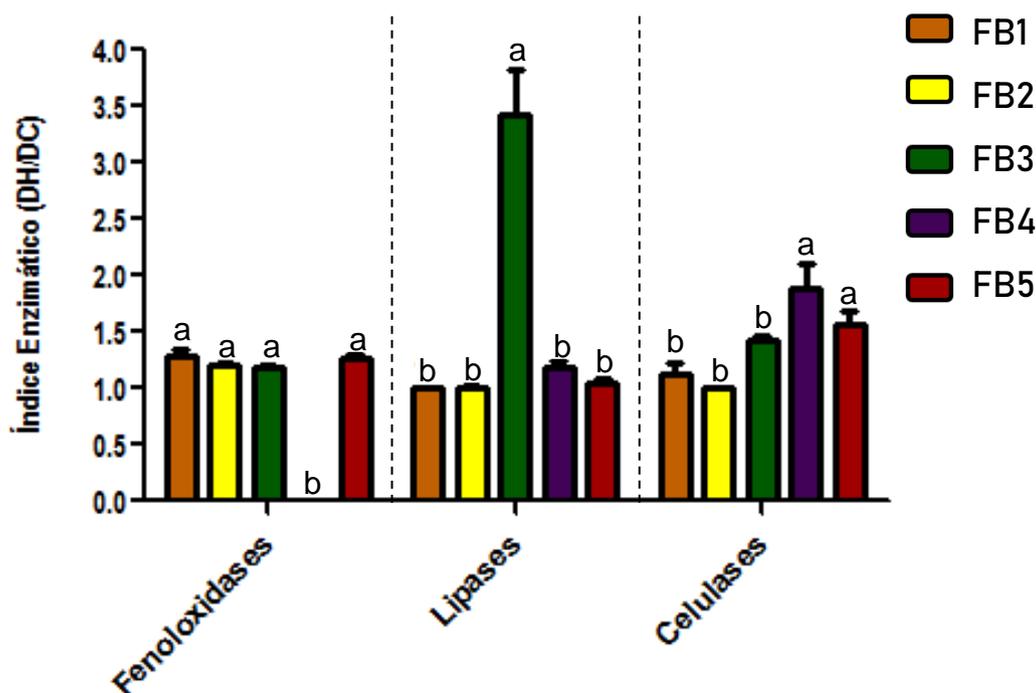
A liberação de fenol-oxidases foi sinalizada por um halo marrom-escuro formado por melaninas fúngicas provenientes da oxidação do ácido gálico, fenômeno que é conhecido como “Reação de Bavendamm” (Davidson et al., 1938).

Quando o Tween® 80 é hidrolisado, ocorre a precipitação de um halo opaco formado por cristais de cálcio, o que possibilita a detecção da ação lipolítica dos fungos testados (Sierra, 1957).

O vermelho congo possui alta capacidade de interação com a carboximetilcelulose. Desse modo, quando a CMC é hidrolisada por celulasas e o meio é submetido à lavagem com solução salina, a área onde a reação de hidrólise ocorreu perde a coloração avermelhada característica do corante, assim destacando-se do restante do meio (Teather & Wood, 1982).

Os dados dos índices enzimáticos se encontram no gráfico a seguir (Figura 3).

**Figura 3** – Produção de enzimas pelos isolados fúngicos.  
Figure 3 - Enzyme production by the fungal isolates.



\*Letras iguais para uma mesma enzima avaliada significam que não houve diferença estatística entre as médias. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as colunas de uma mesma enzima analisada ( $P < 0,05$ ).

**Fonte:** Os autores.  
Source: The authors.

Das 5 cepas isoladas, 4 apresentaram formação de fenol-oxidases extracelulares com coloração de halo intensa, sendo que apenas a cepa FB4 não apresentou atividade de fenol-oxidases nas condições testadas, o que tornou esse resultado bastante positivo se comparado aos de Conceição et al. (2005), que observou a formação de halo oxidativo em apenas 43% dos 257 fungos estudados, sendo que somente 9% destes apresentam coloração intensa. Os IE para essas enzimas ficaram abaixo de 1,5, o que demonstra um baixo potencial de produção de enzimas fenol-oxidases, devido a não apresentarem  $IE \geq 2$  (Abe et al., 2015).

Todos os isolados apresentaram atividade lipolítica com IE < 1,5, exceto o isolado FB3, que se destacou na produção dessas enzimas, atingindo IE significativamente maior (IE = 3,4). Esse valor de IE para lipases é consideravelmente maior do que os encontrados na literatura. Para fungos isolados da madeira o IE máximo foi de 2,5 (Peraza-Jiménez et al., 2021) e para micro-organismos isolados de diferentes pontos de um parque estadual, o IE máximo foi de 2,96 (Luz, 2014).

As lipases são amplamente utilizadas industrialmente, como na produção de biodiesel, de alimentos e bebidas, de detergentes e nas indústrias têxtil e farmacêutica (Messias, 2011). Atualmente, as principais fontes comerciais de lipases são bactérias, leveduras e fungos ascomicetos, sendo escassos os estudos sobre a alta produção dessas enzimas por basidiomicetos (Nath & Kango, 2022). Dessa forma, a cepa FB3 apresenta um alto potencial biotecnológico ligado à sua ação lipolítica acima dos dados encontrados na literatura.

Para celulases, todas as cepas apresentaram atividade com IE < 2. Os isolados FB4 e FB5 apresentaram produção de celulases significativamente maior do que os outros isolados, sendo IE = 1,89 e IE = 1,56, respectivamente. Esses valores são similares aos encontrados por Behera et al. (2014) em bactérias e em fungos degradadores de madeira por Sánchez-Corzo et al. (2021).

### 3.2. Análise de tolerância das cepas isoladas ao 2,4-D

Comparativamente ao desenvolvimento das colônias em meio BDA, todos os isolados tiveram um rápido crescimento micelial em meio de cultura a base de bagaço de malte a 3% sem a adição do herbicida (testemunha), o que demonstra a eficácia dessa composição de meio (Tabela 1), podendo assim, o bagaço de malte ser reaproveitado para o cultivo laboratorial de fungos basidiomicetos.

**Tabela 1** – Crescimento das cepas em meio sem adição de 2,4-D (testemunha).  
Tabela 1 - Growth of strains in medium without addition of 2,4-D (control).

Cepa	Diâmetro das Colônias analisadas (cm) após período de incubação			TDC (mm dia <sup>-1</sup> )
	2 dias	3 dias	4 dias	
<b>FB1</b>	2,25 ± 0,03	4,77 ± 0,03	6,93 ± 0,13	1,61
<b>FB2</b>	2,88 ± 0,20	5,08 ± 0,14	7,00 ± 0,00	1,62
<b>FB3</b>	2,03 ± 0,28	4,28 ± 0,33	6,50 ± 0,26	1,5
<b>FB4</b>	2,63 ± 0,33	4,17 ± 0,15	5,63 ± 0,25	1,28
<b>FB5</b>	2,45 ± 0,05	4,93 ± 0,15	7,18 ± 0,16	1,67

**Fonte:** Os autores.  
Source: The authors.

Em contrapartida, nenhuma das cepas apresentou crescimento em meio nutritivo com adição da proporção de 5 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido do ingrediente ativo, o que aponta que essa dose excede o limite tolerado pelos fungos estudados. A ausência de desenvolvimento difere-se do que foi observado em um experimento em que o basidiomiceto *Lentinus crinitus* foi submetido a uma dose de 2,4-D semelhante (5,025 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido), já que o micélio da colônia demonstrou crescimento similarmente ao tratamento testemunha, divergindo-se do presente trabalho pelo modo de aplicação do herbicida, que foi adicionado à superfície do meio já solidificado (Serbent et al., 2020).

Após a exposição à proporção de 3 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido de 2,4-D, somente a cepa FB1 apresentou crescimento, mostrando-se assim tolerante à molécula do herbicida nas condições estudadas (Tabela 2).

**Tabela 2** – Análise de tolerância das cepas isoladas ao 2,4-D na proporção de 3 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido.  
 Table 2 – Tolerance analysis of isolated strains to 2,4-D in the proportion of 3 g L<sup>-1</sup> of the acid equivalent.

Cepa	Diâmetro das Colônias analisadas (cm) após período de incubação				TDC (mm dia <sup>-1</sup> )
	15 dias	25 dias	32 dias	40 dias	
<b>FB1</b>	1,48 ± 0,10	2,33 ± 0,14	2,93 ± 0,20	3,77 ± 0,21	0,08
<b>FB2</b>	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	-
<b>FB3</b>	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	-
<b>FB4</b>	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	-
<b>FB5</b>	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	-

**Fonte:** Os autores.  
 Source: The authors.

As proporções avaliadas são muito superiores àquelas já passíveis de causar efeitos prejudiciais agudos em algumas espécies de animais (Silva et al., 2022). A dose de 3 g L<sup>-1</sup> é um nível de contaminação altamente superior aos que foram encontrados na prática (Secretaria da Saúde do Paraná, 2019). Por conta disso e pelo fato de que, com exceção da cepa FB4, a produção de fenol-oxidases foi semelhante entre as culturas, torna-se relevante a testagem de doses reduzidas do herbicida em estudos subsequentes, principalmente sobre a cepa FB1, já que, como constatado por Rodriguez et al. (2004) e Tsujiyama et al. (2013), esse grupo de enzimas está intrinsicamente ligado a processos de degradação do herbicida 2,4-D e de seu metabólito primário, o 2,4-DCP.

A taxa diária de crescimento fúngico para o isolado FB1 se encontrou muito próxima dos valores encontrados para os fungos *Pleurotus pulmonarius* e *Tyromyces pulcherrimus* em condições de cultivo similares (Serbent et al., 2020).

### 3.3. Avaliação da toxicidade do 2,4-D após adição do extrato enzimático bruto

A testemunha apresentou uma média de crescimento radicular de 0,5 ± 0,27 cm, enquanto que a média de crescimento do hipocótilo foi de 1,15 ± 0,09 cm, com uma taxa de germinação de 81,67 ± 10,41%. Nenhum outro tratamento apresentou germinação considerável pela metodologia (radícula > 1 mm), portanto, o crescimento relativo para estas foi nulo, o que demonstra que a degradação do 2,4-D por enzimas extracelulares possivelmente presente no extrato bruto não foi suficientemente efetiva para reduzir a toxicidade do herbicida.

Recentemente, a degradação do 2,4-D em diferentes tampões (pH 4 e pH 7) foi analisada, observando-se que parte do herbicida foi degradada por um extrato fúngico rico em lacases após 5 horas de incubação. Os autores relataram que o pH influencia a degradação do agrotóxico, bem como a estabilidade das lacases. Além da ação das lacases na via de degradação do 2,4-D, alguns estudos observaram uma redução na degradação do 2,4-D quando a colônia fúngica foi cultivada na presença de inibidores do citocromo P-450, um sistema enzimático intracelular envolvido na degradação de poluentes (Nguyen et al., 2022; Nykiel-Szymańska et al., 2018). Esses estudos sugerem que a degradação do 2,4-D por fungos requer diferentes sistemas enzimáticos, tanto extracelulares quanto intracelulares, além de que a ação enzimática varia conforme as condições do meio de cultivo.

#### 4. Conclusão

Com exceção do isolado FB4, que não apresentou formação de fenol-oxidases, todas as cepas aferidas apresentam capacidade de síntese e secreção de fenol-oxidases, lipases e celulases nas condições testadas. O isolado FB3 se destacou na produção de lipases extracelulares, demonstrando-se promissor para aplicações biotecnológicas. O bagaço de malte apresentou desempenho satisfatório como componente para meio de cultivo laboratorial de fungos basidiomicetos. Nenhuma das cepas apresenta tolerância ao 2,4-D na proporção de 5 g L<sup>-1</sup>, enquanto que apenas o isolado FB1 demonstra tolerância à concentração de 3 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido do ingrediente ativo. A atividade das enzimas extracelulares possivelmente presentes no extrato bruto enzimático obtido a partir da cepa FB1 não é suficiente para evitar a toxicidade da dose de 3 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido de 2,4-D sobre as sementes de alface submetidas às condições testadas nesse trabalho.

#### 5. Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária, pela bolsa cedida por meio do Programa de Bolsas de Iniciação Científica e Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBIC & PIBIT). Agradecemos também ao Instituto Federal do Paraná – Campus Ivaiporã, pelo apoio financeira por meio do Programa de Assistência Complementar ao Estudante (PACE), por todo o material, pelo espaço e pelo auxílio oferecido por seus técnicos de laboratório, o que possibilitou a realização desse trabalho.

#### 6. Referências

- Abe, C. A. L., Faria, C. B., Castro, F. F., Souza, S. R., Santos, F. C., Silva, C. N., Tessmann, D. J., Barbosa-Tessmann, I. P. (2015). Fungi Isolated from Maize (*Zea mays* L.) Grains and Production of Associated Enzyme Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, 16(12), 15328–15346.
- Aust, S. D. (1990). Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbial Ecology**, 20(1), 197-209.
- Behera, B. C., Parida, S., Dutta, S. K., Thatoi, H. N. (2014). Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Mangrove Soil of Mahanadi River Delta and Their Cellulase Production Ability. **American Journal Of Microbiological Research**, 2 (1), 41-46.
- Boddy, L., Frankland, J. C., West, P. V. (2008). **Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes** (1<sup>a</sup> ed.). Aberdeen: The British Mycological Society. 387.
- Brasil. **Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021, que altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 07 de mai. Disponível em: < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562> >. Acessado em: julho/2022. 2021.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado do São Paulo (2019). Diagnóstico da contaminação de águas superficiais, subterrâneas e sedimentos por agrotóxicos. (**Relatório final**). Disponível em: < [https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2020/03/Relatorio-Agrot%C3%B3xicos\\_28\\_11\\_2019\\_Conclu%C3%ADdo\\_PDF-1.pdf](https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2020/03/Relatorio-Agrot%C3%B3xicos_28_11_2019_Conclu%C3%ADdo_PDF-1.pdf) >. p. 161.

Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian journal of microbiology**, 48(1), 114–127.

Conceição, D. M., Angelis, D. A., Bidoia, E. D., Angelis, D. F. (2005). Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, 72(1), 99-106.

Davidson, R.W., Campbell, W. A., Blaisdell, D. J. (1938). Differentiation of wooddecaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research**, 57(9), 683-685.

Eerd, L. L. V., Hoagland, R. E., Zablutowicz, R. M., Hall, J. C. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, 51, 472–495.

Emolecules. **Estrutura química do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)**. Disponível em: < <https://orderbb.emolecules.com/getimage?id=88E8CC6CF122003CFA728431&width=600&height=400&cs=cow> >. Acesso em: 06/09/2022.

Emolecules. **Estrutura química do 2,4-diclorofenol (2,4-DCP)**. Disponível em: < <https://orderbb.emolecules.com/getimage?id=7971DB065BEED3A39B49C95A&width=600&height=400&cs=cow> >. Acesso em: 06/09/2022.

Hankin, L., Anagnostakis, S. L. (1975). The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, 67(3), 597-607.

IARC - International Agency for Research on Cancer (2018). DDT, lindane and 2,4-D. IARC Working Group. (Monografia), **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. (113), p. 513.

Instituto Nacional de Câncer – INCA (2022). **Agrotóxico**. Maio. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico> >. Acesso em: 01/08/2022.

Kango, N., Jana, U. K., Choukade, R. (2019). Fungal Enzymes: sources and biotechnological applications. **Advancing Frontiers In Mycology & Mycotechnology**, 515-538.

Khotimah, S., Suharjono, S., Ardyati, T., Nuraini, Y. (2021). The potential of cellulose-degrading fungi at various peat maturities in Teluk Bakung Peat Area, Kubu Raya District, Indonesia. **Biodiversitas Journal Of Biological Diversity**, 22(4), 1981-1990.

Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., Alcalde, M. (2008). Laccases and Their Applications: a patent review. **Recent Patents On Biotechnology**, 2(1), 10-24.

Leon, M. E. (1998). **Uma análise de redes de cooperação das pequenas e médias empresas do setor das telecomunicações**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Lima, H. R. S., Sales, V. O. (2022). Aspectos gerais da ecotoxicologia, monitoramento ambiental, biodegradação e biorremediação. In: Peralta, R. M. **Biodegradação e Biorremediação: Ênfase em bactérias e fungos**. Mérida Publishers, 1, 9-21.

- Loomis, D., Guyton, K., Grosse, Y., El-Ghissasi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K. (2015). Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **The Lancet Oncology**, 16(8), 891-892.
- Lundell, T. K., Mäkelä, M. R., Hildén, K. (2010). Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - ecological, functional and phylogenetic review. **Journal Of Basic Microbiology**, 50(1), 5-20.
- Luz, B. D. S. (2014). **Produção de lipases visando-se aplicações industriais empregando-se microorganismos selecionados na bioprospecção realizada no Parque Estadual Serra Do Ouro Branco/MG**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São João Del-Rei Campus Alto Paraopeba, Ouro Branco, MG, Brasil.
- Messias, J. M., Costa, B. Z., Lima, V. M. G., Giese, C., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M. (2011). Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, 32(2), 213-234.
- Moreira, J. S. C., Magalhães, E. M., Thiem, B., Silva, J. V., Inácio, F. D. (2022). Isolamento e seleção de basidiomicetos comerciais e selvagens produtores de amilases e fenoloxidasas. In: **Open Science Research III**. Editora Científica Digital, 3, 576-585.
- Nath, S., Kango, N. (2021). Recent Developments in Industrial Mycozymes: A Current Appraisal. **Mycology**, 13(2), 81–105.
- Nguyen, T. L. A., Dao, A. T. N., Dang, H. T. C., Koekkoek, J., Brouwer, A., Boer, T. E., Van-Spanning, R. J. M. (2022). Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) by fungi originating from Vietnam. **Biodegradation**, 33(3), 301–316.
- Nykiel-Szymańska, J., Stolarek, P., Bernat, P. (2018). Elimination and detoxification of 2,4-D by *Umbelopsis isabellina* with the involvement of cytochrome P450. **Environmental science and pollution research international**, 25(3), 2738–2743.
- Oliveira, B. R. F. (2020). **Efeitos do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre a morfologia das brânquias e parâmetros comportamentais em peixes-zebra *Danio rerio* adultos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.
- Oliveira-Junior, R. S., Constantin, J., Inoue, M. H. (2011). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas** (22<sup>a</sup> ed.). Curitiba: Ominipax. 362.
- Peraza-Jiménez, K., Larosa-García, S., Huijara-Vasconcelos, J. J., Reyes-Estebanez, M., Gómez-Cornelio, S. (2021). Enzymatic Bioprospecting of Fungi Isolated from a Tropical Rainforest in Mexico. **Journal Of Fungi**, 8(1), 22.
- Pinto, B. G. S. (2020). **Análise da toxicidade do herbicida 2,4-d (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) sobre o desenvolvimento inicial de embriões de ave (*Gallus Gallus domesticus* L. 1758)**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR, Brasil.

Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A. T., Martínez, M. J. (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biology and Biochemistry**, 36(6), 909-916.

Roman, E. S., Vargas, L., Rizzardi, M. A., Hall, L., Beckie, H., Wolf, T. M. (2005). **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação** (21ª ed.). Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 152.

Santos, R. A. T., Francisquini, M., Biasotto, G., Rossi, L. C. L. (2021). Degradação do herbicida 2,4-D em função de técnicas de biorremediação. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, 2 (3), 61.

Sánchez-Corzo, L. D., Álvarez-Gutiérrez, P. E., Meza-Gordillo, R., Villalobos-Maldonado, J. J., Enciso-Pinto, S., & Enciso-Sáenz, S. (2021). Lignocellulolytic Enzyme Production from Wood Rot Fungi Collected in Chiapas, Mexico, and Their Growth on Lignocellulosic Material. **Journal of fungi**, 7(6), 450.

Secretaria da Saúde do Paraná. Plano De Vigilância e Atenção à Saúde de Populações Expostas aos Agrotóxicos do Estado do Paraná - PEVASPEA 2020-2023 (2019). **Vigilância Ambiental de resíduos de agrotóxicos em água para consumo humano no Paraná 2017-2019**. Disponível em: < [https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2022-04/02.03.2022\\_arquivo-final-\\_vigilancia\\_ambiental\\_de\\_residuos\\_de\\_agrotoxicos\\_em\\_agua\\_para\\_ocnsumo\\_humano\\_no\\_parana\\_2017\\_-\\_2019.pdf](https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2022-04/02.03.2022_arquivo-final-_vigilancia_ambiental_de_residuos_de_agrotoxicos_em_agua_para_ocnsumo_humano_no_parana_2017_-_2019.pdf) >. p. 38.

Serbent, M. P., Guimarães, D. K. S., Drechsler-Santos, E. R., Helm, C. V., Giongo, A., Tavares, L. B. B. (2020). Growth, enzymatic production and morphology of the white-rot fungi *Lentinus crinitus* (L.) Fr. upon 2,4-D herbicide exposition. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 17(5), 2995–3012.

Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, 23(1), 15-22.

Silva, A. P., Morais, E. R., Oliveira, E. C., Ghisi, N. C. (2022). Does exposure to environmental 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations increase mortality rate in animals? A meta-analytic review. **Environmental pollution**, 303, 119179.

Sobrero, M. S., Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: Castillo, G. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas** (1ª ed.). Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 4, 71-79.

Teather, R. M.; Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied And Environmental Microbiology**, 43(4), 777-780.

Tsujiyama, S., Muraoka, T., Takada, N. (2013). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) using vanillin as an activator. **Biotechnology letters**, 35(7), 1079–1083.

União Europeia. **The European Parliament and the Council of the European Union. Directive (EU)**

---

**2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption.** Official Journal of the European Union, 16 de dez. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj>>. Acessado em: julho/2022. 2021.

Venâncio, C., Pereira, R., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A. P., Costa, J. P., Duarte, A. C., Lopes, I. (2017). Salinity induced effects on the growth rates and mycelia composition of basidiomycete and zygomycete fungi. **Environmental pollution**, 231(2), 1633–1641.



## 1. Introdução

A Revista Brasileira de Meio Ambiente é um periódico destinado a publicação de artigos técnicos-científicos e de revisão bibliográfica, sendo estes resultados de pesquisas originais e inéditas nos diferentes ramos das Ciências Ambientais e seus pares. A revista mantém os respectivos eixos norteadores: **Cotidiano e Meio Ambiente; Meio Ambiente e Ciências Sociais; Tecnologias e Estudos Ambientais; Planejamento e Meio Ambiente**, sendo esses divididos em diversos subgrupos: 1) Agroecologia e Agricultura familiar; 2) Comunidades Tradicionais e Etnociência; 3) Paisagem, Cultura e Meio Ambiente; 4) Educação e Epistemologia ambiental; 5) Movimentos Sociais e relação Sociedade/Natureza; 6) Turismo, sustentabilidade e áreas protegidas; 7) Ecologia, Biodiversidade e seus correlatos; 8) Geoprocessamento, Sensoriamento Remoto e Modelagem aplicadas ao meio Ambiente; 9) Novas tecnologias/tecnologias alternativas sustentáveis; 10) Bioquímica e Saneamento ambiental; 11) Poluição, Mudanças Climáticas e Recursos hídricos; 12) Agricultura de precisão, agroindústria e seus derivados; 13) Solos, minerais e rochas; 14) Conservação e preservação de patrimônio ambiental; 15) Governança Ambiental, Gestão, Indicadores, Direito e Políticas ambientais; 16) Saúde e Meio Ambiente; 17) Economia Ambiental, Serviços Ecosistêmicos e seus processos; 18) Planejamento, desenvolvimento urbano e problemática das cidades.

Neste manuscrito daremos as diretrizes básicas para a confecção adequada para a revista, onde serão explanadas as normas para tabelas, figuras, fórmulas citações e referências. Caso não observe as normas para algum caso específico, valerá a norma vigente da última edição da revista. Ressaltamos que arquivos fora do modelo da revista (*Sem cabeçalho da revista, muitas normas inadequadas, etc*), **não serão avaliados**.

A língua principal da Revista Brasileira de Meio Ambiente é o **Português (BR)**, caso o pesquisador tenha desejo de publicar em outras línguas, é **obrigatório** que haja uma versão em português além das outras versões que possa haver. Para nativos da língua portuguesa, a escrita primária disponível para submissão de trabalhos é o **Português (BR)**. Submissões em português (BR) que mantenha versões em inglês **terão prioridade na avaliação**.

**Além do Português**, as línguas para submissão podem ser o **Inglês e/ou Espanhol**, contudo, deverá haver uma versão traduzida para o português junto a submissão original. O desrespeito a essa regra de submissão resultará na **rejeição do trabalho**. Estrangeiros poderão ter a versão submetida em língua mãe para o português (BR).

Respeitando a avaliação às cegas, **as informações sobre autores serão incluídas na carta suplementar** e submetidas via documento suplementares **no formato WORD**. Você deverá utilizar o modelo da carta de apresentação para preencher os dados dos autores, nunca o modelo geral, uma vez que artigos com as informações de autores em seu momento de submissão **serão recusados na íntegra**.

O trabalho deverá iniciar com o Título em português deste, com alinhamento a esquerda e fonte Times New Roman 15; **não utilizar o título em caixa alta (maiúsculo)**. Todos os Resumos deverão conter **Resumo** e **Abstract**. O máximo de palavras permitidas em ambos os resumos é 250. Serão permitidas para Palavras Chaves e os Keywords de no máximo 05 palavras chaves e mínimo 03. A fonte do resumo é a Times New Roman tamanho 9 vide exemplo acima.

Os Artigos obrigatoriamente deverão conter: **Introdução, Material e Método, Resultado e Discussão, Conclusão, Agradecimentos e Referências**. Destacamos aqui que os **Resultados e Discussão** podem estar separados no texto, caso seja conveniente para o pesquisador (**Resultados, Discussão**). As revisões bibliográficas e/ou de Literatura obrigatoriamente deverão conter: **Introdução, Desenvolvimento, Conclusões ou Considerações Finais, Agradecimentos e Referências**. Destacamos aqui que se pode incluir **Material e Método** entre a **Introdução** e o **Desenvolvimento** no manuscrito de revisão bibliográfica no trabalho, caso queira, ou então dentro do **Desenvolvimento**. A formatação requerida é a fonte Times New Roman 12, enumerado e negrito; caso haja subtítulos, estes ficarão em itálico e respeitarão a numeração

**Comentado [A3]:** PARA BAIXAR A CARTA SUPLEMENTAR COPIE E COLE O LINK ABAIXO E PROCURE A ABA REFERENTE A APRESENTAÇÃO:  
<https://revistabrasileirademeioambiente.com/index.php/RVBMA/abou/submissions#authorGuidelines>

secundária (exemplo **1. Introdução**) (exemplo para subtítulo: *1.1 Exemplo*). **Não aceitamos notas de rodapé, retire-as antes de submeter para evitar transtornos.**

O trabalho deverá digitado em tamanho A4 (210 por 297 mm) formato de layout retrato; suas margens ajustadas em Superior (2 cm), Inferior (2 cm), Esquerda (2 cm) e Direita (2 cm), texto em uma coluna, espaçamento simples linhas e parágrafo de 1,00 centímetros. A Fonte Times New Roman 11 será usada em todo o texto. Para demais formatações específicas, nomenclaturas e nomes e fórmulas científicas, observe as últimas edições da revista. Não utilizamos na revista notas de rodapé. O número mínimo de páginas aceitos para a publicação (já na formatação oficial com imagens, gráficos, tabelas e fórmulas) será **10 (dez)** páginas para a modalidade **Artigos Completos**, onde estão incluídas os gráficos, figuras e tabelas. Para modalidade **Cotidiano e Meio Ambiente**, o número de páginas irão variar de **4 (quatro) a 8 (oito) páginas no máximo**. Artigos abaixo de 4 páginas ou acima de 25 páginas **serão recusados na íntegra**.

### 1.1 Citações

Sobre Citações, durante a escrita deve ser respeitada tais condições (Ver exemplos abaixo):

Para início e durante o texto (1 autor), exemplo: Candeias (2016) comentou sobre a morfologia matemática no Sensoriamento Remoto.

Para início e durante o texto (2 autores), exemplo: Silva e Candeias (2016) avaliaram os produtos SRTM.

Para início e durante o texto (3 autores), exemplo: Guerra, Keles e Azevedo (2017) trabalharam com a agroecologia nas comunidades indígenas.

Para início e durante o texto (acima de 3 autores), exemplo: Gomes et al. (2015) produziu material semelhante no ambiente de Caatinga.

Para final das sentenças (1 autor), exemplo: (Candeias, 2016).

Para final das sentenças (2 autores), exemplo: (Silva; Candeias, 2016) ou (Silva & Candeias, 2016)

Para final das sentenças (3 autores), exemplo: (Guerra, Keles e Azevedo, 2017) ou (Guerra, Keles & Azevedo, 2017).

Para final das sentenças (acima de 3 autores): (Guerra et al., 2014).

Citações diretas acima de duas linhas seguirão as regras seguintes sobre espaçamento e tamanho de fonte. (Recuo de 4 cm, fonte Times New Roman 9).

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Tabelas

Todas as tabelas devem ser numeradas com algarismos arábicos (1,2,3, ...). Os títulos devem ser colocados acima das tabelas, centralizados (Fonte 10) em **português e em inglês**. Somente linhas horizontais devem ser usadas dentro de uma tabela, para distinguir os cabeçalhos das colunas do corpo tabela. As tabelas devem ser incorporadas no texto e não fornecidas separadamente. Abaixo está um exemplo que os autores podem achar útil (Tabela 1). Caso haja fonte na tabela, esta deverá ser colocada na parte inferior da mesma (Fonte 9) **em português e em inglês**. Destaca-se aqui que toda e qualquer tabela deverá ser chamada com antecedência da mesma durante o manuscrito.

**Tabela 1** – Um exemplo de tabela  
Table 1 – Example of Table 1 (Tabela em inglês)

Um exemplo de coluna	Coluna A (t)	Coluna B (t)
Entrada A	1	2

Entrada B	3	4
Entrada C	5	6

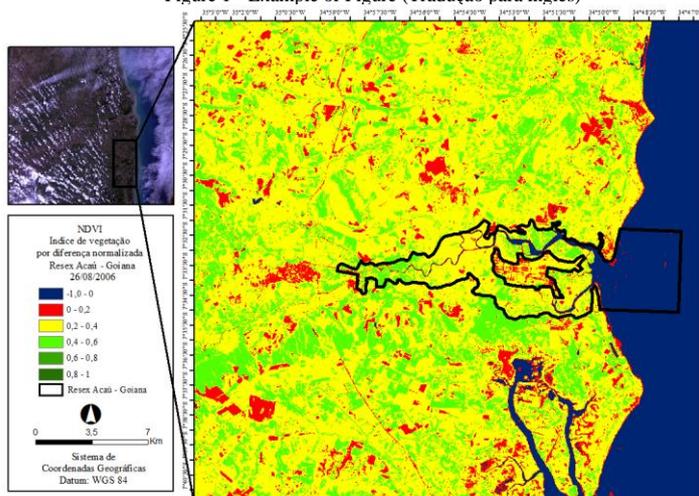
Fonte: Exemplo (2003) [Fonte 9]  
 Source: Example (Fonte em inglês)

## 2.2 Figuras

Todas as figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos (1,2,3, ...) onde cada figura deve ter uma legenda em **português e em inglês**. Todas as fotografias, esquemas, gráficos e diagramas devem ser referidos como figuras. As Figuras devem ser de boa qualidade caso contrário não serão aceitas. As figuras devem ser incorporadas no texto e não fornecidas separadamente. A rotulação e os símbolos devem ser claramente definidos na legenda ou em uma legenda fornecida como parte da figura. As figuras deverão ser chamadas com antecedência de sua exposição no trabalho. Certifique-se de que a qualidade da imagem está em 300 DPI de resolução, pois isso facilitará a boa saída.

O número e a legenda da figura devem ser digitados abaixo da ilustração em Times New Roman 10, sendo centralizado ou justificados e em **português e em inglês**. Se porventura for apresentado uma série de imagens em separados onde todas estas fazem referência a uma só figura, recomenda-se a junção destas em programas de edição de imagens para economizar espaço. A fonte seguirá após a descrição da figura. Eis um exemplo para a uma boa visualização (Figura 1).

**Figura 1** – Exemplo de Figura em uma coluna. (Fonte 10 - Times New Roman)  
 Figure 1 - Example of Figure (Tradução para inglês)



Fonte: Exemplo (2002). [Fonte 9 – Times New Roman]  
 Source: Example of source



escritos estão em concordância com o ineditismo acadêmico. O software COPYSPYDER (<http://copyspider.com.br/main/pt-br/download>) por ser gratuito é o mais recomendado para a varredura e análise.

O pesquisador deverá submeter o trabalho completo com imagens, gráficos e tabelas, sendo estas com excelente qualidade. Recomendamos que o participante envie seu trabalho anteriormente para um orientador ou um participante da pesquisa, com finalidade de refinar o manuscrito antes da submissão propriamente dita. Uma visão de terceiros e uma revisão gramatical é recomendada também.

## 5. Agradecimentos

Aqui é o local onde agradece os órgãos de fomento e laboratórios de pesquisas, caso necessite.

## 6. Referências

Sobre as referências: todas as Citações no corpo do texto devem ser referenciadas, todas. As referências terão como base a vigente o modelo APA com pequenas modificações. Caso haja alguma especificidade não encontrada nos modelos abaixo observe edições anteriores da revista (no mesmo ano).

Exemplos:

- *Para Artigo em revistas:* [Autores (separados por ponto e vírgula), Ano, Título, Revista, volume, número, número de páginas]. **Negrito no Nome do Periódico:**

Chang, T., Lee, W., Fu, H., Lin, Y., & Hsueh, H. (2007). A study of an augmented CPFR model for the 3C retail industry. **Supply Chain Management: An International Journal**, 12(3), 200-209.

Spender, J. C. (1996). Making knowledge the basis of a dynamical theory of the firm. **Strategic Management Journal**, 17(Special Issue), 45-62.

Vandenbos, G. Knapp, S., & Doe, J. (2001). Role of reference elements in the selection of resources by psychology undergraduates [Eletronic version], **Journal of Bibliographic Research**, 5, 117-123.

- *Para Artigo em anais:* [Autores (Separados por ponto e vírgula), Ano, título, nome do evento, local do evento, número de páginas]. **Negrito no nome do evento:**

Silva, A. B., & Pereira, A. A. (2004, setembro). Fatores de influência na gestão das empresas de pequeno e médio porte da grande Florianópolis/SC. **Anais do Encontro Nacional da Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Administração**, Curitiba, PR, Brasil, 28.

Junglas, I., & Watson, R. (2003, December). U-commerce: a conceptual extension of e-commerce and m-commerce. **Proceedings of the International Conference on Information Systems**, Seattle, WA, USA, 24.

- *Monografias, Dissertações e Teses* (Autor, Ano, título, produto, curso de formação, Universidade, Cidade, número de páginas, País). **Negrito no título do trabalho**

Leon, M. E. (1998). **Uma análise de redes de cooperação das pequenas e médias empresas do setor das telecomunicações**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Ariffin, N. (2000). **The internationalisation of innovative capabilities: the Malaysian electronics industry**. Doctoral dissertation, Science and Technology Policy Research, University of Sussex, Brighton, England.

- Livro [Autores (Separados por ponto e vírgula), Ano, título, cidade, editora, número de páginas]

Toffler, A. (1994). **O choque do futuro** (5a ed.). Rio de Janeiro: Record.

Tolkien, J. R. R. (1985). **The Silmarillion** (C. Tolkien, ed.). New York: Del Rey.

Ribault, M., Martinet, B., & Lebedois, D. (1995). **A gestão das tecnologias** (Coleção gestão & inovação). Lisboa: Publicações Dom Quixote.

- *Leis* (Instituição, título, Documento, disponível em: acesso em e ano). **Negrito no título do texto:**

BRASIL. Decreto s/n de 26 de setembro de 2007, que cria a Reserva Extrativista Acaú-Goiana, nos Municípios de Pitimbú e Caaporã, no Estado da Paraíba, e Goiana, no Estado de Pernambuco, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 27 de set. Disponível em: <  
[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2007/Dnn/Dnn11351.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Dnn/Dnn11351.htm) >. Acessado em março/2017. 2007.

- *Notícias Eletrônicas* (Instituição ou autor, Ano original da publicação, título, local, disponível em: < link >. Acesso em: data de coleta da informação). **Negrito no título do texto:**

DDC – Department of Design and Construction (2012). **BiM Guidelines**. New York City, July. Disponível em: [http://facilities.usc.edu/uploads/documents/cas/BIMGuidelines\\_VS1\\_6\\_2012.pdf](http://facilities.usc.edu/uploads/documents/cas/BIMGuidelines_VS1_6_2012.pdf). Acesso em: 13/11/2016.

- *Notícias Impressas* (Instituição ou autor, Ano, título, local). **Negrito no título do texto:**

Moreira, A. (2009, agosto 11). **Banco de país emergente ganha mais espaço com crise financeira**. Valor Econômico, Caderno Valor Finanças, p. C2.

- *Documentos impressos (pareceres)* (Instituição, Ano, título, documento). **Negrito no nome do banco de dados da informação.**

ONS – Operador Nacional do Sistema Elétrico (2015). Diretrizes para as regras de operação de controle de cheias - bacia do Rio São Francisco (CICLO 2015-2016). (Nota Técnica), Operador Nacional do Sistema Elétrico Diretoria de Planejamento Programação da Operação.

Barbirato, R. (2007, janeiro). Precisamos moderar. **Boletim Informativo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, (66), p. 11.

Economática - Tools for Investment Analysis (n.d.). **Base de Dados [CD-ROM]**. São Paulo: Author.