

LETÍCIA FONTES GAMA

**ANÁLISE DO PROTEOMA DURANTE A BIODEGRADAÇÃO
DE MICROPLÁSTICO DE POLIESTIRENO EM FUNGOS
FILAMENTOSOS**

SÃO VICENTE – SP

2025

LETÍCIA FONTES GAMA

ANÁLISE DO PROTEOMA DURANTE A BIODEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICO DE POLIESTIRENO EM FUNGOS FILAMENTOSOS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, para obtenção do título de Mestra em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

SÃO VICENTE – SP

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

G184a	Gama, Letícia Fontes Análise do proteoma durante a biodegradação de microplástico de poliestireno em fungos filamentosos / Letícia Fontes Gama. -- São Vicente, 2025 68 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente Orientador: Leandro Mantovani de Castro Coorientadora: Cristiane Angélica Ottoni 1. Fungo derivado marinho. 2. poliestireno. 3. biodegradação. 4. proteômica. 5. bottom-up. I. Título.
-------	--

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LETÍCIA FONTES GAMA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA.

Aos 26 dias do mês de agosto do ano de 2025, às 9h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LETÍCIA FONTES GAMA, intitulada **Análise do proteoma durante a biodegradação de microplástico de poliestireno em fungos filamentosos**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências da UNESP campus de São Vicente, Profa. Dra. ANA JULIA FERNANDES (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / IB/CLP - UNESP, Dra. CHRISTIANE BEZERRA DE ARAUJO (Participação Virtual) do(a) Pesquisa e Desenvolvimento - Controle de Qualidade / Fundação Butantan. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO

DEDICATÓRIA

A minha amada avó Cida, guardarei para sempre o privilégio de ter recebido seus ensinamentos e o seu amor incondicional. Agradeço, com profunda gratidão, por cada instante compartilhado e pelos conselhos que moldaram meu caráter. Com sua sabedoria e ternura, mostrou-me que a vida é como um livro por escrever, no qual cada página deve ser preenchida com coragem, alegria e gratidão, e que nenhum momento deve ser desperdiçado, pois o agora é o bem mais precioso que possuímos. Seus conselhos, sua força e seu amor permanecerão eternamente vivos em mim, guiando minhas escolhas e aquecendo minha memória com a saudade de quem foi e sempre será um capítulo essencial da minha história.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fábio e Rose, pelo amor, pelos ensinamentos e pelo apoio em cada etapa da minha vida. Aos meus irmãos Felipe e Gabriel, pela amizade e incentivo. Ao meu querido irmão Willian (in memoriam), cujo amor e amizade continuam a me fortalecer. Sua ausência é sentida, mas sua memória permanece viva, guiando-me e fortalecendo-me em todas as etapas da vida.

Ao meu filho Murilo, razão da minha maior motivação, que, mesmo tão pequeno, trouxe luz, alegria e um novo sentido para a minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, pelo tempo dedicado, pela orientação e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho. Pela paciência, compreensão e flexibilidade ao longo de toda a jornada, bem como pela motivação constante e por acreditar no meu potencial.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni, pela confiança, paciência, generosidade na partilha de conhecimentos e pelo apoio essencial para a realização desta pesquisa. Levo-a como inspiração, tanto na vida profissional quanto pessoal, e agradeço profundamente por todos os anos que caminhamos juntas, pelos aprendizados e pela valiosa convivência que contribuíram de forma marcante para a minha trajetória.

Aos laboratórios que tornaram este trabalho possível: ao Laboratório de Proteínas e Peptídeos Marinhos, ao Laboratório de Micologia e Aplicações Biotecnológicas e Nanotecnológicas e ao Instituto de Estudos Avançados do Mar, pela infraestrutura, pelo suporte técnico e pelo ambiente colaborativo.

Aos amigos de laboratório que levarei para a vida — Arthur Aguiar, Felipe Mello e Gabriel Marques — pela amizade, companheirismo e pelas inúmeras trocas de conhecimento, risadas e apoio mútuo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros do Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista – UNESP, e a todos os docentes e funcionários do câmpus, pelas contribuições para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo financeiro para a realização desta pesquisa.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada, o meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

A crescente contaminação ambiental por microplásticos, especialmente poliestireno (PS), representa um desafio global devido à sua persistência, baixa taxa de degradação e acúmulo em ecossistemas. Esses resíduos têm sido detectados em solos, corpos d'água e até organismos vivos, levantando preocupações sobre seus impactos ecológicos e à saúde humana. Frente à limitada eficiência dos métodos físicos e químicos tradicionais para eliminar esses poluentes, a biodegradação por fungos filamentosos surge como uma alternativa promissora. O presente estudo investigou o potencial de biodegradação de microplásticos de poliestireno pelo fungo *Aspergillus tubingensis*, por meio de análises proteômica e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ao longo de 35 dias. As análises identificaram variações significativas na expressão de proteínas intracelulares entre os grupos controle e experimental, especialmente enzimas envolvidas em processos oxidativos, hidrolíticos e de detoxificação, como peroxidases, esterases, lipases, glutathione S-transferases e superóxido dismutase. As respostas metabólicas foram temporais, com pico de atividade nas fases intermediárias (dias 21 e 28), seguidas por uma estabilização no perfil proteômico no dia 35. As alterações estruturais do PS, evidenciadas por FTIR, reforçaram a ocorrência de oxidação superficial do polímero. Embora não tenha havido aumento significativo de biomassa, observou-se forte adesão do micélio ao plástico e resposta enzimática compatível com processos de biofragmentação. A ontologia gênica revelou processos biológicos ligados à síntese proteica, metabolismo secundário, resposta ao estresse e transporte ativo, especialmente no grupo experimental. Os achados indicam que *A. tubingensis* apresenta plasticidade metabólica e capacidade de modular seu proteoma frente à presença de poliestireno, sugerindo seu potencial para futuras estratégias de biorremediação de microplásticos no ambiente.

Palavras-chave: Fungo derivado marinho, poliestireno, biodegradação, proteômica, bottom-up.

ABSTRACT

The increasing environmental contamination by microplastics, particularly polystyrene (PS), poses a global challenge due to its persistence, low degradation rate, and accumulation in ecosystems. These particles have been detected in soils, aquatic environments, and even within living organisms, raising concerns about their ecological and human health impacts. Given the limited efficiency of conventional physical and chemical methods to remove such pollutants, biodegradation by filamentous fungi emerges as a promising alternative. This study investigated the biodegradation potential of polystyrene microplastics by the fungus *Aspergillus tubingensis* through proteomic analysis and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) over a 35-day period. The analyses revealed significant variations in intracellular protein expression between control and experimental groups, particularly enzymes involved in oxidative, hydrolytic, and detoxification processes, such as peroxidases, esterases, lipases, glutathione S-transferases, and superoxide dismutase. Metabolic responses were time-dependent, peaking during intermediate phases (days 21 and 28), followed by stabilization of the proteomic profile on day 35. Structural alterations of PS, confirmed by FTIR, indicated surface oxidation of the polymer. Although no significant increase in biomass was observed, strong mycelial adhesion to the plastic and enzymatic responses consistent with biofragmentation processes were detected. Gene ontology analysis revealed biological processes related to protein synthesis, secondary metabolism, stress response, and active transport, particularly in the experimental group. These findings indicate that *A. tubingensis* exhibits metabolic plasticity and the ability to modulate its proteome in response to polystyrene, suggesting its potential for future bioremediation strategies targeting microplastic pollution.

Keywords: Marine-derived fungus, polystyrene, biodegradation, proteomics, bottom-up.

Sumário

1.Introdução	10
1.2 Plásticos: composição, classificação e tipos.....	11
1.2.1 Microplásticos	12
1.3 Degradação de microplásticos por microrganismos.....	13
1.3.1 Mecanismos de degradação de plásticos por fungos filamentosos.....	16
1.4 Ferramentas moleculares para elucidação de mecanismos intracelulares e extracelulares de biodegradação	18
1.5 Técnicas atuais para avaliação da degradação de microplásticos.....	19
1.6 Justificativa do estudo	20
2. Objetivos.....	22
2.1 Objetivos específicos.....	22
3. Materiais e métodos.....	22
3.1 Desenho experimental	22
3.2 Isolamento de fungos filamentosos de sedimentos de Manguezal e Apicum	23
3.3 Criopreservação	26
3.4 Identificação molecular	26
3.4.1 Crescimento fúngico e extração de DNA.....	26
3.4.2 Amplificação da região ITS, purificação e Sequenciamento	27
3.5 Ensaio de exposição do fungo aos Microplásticos	28
3.5.1 Inóculo	28
3.5.2 Microplástico de Poliestireno	28
3.5.3 Ensaio de Biodegradação.....	29
3.6 Técnica de biodegradação: Análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	29
3.7 Proteômica.....	30
3.7.1 Preparação das Amostras.....	30

3.7.2 Digestão das Proteínas.....	30
3.7.3 Análise LC-MS/MS.....	31
3.7.4 Análise de dados.....	32
4. Resultados.....	33
4.1 Caracterização morfológica e molecular	33
4.2 Análise do crescimento da biomassa durante o processo de biodegradação.....	35
4.3 Análise do microplástico de poliestireno por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	37
4.4 Análise do proteoma e quantificação relativa durante a exposição do fungo ao microplástico	38
4.4.1 Tempo de exposição 14 dias.....	38
4.4.2 Tempo de exposição 21 dias.....	42
4.4.3 Tempo de exposição 28 dias.....	44
4.4.4 Tempo de exposição 35 dias.....	48
5. Discussão.....	51
6. Conclusão	55
7. Perspectivas Futuras	55
Referências bibliográficas	56

1.Introdução

O rápido desenvolvimento da sociedade tem contribuído para o aumento expressivo na produção e no consumo de plásticos, materiais amplamente reconhecidos como uma das inovações mais impactantes da era moderna. Tal relevância se deve às características intrínsecas destes polímeros sintéticos, como elevada durabilidade, versatilidade e baixo custo de produção (Heidbreder et al., 2019; Miri et al., 2022).

O consumo global de plástico tem aumentado de forma contínua ao longo das últimas décadas. Na década de 1950, a produção era de aproximadamente 1,5 milhão de toneladas por ano, enquanto em 2018 esse número saltou para 359 milhões de toneladas. Projeções indicam que a produção poderá triplicar até 2050, passando a representar cerca de um quinto do consumo global de petróleo. No entanto, dos cerca de 9 bilhões de toneladas de plástico produzidos até 2017, apenas 9% foram efetivamente reciclados (Atiwesh et al., 2021; Chia et al., 2020; Nikiema & Asiedu, 2022).

O uso crescente de materiais plásticos tem sido relacionado ao aumento populacional e o acesso aos bens e serviços de consumo. No entanto, o seu uso gera impactos ambientais, ligados tanto à produção quanto aos métodos inadequados de tratamento de resíduos. Atualmente, os aterros sanitários são as opções predominantes para a gestão de resíduos plásticos, o que resulta na acumulação de cerca de 80% dos resíduos gerados em aterros ou no ambiente natural. Uma vez descartados no meio ambiente, os plásticos são suscetíveis a processos de degradação abióticos, como radiação UV, calor, oxidação química e abrasão mecânica, e bióticos, mediados por microrganismos como fungos e bactérias, que podem fragmentá-los em partículas menores, como microplásticos e nanoplásticos, e, em alguns casos, liberar seus constituintes monoméricos (Evode et al., 2021; Lim & Thian, 2022; Shams et al., 2021).

No caso do poliestireno, o principal monômero liberado é o estireno ($C_6H_5-CH=CH_2$), que pode surgir especialmente em processos térmicos, pirolíticos ou por ação de enzimas oxidativas. Além disso, durante a degradação podem ser formados intermediários e subprodutos, como óxido de estireno, fenol, benzaldeído, benzoato de etila e outros derivados aromáticos, enquanto compostos menores, incluindo CO_2 , H_2O e ácidos orgânicos de cadeia curta, aparecem em estágios avançados de mineralização (Chauhan et al., 2008; Nandiyanto et al., 2024; Xu et al., 2025).

1.2 Plásticos: composição, classificação e tipos

A maioria dos plásticos são compostos por diversos monômeros de moléculas de hidrocarbonetos, provenientes do refino de petróleo e gás natural, que são conectados através de fortes ligações químicas covalentes. Durante o processo de polimerização são obtidos polímeros orgânicos sintéticos ou semissintéticos (Chamas et al., 2020a; Napper & Thompson, 2020; Su et al., 2022). O polímero pode ser sintetizado por duas vias de reação, sendo o método mais comum através de adição de ligações duplas de carbono na olefina inicial para formar novas ligações C–C, ou reação de condensação entre um ácido carboxílico e um grupo álcool/amina para formar uma poliamida ou poliéster (Amobonye et al., 2021).

Os plásticos podem ser divididos em termoplásticos e termofixos, de acordo com seu comportamento quando aquecidos (Wang et al., 2021). Os termofixos não amolecem durante o período de aquecimento, ou seja, sua forma não é alterada em altas temperaturas e não podem ser reciclados devido a sua estrutura altamente reticulada, diferentemente dos termoplásticos que podem sofrer múltiplas moldagens em diversos ciclos de aquecimento e resfriamento sem alterar sua composição química e possuem uma cadeia linear em que átomos e moléculas consistem em uma série de cadeias de carbono causando resistência à degradação ou clivagem hidrolítica de ligações químicas (Kazemi et al., 2021; Patel et al., 2022; Singh et al., 2020). São exemplos mais comuns de termoplásticos o polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno (PP), polietileno de baixa densidade (PEBD), poliestireno (PS) e cloreto de polivinila (PVC) (Jagadeesh et al., 2022). Além disso, durante a fabricação de plásticos, aditivos como éteres difenólicos polibromados, nonilfenol e triclosan (entre outros) são adicionados para aprimorar suas propriedades. No entanto, o uso desses aditivos e monômeros pode levar à desregulação endócrina em diversos organismos, afetando negativamente a mobilidade, reprodução, desenvolvimento e aumentando o risco de carcinogênese (Yu et al., 2019).

O poliestireno é um polímero aromático sintético formado pela adição de unidades de monômeros de estireno (Figura 1). Apresenta transparência, mas pode ser tingido com a adição de corantes. Além disso, este material é resistente ao calor, mais leve e apresenta boa durabilidade e resistência, o que o torna adequado para diversas aplicações. O poliestireno é amplamente utilizado na fabricação de uma variedade de produtos como CDs, brinquedos, escovas de dente etc. (Dong et al., 2020; Kik et al., 2020; Liu et al., 2022; Maafa, 2021). Poliestireno é geralmente considerado não biodegradável devido ao seu alto peso molecular e

alta estabilidade estrutural (Liu et al., 2022). No entanto, estudos têm explorado alternativas para mitigar seu impacto ambiental, incluindo o uso de processos de degradação térmica e química, bem como a aplicação de microrganismos capazes de metabolizar o polímero em condições específicas, sinalizando avanços promissores no desenvolvimento de tecnologias de biorremediação (Mohan et al., 2020; Urbanek et al., 2018).

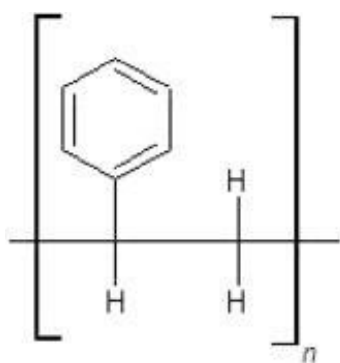


Figura 1. Estrutura química do poliestireno (Kik et al., 2020).

1.2.1 Microplásticos

Os microplásticos (MPs) são caracterizados como partículas de plástico com tamanho inferior ou igual a 5 mm (Bugatti et al., 2023). Existem diversas formas de MPs presentes no meio ambiente, tais como esferas, grânulos, pellets, espuma, fibras, fragmentos e flocos, as quais variam de acordo com o processo de degradação e as condições de erosão às quais foram expostos (Castañeta et al., 2020). Os MPs podem ser classificados em primários ou secundário de acordo com sua origem (Tirkey & Upadhyay, 2021). Os primários são produzidos industrialmente em forma de microesferas de diversos tamanhos, utilizados em produtos de cuidados pessoais, ou em forma de pellets de plástico virgem. Os secundários são gerados da fragmentação de detritos plásticos maiores durante o uso dos produtos ou por meio da degradação de plásticos descartados ao longo do tempo devido a processos como fotodegradação, interações físicas, químicas e biológicas (Andrady, 2017; Li et al., 2018). A contínua degradação de microplásticos primários e secundários ocasiona mudanças em suas propriedades, tais como cor, morfologia de superfície, tamanho, cristalinidade e densidade (Castañeta et al., 2020).

Os MPs são considerados poluentes emergentes que possuem ampla distribuição em diversos compartimentos ambientais. A poluição microplástica em solo, pode desencadear

mudanças nas propriedades físicas (estrutura, capacidade de retenção de água e densidade) alterando o crescimento das plantas (Chia et al., 2020; Du & Wang, 2021; Elgarahy et al., 2021). No ambiente aquático, os MPs são de grande preocupação pública pela presença onipresente, são capazes de se deslocar na coluna de água, flutuando e afundando, e podem ser consumidos por seres vivos marinhos, quer seja por captação direta, atraídos pelos plásticos pelo seu odor, cor e pelas algas que crescem nos plásticos flutuantes, ou por meio da alimentação de organismos previamente expostos. Consequentemente, os microplásticos podem afetar toda a cadeia alimentar de maneira potencial (A. et al., 2020; Li et al., 2018; Novillo et al., 2020).

As principais características dos MPs são alta hidrofobicidade, estrutura multiespacial e porosidade, o que os torna facilmente portadores de diversas substâncias tóxicas e nocivas. As propriedades físicas e químicas dos MPs, como o tipo, cor e grupos funcionais, juntamente com as condições ambientais circundantes, como pH, salinidade e matéria orgânica dissolvida, estão diretamente relacionadas ao comportamento de absorção de metais pesados em MPs (Liu et al., 2022; J. Ma et al., 2019). Os materiais sintéticos como polietileno, polipropileno e poliestireno são os polímeros que ocorrem com mais frequência em MPs marinhos (Gola et al., 2021; Jin et al., 2021).

Devido ao seu tamanho, ampla distribuição e composição complexa, a remoção de MPs do ambiente marinho é uma tarefa desafiadora. Embora muitos estudos tenham sido realizados para investigar a distribuição de microplásticos e seus efeitos adversos nos ecossistemas, poucos se concentraram em identificar a estratégia ideal para eliminar ou mitigar esses efeitos. No entanto, ao explorar métodos para reduzir a poluição por microplásticos, foi observado que alguns microrganismos podem degradá-los, utilizando o polímero como única fonte de carbono e energia. Embora os MPs possam persistir no ambiente e resistir à degradação, essa descoberta abre caminho para possibilidades de minimizar a poluição por microplásticos (Ganesh Kumar et al., 2021; Krueger et al., 2015).

1.3 Degradação de microplásticos por microrganismos

Devido à sua habilidade natural de adaptação a diferentes ambientes e potencial para degradar diversos compostos, inclusive microplásticos, os microrganismos apresentam-se como uma estratégia promissora e relativamente segura para facilitar a biorremediação e a limpeza de ecossistemas, com impactos ambientais significativamente menores quando

comparados a métodos físico-químicos tradicionais (Sánchez, 2020; Wei & Zimmermann, 2017). Fungos filamentosos e bactérias desempenham papel fundamental nesse processo, utilizando enzimas extracelulares e intracelulares para romper as cadeias poliméricas dos plásticos, utilizando-os como fonte de carbono e energia para seu crescimento (Golmohammadi et al., 2023).

No entanto, embora a biodegradação seja uma alternativa sustentável, nem sempre o processo ocorre de forma completa, podendo gerar subprodutos intermediários que podem apresentar toxicidade ainda maior do que o polímero original, além de persistirem no ambiente (Auta et al., 2017; Ghosh et al., 2013; Lara-Topete et al., 2024). Este desafio reforça a importância de estudos que buscam compreender os mecanismos bioquímicos e as vias metabólicas envolvidas, bem como identificar consórcios microbianos ou sistemas enzimáticos que, atuando de forma combinada, possam garantir a mineralização completa dos polímeros em CO₂, H₂O e biomassa, reduzindo assim os riscos ambientais associados (Golmohammadi et al., 2023; Sánchez, 2020).

Apesar de serem o grupo mais abundante de microrganismos encontrados em todos os tipos de ambiente, as bactérias têm sua aplicação limitada. Estudos demonstram que linhagens bacterianas isoladas, como *Pseudomonas sp.* e *Bacillus sp.*, embora capazes de degradar parcialmente polímeros como poliestireno, frequentemente apresentam limitações associadas à baixa taxa de crescimento e à acumulação de intermediários tóxicos que inibem sua atividade metabólica (Ghosh et al., 2013; Golmohammadi et al., 2023). Além disso, pesquisas apontam que a biodegradação bacteriana isolada é menos eficiente, tornando necessária a utilização de consórcios microbianos ou abordagens enzimáticas combinadas para superar os efeitos negativos desses subprodutos (Wei & Zimmermann, 2017b).

A biodegradação de MPs tem início quando os microrganismos começam a proliferar na superfície do material e liberam suas enzimas para fragmentar o polímero em moléculas mais simples (Yuan et al., 2020; Figura 2). A colonização e formação de biofilme por microrganismos são etapas iniciais cruciais para tornar a superfície do poliestireno mais hidrofílica, facilitando assim o processo de biodegradação. Além disso, é importante considerar fatores como antioxidantes, estabilizantes e outros aditivos usados na fabricação do poliestireno, bem como o pré-tratamento e os tipos de substrato, pois eles podem influenciar a eficiência da biodegradação (Cai et al., 2023; Hou & Majumder, 2021a; Y. Zhang et al., 2022).

Os fungos são organismos heterotróficos que podem se associar a superfícies plásticas e utilizá-las como fonte de carbono e energia. Além disso, possuem habilidade de se adaptar a condições ambientais extremas, especialmente os filamentosos.

Os fungos filamentosos constituem um dos grupos mais promissores na biodegradação de polímeros sintéticos, justamente por sua capacidade de secretar uma ampla variedade de enzimas extracelulares oxidativas e hidrolíticas. Além disso, apresentam micélio multicelular ramificado, que facilita a colonização de superfícies sólidas, como os plásticos, promovendo adesão e formação de biofilmes. Essas características, associadas à alta plasticidade metabólica e à tolerância a condições ambientais extremas, conferem a esses microrganismos um papel estratégico em processos de biorremediação e no desenvolvimento de soluções biotecnológicas voltadas à mitigação da poluição plástica (Sánchez, 2020; Wikandari et al., 2022).

Diversas espécies têm sido reportadas como capazes de degradar polímeros sintéticos, incluindo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*, com destaque para sua atuação na degradação de poliestireno, polietileno e poliuretano, o que evidencia seu papel ecológico e biotecnológico (Urbanek et al., 2018; Ali et al., 2021). Entre os fungos filamentosos estudados, destacam-se também *Fusarium falciforme*, *Aspergillus* sp., *Purpureocillium lilacinum* e *Fusarium oxysporum*, reconhecidos pela diversidade de enzimas extracelulares envolvidas no processo de degradação (Sánchez, 2020; Wikandari et al., 2022).

Os fungos presentes nos manguezais sintetizam diversas enzimas e são reconhecidos como uma valiosa fonte de metabólitos bioativos com relevância biotecnológica. Isso se deve ao fato deles se desenvolverem em um ambiente único e extremo, caracterizado por altas temperaturas médias e constantes, água salobra e solo anaeróbico. Apesar do importante papel ecológico e do potencial biotecnológico associado, os fungos de mangue ainda carecem de estudos abrangentes (Jia et al., 2020; Thatoi et al., 2013).

Os manguezais brasileiros, especialmente os localizados na costa sudeste, abrigam uma comunidade diversa de fungos filamentosos adaptados às condições ambientais extremas. Diversos gêneros, incluindo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*, têm sido frequentemente relatados nesses ecossistemas, destacando-se por sua versatilidade metabólica e capacidade de produzir enzimas de relevância ecológica e biotecnológica (Oliveira et al., 2025; Bastos et al., 2024; Jacob et al., 2023). Essa diversidade funcional reforça o potencial dos fungos de manguezais como agentes importantes na ciclagem de nutrientes e na degradação de

compostos recalcitrantes, além de sua relevância como fonte de moléculas bioativas com aplicações ambientais e industriais (Yao et al., 2024)

1.3.1 Mecanismos de degradação de plásticos por fungos filamentosos

A biodegradação do poliestireno é um processo complexo, com inúmeras enzimas desempenhando papéis cruciais, que pode ser dividido em quatro etapas principais: biodeterioração, biofragmentação, assimilação intracelular e, por fim, mineralização, conforme mostrado na Figura 2 (Solanki et al., 2022).

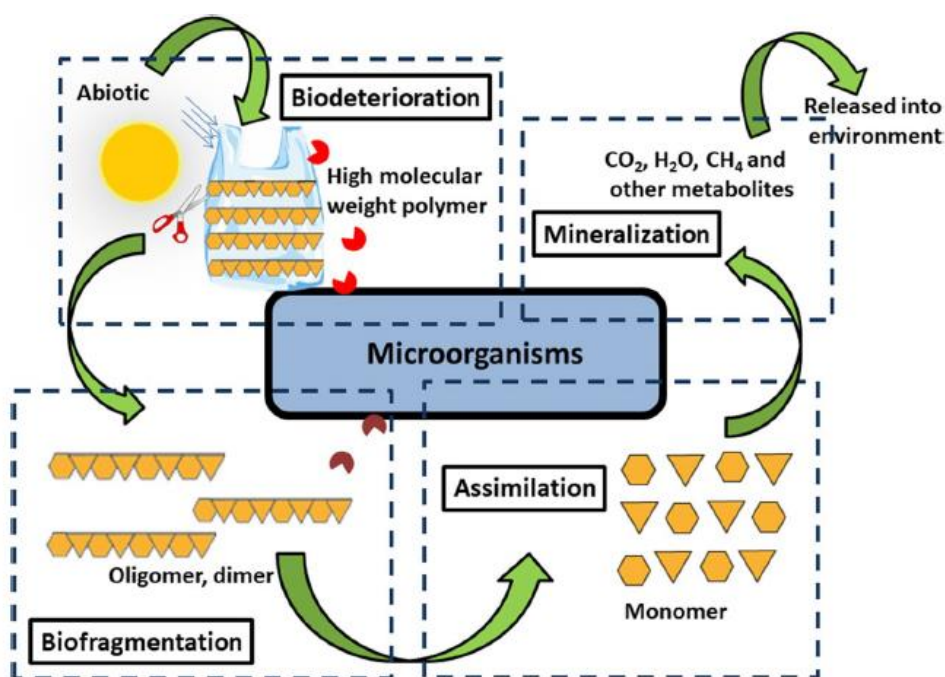


Figura 2: Ilustração esquemática do processo de biodegradação de polímeros plásticos por microrganismos. O processo inicia-se com a Biodeterioração, onde fatores abióticos e bióticos causam a degradação superficial do polímero de alto peso molecular. Segue-se a Biofragmentação, onde a quebra do polímero resulta em oligômeros e dímeros de menor peso. As moléculas menores (monômeros) são então internalizadas e utilizadas pelos microrganismos (Assimilação). Por fim, o processo de Mineralização converte esses compostos em produtos finais inorgânicos estáveis, como CO₂, H₂O, CH₄ e outros metabólitos, que são liberados no ambiente. (Retirado de Solanki et al., 2022)

A etapa inicial, biodeterioração, ocorre a adesão do micélio à superfície hidrofóbica do polímero, muitas vezes mediada por proteínas chamadas hidrofobinas, que aumentam a afinidade entre o fungo e o plástico (Hektor & Scholtmeijer, 2005; Mohanan et al., 2020b; Urbanek et al., 2018).

Uma vez aderido à superfície do poliestireno, o fungo filamentoso secreta um conjunto de enzimas extracelulares. Espécies como *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Phanerochaete chrysosporium*, têm se destacado por sua capacidade de degradar poliestireno por meio da ação combinada de hidrolases e de um complexo sistema oxidativo enzimático. Entre as hidrolases, enzimas como esterases, cutinases e lipases são responsáveis pela clivagem inicial das ligações químicas da cadeia polimérica, promovendo a redução do tamanho molecular do PS (Ali et al., 2021).

O sistema oxidativo envolve enzimas como lacases, peroxidases, além de monooxigenases como o citocromo P450, responsáveis pela oxidação da estrutura aromática do poliestireno (Hou & Majumder, 2021; Yanto et al., 2019). Esse processo de oxidação promove a introdução de grupos hidroxila, facilita a abertura dos anéis fenólicos presentes no polímero e rompe as ligações C-C da cadeia principal, resultando na formação de moléculas menores, como oligômeros e dímeros (Krueger et al., 2015)

No interior das células fúngicas, os produtos gerados na etapa de biofragmentação do polímero são processados por vias metabólicas que envolvem dois estágios principais apreensatados na Figura 3. A Fase I é dominada por reações de oxidação, catalisadas por enzimas como alcano-hidroxilases, monooxigenases, epoxidases e o sistema citocromo P450, que introduzem grupos funcionais aos metabólitos, aumentando sua reatividade (Hou & Majumder, 2021; Krueger et al., 2015). Na sequência, ocorre a Fase II, caracterizada pela atuação de enzimas do tipo transferases, que promovem a conjugação de grupos funcionais como grupos metila, acetila ou glutatona aos metabólitos intermediários. Esse processo aumenta a solubilidade dos compostos, facilitando sua completa assimilação pela célula e posterior mineralização (Shilpa et al., 2022; Srikanth et al., 2022a; Wilkes et al., 2017).

Diversos fungos filamentosos têm demonstrado capacidade de biodegradar poliestireno (PS), ainda que com taxas relativamente baixas. Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aureobasidium* e *Curvularia*, foram associadas a processos de degradação do PS, evidenciados por análises de perda de massa, modificações nas bandas espectrais por FTIR e alterações estruturais observadas em microscopia. Outros fungos, como *Mucor sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Mortierella sp.* e *Geomyces sp.*, também apresentaram desempenho semelhante, embora, na maioria dos casos, as taxas de redução de massa permaneçam inferiores a 5%, indicando sua atuação principalmente nas etapas iniciais de biofragmentação do polímero (Chaudhary & Vijayakumar, 2020; Restrepo-Flórez et al., 2014).

Entre os fungos ligninolíticos, destaca-se *Pyrrhoderma noxium*, que obteve uma taxa de biodegradação de aproximadamente 16% sobre resíduos de poliestireno expandido após 30 dias de incubação, valor significativamente superior em comparação a outras espécies avaliadas (Philippe et al., 2024). De forma semelhante, *Mucor sp.* e *Cephalosporium sp.* alcançaram reduções de 1,81% e 2,17%, respectivamente, após 48 dias, reforçando o papel desses microrganismos no início do processo de despolimerização (JananiRajam S et al., 2021).

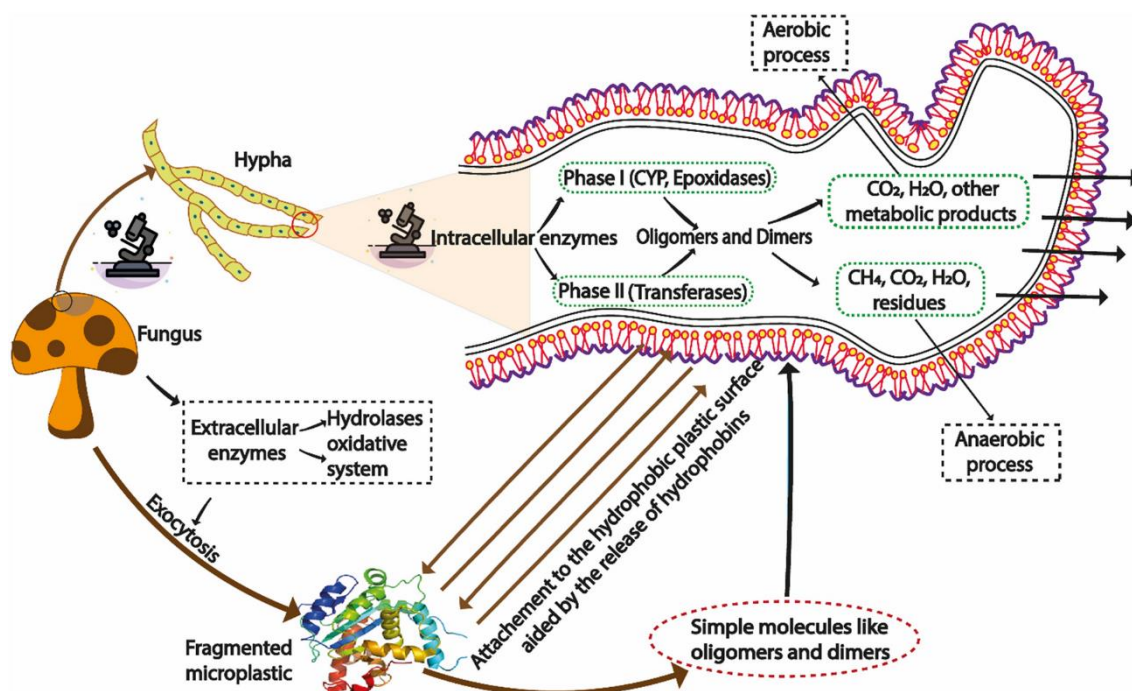


Figura 3. Etapas de degradação de plásticos por fungos filamentosos. (Retirado de Solanki et al., 2022).

No entanto, a via enzimática detalhada e os mecanismos bioquímicos envolvidos na degradação do poliestireno ainda não foram completamente elucidados, demonstrando a necessidade de mais estudos nessa área (Cai et al., 2023; Y. Zhang et al., 2022).

1.4 Ferramentas moleculares para elucidação de mecanismos intracelulares e extracelulares de biodegradação

As ciências ômicas visam a identificação, caracterização e quantificação de um conjunto de moléculas que participam da estrutura, função e de interações dos sistemas biológicos. Isso inclui a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (Vailati-Riboni et al., 2017). A proteômica consiste no estudo do conjunto de proteínas expressas em uma célula, tecido ou

presentes em um fluido considerando diferentes condições em um determinado espaço de tempo ou momento celular. Através da proteômica, é possível obter uma análise precisa do perfil de expressão do produto gênico final, como exemplo, a identificação de modificações pós-traducionais, o que não é possível através da transcriptômica ou genômica, tornando-se uma ciência promissora no estudo da composição enzimática intracelular e extracelular de fungos filamentosos (Cologna et al., 2018; Prabhukarthikeyan et al., 2022).

A separação de proteínas por meio de eletroforese em gel bidimensional (2-DE) foi utilizada como método inicial para análise de enzimas fúngicas (Baggerman et al., 2005; Cologna et al., 2018), entretanto a técnica possui algumas limitações como sensibilidade, faixa dinâmica, pontos sobrepostos e dificuldades para separar proteínas hidrofóbicas. Nos últimos anos o método 2-DE vem sendo substituído pela técnica que utiliza cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massa em tandem (MS/MS) em amostras preparadas com digestão em solução. A abordagem *bottom-up*, pertencente a proteômica *shotgun*, consiste na digestão de proteínas por meio da ação de enzima proteolítica resultando em fragmentos de peptídeos. A utilização dessa abordagem tem se tornado bastante comum devido à maior facilidade de identificação das proteínas (Cologna et al., 2018; Duong & Lee, 2023; Fonslow & Yates, 2012; J. Zhang et al., 2012).

1.5 Técnicas atuais para avaliação da degradação de microplásticos

A avaliação da degradação de microplásticos envolve a utilização de diferentes métodos que permitem obter informações qualitativas e quantitativas sobre as mudanças físicas, químicas e estruturais que ocorrem nos materiais ao longo do processo de biodegradação (Kim et al., 2024; Silva et al., 2023).

As análises morfológicas, por meio de técnicas como a Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e a Microscopia de Força Atômica (AFM), são frequentemente utilizadas para identificar modificações na superfície dos MPs, como fissuras, rugosidade, poros e evidências de degradação física, características frequentemente associadas à biodeterioração (Chamas et al., 2020b; Silva et al., 2023).

As análises químicas estruturais, como cromatografia acoplada à espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS), são essenciais para identificar subprodutos da degradação, como

monômeros e oligômeros liberados durante o processo (Rocha-Santos & Duarte, 2015; Tapia et al., 2019).

As técnicas espectroscópicas, como a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e a Espectroscopia Raman, são amplamente empregadas e desempenham um papel central na caracterização dos MPs, permitindo monitorar alterações estruturais específicas, como a formação de novos grupos funcionais oxidativos e a ruptura de ligações químicas na cadeia polimérica (Harrison et al., 2012; Tan et al., 2023).

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier destaca-se como uma ferramenta essencial na avaliação da degradação de microplásticos, sendo amplamente empregada para monitorar alterações na estrutura química dos polímeros. A técnica baseia-se na absorção de radiação infravermelha por grupos funcionais presentes na molécula, permitindo a identificação de mudanças estruturais associadas aos processos de degradação física, química e biológica (Golmohammadi et al., 2023; Harrison et al., 2012). Portanto, o FTIR não apenas permite a confirmação da presença de processos oxidativos e de fragmentação química nos MPs, como também se configura como uma técnica chave na validação da eficácia de processos biológicos, como a biodegradação fúngica, na transformação do poliestireno e de outros polímeros sintéticos.

1.6 Justificativa do estudo

A poluição por microplásticos, especialmente por polímeros como o poliestireno, constitui uma ameaça ambiental significativa devido à sua persistência. Esses contaminantes emergentes estão amplamente distribuídos em ecossistemas marinhos, terrestres e atmosféricos, trazendo sérios riscos não apenas para a fauna, mas também para a saúde humana (Chamas et al., 2020).

Evidências crescentes indicam que os microplásticos são capazes de atravessar barreiras biológicas, sendo encontrados em sangue humano, placenta, pulmões e trato gastrointestinal, levantando preocupações sobre seus efeitos tóxicos e inflamatórios (Jenner et al., 2022; Leslie et al., 2022). Além dos riscos físicos, essas partículas atuam como vetores de contaminantes químicos e patógenos, agravando seus impactos sobre os organismos expostos (Wright & Kelly,

2017). Frente a isso, a poluição plástica não é mais vista apenas como um problema ambiental, mas também como uma questão de saúde pública global.

Diante da ineficiência dos métodos convencionais de tratamento, como a reciclagem mecânica e a incineração e aterro sanitário, a biotecnologia surge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de soluções sustentáveis (Hale et al., 2020).

Ainda que pesquisas com bactérias tenham avançado por meio de abordagens como metagenômica e engenharia de consórcios, revelando novas rotas metabólicas, o mesmo nível de entendimento ainda não foi alcançado para fungos filamentosos, apesar de seu repertório enzimático altamente versátil e adaptável (Cai et al., 2023; Hou & Majumder, 2021a). Além disso, a seleção adequada de microrganismos de degradação é essencial para tratar diferentes tipos de plásticos, e estudos contínuos podem levar ao desenvolvimento de métodos sustentáveis de biorremediação.

Embora algumas enzimas envolvidas na degradação do poliestireno já tenham sido identificadas, persistem lacunas significativas no entendimento completo desse processo, sobretudo no que se refere aos mecanismos enzimáticos, vias metabólicas e produtos intermediários gerados (Hou & Majumder, 2021). Avançar nesse conhecimento é fundamental não apenas para aprimorar estratégias de biodegradação, mas também para viabilizar o desenvolvimento de tecnologias ambientalmente sustentáveis e aplicáveis em escala industrial.

Ademais, esta pesquisa se alinha diretamente aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) para 2030, os quais visam enfrentar os desafios socioeconômicos e ambientais globais (Ganesh Kumar A. et al., 2020). O desenvolvimento de soluções biotecnológicas para a biodegradação de microplásticos de poliestireno, aliado ao aprofundamento no entendimento dos mecanismos enzimáticos envolvidos, contribui diretamente para os ODS 2 (Fome zero e agricultura sustentável), 3 (Saúde e bem-estar), 6 (Água potável e saneamento), 13 (Ação contra a mudança climática), 14 (Vida na água) e 15 (Vida terrestre).

2. Objetivos

Avaliar a expressão de proteínas fúngicas durante a exposição à microplásticos de poliestireno (PS). O isolado fúngico selecionado para este estudo, designado como **Ff AQ2A**, foi previamente triado durante um projeto de Iniciação Científica, com material proveniente de sedimento de manguezal, que demonstrou potencial para biodegradar MPs de PS. (Fapesp 2021/11074-1)

2.1 Objetivos específicos

- Identificar o fungo Ff AQ2A proveniente de sedimento de manguezal, utilizando técnicas morfológicas e moleculares
- Monitorar as alterações estruturais nos MPs de PS expostos ao Ff AQ2A, por meio análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), para identificar modificações nas propriedades dos plásticos.
- Investigar proteoma intracelular do Ff AQ2A, utilizando técnicas de proteômica, com o objetivo de identificar as proteínas e enzimas envolvidas na possível dinâmica de degradação dos microplásticos de PS.

3. Materiais e métodos

3.1 Desenho experimental

Para o estudo de degradação do microplástico foi estabelecido dois grupos: um controle, contendo meio de crescimento mínimo (MCM) e micélio fúngico, e um experimental, contendo MCM, micélio fúngico e microplástico de poliestireno (MP de PS). O ensaio teve duração de 35 dias, com monitoramento a cada 7 dias (14, 21, 28 e 35 dias), durante o qual foram retirados 3 frascos do tipo Erlenmeyer para cada condição estudada. No total, foram avaliados 24 frascos, pois o ensaio foi realizado em triplicata. Foram analisados também o crescimento do fungo, através da pesagem da biomassa obtida por filtração a vácuo durante a separação do meio de crescimento, usando papel filtro do tipo *Whatman* número 1.

Como parâmetro analítico de biodegradação do microplástico de poliestireno, foi utilizada a análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para avaliar a estrutura química, o PS sem exposição fúngica foi o padrão de comparação das amostras. A análise do

proteoma, em ambas as condições, foi realizada por nanocromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (nanoLC-MS/MS). Os dados brutos gerados pelo espectrômetro de massas foram analisados utilizando o banco de dados do NCBI. Para explorar o metabolismo proteico fúngico nas condições testadas, foi utilizado a ferramenta de quantificação relativa no modo livre de marcação (Figura 4).

3.2 Isolamento de fungos filamentosos de sedimentos de Manguezal e Apicum

Foram coletadas amostras simples de sedimento no Manguezal e Apicum às margens do Rio Una Prelado, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, localizada em Peruíbe/SP (Figura 5a). Cada uma das seis amostras foi obtida em diferentes estações de amostragem e tinha um peso aproximado de 50 g, com profundidades de 1 a 5 cm, em uma área de 5 cm² de sedimento. Essas amostras, identificadas como Q1 a Q3 de acordo com a área de coleta, foram usadas para investigar comunidades fúngicas (Figura 5b). Cada amostra foi acondicionada em frascos coletores esterilizados e transportada em caixas térmicas para manter a temperatura ambiente, antes de serem refrigeradas para o isolamento subsequente de fungos.

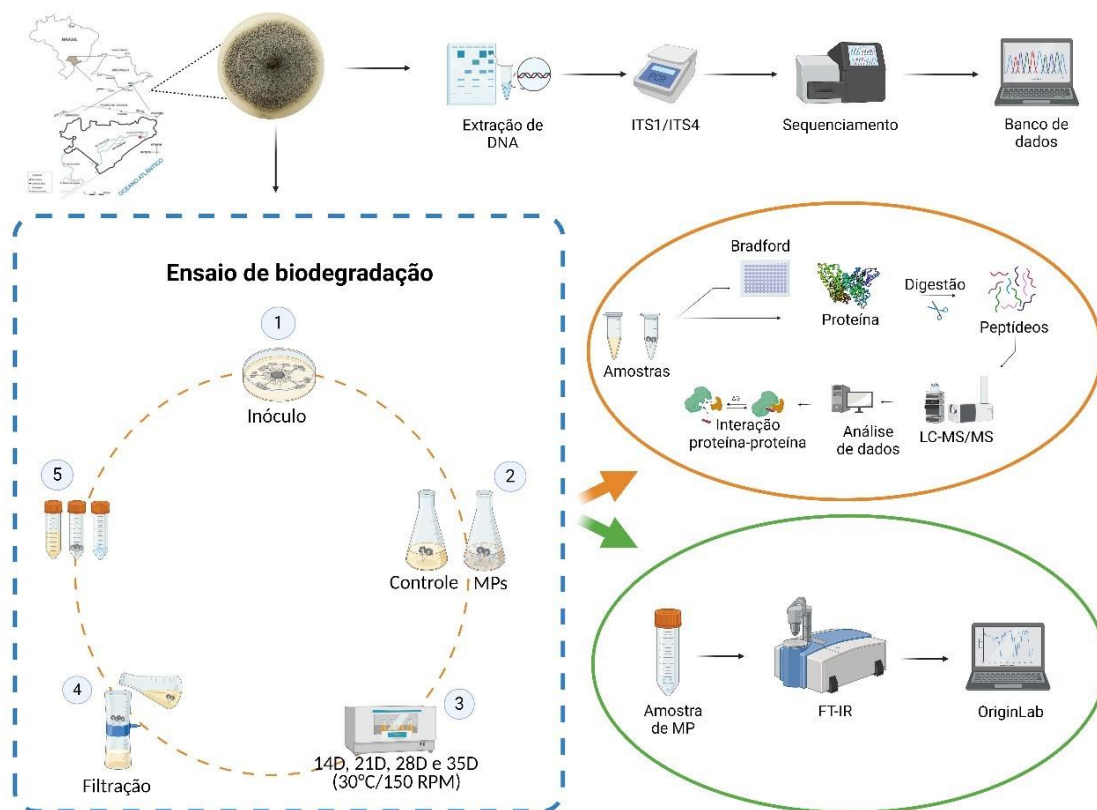


Figura 4. Desenho do estudo para a análise do proteoma durante a biodegradação de microplástico de poliestireno em fungos filamentosos.

Espécies de Ff foram isoladas através da mistura de 10 g de amostra de sedimento com 45 mL de solução salina (0,85%) contendo polisorbato 80 (0,01%), para cada ponto de coleta. A mistura foi agitada em vórtice a 100 rpm por 1 hora à temperatura ambiente utilizando um agitador de órbita para homogeneização. A suspensão resultante foi filtrada a vácuo utilizando papel filtro qualitativo de 45 μ m, obtendo uma solução contendo esporos fúngicos com pouca presença de sedimento. Esta solução foi diluída em série até a concentração de 10^4 . Em seguida, foram semeados 20 μ L da suspensão em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (PDA), que foram incubadas a 30 °C por um período de sete dias. Após esse período, as colônias morfologicamente distintas foram subcultivadas e incubadas nas mesmas condições para obtenção de culturas puras. O isolamento e a utilização das linhagens fúngicas obtidas foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o Código de Cadastro AFCF8A9.

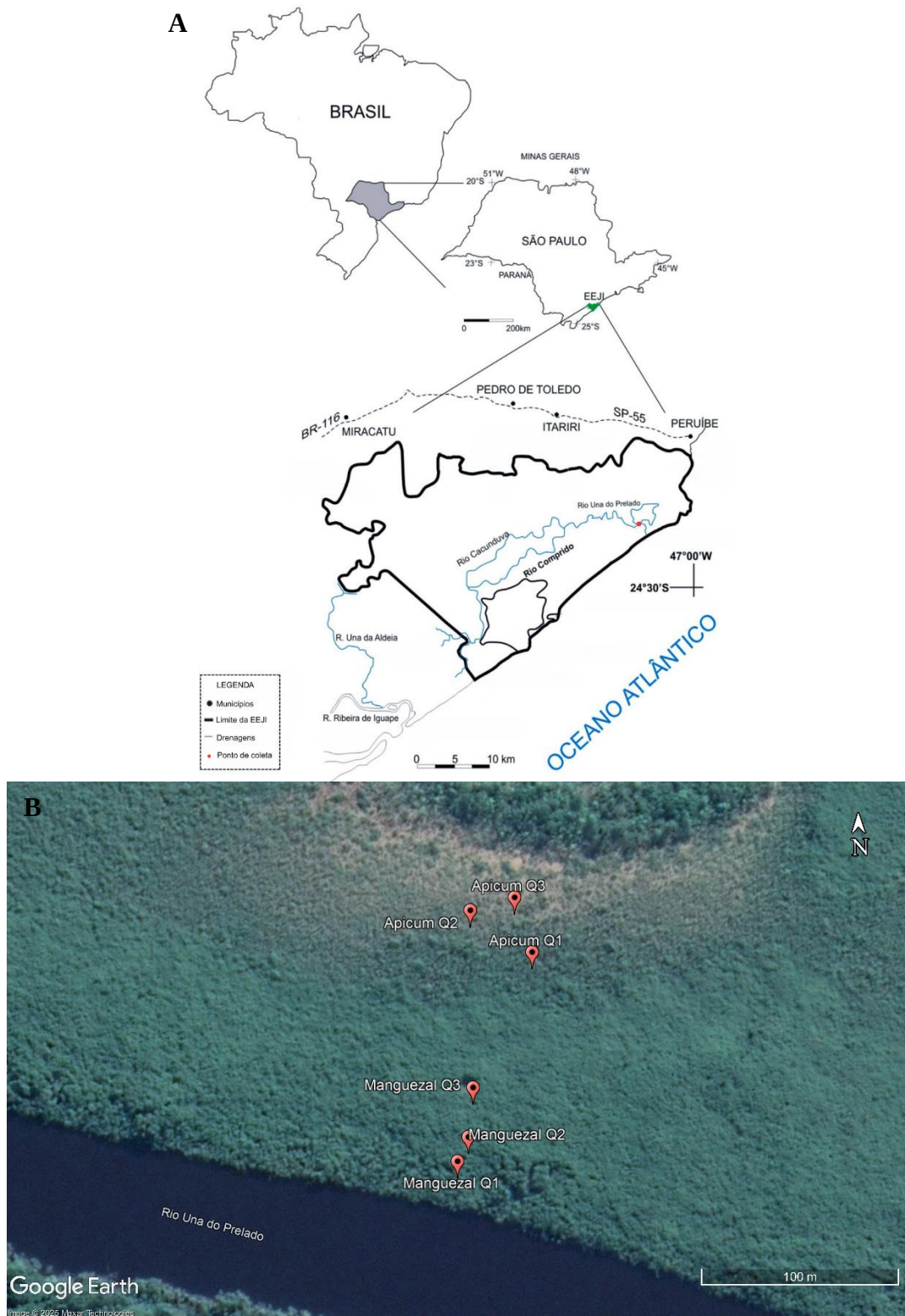


Figura 5. (A) Mapa da Estação Ecológica de Juréia-Itatins apontando região de coleta de sedimentos. (B) Área de coleta de sedimentos a Beira do Rio Una Prelado, Peruíbe/SP (Google Earth, 2022). Nota: Os pontos de coleta de sedimentos apresentam as coordenadas: Manguezal Q1 ($24^{\circ}26'2.30''S$, $47^{\circ}5'57.9''O$), Manguezal Q2 ($24^{\circ}26'1.9''S$, $47^{\circ}5'57.7''O$),

Manguezal Q3 (24°26'1.1"S, 47°5'57.6"O), Apicum Q1 (24°25'58.9"S, 47°5'56.5"O), Apicum Q2 (24°25'58.2"S, 47°5'57.6"O) e Apicum Q3 (24°25'58"S, 47°5'56.8"O).

3.3 Criopreservação

O Ff AQ2A foi criopreservado para que fosse garantido o baixo risco de contaminação, reprodutibilidade do inóculo e manutenção por um período prolongado, além do método de Castellani. Ff AQ2A foi reativado em placas de Petri (90 mm) que continham meio de cultura batata dextrose ágar (PDA). O Ff foi incubado a 30 °C por 7 dias. Após este período, foi adicionada a placa de Petri um volume de 5 mL de solução salina com Tween 80 (Composição: 9,0 g/L NaCl, 1 mL Tween 80, 1 L água destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C).

A suspensão de esporos foi transferida para um sistema de filtração estéril. Após o processo de filtração, foi adicionado a cada microtubo de 2,0 mL um volume de 750 µL de suspensão de esporos e 750 µL de glicerol a 20%. Os microtubos foram então pré-congelados a 4 °C por 4 h e, em seguida, transferidos para um congelador a -20°C por 4 h. Após este período, os microtubos foram armazenados em ultrafreezer -80 °C.

3.4 Identificação molecular

3.4.1 Crescimento fúngico e extração de DNA

A linhagem fúngica AQ2A foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de crescimento lipopolissacarídeo de metilglicose (MGLP) (10 g·L⁻¹ de glicose, 3 g·L⁻¹ de extrato de malte e 5 g·L⁻¹ de peptona, 3 g·L⁻¹ de extrato de levedura). A incubação foi realizada por um período de 5 dias à temperatura de 30 °C sob agitação de 150 rpm.

Foi utilizado cerca de 50 mg de material fúngico crescido no meio líquido MGLP para realizar a extração do DNA. Os fungos foram colocados em microtubo contendo 100 µl EAR buffer (TRIS/HCl: 100 mM, pH 8,5; EDTA: 5 mM, pH 8,0; NaCl 200 mM e 0,2% SDS) e 8 µL proteinase K (20 mg·mL⁻¹). A amostra foi incubada a 55 °C sob agitação de 300 rpm overnight. Na sequência, a amostra foi aquecida por 10 min para inativar a proteinase K e, com auxílio de esferas de vidro, centrifugada a 4.260 rpm por 1 minuto de 3 ciclos com intervalo de 1 minuto. Após esta etapa, 500 µL de tampão TE (TRIS/HCl: 10 mM, pH 7,5 e EDTA: 1 mM)

e 5 μL de RNase A (3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram adicionados e incubados por mais 10 min a 37 °C. A amostra de DNA genômico foi armazenada a -20 °C.

3.4.2 Amplificação da região ITS, purificação e Sequenciamento

O ITS é amplamente utilizado na identificação de espécies de fungos devido às suas características distintas e vantagens específicas. Esta região está localizada entre os genes de rRNA da subunidade pequena (SSU) e da subunidade grande (LSU) no genoma nuclear dos fungos. A região ITS é composta por dois loci, ITS1 e ITS2, separados pelo gene 5.8S rRNA. A principal razão para a preferência pelo ITS é a sua rápida taxa de mutação em comparação com as regiões codificadoras de rRNA SSU e LSU, o que resulta em variações de sequência acumuladas ao longo do tempo. Essas variações de sequência são cruciais para a discriminação de diferentes taxonomias de fungos, tornando o ITS uma ferramenta valiosa na identificação de espécies (Langsiri et al., 2023; Ohta et al., 2023).

A amplificação do fragmento do gene espaçador interno transcrito (ITS) do DNA por reação em cadeia de polimerase foi realizada utilizando os primers ITS1F, ITS1 ou TS2 (*forward*) e ITS4 (*reverse*). A reação foi conduzida em um volume final de 25 μL , contendo: 0,2 μL de Taq DNA Polymerase (GE Healthcare™), 0,5 μL de dNTP Mix (Promega Corporation™), 100 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de cada primer, 1 μL da amostra de DNA molde, 2,5 μL de tampão 10 $\times$ (PCR Buffer, GE Healthcare™) e 18,8 μL de água deionizada autoclavada. A reação em cadeia da polimerase foi conduzida em termociclador iniciada com incubação a 95 °C por 5 minutos, seguida por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Essas etapas foram repetidas por 35 ciclos. Ao término dos ciclos, a reação foi mantida a 72 °C por 8 minutos e, posteriormente, resfriada a 4 °C por tempo indeterminado.

Os produtos amplificados por PCR foram purificados utilizando o kit PureLink™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific™), posteriormente quantificados e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, com o objetivo de verificar o tamanho esperado dos fragmentos de DNA e avaliar sua pureza. O fragmento de cDNA obtido foi enviado ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, para sequenciamento por meio da técnica de Sanger, utilizando eletroforese capilar. As sequências geradas foram posteriormente analisadas e comparadas com os dados disponíveis no banco de

dados de fungos MycoBank, com o objetivo de identificação e caracterização do material genético.

3.5 Ensaio de exposição do fungo aos Microplásticos

3.5.1 Inóculo

O isolado fúngico Ff AQ2A foi reativado em placas de Petri (90 mm) contendo PDA. Um volume de 30 μL da suspensão de esporos foi inoculado no centro de cada placa, seguida de incubação a 30 °C por 7 dias. Após esse período, discos de 6 mm foram retirados da região periférica do micélio e transferidos para novas placas de Petri (90 mm) contendo meio mínimo de crescimento composto por água destilada e ágar (15,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). No centro de cada placa, foi previamente inserido um disco de papel filtro Whatman nº 42 (6 mm), utilizado como única fonte de carbono. As placas foram incubadas a 30 °C por mais 7 dias.

3.5.2 Microplástico de Poliestireno

Micropartículas de poliestireno (PS) com tamanho alvo de 250 μm foram obtidas por moagem de fragmentos maiores em moinho de bancada. O material foi peneirado em peneira com malha de 250 μm , utilizando vibrador mecânico calibrado a 70% da capacidade máxima (3.600 rpm) por 15 minutos. As frações retidas foram examinadas em estereoscópio e classificadas morfológicamente conforme critérios descritos por Hidalgo-Ruz et al., (2012), incluindo microfibras, microfragmentos, microesferas e microfilmes. Apenas microesferas foram selecionadas para os ensaios de biodegradação. Quantidades adicionais foram submetidas à triagem manual sob estereoscópio para garantir a homogeneidade morfológica. As amostras finais foram lavadas com etanol 70%, secas à temperatura ambiente (25 °C) e esterilizadas por exposição à radiação UV por 30 minutos (Figura 6).

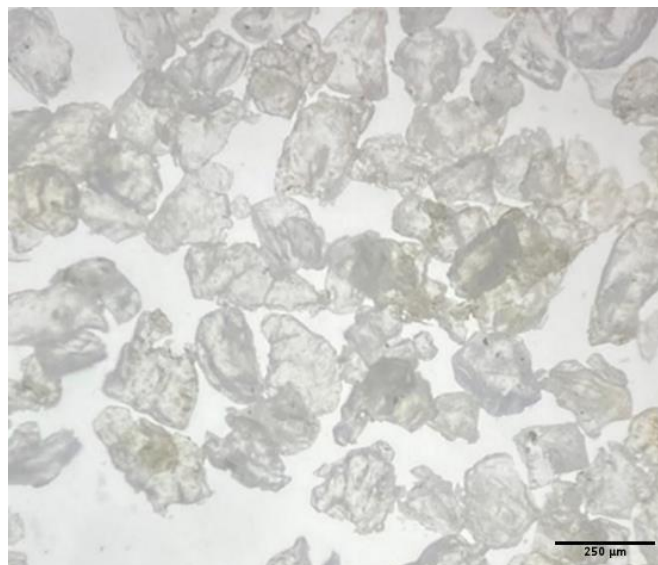


Figura 6: Imagem representativa da morfologia dos microplásticos de poliestireno (PS) utilizados no estudo, registrada em lupa estereoscópica.

3.5.3 Ensaio de Biodegradação

Os ensaios foram realizados conforme metodologia adaptada de Paço et al. (2017) e J. Zhang et al. (2020). O isolado Ff AQ2A foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mínimo diluído ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose, $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de extrato de malte e $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de peptona), cinco discos de micélio fúngico (6 mm) e 0,05 g de micropartículas de PS ($250 \mu\text{m}$). As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação a 150 rpm por 35 dias. Amostragens foram realizadas nos dias 14, 21, 28 e 35. O grupo controle consistiu em cultivos idênticos sem adição de microplásticos. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

3.6 Técnica de biodegradação: Análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A estrutura dos microplásticos de poliestireno submetidos aos ensaios de biodegradação foi analisada por meio de espectrometria FTIR, usando espectrômetro FT-IR Thermo Scientific Nicolet 6700, no intervalo de frequência espectral de $4.000\text{-}450 \text{ cm}^{-1}$. As análises foram realizadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em São Paulo. Os microplásticos virgens e dos ensaios controles ausentes de inóculo também foram analisados e utilizados como referência e comparativo de modificação estrutural.

3.7 Proteômica

3.7.1 Preparação das Amostras

Os extratos foram obtidos conforme protocolo adaptado de Grimsrud et al. (2012) Após o cultivo, as amostras foram submetidas à filtração a vácuo com papel filtro Whatman (45 µm), separando biomassa do sobrenadante (secretoma). A biomassa fúngica foi transferida para tubos cônicos estéreis contendo 1 mL de tampão Urea-Tris (8 M ureia, 40 mM Tris-HCl pH 8.0, 30 mM NaCl, 1 mM ortovanadato de sódio, 1 mM CaCl₂, inibidores de protease e fosfatase 1×). A lise celular foi realizada por sonicação (Qsonica Q55) com amplitude de 50 Hz, utilizando 15 pulsos de 3 segundos repetidos quatro vezes, mantendo-se as amostras em gelo. Após a lise, os homogenatos foram centrifugados a 14.000 rpm por 40 minutos a 4 °C, e os sobrenadantes armazenados a -80 °C.

O sobrenadante (secretoma) foi concentrado utilizando membranas de ultrafiltração (Amicon Ultra, Millipore, EUA) com ponto de corte de 10 kDa por centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A fração retida (>10 kDa) foi lavada com 500 µL de tampão Urea-Tris com inibidores, por centrifugação a 4.500 rpm por 20 minutos a 4 °C, sendo o concentrado final armazenado a -80 °C.

Cem microgramas de proteína foram precipitados com acetona (4:1 v/v), incubados a -20 °C por 2 horas e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O pellet proteico foi ressuspenso em 20 µL de ureia 8 M.

3.7.2 Digestão das Proteínas

As amostras foram diluídas com solução de ureia 8 M até concentração final de 4 M. Ditiotreitól (DTT) foi adicionado até 5 mM e a mistura incubada a 65 °C por 60 minutos. Em seguida, iodoacetamida (IAA) foi adicionado até 15 mM, com incubação por 60 minutos à temperatura ambiente, no escuro. O excesso de IAA foi neutralizado com adição de DTT até concentração final de 10 mM. A digestão proteica foi realizada com tripsina (Promega, Madison, WI, EUA) na proporção 1:50 (enzima:proteína), durante a noite a 37 °C. As amostras foram então acidificadas com ácido fórmico e dessalinizadas. O pH final foi ajustado entre 2 e 4 com TFA 50%, e os peptídeos aplicados em colunas C18 (OASIS, Waters, UK). As colunas

foram lavadas com solução de ACN 5% contendo TFA 0,1%, seguida de eluição com ACN 0,15%. O volume final foi reduzido para 5 μ L em centrifuga a vácuo, e as amostras armazenadas a -80 °C até a análise.

3.7.3 Análise LC-MS/MS

As amostras de peptídeos trípticos foram ressuspensas em 10 a 15 μ L de ácido fórmico a 0,1% e o equivalente a 5 μ g de cada em e analisada da seguinte forma. Foi montado um Sistema Automatizado Básico UltiMate 3000 (Thermo Fisher®, Waltham, MA, EUA) e conectado on-line a um espectrômetro de massa Fusion Lumos Orbitrap (Thermo Fisher®) no centro de espectrometria de massa RPT02H/Instituto Carlos Chagas-Fiocruz, Paraná. A mistura de peptídeos foi separada cromatograficamente em uma coluna (comprimento de 15 cm e diâmetro interno de 75 μ m), embalada in-house com resina ReproSil- Pur C18-AQ 3 μ m (Dr. Maisch GmbH HPLC) com uma taxa de fluxo de 250 nL/min de 5% a 38% de ACN em ácido fórmico a 0,1% em um gradiente de 120 min. O Fusion Lumos Orbitrap foi colocado no modo de aquisição dependente de dados (DDA) para alternar automaticamente entre aquisição de MS de varredura completa e MS/MS com exclusão dinâmica de 60s. Varreduras de pesquisa (300-1500 m/z) foram adquiridas no sistema Orbitrap com uma resolução de 120.000 em m/z 200. Os íons mais intensos capturados em um tempo de ciclo de 2 s foram escolhidos, excluindo aqueles que estavam sem atribuição ou tinham estado de carga 1+. Os íons selecionados foram então isolados em sequência e fragmentados usando HCD (dissociação colisional de energia mais alta) com energia de colisão normalizada de 30%. Os íons fragmentados foram analisados com uma resolução de 50.000 em m/z 200. As condições gerais de espectrometria de massa foram as seguintes: voltagem de spray de 2,3 kV, sem fluxo de gás de suporte ou auxiliar, temperatura do capilar aquecido de 175 °C, controle automático de ganho (AGC) preditivo ativado e um nível de RF de lente S de 30%. As funções de varredura do espectrômetro de massa e os gradientes de solvente nLC foram regulados usando o sistema de dados Xcalibur 4.1 (Thermo Fisher®).

3.7.4 Análise de dados

3.7.4.1 Identificação de Proteínas e Quantificação relativa livre de marcação

Os arquivos de dados brutos (.raw) gerados pelo espectrômetro de massas foram analisados utilizando banco de dados do UNIPROT, com o auxílio do software PEAKS Studio (versão 8.5; Solução de Bioinformática, Waterloo, ON, Canadá) (B. Ma et al., 2003; J. Zhang et al., 2012). Os parâmetros de pesquisa utilizados foram: especificidade enzimática: tripsina; tolerância à massa do precursor ajustada para ± 15 ppm e massa do íon de fragmentação (tolerância $\pm 0,5$ Da); metionina oxidada (+15,99 Da) e acetilação (+42,01 Da) foram definidas como modificações variáveis. A carbamidometilação (+57,02) também foi adicionada como modificação fixa. Os peptídeos identificados foram então classificados por sua confiança local média para selecionar os melhores espectros para anotação e filtrados por $FDR \leq 1\%$. Proteínas enriquecidas do proteoma intracelular foram quantificadas de acordo com a área amostral, em modo de quantificação livre de marcação e apresentadas em mapas de calor em módulos específicos do software PEAKS Studio.

3.7.4.2 Análise Redes de interação proteína-proteína e vias bioquímicas

Para explorar a interação proteína-proteína dos dados obtidos a partir do proteoma quantitativo do fungo filamentoso exposto ou não a presença do microplástico, foi utilizado o STRING (<https://string-db.org>). Para a rede de interação proteína-proteína, várias opções de busca de proteína foram selecionadas para incluir e analisar as diferenças encontradas entre os grupos controle e experimentais. Além disso, um limite rigoroso de alta confiança de 0,7 foi aplicado nas categorias de pontuação mínima de interação necessária, a fim de selecionar apenas a rede de interações significativas.

O STRING é um banco de dados de interações conhecidas e previstas entre proteínas. As interações incluem associações diretas (físicas) e associações indiretas (funcionais); elas derivam de previsões computacionais, da transferência de conhecimento entre organismos e de interações agregadas de outros bancos de dados (primários). As interações no STRING são derivadas de cinco fontes principais: previsões de contexto genômico, experimentos de laboratório de alto rendimento (Coexpressão Conservada), mineração automatizada, conhecimento anterior em bancos de dados e cobertura. O banco de dados STRING atualmente abrange 67.592.464 proteínas de 14.094 organismos (Szklarczyk et al., 2023).

4. Resultados

4.1 Caracterização morfológica e molecular

A Figura 7, itens A e B mostram a macromorfologia e micromorfologia do crescimento do isolado fúngico AQ2A em PDA após o cultivo por 7 dias a 30°C. Foram verificados alguns aspectos morfológicos como pigmentação preta, borda branca, textura arenosa, relevo apiculado. Os conidióforos com estruturas alongadas com paredes lisas e translúcidas, no entanto, exibem uma coloração mais escura na área próxima à vesícula. As cabeças conidiais assumem uma forma esférica e radiada, exibindo uma coloração negra, e são compostas por fiálides bisseriadas (Bleichrodt et al., 2013; Martins et al., 2005).

A análise da amostra purificada por eletroforese em gel de agarose a 2% revelou a detecção de fragmentos com tamanhos de aproximadamente 550 pares de bases (Figura 7, item C). A concentração da amostra foi medida em 37,16 ng/μL, com uma pureza superior a 1,8, indicando assim uma quantidade adequada para a próxima fase de sequenciamento. As sequências dos fragmentos obtidas utilizando o *primer forward* ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3) e o *primer reverse* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) do DNA da linhagem isolada estão demonstradas na Figura 7, item D.

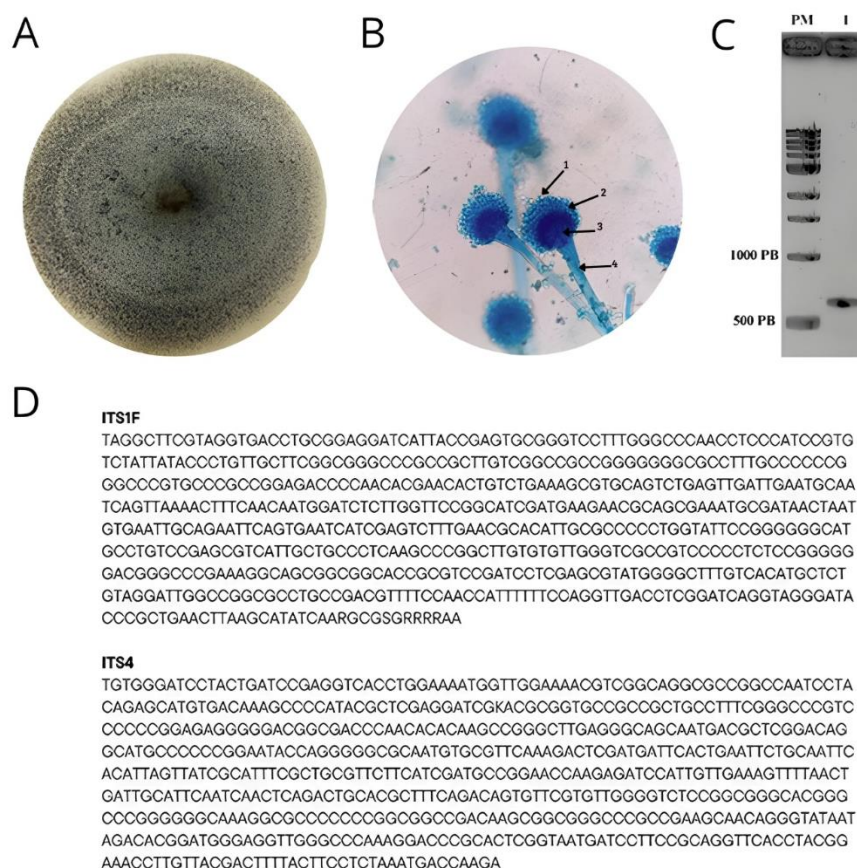


Figura 7. Caracterização morfológica e molecular do isolado fúngico AQ2A. (A) Macromorfologia da colônia em meio PDA após 4 dias de cultivo a 30 °C. (B) Micromorfologia observada em microscópio óptico (aumento de 400×), evidenciando conídios, fiálides, vesícula e conidióforo característicos do gênero *Aspergillus* representados respectivamente em 1, 2, 3 e 4. (C) Produto de amplificação em gel de agarose 2% (linha 1). PM: padrão peso molecular de DNA.

A análise das sequências no MycoBank, por meio de uma busca de alinhamento online, permitiu a identificação a nível de espécie. O resultado indicou uma porcentagem de identidade de 100% para a espécie *Aspergillus tubingensis* (Figura 8).

```

Reference sequence:
UOA/HCPF 8806
UOA/HCPF 8806 ITS
Aspergillus tubingensis, Greece, n3: rDNA sequences ITS

Sequence length: 623

Similarity: 568/568 [100.000%], Gaps: 0 [0.000%], Coverage: 568/568 [100.000%]
Score: 907.311, Probability: 0, Direction: +/+

Qry 24      aggatcattaccgagtgccgggtcctttgggcccacccatccgtgtctattataccc 83
Ref 45      aggatcattaccgagtgccgggtcctttgggcccacccatccgtgtctattataccc 104

Qry 84      tgttgcttcggcgcccgccgctgttcggcgccggggggcgccctttgccccgggc 143
Ref 105     tgttgcttcggcgcccgccgctgttcggcgccggggggcgccctttgccccgggc 164

Qry 144     ccgtgcccgccggagaccccaacacgaacactgtctgaaagcgtgcagtcgtgatt 203
Ref 165     ccgtgcccgccggagaccccaacacgaacactgtctgaaagcgtgcagtcgtgatt 224

Qry 204     gaatgcaatcagttaaaactttcaacaatggatctcttggttcggcatcgatgaagaac 263
Ref 225     gaatgcaatcagttaaaactttcaacaatggatctcttggttcggcatcgatgaagaac 284

Qry 264     gcagcgaaatgcgataactaatgtgaattgcagaattcagtgaaatcatcgagtccttgaa 323
Ref 285     gcagcgaaatgcgataactaatgtgaattgcagaattcagtgaaatcatcgagtccttgaa 344

Qry 324     cgcacattgcgccccctggtattccgggggcatgcctgtccgagcgtcattgctgccct 383
Ref 345     cgcacattgcgccccctggtattccgggggcatgcctgtccgagcgtcattgctgccct 404

Qry 384     caagcccgcttctgtgttggttcgcccgtcccccctctccgggggacgggcccgaagggc 443
Ref 405     caagcccgcttctgtgttggttcgcccgtcccccctctccgggggacgggcccgaagggc 464

Qry 444     agcggcgccacccgctccgatccctcgagcgtatggggcttctcacatgctctgtaggat 503
Ref 465     agcggcgccacccgctccgatccctcgagcgtatggggcttctcacatgctctgtaggat 524

Qry 504     tggccggcgccctgcgacgcttttccaaccatttttccaggttgacctcgatcaggttag 563
Ref 525     tggccggcgccctgcgacgcttttccaaccatttttccaggttgacctcgatcaggttag 584

Qry 564     ggatacccgctgaacttaagcatatcaa 591
Ref 585     ggatacccgctgaacttaagcatatcaa 612

```

Figura 8. Resultado de análise comparativa realizada no MycoBank. Espécie *Aspergillus tubingensis*, com primer Forward ITS1F.

4.2 Análise do crescimento da biomassa durante o processo de biodegradação

O Ff AQ2A formou biomassa de tamanho e aparência variáveis, dependendo da condição de cultivo, tanto na presença MP de PS quanto no controle, conforme mostrado na figura 9. Após 14 dias de incubação, foi observada uma forte associação entre as MPs e PS e a biomassa fúngica, a ponto de não conseguir observar MP no meio de cultura. Notavelmente, a cultura fúngica exibiu uma maior capacidade de crescimento quando exposta aos MPs de PS, apresentando crescimento contínuo até 28 dias, conforme mostrado na figura 10, atingindo um peso máximo médio de 1,32 g.

Foram realizadas duas análises estatísticas, teste t para comparar as médias dos dois grupos e regressão linear do crescimento de biomassa. O valor de t foi - 0,215, sugerindo que a diferença entre as médias dos grupos é mínima em termos de desvios padrão. O valor p associado foi 0,8436, maior que o limiar convencional de 0,05. Na análise de regressão linear

do crescimento de biomassa, O grupo MP apresentou uma pequena taxa de crescimento positiva (0,0131), enquanto o grupo controle apresentou taxa de crescimento negativa (-0,0038). No entanto, os valores p associados a essas taxas foram 0.2271 para o grupo MP e 0.7177 para o grupo Controle, ambos superiores a 0.05.

Portanto, os resultados do teste t e da regressão linear sugerem que não há diferenças estatisticamente significativas nas médias e nas taxas de crescimento de biomassa entre os grupos MP e Controle.

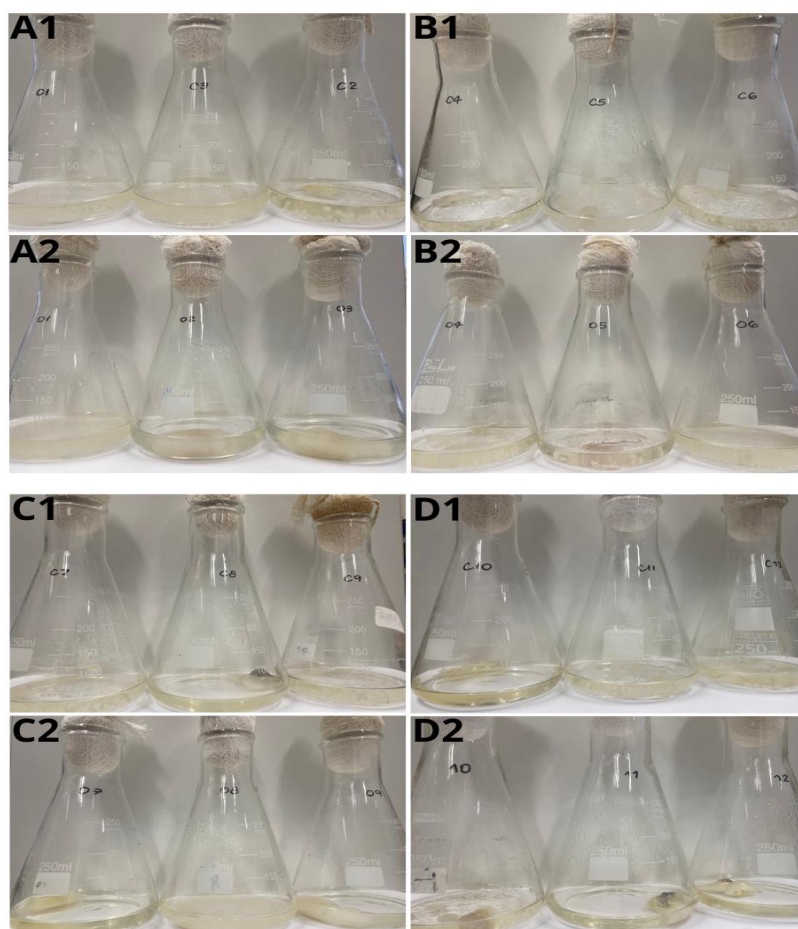


Figura 9: Aparência macroscópica da biomassa de *Aspergillus tubingensis* durante o processo de biodegradação do poliestireno (PS). (A1–D1) Amostras controle, cultivadas sem adição de microplástico, correspondentes aos dias 14, 21, 28 e 35, respectivamente. (A2–D2) Amostras experimentais, cultivadas na presença de microplástico de PS, correspondentes aos mesmos períodos. As imagens foram registradas em bancada por fotografia digital, evidenciando diferenças no crescimento micelial e na interação do fungo com o substrato plástico.

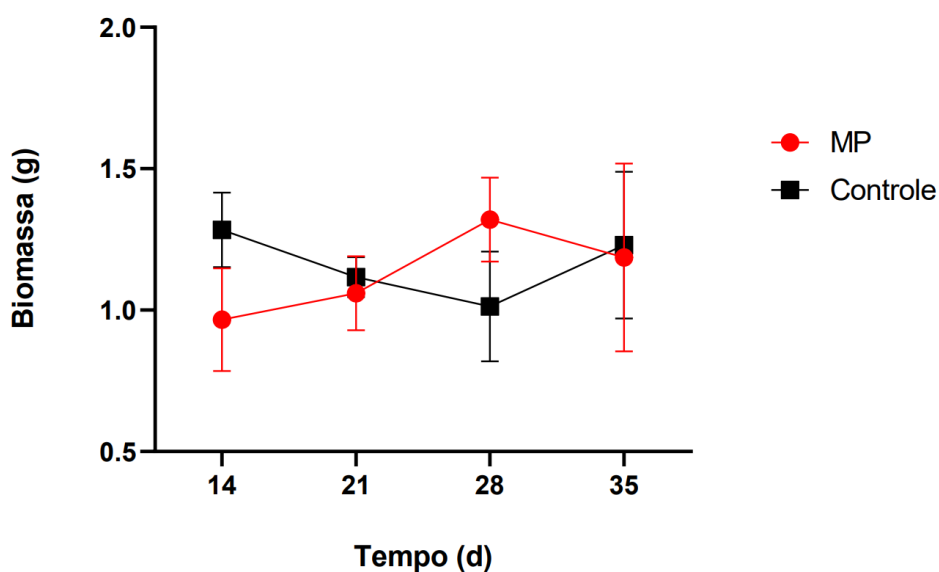


Figura 10: Peso médio da biomassa de *Aspergillus tubingensis* durante o ensaio de biodegradação de MP de PS ao longo de 35 dias.

4.3 Análise do microplástico de poliestireno por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros obtidos para a amostra controle apresentaram bandas características do poliestireno, com estiramentos C–H alifáticos na faixa de 3000 a 2800 cm^{-1} , estiramentos C=C do anel aromático entre 1600 e 1450 cm^{-1} , e deformações fora do plano da estrutura aromática na região de 760 a 700 cm^{-1} , indicando a preservação da integridade estrutural do polímero.

A partir do 14º dia de incubação, foi observada uma redução na intensidade de bandas associadas às estruturas aromáticas (~ 1600 , ~ 1490 e $\sim 760\text{ cm}^{-1}$), o que sugere o início de modificações superficiais na matriz do polímero. No 21º dia, identificou-se o surgimento de uma banda em torno de 1700 cm^{-1} , atribuída à presença de grupos carbonila (C=O), indicativo de processos oxidativos atuando sobre a cadeia polimérica. No 28º dia, essa modificação tornou-se mais evidente, acompanhada por um leve decréscimo nas bandas relacionadas ao núcleo aromático, reforçando o avanço da oxidação.

As alterações espectrais mais significativas foram registradas no 35º dia, com intensificação da banda em $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ e o aparecimento de uma nova banda em $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$, atribuída à presença de grupos hidroxila (–OH). A introdução desses grupos funcionais é compatível com reações de oxidação ou hidrólise promovidas pela atividade fúngica. Além

disso, verificou-se uma atenuação expressiva das bandas entre 760 e 700 cm^{-1} , o que indica a degradação da estrutura aromática, um dos componentes estruturais centrais do PS (Figura 11).

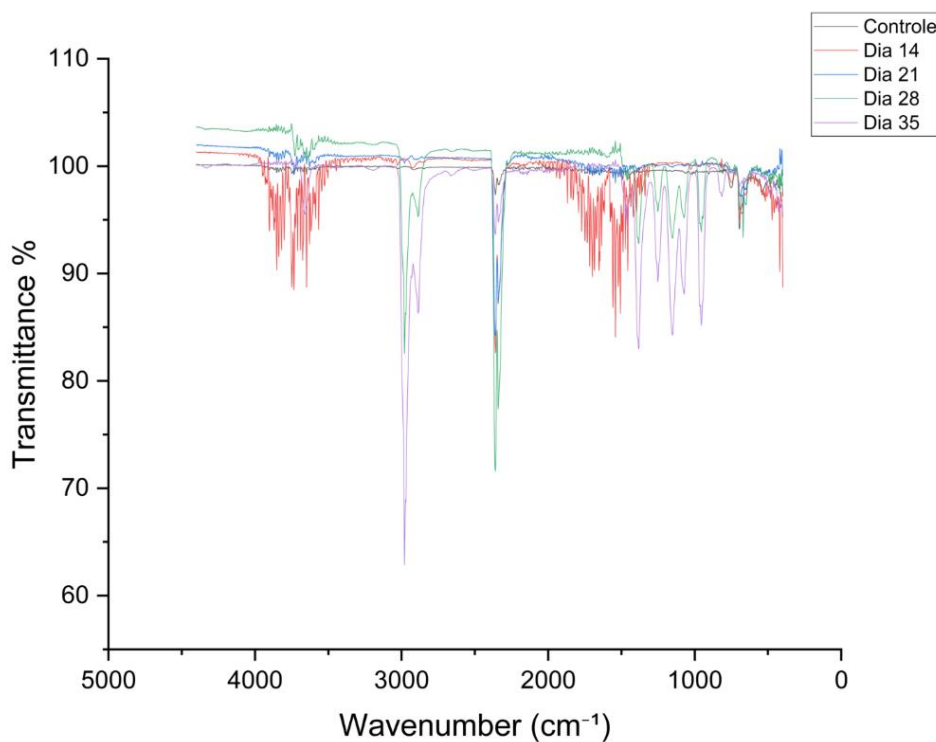


Figura 11: Espectros de FTIR do poliestireno (controle) e após 14, 21, 28 e 35 dias de incubação com *Aspergillus tubingensis*. As análises foram realizadas em espectrofotômetro *Thermo Scientific Nicolet 6700* no intervalo de 4000–450 cm^{-1} . Destacam-se a formação de novas bandas associadas a grupos carbonila ($\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$) e hidroxila ($\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$), indicativas de oxidação da matriz polimérica.

4.4 Análise do proteoma e quantificação relativa durante a exposição do fungo ao microplástico

4.4.1 Tempo de exposição 14 dias

A análise proteômica livre de marcação (*label-free quantification*), realizada no módulo de quantificação do software PEAKS, comparou o perfil de expressão proteica entre o grupo controle e o grupo experimental (*Aspergillus tubingensis* exposto a microplásticos por 14 dias). Foram identificados 187 códigos de acesso proteico, correspondendo a 63 grupos de proteínas diferencialmente expressos, dos quais 41 apresentaram regulação negativa e 22 positiva (Figura 12).

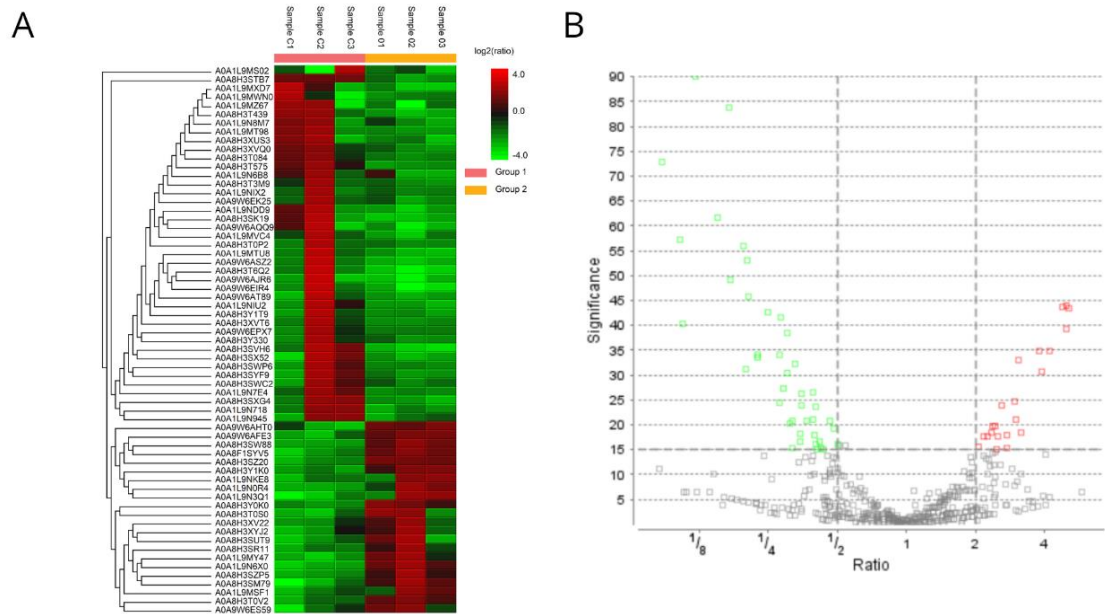


Figura 12. Conjunto de proteínas diferencialmente expressas entre amostras controle e amostras experimentais (fungo na presença do microplástico por 14 dias). Em A, mapa de calor e em B, Volcano plot.

A análise de interação utilizando o banco de dados STRING resultou em uma rede composta por 63 genes e 85 interações funcionais, em contraste com as 41 interações esperadas para um conjunto aleatório de proteínas com características similares. O valor de p para o enriquecimento da rede foi de $1,2 \times 10^{-9}$, indicando um enriquecimento estatisticamente significativo. Os três principais grupamentos funcionais, categorizados com base na organização em módulos (*clusters*), foram: a) 14 proteínas relacionadas ao alongamento translacional, hidrólise de GTP e à união da subunidade ribossomal 60S; b) 5 proteínas associadas a espécies reativas de oxigênio, peróxido de hidrogênio e atividade antioxidante; e c) proteínas envolvidas no ciclo do ácido cítrico e na cadeia transportadora de elétrons (Figura 13).

associados ao ribossomo citosólico e 4 à subunidade ribossomal maior citosólica (Figura 14, C).

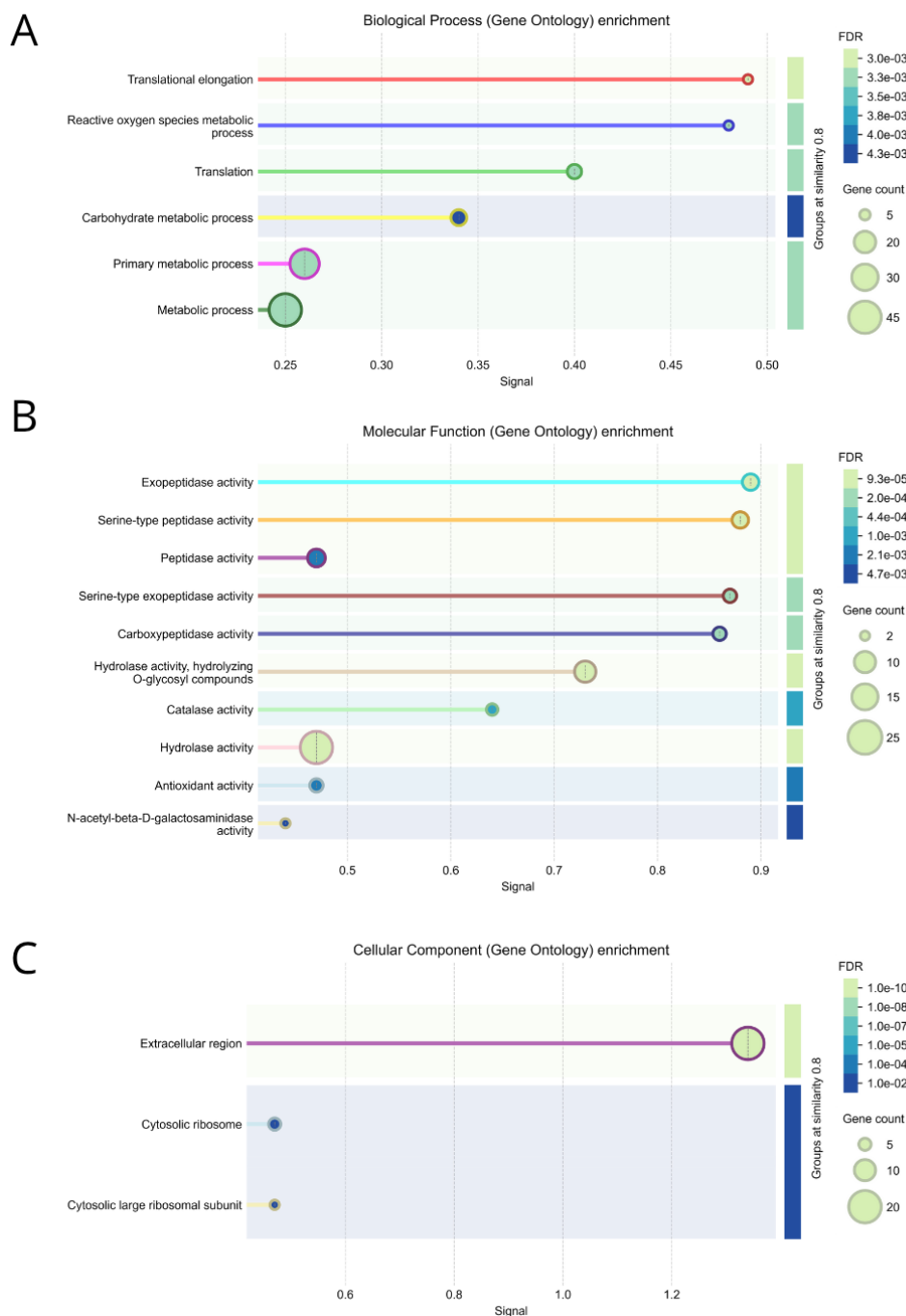


Figura 14. Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos segundo processos biológicos, função molecular e componente celular do proteoma intracelular de *A. tubingensis* após 14 dias de exposição ao microplástico de poliestireno.

4.4.2 Tempo de exposição 21 dias

A análise do proteoma intracelular de *Aspergillus tubingensis* após 21 dias de incubação com microplástico de poliestireno revelou alterações significativas no perfil de proteínas. A partir do módulo de quantificação do software PEAKS, foram identificados 172 códigos de acesso de proteínas, organizados em 55 grupos proteicos distintos. Dentre essas, 55 proteínas apresentaram expressão diferencial, sendo 19 reguladas positivamente (up-reguladas) e 36 reguladas negativamente (down-reguladas).

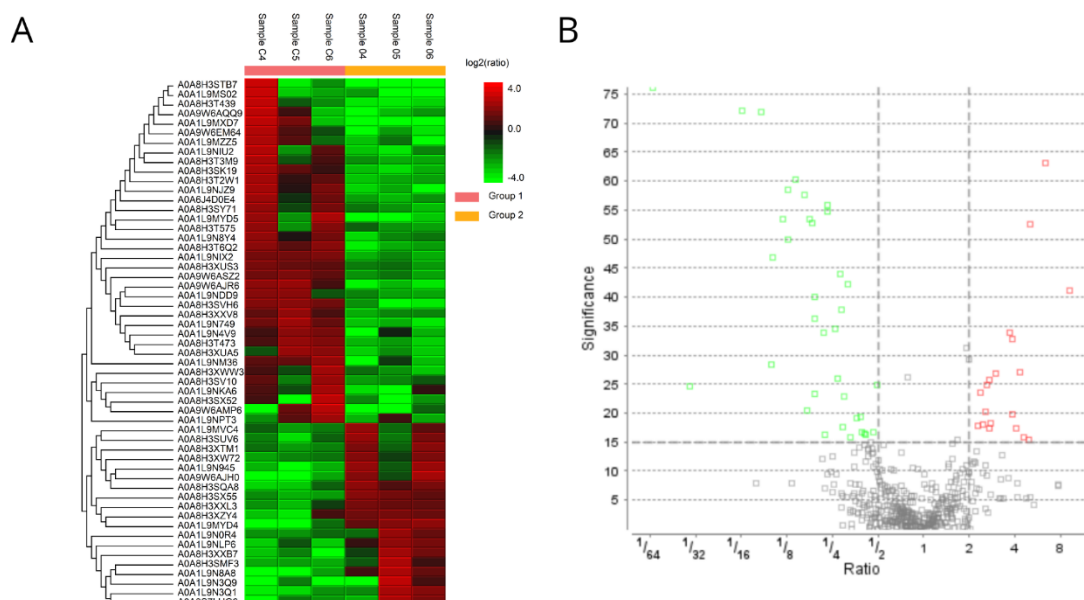


Figura 15. Conjunto de proteínas diferencialmente expressas entre amostras controle e amostras experimentais (fungo na presença do microplástico por 21 dias). Em A, mapa de calor e em B, Volcano plot.

A rede de interação proteína-proteína (PPI) construída com o programa STRING apresentou 53 proteínas com 46 interações observadas, em comparação com 28 interações esperadas para um conjunto aleatório com distribuição de grau semelhante. O valor de p para o enriquecimento foi de 0,00151, indicando que a rede possui um número de interações significativamente maior do que o esperado por acaso. Esse resultado sugere uma possível conectividade funcional entre os componentes analisados. A partir da análise de agrupamentos (*clusters*), destacaram-se dois principais grupos funcionais: um associado ao ribossomo

citosólico (com 11 proteínas) e outro relacionado à degradação de glicosaminoglicanos e à atividade de hidrolases pertencentes à família 88 de glicosil hidrolases (com 4 proteínas).

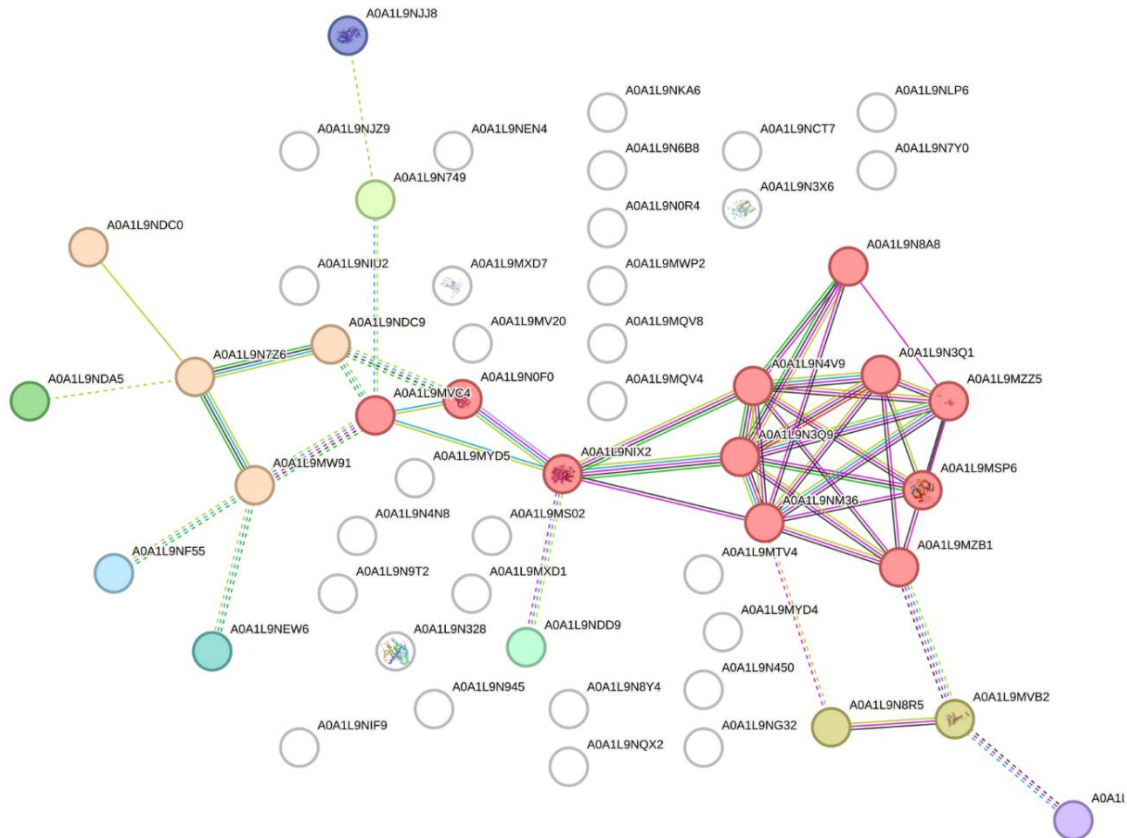
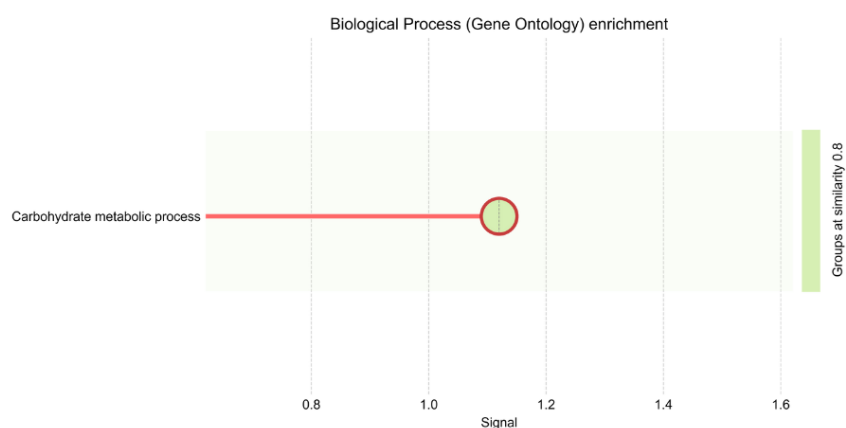


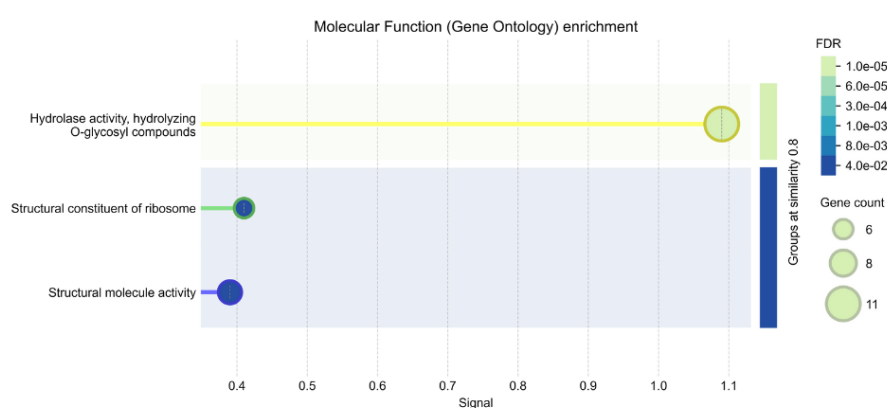
Figura 16. Rede de interação funcional e grupamentos modulares (*clusters*) no STRING no proteoma intracelular de *A. tubingensis* após 21 dias de exposição ao microplástico de poliestireno.

A análise de ontologia gênica (GO), também realizada no STRING, apontou como categorias predominantes nos seguintes domínios: Processos biológicos: 17 proteínas envolvidas no processo metabólico de carboidratos; Função molecular: 7 proteínas com atividade estrutural, 6 com função de constituinte estrutural do ribossomo e 11 associadas à atividade hidrolase, especialmente na hidrólise de compostos O-glicosilados; Componente celular: 15 proteínas localizadas na região extracelular e 7 relacionadas ao ribossomo.

A



B



C

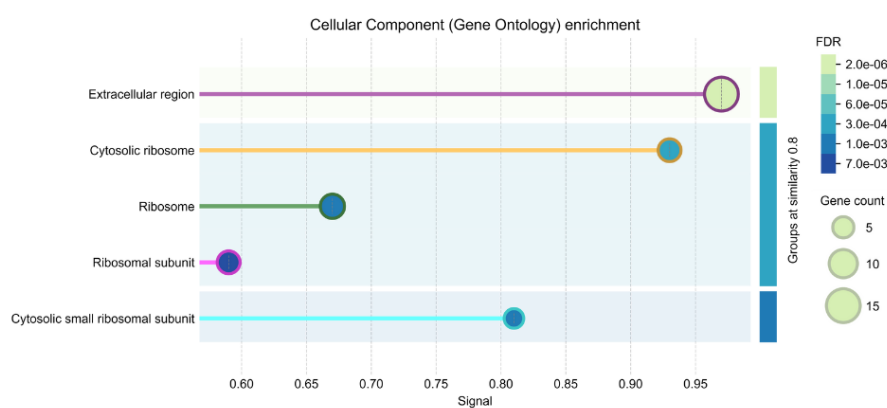


Figura 17. Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos segundo processos biológicos, função molecular e componente celular do proteoma intracelular de *A. tubingensis* após 21 dias de exposição ao microplástico de poliestireno.

4.4.3 Tempo de exposição 28 dias

A análise proteômica do compartimento intracelular de *Aspergillus tubingensis*, incubado por 28 dias na presença de microplástico de poliestireno, foi conduzida por meio do

módulo de quantificação livre de marcação do software PEAKS, utilizando-se como referência um grupo controle cultivado na ausência de plástico. Foram identificados 167 códigos de acesso de proteínas, agrupados em 78 grupos proteicos. A análise do mapa de calor revelou um total de 78 proteínas diferencialmente expressas, sendo 76 delas reguladas negativamente e apenas 2 reguladas positivamente em resposta à exposição ao poliestireno.

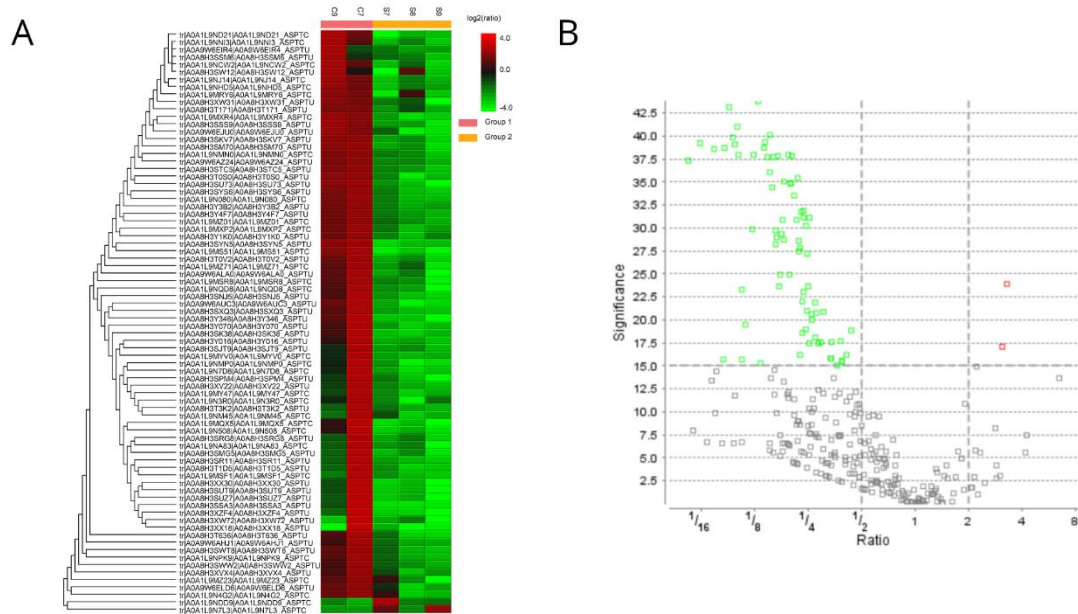
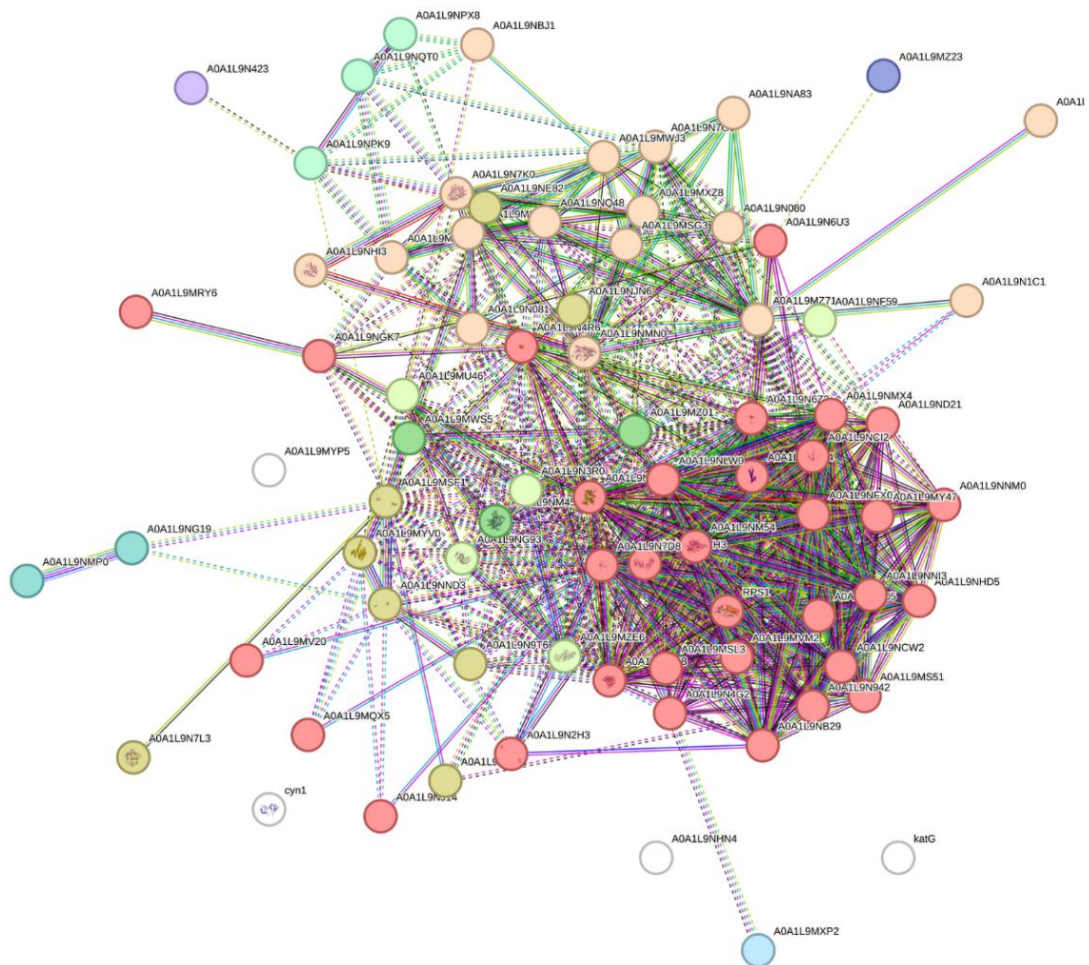


Figura 18. Conjunto de proteínas diferencialmente expressas entre amostras controle e amostras experimentais (fungo na presença do microplástico por 28 dias). Em A, mapa de calor e em B, Volcano plot.

A análise de interações proteína-proteína (PPI), realizada com base nos dados obtidos, por meio da plataforma STRING, resultou em uma rede composta por 78 nós e 665 interações (edges), superando significativamente o número de interações esperadas (409), com um valor de enriquecimento altamente significativo (PPI enrichment p-value < 1,00E-16). A análise de clusterização funcional indicou a formação de agrupamentos majoritariamente relacionados a processos celulares fundamentais, destacando-se os seguintes módulos funcionais: tradução (33 proteínas), via das pentoses fosfato (17), regulação da dinâmica de actina na formação do “phagocytic cup” (8), remodelamento proteico (5), agrupamentos mistos incluindo complexo de poro nuclear e domínios tipo citocromo c (3), além da biossíntese de acetato (3).



A anotação funcional com base nos termos do Gene Ontology revelou 52 termos associados a processos biológicos, sendo os mais representativos: tradução (20 proteínas), processo biossintético de amidas (21), processo metabólico de peptídeos (21), metabolismo celular de amidas (22) e metabolismo de compostos organonitrogenados (25). Em relação à função molecular, foram identificados 17 termos, com destaque para constituinte estrutural do ribossomo (16), atividade estrutural de moléculas (18), atividade relacionada à tradução (4), bem como elevada ocorrência de proteínas com capacidade de ligação a compostos heterocíclicos e orgânicos cíclicos (42 proteínas em cada categoria). Quanto à classificação por componente celular, foram observados 13 termos, com predominância de ribossomos (16), organelas intracelulares não delimitadas por membrana (26) e estruturas anatômicas intracelulares (66).

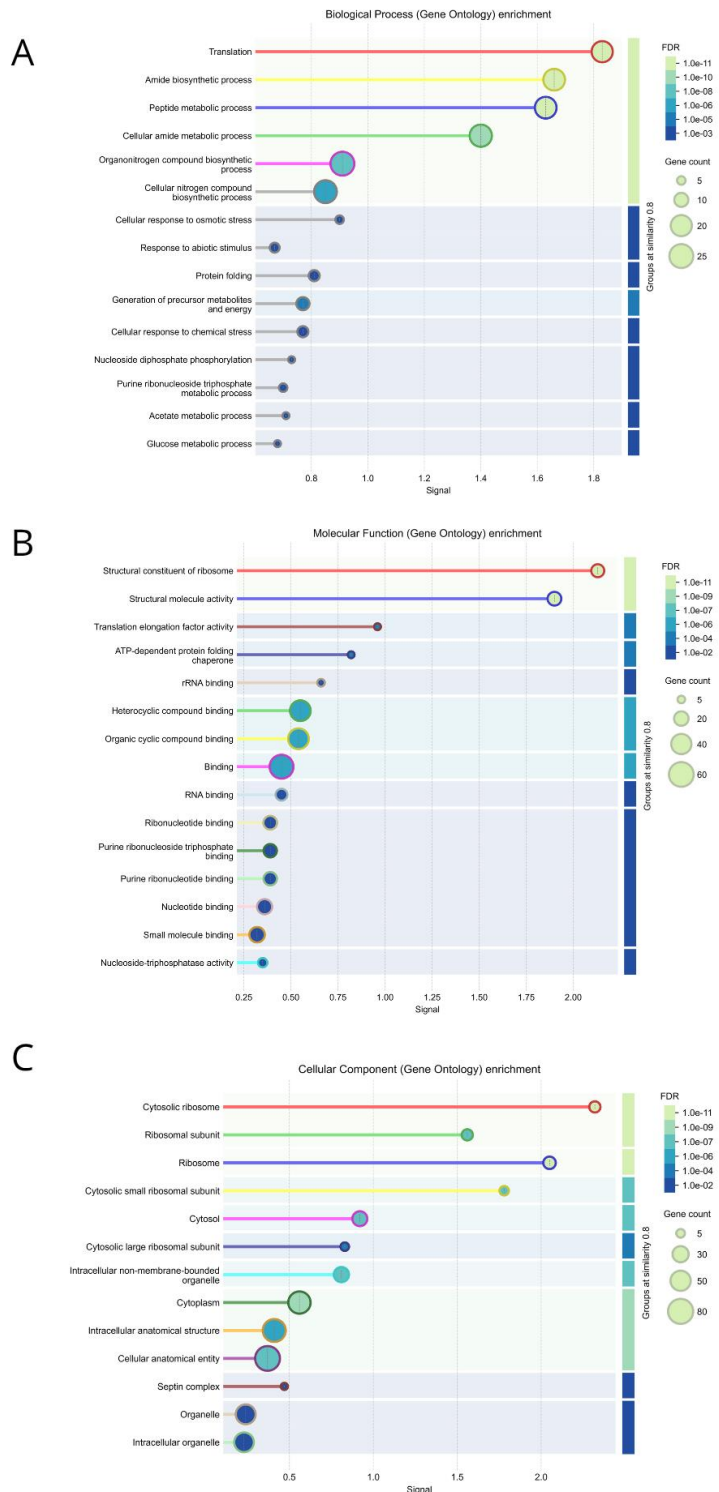


Figura 20. Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos segundo processos biológicos, função molecular e componente celular do proteoma intracelular de *A. tubingensis* após 28 dias de exposição ao microplástico de poliestireno.

4.4.4 Tempo de exposição 35 dias

A análise proteômica do *Aspergillus tubingensis* após 35 dias de incubação com microplásticos de poliestireno, em comparação com o controle sem microplástico, foi realizada utilizando o módulo de quantificação livre de marcação do software PEAKS. Foram identificados 203 acessos de proteínas, distribuídos em 57 grupos distintos. Entre essas proteínas, 56 foram reguladas positivamente e apenas 1 foi regulada negativamente na condição com microplástico.

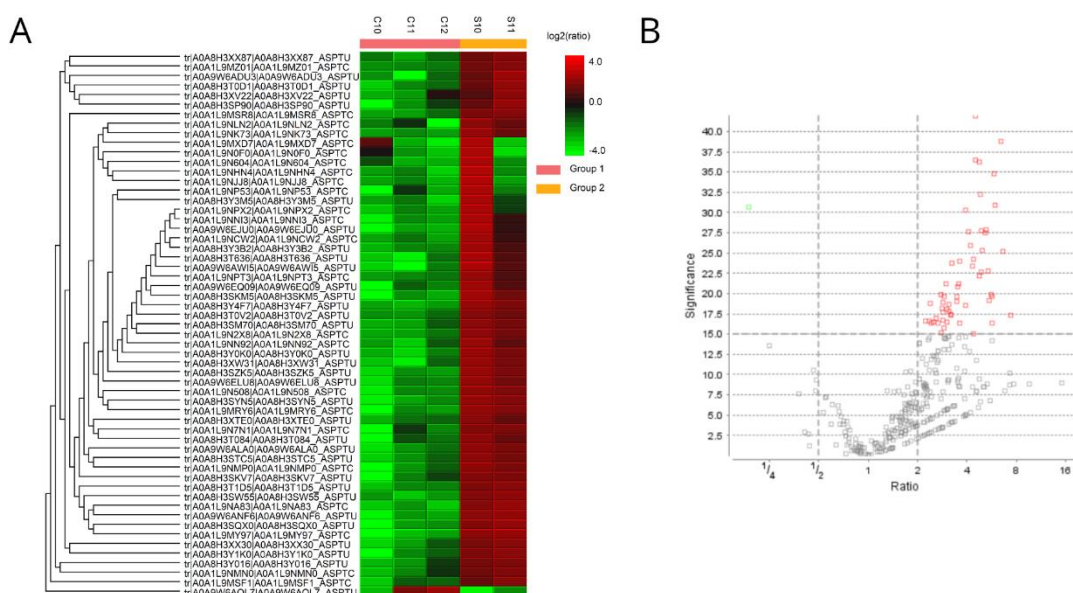


Figura 21. Conjunto de proteínas diferencialmente expressas entre amostras controle e amostras experimentais (fungo na presença ou não do microplástico por 35 dias). Em A, mapa de calor e em B, Volcano plot.

A análise de interação proteica (PPI) conduzida na plataforma STRING revelou uma rede composta por 59 nós e 319 interações (edges), número substancialmente superior ao esperado (158 interações), indicando um valor de enriquecimento de PPI altamente significativo ($p < 1e-16$). A análise de agrupamento (clusters) funcional evidenciou a presença de quatro principais conjuntos de proteínas: 17 associadas à hidrólise de GTP e à união da subunidade ribossomal 60S, 8 envolvidas no processo glicolítico, 6 relacionadas à organização do anel contrátil actomiosina e 5 associadas à desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

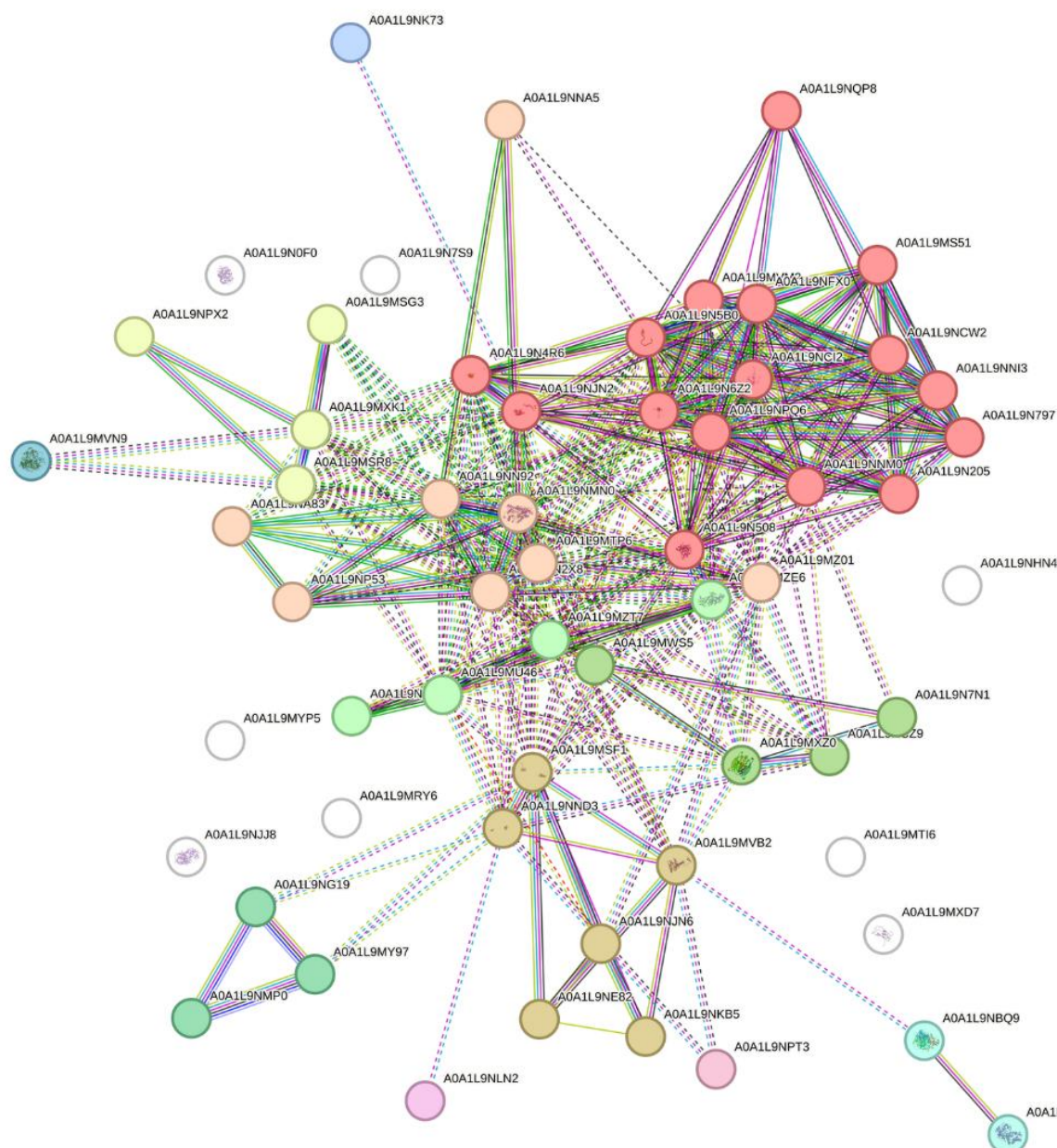


Figura 22. Rede de interação funcional e grupamentos modulares (clusters) no STRING no proteoma intracelular de *A. tubingensis* após 35 dias de exposição ao microplástico de poliestireno.

A análise dos termos de ontologia gênica (Gene Ontology) revelou, no âmbito de processos biológicos, a participação de proteínas em citocinese dependente do citoesqueleto (6 proteínas), processo metabólico de ATP (6), dobramento de proteínas de novo (4), citocinese mitótica (4) e tradução (12). Em relação à função molecular, foram identificadas proteínas envolvidas na constituição estrutural de ribossomos (11), atividade estrutural molecular (12), ligação a compostos heterocíclicos (28) e ligação a trifosfatos de ribonucleosídeos de purina (14). No que se refere ao componente celular, observou-se enriquecimento em ribossomos

citossólicos (9), organelas intracelulares não delimitadas por membrana (23), estruturas anatômicas intracelulares (50) e elementos do citoesqueleto (9).

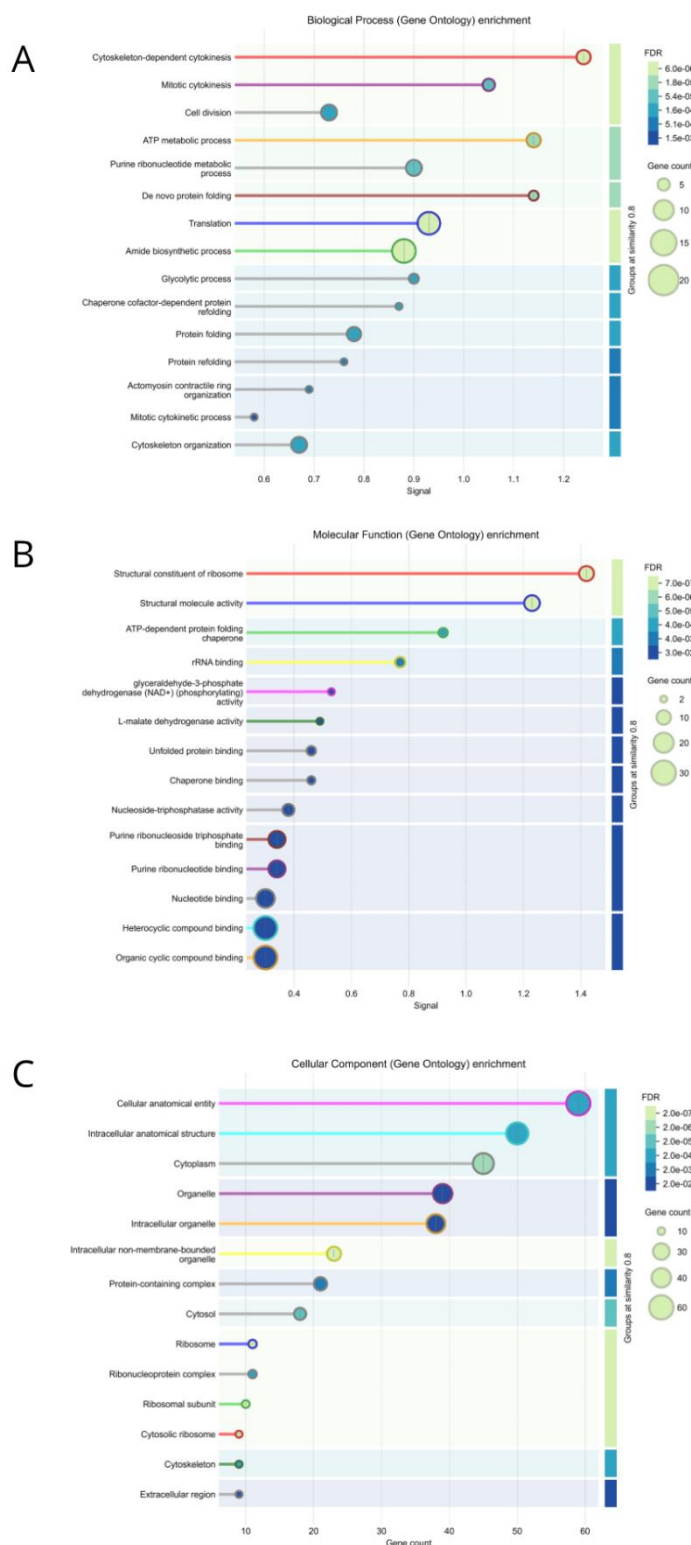


Figura 23. Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos segundo processos biológicos, função molecular e componente celular do proteoma intracelular de *A. tubingensis* após 35 dias de exposição ao microplástico de poliestireno.

5. Discussão

A crescente preocupação com a poluição por microplásticos, especialmente o poliestireno (PS), tem impulsionado a busca por soluções biotecnológicas sustentáveis. Entre os organismos com potencial promissor para a biodegradação desses polímeros, destaca-se *Aspergillus tubingensis*, um fungo filamentoso reconhecido por sua versatilidade enzimática. Neste estudo, investigamos as respostas fisiológicas e moleculares de *A. tubingensis*, isolado de sedimento de mangue, ao longo de 35 dias de exposição ao microplástico de PS, avaliando as alterações no proteoma intracelular e os dados espectroscópicos obtidos por FTIR no material polimérico exposto, como discutido a seguir.

A exposição de *Aspergillus tubingensis* a microplástico de poliestireno ao longo de 35 dias desencadeou respostas fisiológicas e metabólicas complexas, reveladas pela integração das análises proteômicas intracelulares, ontologia genética (GO), espectroscopia FTIR e monitoramento da biomassa fúngica. A sequência temporal dessas respostas revela os mecanismos moleculares e celulares que sustentam o potencial do fungo para biodegradar o PS.

Nos primeiros 14 dias de incubação, a ontologia funcional evidenciou forte enriquecimento em “tradução” e “alongamento translacional”, sugerindo um aumento significativo na biossíntese proteica, como estratégia inicial do fungo para enfrentar o estresse imposto pelo contato com o PS. No grupo experimental destacaram-se as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, oxidoredutase de cadeia curta e ATP-sintase, sinalizando reorganização metabólica inicial. Lipases, esterases e peroxidases, enzimas reconhecidas como catalisadoras da fragmentação oxidativa de PS (Chaudhary & Vijayakumar, 2020) também foram detectadas (Tabela 1). No controle, a expressão manteve-se restrita a vias de manutenção basal.

Tabela 1: Principais proteínas/enzimas diferencialmente expressas por *Aspergillus tubingensis* após 14 dias de exposição ao poliestireno.

Proteína/enzima	Função principal	Relevância na biodegradação de PS
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Metabolismo glicolítico	Reorganização energética inicial frente ao estresse do PS
Oxidoredutase de cadeia curta	Reações redox	Geração de metabólitos oxidativos associados à fragmentação inicial

Proteína/enzima	Função principal	Relevância na biodegradação de PS
ATP-sintase	Produção de ATP	Suporte energético para resposta ao estresse e secreção
Esterases/lipases	Hidrólise de ligações éster	Início da fragmentação da matriz do PS
Peroxidases	Oxidação de polímeros	Formação de grupos carbonila detectados por FTIR

Entre os dias 14 e 21, o perfil metabólico sofreu alterações significantes. No grupo experimental, processos biológicos relacionados ao metabolismo secundário, resposta ao estresse oxidativo e detoxificação celular tornaram-se dominantes. Observou-se maior expressão de proteínas antioxidantes e redox, como superóxido dismutase, peroxirredoxina e HSP70, além de transportadores ABC, sugerindo um mecanismo ativo de exportação de metabólitos tóxicos resultantes da fragmentação do PS (Tabela 2). Essa mudança metabólica foi acompanhada pela intensificação no FTIR das bandas carbonílicas ($\sim 1715 \text{ cm}^{-1}$), típicas da oxidação avançada do polímero, o que corrobora relatos anteriores sobre biodegradação fúngica de PS por espécies de *Aspergillus*, como demonstrado por Chaudhary & Vijayakumar (2020). No controle, prevaleceram proteínas de metabolismo energético basal, sem ativação robusta de vias redox.

Tabela 2: Principais proteínas/enzimas diferencialmente expressas por *Aspergillus tubingensis* após 21 dias de exposição ao poliestireno.

Proteína/enzima	Função principal	Relevância na biodegradação de PS
Superóxido dismutase (SOD)	Defesa antioxidante	Neutralização de ROS gerados pela oxidação do PS
Peroxirredoxina	Redox/antioxidante	Proteção contra danos oxidativos e manutenção celular
HSP70 (chaperona)	Dobramento proteico	Proteção contra estresse oxidativo causado pelo PS
Transportadores ABC	Transporte ativo	Exportação de metabólitos tóxicos derivados do PS
Endo-poligalacturonases	Degradação de polissacarídeos	Sugerem potencial de ação hidrolítica adaptada ao PS

O período entre 21 e 28 dias marcou o pico de atividade metabólica no grupo experimental, evidenciado pela diversidade dos processos biológicos relacionados ao catabolismo de compostos orgânicos e xenobióticos, e pela mobilização energética mitocondrial. Funções moleculares destacadas incluíram hidrolases (esterases e lipases),

glutathione S-transferases, monooxygenases e oxidoreductases, sugerindo intensa fragmentação do PS e geração de intermediários potencialmente metabolizáveis (Tabela 3). Khan et al., (2017) mostraram, por meio de análises enzimáticas (atividade esterase/lipase), espectrometria na região do infravermelho acoplada à reflectância total atenuada (ATR-FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), que *A. tubingensis* degrada poliéster-poliuretano e aumenta a produção de enzimas oxidativas, padrão que converge com a resposta enzimática observada neste estudo. O retículo endoplasmático foi um dos compartimentos na classificação de componente celular significativamente representado nesse período, sugerindo intensificação de processos secretórios. Paralelamente, a forte alteração das bandas FTIR relacionadas a grupos carbonila e hidroxila confirmou o aumento da hidrofilicidade e da biodegradabilidade superficial do polímero. Em contrapartida, o grupo controle não apresentou mudanças marcantes em relação à expressão de proteínas antioxidantes ou secretórias, reforçando que as mudanças observadas eram específicas em resposta a exposição com PS.

Tabela 3 – Principais proteínas/enzimas diferencialmente expressas por *Aspergillus tubingensis* após 28 dias de exposição ao poliestireno.

Proteína/enzima	Função principal	Relevância na biodegradação de PS
Esterases/lipases	Hidrólise	Pico de atividade hidrolítica, fragmentação do PS
Glutathione S-transferases (GSTs)	Detoxificação	Conjugação de metabólitos tóxicos derivados do PS
Monooxygenases	Oxidação enzimática	Introdução de grupos hidroxila/carbonila no PS (confirmado por FTIR)
Oxidoreductases	Reações redox	Intensificação da oxidação da matriz polimérica
Proteínas do RE	Processamento/Secreção	Indicam secreção ativa de enzimas hidrolíticas

No dia 35, observou-se uma diminuição na atividade metabólica do grupo experimental, com estabilização de processos associados à homeostase redox e manutenção intracelular. Entretanto, diferentemente dos períodos anteriores, enzimas essenciais à biodegradação direta do PS, como lipases e esterases, não foram detectadas com a mesma intensidade no grupo experimental (Tabela 4). Curiosamente, no grupo controle, proteínas relacionadas ao estresse celular permaneceram expressas até o final do cultivo. Esse contraste sugere que o fungo exposto ao microplástico pode ter atenuado sua resposta ao estresse oxidativo, possivelmente devido à adaptação ao microambiente criado pela presença prolongada do PS. Uma interpretação plausível para esse fenômeno é que o estresse persistente observado no controle

decorra do déficit nutricional inerente ao crescimento em meio mínimo, mantendo ativo os mecanismos de defesa metabólica devido à ausência de substratos suficientes. Em oposição, o grupo experimental poderia ter reduzido sua resposta ao estresse por utilizar fragmentos gerados da degradação parcial do PS como fonte alternativa de carbono, ou pela indução de mecanismos adaptativos antioxidantes que atenuaram a pressão fisiológica. As bandas FTIR estabilizaram-se neste período, indicando saturação dos sítios oxidáveis do PS.

Tabela 4: Principais proteínas/enzimas diferencialmente expressas por *Aspergillus tubingensis* após 35 dias de exposição ao poliestireno.

Proteína/enzima	Função principal	Relevância na biodegradação de PS
Catalases	Antioxidante	Manutenção do equilíbrio redox intracelular
HSPs	Chaperonas	Estabilidade proteica em fase de adaptação
Proteínas mitocondriais	Energia/respiração	Suporte energético residual
Ausência relativa de lipases/esterases	-	Sugere estabilização do processo e redução da fragmentação ativa
Proteínas de parede celular	Estruturais	Relacionadas à aderência do micélio ao PS

Embora o ganho de biomassa não tenha diferido estatisticamente entre os grupos, a aderência micelial ao PS, as alterações observadas no FTIR e a expressão diferencial de proteínas secretórias sustentam a ocorrência de biodegradação sem necessidade de grande aumento de biomassa. Revisões recentes indicam que a biodegradação fúngica de plásticos sintéticos nem sempre se traduz em aumentos expressivos de biomassa, ocorrendo, em geral, uma resposta metabólica específica voltada à adaptação ao substrato xenobiótico (Srikanth et al., 2022; Zeghal et al., 2021).

Diversos autores (Ekanayaka et al., 2025; Habib Ullah et al., 2025; Temporiti et al., 2022) enfatizam que lipases, esterases, peroxidases, monooxigenases e a enzima acessória superóxido dismutase são centrais na degradação fúngica de polímeros sintéticos, corroborando as enzimas detectadas entre os dias 14 e 28. A prevalência de proteínas ligadas ao retículo endoplasmático e ao tráfego vesicular reforça a necessidade de investigar o secretoma para confirmar a exportação das hidrolases responsáveis pela degradação extracelular do PS.

Assim, *A. tubingensis* percorreu quatro estágios sucessivos: preparação biossintética com defesa oxidativa leve; intensificação de vias redox e início da fragmentação; pico hidrolítico e secreção enzimática robusta; e fase de homeostase antioxidante. Esses achados sugerem o potencial biotecnológico do fungo na mitigação de resíduos de poliestireno e

fundamentam a importância de estudos mais longos, incluindo análise do secretoma, para elucidar plenamente os mecanismos extracelulares de mineralização do PS.

6. Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que *Aspergillus tubingensis* é capaz de desencadear uma resposta fisiológica e proteômica coordenada frente à exposição ao poliestireno, ativando vias relacionadas à biossíntese, detoxificação e degradação de substratos recalcitrantes. As análises por FTIR indicaram modificações estruturais no polímero ao longo do cultivo, enquanto o perfil proteômico revelou expressão diferencial de enzimas como oxidoredutases, peroxidases, lipases e transportadores ABC, especialmente nos grupos expostos ao PS. A ontologia gênica (GO) reforçou a atuação dessas proteínas em processos biológicos associados à resposta ao estresse, metabolismo secundário e transporte de metabólitos. Embora não tenha sido detectado aumento estatisticamente significativo na biomassa, a associação física do micélio com o PS e a dinâmica proteômica evidenciam um processo de biofragmentação ativo. Esses achados contribuem para o avanço do entendimento sobre mecanismos fúngicos de adaptação e degradação de microplásticos, abrindo caminho para futuras aplicações biotecnológicas na mitigação da poluição por poliestireno.

7. Perspectivas Futuras

Embora este estudo tenha fornecido evidências importantes sobre as respostas intracelulares de *Aspergillus tubingensis* frente à exposição ao poliestireno, análises adicionais são necessárias para ampliar a compreensão dos mecanismos de biodegradação. Em particular, destaca-se a necessidade de investigar o proteoma extracelular (secretoma), uma vez que a degradação de polímeros sintéticos envolve, em grande parte, a ação de enzimas secretadas no meio. A caracterização dessas proteínas poderá complementar os achados obtidos neste trabalho, permitindo identificar enzimas-chave envolvidas diretamente na oxidação, fragmentação e metabolização do poliestireno. Assim, estudos futuros que integrem análises combinadas do proteoma intracelular e extracelular serão fundamentais para elucidar de forma mais completa os mecanismos bioquímicos e celulares que sustentam o potencial de *A. tubingensis* como agente de biorremediação de microplásticos.

Referências bibliográficas

- Ali, S. S., Elsamahy, T., Al-Tohamy, R., Zhu, D., Mahmoud, Y. A. G., Koutra, E., Metwally, M. A., Kornaros, M., & Sun, J. (2021). Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects. *Science of The Total Environment*, 780, 146590. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.146590>
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., & Pillai, S. (2021). Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. *Science of The Total Environment*, 759, 143536. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143536>
- Andrady, A. L. (2017). The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2017.01.082>
- Atiweh, G., Mikhael, A., Parrish, C. C., Banoub, J., & Le, T. A. T. (2021). Environmental impact of bioplastic use: A review. *Heliyon*, 7(9), e07918. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E07918>
- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, 102, 165–176. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2017.02.013>
- Baggerman, G., Vierstraete, E., Loof, A. De, & Schoofs, L. (2005). Gel-Based Versus Gel-Free Proteomics: A Review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 8(8), 669–677. <https://doi.org/10.2174/138620705774962490>
- Bleichrodt, R., Vinck, A., Krijgsheld, P., van Leeuwen, M. R., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013). Cytosolic streaming in vegetative mycelium and aerial structures of *Aspergillus niger*. *Studies in Mycology*, 74(1), 31. <https://doi.org/10.3114/SIM0007>
- Britto Martins de Oliveira, J., Corrêa Junior, D., Parente, C. E. T., & Frases, S. (2025). Fungi in Mangrove: Ecological Importance, Climate Change Impacts, and the Role in Environmental Remediation. *Microorganisms*, 13(4), 878. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS13040878>
- Bugatti, C., Almeida, K. C. de, Guimarães, M. S. de A., & Amâncio, N. de F. G. (2023). Microplastics and Nanoplastic and their relevance in human health: literature review. *Research*,

Society and Development, 12(1), e6712139302–e6712139302. <https://doi.org/10.33448/RSD-V12I1.39302>

Cai, Z., Li, M., Zhu, Z., Wang, X., Huang, Y., Li, T., Gong, H., & Yan, M. (2023). Biological Degradation of Plastics and Microplastics: A Recent Perspective on Associated Mechanisms and Influencing Factors. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 1661, 11(7), 1661. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11071661>

Castañeta, G., Gutiérrez, A. F., Nacaratte, F., & Manzano, C. A. (2020). Microplásticos: un contaminante que crece en todas las esferas ambientales, sus características y posibles riesgos para la salud pública por exposición. *Revista Boliviana de Química*, 37(3), 142–157. <https://doi.org/10.34098/2078-3949.37.3.4>

Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020a). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(9), 3494–3511.

Chaudhary, A. K., & Vijayakumar, R. P. (2020). Effect of chemical treatment on biological degradation of high-density polyethylene (HDPE). *Environment, Development and Sustainability*, 22(2), 1093–1104. <https://doi.org/10.1007/S10668-018-0236-6/FIGURES/4>

Chauhan, R. S., Gopinath, S., Razdan, P., Delattre, C., Nirmala, G. S., & Natarajan, R. (2008). Thermal decomposition of expanded polystyrene in a pebble bed reactor to get higher liquid fraction yield at low temperatures. *Waste Management*, 28(11), 2140–2145. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.10.001>

Chia, W. Y., Ying Tang, D. Y., Khoo, K. S., Kay Lup, A. N., & Chew, K. W. (2020). Nature's fight against plastic pollution: Algae for plastic biodegradation and bioplastics production. *Environmental Science and Ecotechnology*, 4, 100065. <https://doi.org/10.1016/J.ESE.2020.100065>

Cologna, N. de M. di, Gómez-Mendoza, D. P., Zanoelo, F. F., Giannesi, G. C., Guimarães, N. C. de A., Moreira, L. R. de S., Filho, E. X. F., & Ricart, C. A. O. (2018a). Exploring Trichoderma and Aspergillus secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme and Microbial Technology*, 109, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2017.08.007>

da Silveira Bastos, I. M. A., Cadamuro, R. D., de Freitas, A. C. O., da Silva, I. T., Stoco, P. H., Sandjo, L. P., Treichel, H., Fongaro, G., Robl, D., & Steindel, M. (2024). Diversity of fungal endophytes from mangrove plants of Santa Catarina Island, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(2), 1477. <https://doi.org/10.1007/S42770-023-01234-5>

Dong, Y., Gao, M., Song, Z., & Qiu, W. (2020). As(III) adsorption onto different-sized polystyrene microplastic particles and its mechanism. *Chemosphere*, 239, 124792. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124792>

Du, H., & Wang, J. (2021). Characterization and environmental impacts of microplastics. *Gondwana Research*, 98, 63–75. <https://doi.org/10.1016/J.GR.2021.05.023>

Duong, V. A., & Lee, H. (2023). Bottom-Up Proteomics: Advancements in Sample Preparation. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 5350, 24(6), 5350. <https://doi.org/10.3390/IJMS24065350>

Ekanayaka, A. H., De Silva, N. T., Tarafder, E., Chen, X. M., Dai, D. Q., Stephenson, S. L., Asad, S., Tibpromma, S., & Karunarathana, S. C. (2025). Linking the Metabolic Activity of Plastic-Degrading Fungi to Their Taxonomy and Evolution. *Journal of Fungi* 2025, Vol. 11, Page 378, 11(5), 378. <https://doi.org/10.3390/JOF11050378>

Elgarahy, A. M., Akhdhar, A., & Elwakeel, K. Z. (2021). Microplastics prevalence, interactions, and remediation in the aquatic environment: A critical review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106224. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.106224>

Evode, N., Qamar, S. A., Bilal, M., Barceló, D., & Iqbal, H. M. N. (2021). Plastic waste and its management strategies for environmental sustainability. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 4, 100142. <https://doi.org/10.1016/J.CSCEE.2021.100142>

Fonslow, B. R., & Yates, J. R. (2012). Proteolytic Digestion Methods for Shotgun Proteomics. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 3, 261–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00082-X>

Ganesh Kumar A., Anjana K, Hinduja M, Sujitha K, & Dharani G. (2020). Review on plastic wastes in marine environment – Biodegradation and biotechnological solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110733. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2019.110733>

Ganesh Kumar, A., Hinduja, M., Sujitha, K., Nivedha Rajan, N., & Dharani, G. (2021). Biodegradation of polystyrene by deep-sea *Bacillus paralicheniformis* G1 and genome analysis. *Science of The Total Environment*, 774, 145002. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.145002>

Ghosh, S. K., Pal, S., & Ray, S. (2013). Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(7), 4339–4355. <https://doi.org/10.1007/S11356-013-1706-X/TABLES/2>

Gola, D., Kumar Tyagi, P., Arya, A., Chauhan, N., Agarwal, M., Singh, S. K., & Gola, S. (2021). The impact of microplastics on marine environment: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100552. <https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2021.100552>

Golmohammadi, M., Fatemeh Musavi, S., Habibi, M., Maleki, R., Golgoli, M., Zargar, M., Dumée, L. F., Baroutian, S., & Razmjou, A. (2023). Molecular mechanisms of microplastics degradation: A review. *Separation and Purification Technology*, 309, 122906. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2022.122906>

Grimsrud, P. A., Carson, J. J., Hebert, A. S., Hubler, S. L., Niemi, N. M., Bailey, D. J., Jochem, A., Stapleton, D. S., Keller, M. P., Westphall, M. S., Yandell, B. S., Attie, A. D., Coon, J. J., & Pagliarini, D. J. (2012). A quantitative map of the liver mitochondrial phosphoproteome reveals posttranslational control of ketogenesis. *Cell Metabolism*, 16(5), 672–683. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2012.10.004>

Habib Ullah, Mehran Hayat, Bilawal Raza, Kashif Alam, Muhammad Ziad, Junaid Afridi, & Furqan Khan. (2025, January 9). *Biodegradation of microplastic: the role of aspergillus species in sustainable plastic waste management*. <https://medscireview.net/index.php/Journal/article/view/380/723>

Harrison, J. P., Ojeda, J. J., & Romero-González, M. E. (2012). The applicability of reflectance micro-Fourier-transform infrared spectroscopy for the detection of synthetic microplastics in marine sediments. *Science of The Total Environment*, 416, 455–463. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2011.11.078>

- Heidbreder, L. M., Bablok, I., Drews, S., & Menzel, C. (2019). Tackling the plastic problem: A review on perceptions, behaviors, and interventions. *Science of The Total Environment*, 668, 1077–1093. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.437>
- Hektor, H. J., & Scholtmeijer, K. (2005). Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(4), 434–439. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2005.05.004>
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science and Technology*, 46(6), 3060–3075. https://doi.org/10.1021/ES2031505/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2011-031505_0005.JPEG
- Hou, L., & Majumder, E. L. W. (2021a). Potential for and Distribution of Enzymatic Biodegradation of Polystyrene by Environmental Microorganisms. *Materials 2021, Vol. 14, Page 503*, 14(3), 503. <https://doi.org/10.3390/MA14030503>
- Jacob, J. K. S., Witzel, K., & dela Cruz, T. E. E. (2023). Comparative Diversity and Functional Traits of Fungal Endophytes in Response to Elevated Mineral Content in a Mangrove Ecosystem. *Journal of Fungi*, 9(12), 1186. <https://doi.org/10.3390/JOF9121186/S1>
- Jagadeesh, P., Mavinkere Rangappa, S., Siengchin, S., Puttegowda, M., Thiagamani, S. M. K., Rajeshkumar, G., Hemath Kumar, M., Oladijo, O. P., Fiore, V., & Moure Cuadrado, M. M. (2022). Sustainable recycling technologies for thermoplastic polymers and their composites: A review of the state of the art. *Polymer Composites*, 43(9), 5831–5862. <https://doi.org/10.1002/PC.27000>
- JananiRajam S, Devakumar J, Kiruthika R, Vaishali S, & Pavithra K S. (2021). Development of Fungal Consortium to Degrade the Polyethylene Polymer and Polystyrene. *International Journal of Progressive Research in Science and Engineering*, 2(7), 38–46. <https://journal.ijprse.com/index.php/ijprse/article/view/324>
- Jenner, L. C., Rotchell, J. M., Bennett, R. T., Cowen, M., Tentzeris, V., & Sadofsky, L. R. (2022). Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy. *Science of The Total Environment*, 831, 154907. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.154907>
- Jia, S. L., Chi, Z., Liu, G. L., Hu, Z., & Chi, Z. M. (2020). Fungi in mangrove ecosystems and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 852–864. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1789063>

- Jin, H., Ma, T., Sha, X., Liu, Z., Zhou, Y., Meng, X., Chen, Y., Han, X., & Ding, J. (2021). Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123430. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.123430>
- Kazemi, M., Faisal Kabir, S., & Fini, E. H. (2021). State of the art in recycling waste thermoplastics and thermosets and their applications in construction. *Resources, Conservation and Recycling*, 174, 105776. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2021.105776>
- Khan, S., Nadir, S., Shah, Z. U., Shah, A. A., Karunarathna, S. C., Xu, J., Khan, A., Munir, S., & Hasan, F. (2017). Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution*, 225, 469–480. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2017.03.012>
- Kik, K., Bukowska, B., & Sicińska, P. (2020). Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environmental Pollution*, 262, 114297. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.114297>
- Kim, Y. Bin, Kim, S., Park, C., & Yeom, S. J. (2024). Biodegradation of polystyrene and systems biology-based approaches to the development of new biocatalysts for plastic degradation. *Current Opinion in Systems Biology*, 37, 100505. <https://doi.org/10.1016/J.COISB.2024.100505>
- Krueger, M. C., Harms, H., & Schlosser, D. (2015). Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(21), 8857–8874. <https://doi.org/10.1007/S00253-015-6879-4/FIGURES/2>
- Langsiri, N., Worasilchai, N., Irinyi, L., Jenjaroenpun, P., Wongsurawat, T., Luangsa-ard, J. J., Meyer, W., & Chindamporn, A. (2023). Targeted sequencing analysis pipeline for species identification of human pathogenic fungi using long-read nanopore sequencing. *IMA Fungus*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S43008-023-00125-6/FIGURES/10>
- Lara-Topete, G. O., Castanier-Rivas, J. D., Bahena-Osorio, M. F., Krause, S., Larsen, J. R., Loge, F. J., Mahlknecht, J., Gradilla-Hernández, M. S., & González-López, M. E. (2024). Compounding one problem with another? A look at biodegradable microplastics. *Science of The Total Environment*, 944, 173735. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.173735>
- Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, 163, 107199. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2022.107199>

- Li, J., Liu, H., & Paul Chen, J. (2018). Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research*, 137, 362–374. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.12.056>
- Lim, B. K. H., & Thian, E. S. (2022). Biodegradation of polymers in managing plastic waste — A review. *Science of The Total Environment*, 813, 151880. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.151880>
- Liu, S. J., Huang, Z. Q., Yang, C., Yao, Q., & Dang, Z. (2022). Effect of polystyrene microplastics on the degradation of sulfamethazine: The role of persistent free radicals. *Science of The Total Environment*, 833, 155024. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.155024>
- Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A., & Lajoie, G. (2003). PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(20), 2337–2342. <https://doi.org/10.1002/RCM.1196>
- Ma, J., Zhao, J., Zhu, Z., Li, L., & Yu, F. (2019). Effect of microplastic size on the adsorption behavior and mechanism of triclosan on polyvinyl chloride. *Environmental Pollution*, 254, 113104. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.113104>
- Maafa, I. M. (2021). Pyrolysis of Polystyrene Waste: A Review. *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 225, 13(2), 225. <https://doi.org/10.3390/POLYM13020225>
- Martins, J. E. C., Melo, N. T. de, & Heins-Vaccari, E. M. (2005). *Atlas de micologia médica*. <https://repositorio.usp.br/item/001604373>
- Miri, S., Saini, R., Davoodi, S. M., Pulicharla, R., Brar, S. K., & Magdouli, S. (2022). Biodegradation of microplastics: Better late than never. *Chemosphere*, 286, 131670. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131670>
- Mohanani, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020a). Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology*, 11, 580709. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.580709>
- Nandiyanto, A. B. D., Henny, K. C. A., Assaniyah, S. Z., Amanah, Z. S., Kaniawati, I., Kurniawan, T., Farobie, O., & Bilad, M. R. (2024). Chemical Reaction Mechanism from Pyrolysis Degradation of Polystyrene Styrofoam Plastic Microparticles based on FTIR and GC-MS Completed with

Bibliometric Literature Review to Support Sustainable Development Goals (SDGs). *Moroccan Journal of Chemistry*, 12(3), 1380–1398. <https://doi.org/10.48317/IMIST.PRSM/MORJCHEM-V12I3.49124>

Napper, I. E., & Thompson, R. C. (2020). Plastic Debris in the Marine Environment: History and Future Challenges. In *Global Challenges* (Vol. 4, Issue 6). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/gch2.201900081>

Nikiema, J., & Asiedu, Z. (2022). A review of the cost and effectiveness of solutions to address plastic pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(17), 24547–24573. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-18038-5/TABLES/13>

Novillo, O., Raga, J. A., & Tomás, J. (2020). Evaluating the presence of microplastics in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded in the Western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111557. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2020.111557>

Ohta, A., Nishi, K., Hirota, K., & Matsuo, Y. (2023). Using nanopore sequencing to identify fungi from clinical samples with high phylogenetic resolution. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37016-0>

Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Pereira, R., Pereira, M. E., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of The Total Environment*, 586, 10–15. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.02.017>

Patel, D., Mamtora, D., Kamath, A., & Shukla, A. (2022). Rogue one: A plastic story. *Marine Pollution Bulletin*, 177, 113509. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2022.113509>

Philippe, A., Salaun, M., Quemener, M., Noël, C., Tallec, K., Lacroix, C., Coton, E., & Burgaud, G. (2024). Colonization and Biodegradation Potential of Fungal Communities on Immersed Polystyrene vs. Biodegradable Plastics: A Time Series Study in a Marina Environment. *Journal of Fungi*, 10(6), 428. <https://doi.org/10.3390/JOF10060428/S1>

Prabhukarthikeyan, S. R., Parameswaran, C., Sawant, S. B., Naveenkumar, R., Mahanty, A., Keerthana, U., Yadav, M. K., Anandan, A., Panneerselvam, P., Bag, M. K., & Rath, P. C. (2022). Comparative Proteomic Analysis of *Rhizoctonia solani* Isolates Identifies the Differentially

Expressed Proteins with Roles in Virulence. *Journal of Fungi*, 8(4), 370.
<https://doi.org/10.3390/JOF8040370/S1>

Restrepo-Flórez, J. M., Bassi, A., & Thompson, M. R. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene – A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 83–90. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2013.12.014>

Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2015). A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 65, 47–53. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2014.10.011>

Sánchez, C. (2020). Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances*, 40, 107501. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.107501>

Shams, M., Alam, I., & Mahbub, M. S. (2021). Plastic pollution during COVID-19: Plastic waste directives and its long-term impact on the environment. *Environmental Advances*, 5, 100119. <https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2021.100119>

Shilpa, Basak, N., & Meena, S. S. (2022). Microbial biodegradation of plastics: Challenges, opportunities, and a critical perspective. *Frontiers of Environmental Science & Engineering 2022* 16:12, 16(12), 1–22. <https://doi.org/10.1007/S11783-022-1596-6>

Silva, R. R. A., Marques, C. S., Arruda, T. R., Teixeira, S. C., & de Oliveira, T. V. (2023). Biodegradation of Polymers: Stages, Measurement, Standards and Prospects. *Macromol 2023*, Vol. 3, Pages 371-399, 3(2), 371–399. <https://doi.org/10.3390/MACROMOL3020023>

Singh, A. K., Bedi, R., & Kaith, B. S. (2020). Mechanical properties of composite materials based on waste plastic – A review. *Materials Today: Proceedings*, 26, 1293–1301. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.02.258>

Solanki, S., Sinha, S., Singh, R., Solanki, S., Sinha, S., & Singh, R. (2022). Myco-degradation of microplastics: an account of identified pathways and analytical methods for their determination. *Biodegradation 2022* 33:6, 33(6), 529–556. <https://doi.org/10.1007/S10532-022-10001-6>

- Srikanth, M., Sandeep, T. S. R. S., Sucharitha, K., & Godi, S. (2022a). Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S40643-022-00532-4/METRICS>
- Su, L., Xiong, X., Zhang, Y., Wu, C., Xu, X., Sun, C., & Shi, H. (2022). Global transportation of plastics and microplastics: A critical review of pathways and influences. *Science of The Total Environment*, 831, 154884. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.154884>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC1000>
- Tan, A., Zhao, J., Zhao, Y., Li, X., & Su, H. (2023). Determination of microplastics by FTIR spectroscopy based on quaternion parallel feature fusion and support vector machine. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 243, 105018. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2023.105018>
- Tapia, J. B., Haines, J., Yapor, J. P., & Reynolds, M. M. (2019). Identification of the degradation products of a crosslinked polyester using LC-MS. *Polymer Degradation and Stability*, 168, 108948. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2019.108948>
- Temporiti, M. E. E., Nicola, L., Nielsen, E., & Tosi, S. (2022). Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 1180, 10(6), 1180. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10061180>
- Thatoi, H., Behera, B. C., & Mishra, R. R. (2013). Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. *Mycology*, 4(1), 54–71. <https://doi.org/10.1080/21501203.2013.785448>
- Tirkey, A., & Upadhyay, L. S. B. (2021). Microplastics: An overview on separation, identification and characterization of microplastics. *Marine Pollution Bulletin*, 170, 112604. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2021.112604>
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2018a). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7669–7678. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9195-Y/TABLES/2>

- Vailati-Riboni, M., Palombo, V., & Loor, J. J. (2017). What Are Omics Sciences? *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach*, 1–7. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1
- Wang, C., Liu, Y., Chen, W. Q., Zhu, B., Qu, S., & Xu, M. (2021). Critical review of global plastics stock and flow data. *Journal of Industrial Ecology*, 25(5), 1300–1317. <https://doi.org/10.1111/JIEC.13125>
- Wei, R., & Zimmermann, W. (2017a). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1308. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>
- Wilkes, R., Aristilde, L., Ludmilla Aristilde, C., & Hall, R.-R. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 582–593. <https://doi.org/10.1111/JAM.13472>
- Wright, S. L., & Kelly, F. J. (2017). Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environmental Science and Technology*, 51(12), 6634–6647. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.7B00423/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2017-004235_0003.JPEG
- Xu, E., Liu, T., Xie, F., He, J., & Zhang, Y. (2025). *Aerobic oxidation of alkylarenes and polystyrene waste to benzoic acids via a copper-based catalyst*. <https://doi.org/10.1039/d4sc03269a>
- Yanto, D. H. Y., Krishanti, N. P. R. A., Ardiati, F. C., Anita, S. H., Nugraha, I. K., Sari, F. P., Laksana, R. P. B., Sapardi, S., & Watanabe, T. (2019). Biodegradation of styrofoam waste by ligninolytic fungi and bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 308(1), 012001. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012001>
- Yao, H., Liu, S., Chang, R., Liu, T., Ma, D., Han, X., Lin, C., Zhou, Z., & Mao, J. (2024). Purification, characterisation and visualisation of soybean protein hydrolysis by aspergillopepsin I from mangrove *Aspergillus tubingensis*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 191, 105798. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2024.105798>
- Yu, F., Yang, C., Zhu, Z., Bai, X., & Ma, J. (2019). Adsorption behavior of organic pollutants and metals on micro/nanoplastics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 694, 133643. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.133643>

Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y., & Yu, F. (2020). Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *Science of The Total Environment*, 715, 136968. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.136968>

Zeghal, E., Vaksmaa, A., Vielfaure, H., Boekhout, T., & Niemann, H. (2021). The Potential Role of Marine Fungi in Plastic Degradation – A Review. *Frontiers in Marine Science*, 8, 738877. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.738877/XML>

Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H., Bi, Q., & Zhao, Y. (2020). Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of The Total Environment*, 704, 135931. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.135931>

Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G. A., & Ma, B. (2012). PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 11(4). <https://doi.org/10.1074/MCP.M111.010587>

Zhang, Y., Pedersen, J. N., Eser, B. E., & Guo, Z. (2022). Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery. *Biotechnology Advances*, 60, 107991. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2022.107991>