

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SIMONE THIELE

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA DEGRADAÇÃO DE CELULOSE POR ISOLADOS FÚNGICOS DO GÊNERO *MACROCYBE* COLETADOS NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO PARANÁ.

PALOTINA

2021

SIMONE THIELE

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA DEGRADAÇÃO DE CELULOSE POR ISOLADOS  
FÚNGICOS DO GÊNERO *MACROCYBE* COLETADOS NA REGIÃO NOROESTE  
DO ESTADO DO PARANÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, Setor de Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado  
Coorientador: Prof. Dr. Fabiano Bisinella Scheufele

PALOTINA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

## ATA DE REUNIÃO

Aos dezesseis dias do mês de dezembro do ano de 2021, às dezenove horas, na Sala virtual <https://teams.microsoft.com/join/19%3avaiFuPwshJYpXQWz2p49QJXU8HRRTw52W58xVXngTEc1%40thread.tacv2/1638308201310?context=%7b%22Tid%22%3a%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22%2c%22Oid%22%3a%22e47d3bd8-a229-47b4-b270-b5155d01e17e%22%7d> da Plataforma Microsoft Teams, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Avaliação Preliminar da Degradação de Celulose por Isolados Fúngicos do Gênero *Macrocybe* Coletados na Região Noroeste do Estado do Paraná" apresentado pela discente Simone Thiele, orientada pelo Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, o orientador e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, nota: 98 (noventa e oito), Prof.(a) Dr.(a) Adriana Fiorini Rosado, nota: 98 (noventa e oito) e Prof.(a) Dr.(a) Raquel Stroher, nota: 98 (noventa e oito). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 98 (noventa e oito). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de seu orientador. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/12/2021, às 21:50, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/12/2021, às 17:26, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FABIO ROGERIO ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/12/2021, às 17:27, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4135007** e o código CRC **9C55BBD6**.

A minha mãe, que me apoiou incondicionalmente e sempre me incentivou a ir em direção dos meus sonhos, meu maior exemplo de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família que esteve ao meu lado todos esses anos, especialmente minha mãe Maria Terezia Haupenthal que foi minha confidente e meu abrigo durante os momentos mais difíceis. Ao meu irmão Tiago, que me amparou como um pai no decorrer de todos esses anos e as minhas irmãs Luana e Andressa que me apoiaram e torceram por mim.

A todos os demais membros da família, primas, tias, tios e a minha vó que sempre torceram e rezaram para que tudo desse certo até o final.

A minhas amigas de tempos Mariane, Pâmela e Jaqueline por sempre me animarem e acreditarem no meu potencial. A minhas amigadas que conquistei em Palotina, em especial a Brenda, Agatha, Erika, Beatriz e Mateus por me darem suporte e proporcionar momentos incríveis. E demais amigos que ao longo desses anos se tornaram especiais em minha vida.

À meu orientador prof. Fabio e coorientador prof. Fabiano, por aceitar se aventurar comigo nesta pesquisa e a demais professores, técnicos, colaboradores que de alguma forma me auxiliaram a chegar ao fim da graduação. Ao NEMA e UFPR por me acolher e proporcionar um ambiente de pesquisa e ensino.

É preciso coragem para ser imperfeito. Aceitar e abraçar as nossas fraquezas e amá-las. E deixar de lado a imagem da pessoa que devia ser, para aceitar a pessoa que realmente sou. (BRENÉ BROWN, 2019)

## RESUMO

A busca por organismos capazes de degradar a celulose de maneira eficiente tem sido objeto de estudo por vários setores da biotecnologia. A celulose constitui o principal polissacarídeo presente nas paredes celulares dos vegetais e o polímero biológico mais abundante no planeta, representando uma fonte energética com potencial para a obtenção de bioprodutos. Os fungos basidiomicetos são conhecidos por sua capacidade de degradar a celulose através de sua potente bateria enzimática, no entanto, esta capacidade varia de espécie para espécie. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de degradação de celulose por isolados do gênero *Macrocybe*, coletados por bioprospecção na região noroeste do estado do Paraná. As linhagens foram isoladas em meio de cultivo semi-sólido BDA e cultivadas em meio Theater e Wood (1989) contendo CMC (carboximetilcelulose) como fonte de carbono, para possíveis aplicações destes isolados na degradação de resíduos celulolíticos. O procedimento experimental baseou-se no condicionamento dos isolados em meio CMC (1 e 0,2%) e posteriormente submetidos a técnica de coloração Vermelho Congo para a visualização da formação de halos de hidrólise enzimática da celulose. Os principais resultados obtidos demonstram que todos os isolados se adaptaram ao meio de celulose, contudo cada um apresenta aspectos particulares em relação a degradação de celulose. Entretanto, o MT1 e *P. columbinus* em CMC 0,2% demonstram um comportamento semelhante, também ressaltado que são capazes de se desenvolver eficientemente em ambos os meios (0,2 e 1%). Dentre os isolados de *Macrocybe* testados, o com maior potencial de degradação consiste no MT12 em meio CMC 0,2%, apresentando um diâmetro de halo equivalente a 71,91 mm.

**Palavras-chave:** degradação de celulose. fungo basidiomiceto. *Macrocybe* spp.

## ABSTRACT

The search for organisms capable of cellulose degradation in an efficient way has been the object of study in many sectors of biotechnology. Cellulose constitutes the main polysaccharide present in vegetable cellular walls and is the most abundant biological polymer on the planet, representing an energetic source with the potential for bioproducts obtention. The basidiomycete fungi are known for their ability to degrade the cellulose through their potent enzymatic battery, however, this degradation capability varies between species. Therefore, the goal of this work was to evaluate the cellulose degradation potential by isolates of the genre *Macrocybe*, collected by bioprospecting in the northwestern region of the state of Paraná. The lineages were isolated in a semi-solid growth medium BDA and cultivated on the medium Theater and Wood (1989), containing CMC (carboxymethyl cellulose) as a carbon source, for possible application of these isolates on degradation of cellulolytic residues. The experimental procedure was based on conditioning of the isolated on the medium CMC (1 and 0,2%) and afterwards submitted to the coloring technique Congo Red for the visualization of halos of cellulose enzymatic hydrolysis. The main results obtained demonstrate that all isolates adapted to the cellulose medium, however each one presents particular aspects in relation to cellulose degradation. However, MT1 and *P. columbinus* in 0.2% CMC demonstrate a similar behavior, I also emphasize that they are able to develop efficiently in both media (0.2 and 1%). Among the *Macrocybe* isolates tested, with the biggest degradation potential is the MT12 in the medium CMC 0,2%, presenting a halo of 71,91 mm of diameter.

**Key-words:** cellulose degradation. basidiomycete fungi. *Macrocybe* spp.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – COLÔNIAS DE BASIDIOMAS FRESCOS DE <i>Macrocybe titns</i> COLETADOS EM ANTONINA, 2003.....	21
FIGURA 2 – ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE.....	22
FIGURA 3 – MECANISMO ENZIMÁTICO DE DEGRADAÇÃO DA CELULOSE.....	23
FIGURA 4 – COLÔNIAS DE BASIDIOMAS FRESCOS DE <i>Macrocybe</i> <i>spp</i> .....	26
FIGURA 5 – LOCAL DE COLETA DAS POSSÍVEIS ESPÉCIES DE <i>Macrocybe</i> <i>spp</i> .....	27
FIGURA 6 – MORFOLOGIA MACROSCÓPICA DA LINHAGEM MT6 EM MEIO SABOURAUD.....	32
FIGURA 7 – MORFOLOGIA MACROSCÓPICA DAS LINHAGENS MT1, MT12 E <i>P.</i> <i>columbinus</i> EM MEIO SABOURAUD.....	32
FIGURA 8 – CRESCIMENTO MICELIAL DAS LINHAGENS EM MEIO CMC APÓS 5 DIAS.....	34
FIGURA 9 – FORMAÇÃO DE HALOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO CMC VIA MT12.....	37
FIGURA 10 – FORMAÇÃO DE HALOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO CMC VIA MT1.....	38
FIGURA 11 – FORMAÇÃO DE HALOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO CMC VIA <i>P. columbinus</i> .....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CRESCIMENTO MICELIAL DO MT1 NO MEIO CMC, ENTRE OS TRÊS REPIQUES DURANTE 5 DIAS.....	33
GRÁFICO 2 – CRESCIMENTO MICELIAL DAS LINHAGENS NO MEIO CMC DURANTE 5 DIAS.....	35
GRÁFICO 3 – FORMAÇÃO DE HALO DE DEGRADAÇÃO DA CELULOSE DAS LINHAGENS <i>Macrocybe spp.</i> .....	39

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS FÚNGICOS DE <i>Macrocybe spp.</i> EM MEIO DE CULTURA SABOURAUD COM CMC (+) E SEM CMC (-) APÓS 3 DIAS DE CRESCIMENTO DO INÓCULO.....	31
QUADRO 2 – FORMAÇÃO DE HALO DE DEGRADAÇÃO DA CELULOSE DAS LINHAGENS <i>Macrocybe spp.</i> E <i>P. columbinus</i> .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CMC	-	Carboximetilcelulose
NEMA	-	Núcleo Experimental de Micologia Aplicada
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
SDA	-	Sabouraud Dextrose Ágar
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	JUSTIFICATIVA.....	16
1.2	OBJETIVOS.....	17
1.2.1	Objetivo geral.....	17
1.2.2	Objetivos específicos.....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1	VEGETAÇÃO DO NOROESTE PARANAENSE.....	18
2.2	FUNGOS CELULOLÍTICOS.....	19
2.2.1	<i>Macrocybe spp.</i> .....	20
2.3	DEGRADAÇÃO DA CELULOSE VIA ENZIMÁTICA.....	23
2.4	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1	FONTE DOS COGUMELOS.....	26
3.1.1	Isolamento das linhagens em cultura axênica e manutenção das linhagens culturas.....	27
3.2	ACLIMATAÇÃO DO INÓCULO PARA O ENSAIO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	28
3.3	PREPARO DAS PLACAS CONTENDO CMC.....	28
3.4	PADRONIZAÇÃO DO VOLUME DE INÓCULO POR PLACA E AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA CELULOSE.....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
4.1	ACLIMATAÇÃO DO INÓCULO.....	31
4.2	CRESCIMENTO DO INÓCULO EM MEIO CMC.....	33
4.3	ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE HALOS DE DEGRADAÇÃO DO CMC.....	36
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>40</b>
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	41
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
	<b>ANEXO 1 – IMAGENS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO DE CELULOSE VIA LINHAGEM MT1.....</b>	<b>46</b>

<b>ANEXO 2 – IMAGENS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO DE CELULOSE VIA LINHAGEM MT6.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO 3 – IMAGENS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO DE CELULOSE VIA LINHAGEM MT12.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO 4 – IMAGENS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO DE CELULOSE VIA LINHAGEM <i>P. columbinus</i>.....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas o mundo vem se preocupando cada vez mais com o meio ambiente, estabelecendo metas e legislações com viés de sustentabilidade. A intenção é reduzir a “pegada ambiental”, buscando a utilização dos recursos naturais com mais responsabilidade, assim evitando desperdícios e promovendo o uso racional de matérias primas.

Um dos ramos mais consolidados no país e no mundo, perante esses ideais é a exploração apropriada das biomassas em conjunto com os microrganismos, preferencialmente aqueles adaptados ao microclima de cada região em questão, e com baixa ou nenhuma patogenicidade. Neste cenário, as usinas de cana-de-açúcar, papel e celulose se destacam mundialmente, sendo o Brasil considerado modelo de empreendimento no setor, possuindo uma sólida matriz energética, além de conter uma das maiores biodiversidades do mundo (OLATUNJI; AKINLABI; MADUSHELE, 2020; RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

A celulose é a molécula orgânica mais abundante na natureza e diversos microrganismos são responsáveis pela sua degradação, convertendo a biomassa em nutrientes e fonte energética para o seu metabolismo. Após anos de estudos, diversos pesquisadores apontam várias vantagens na implementação industrial desses organismos, tendo em vista otimizar processos já existentes (OSORIO-GONZÁLEZ et al., 2020; OLIVEIRA, 2020).

Dentre os principais microrganismos capazes de degradar a complexa molécula da celulose estão as bactérias e os fungos celulolíticos. Muitos fungos basidiomicetos, como o *Pleurotus spp.* possuem a capacidade de usar e decompor a celulose, tornando-se de conhecimento público seu potencial. Contudo, a busca por novas espécies com possível potencial de degradação de materiais celulolíticos vem aumentando nos últimos anos (ISLAS, 2019).

O gênero *Macrocybe spp.* se enquadra dentre os novos fungos em ascensão, apesar dos poucos registros na literatura que tratam da potencialidade deste gênero no ramo, espécies como *M. titans* e *M. gigantea* já apresentam em estudos preliminares uma interação com materiais lignocelulolíticos (DEVI; SUMBALI, 2021). Ademais, não foram documentadas

características fisiológicas ou condições de cultivo, entretanto, alguns autores já apontam um potencial biotecnológico para este fungo, tendo conhecimento de estudos preliminares que indicam ausência de produção de toxinas clássicas, produção de  $\alpha$ -amilase e glucoamilase, e frações polissacarídicas isoladas de *M. titans* que contém a capacidade de inibir a migração de células tumorais. (WISNIEWSKI *et al.*, 2010; WISNIEWSKI, 2009; MILHORINI *et al.*, 2018; MILHORINI *et al.*, 2021).

O principal interesse na busca por demais microrganismos que apresentam a capacidade de degradação de material vegetal, é o complexo enzimático responsável pela clivagem da biomassa e sua deterioração posterior. Essas enzimas em sua maioria são as celulases, já aplicadas em diversos ramos da biotecnologia e bioprocessos.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A utilização de resíduos vegetais ou a biomassa em si em diversos processos biotecnológicos vêm sendo amplamente estudada, e a escolha dos microrganismos mais apropriados para este papel é de extrema importância. Tendo em vista este novo mercado e a expressiva biodiversidade brasileira, além da grande produção de resíduos lignocelulolíticos no país, justifica por si só a necessidade da pesquisa básica nesta área.

O estudo de diferentes fungos para a degradação dos componentes das biomassas e sua seleção é o ponto inicial para a implementação de bioprocessos que utilizam esses microrganismos em escala industrial ou piloto. Diversos autores apontam fungos com potencial celulolítico oriundos do cerrado, floresta amazônica meridional, estação ecológica de Juréia-Itatins e da região dos campos gerais – PR (SILVA *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2015; RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004; OLIVEIRA, 2020).

A escolha de um fungo com um alto potencial de degradação já se enquadra como uma otimização do processo, assim buscando uma produção adequada e economicamente viável antes mesmo de iniciar na prática. O foco principal desses microrganismos é a degradação da celulose, o que facilita

algumas etapas industriais, como a fermentação/hidrólise, os quais têm relevância principalmente em processos de produção de etanol de segunda geração, digestão anaeróbica (biogás), indústria de papel e celulose, dentre outros (ÂNGELO, 2010; COURI et al., 2008).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Verificar a capacidade celulotítica, através da formação de halo de degradação da celulose, em cultivo sólido, de isolados do fungo *Macrocybe* spp. Analisar e identificar o potencial de degradação de celulose por isolados de fungos do gênero *Macrocybe*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os isolados com os melhores desempenhos de desenvolvimento micelial em meio de cultivo específico contendo CMC (carboximetilcelulose);
2. Identificar capacidade de degradação da CMC através da formação de halo em meio de cultura semi-sólido;
3. Comparar a capacidade de degradação da CMC dos isolados mais promissores com outras espécies de basidiomicetos celulolíticos, como por exemplo, representante do gênero *Pleurotus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 VEGETAÇÃO DO NOROESTE PARANAENSE

O estado do Paraná contém uma diversidade enorme de vegetação, além de um bioma bem característico, a mata de araucárias, também chamada Floresta Ombrófila Mista. Suas regiões norte, noroeste e oeste apresentam uma vegetação predominante denominada Floresta Estacional Semidecidual devido a seus aspectos marcantes, dentre eles, um clima de baixa umidade, a uma altitude de 200 a 800 m, e perda de 20-50% de suas folhas durante a estação mais fria/seca do ano. Suas árvores podem atingir até 30 metros de altura e não formam uma cobertura superior contínua (ESTEVAN et al., 2016; RODERJAN et al., 2002).

Devido ao aspecto florestal não conter uma unificação contínua ao longo de seu território e copas de árvores bem fechadas, sua cobertura terrestre permite maior acessibilidade na captação de luminosidade, contribuindo para o desenvolvimento de diversas espécies vegetais. Entretanto, essas florestas ao longo dos últimos anos vem diminuindo sua área de ocupação, resultado da exploração da terra e a poluição do ambiente aquático que interferem no ciclo de desenvolvimento florestal em conjunto com a fauna. Devido a isso diversos parques foram instalados para assegurar a preservação da biodiversidade no estado do Paraná.

A vegetação proporciona um *habitat* natural para diversos animais e microrganismos, dentre estes, os fungos, que preferem ambientes escuros e úmidos, porém se adaptam às características do local com facilidade. Suas árvores (folhas, galhos e tronco) são denominadas como biomassa lignocelulósica, apesar de existirem diferentes biomassas, sua composição sempre contemplará três polímeros principais: celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%) e a lignina (15-20%), além de conter outros componentes (15-20%) (MOOD et al., 2013).

A celulose ( $\beta$ -1-4-glucano) é o principal composto da biomassa que constitui a parede celular vegetal, desta forma, encontra-se em maior abundância em todo o planeta. Considerada uma fonte natural de carbono, além de apresentar um mecanismo de degradação mais acessível, devido a suas características e maior proporção na biomassa, a celulose é amplamente utilizada em pesquisas relacionadas à degradação de fragmentos de plantas e obtenção de bioprodutos (OSORIO-GONZÁLEZ et al., 2020).

## 2.2 FUNGOS CELULOLÍTICOS

A diversidade de microrganismos celulolíticos em território nacional ao longo dos últimos anos vem sendo amplamente estudada, a fim de explorar seu potencial até então desconhecido. O Brasil contempla um ecossistema heterogêneo, o que o torna único, desta maneira cada microrganismo apresenta algumas características específicas conforme seu *habitat* natural.

Dentre os microrganismos, a literatura aponta uma vasta gama de bactérias e fungos com capacidade de degradar materiais celulolíticos, entretanto, destacam-se os fungos filamentosos que já são amplamente utilizados a fim de se obter coprodutos e bioprodutos derivados de vegetais (WEI et al., 2009; WILSON, 2008).

Alguns gêneros fúngicos já apresentam uma confirmação baseado em estudos de atuação perante a degradação de diferentes biomassas, sendo eles representantes dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Trichoporum*, *Humicola*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Cryptococcus* (HANSEN et al., 2015; SINGHANIA et al., 2010; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Entretanto, demais gêneros também são estudados em busca de um bom potencial, neste caso, ressaltamos os fungos basidiomicetos.

O filo Basidiomycota inclui a maioria dos fungos conhecidos pelo seu formato característico do basidioma (estrutura produtora de esporos sexuais) denominados popularmente de cogumelos ou orelhas-de-pau. Esses fungos são encontrados em sua maioria em ambientes terrestres vivendo como *saprótrofos*,

que constituem um grupo altamente degradativo, principalmente de materiais orgânicos lignocelulolíticos em decomposição, a celulose é a principal fonte nutritiva desses microrganismos, portanto conseguem deteriorar a celulose e absorvê-la como fonte de energia (SHISHIDO, 1992; LEITE, 2010).

Basidiomicetos são considerados os seres com o maior potencial de degradação deste polímero porque muitas espécies crescem em seu *habitat* natural em biomassas vegetais ricas em celulose. Embora a degradação da celulose por basidiomicetos seja estudada extensivamente desde meados do século passado, algumas espécies basidiomicetos de *habitat* diferentes e singulares vêm ganhando atenção nos últimos anos (BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008).

A título de exemplo, o caso do cultivo comercial do *P. columbinus* amplamente conhecido, que já ocorre através de seu crescimento em diferentes substratos de origem vegetal, como palha pasteurizada, grãos, borra de café, resíduos agrícolas, folhas de bananeira, papelão, bagaço de malte, serragem e outros (LUNARDI, 2019; ISLAS, 2019). E dentre essas novas espécies estudadas inclui-se o gênero *Macrocybe*, conhecidos pela sua aparência gigante e em sua maioria destinados à alimentação, contudo alguns autores apontam aptidão a decomposição de materiais lignocelulolíticos, principalmente resíduos agroindustriais (DEVI; SUMBALI, 2021)

### 2.2.1 *Macrocybe spp.*

O gênero *Macrocybe spp.* é considerado uma classe de fungo relativamente nova, pois contém pouca pesquisa direcionada a seus registros territoriais e aplicações, entretanto até o momento sua maioria se enquadra como cogumelos comestíveis, contendo sete espécies bem definidas incluindo *M. gigantea*, *M. pachymeres*, *M. spectabilis*, *M. crassa*, *M. praegrandis*, *M. titans* e *M. lobayensis* (DUONG et al. 2017; PEGLER et al., 1998).

O primeiro registro deste gênero foi mencionado por Pegler et al. (1998), relacionando os fungos à região pantropical de climas tropicais e subtropicais. Baseado neste estudo, demais autores buscam por novas espécies e dentre as

regiões já citadas na literatura pode-se encontrar o cogumelo no Brasil, Argentina, Índia, Colômbia, Costa Rica e entre outros países (PEGLER et al., 2005; BATTISTIN; PICCIOLA, 2015; RAMIREZ et al., 2017).

No Brasil, a espécie foi inicialmente notada no estado do Paraná sendo confirmada como *M. titans*, localizado na Reserva Natural do Rio Cachoeira situada na comunidade de Lageado em Antonina em 2003, tornando-se notícia de âmbito nacional e internacional (FIGURA 1) (STIJVE, 2004). Após esta descoberta, pesquisadores continuam em busca de novas espécies de *Macrocybe spp.* em território nacional.

FIGURA 1. COLÔNIAS DE BASIDIOMAS FRESCOS DE *Macrocybe titans* COLETADOS EM ANTONINA, 2003.



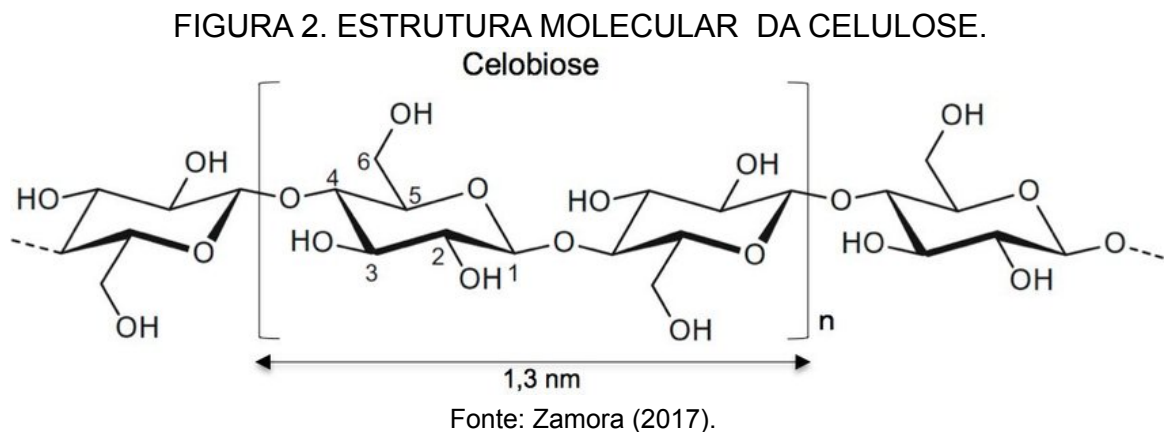
Fonte: Portal fungo shop (2003).

Pesquisas recentes apontam um potencial inicial para o cultivo de *Macrocybe spp.* em materiais lignocelulolíticos, já contendo registros preliminares de produção baseada em resíduos agrícolas de milho como espiga, caule e colmo de milho para o crescimento do *M. gigantea* (DEVI; SUMBALI, 2021). Desta maneira, outras espécies também podem apresentar potencial de interação com biomassas vegetais, acarretando na reciclagem econômica de resíduos.

### 2.3 DEGRADAÇÃO DA CELULOSE VIA ENZIMÁTICA

A celulose é uma substância orgânica renovável, formada por unidades de  $\beta$ -D-glicose contendo ligações glicosídicas de tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) ao longo de sua

cadeia linear, plana e com regiões cristalinas de cadeia repetitiva (FIGURA 2). Para ocorrer a degradação da celulose em si, pode-se citar dois mecanismos, através de meio ácido (químico) ou através de via enzimática (biológico) (FENGEL; WEGENER, 1989; ÂNGELO, 2010).

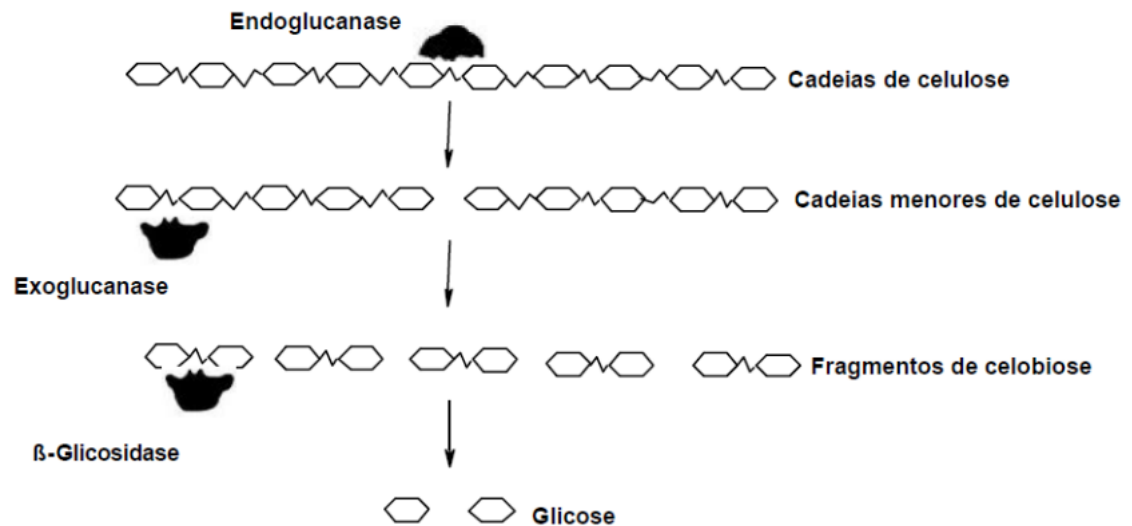


O mecanismo biológico de degradação de materiais lignocelulolíticos é oriundo de microrganismos que secretam diferentes enzimas (ação sinérgica) que formam um sistema enzimático complexo (celulases,  $\beta$ -glicosidase, xilanases, lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases) (QINNGHE et al., 2003; PALMIERI et al., 2000). Entretanto, o elemento em maior abundância da biomassa é a celulose que contém o mecanismo relativamente mais simples que os demais.

O sistema enzimático celulolítico é responsável pela biodegradação da celulose e seus intermediários, que contempla uma classe de enzimas denominadas celulases (E.C 3.2.4.1). Pode-se dividir este sistema de enzimas em três grandes grupos que são encarregadas pela clivagem dos polímeros de glicose a fim de suprir a necessidade de substâncias nutricionais e fonte de energia ao microrganismo (MADIGAN et al., 2016). O conjunto de enzimas é composto pelas celobiasas ( $\beta$ -D-glucanases) que são responsáveis pela hidrólise de fragmentos de celobiose e alguns celo-oligosacarídeos promovendo a formação de glicose, as exoglucanases (celobiohidrolases) que atuam nas celobioses de terminais não-redutores da celulose e sobre as partes não cristalinas, e por fim as endoglucanases (1,4-D-glucanohidrolases) que

clivam randomicamente a celulose reformulando seu grau de polimerização (FIGURA 3) (MADIGAN et al., 2016; ÂNGELO, 2010).

FIGURA 3. MECANISMO ENZIMÁTICO DE DEGRADAÇÃO DA CELULOSE.



Fonte: Wright et al., (1988).

A atividade celulolítica pode ser induzida e monitorada através da carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono no meio de crescimento dos isolados. O polímero semi-sintético CMC vem substituindo a fração vegetal em diversos experimentos, derivada da própria celulose apresenta características emulsificantes e ligantes, além de uma solubilização maior em água, o que facilita seu uso (ORESHEK et al., 2014).

## 2.4 APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

O ramo de bioprocessos vem ganhando espaço gradativamente ao longo dos últimos anos, visando a sustentabilidade e maximizar a produção. Alguns processos que utilizam biomassas e microrganismos já são consolidados no território nacional, como as biorrefinarias, fábricas de papel e celulose, cervejarias, cogumelos comestíveis, e mais recentemente a produção de enzimas por meio de empresas internacionais.

Os materiais lignocelulolíticos em virtude da sua composição representam uma ótima fonte de energia e suporte para a geração de produtos de alto valor agregado com interesse ambiental, social e educacional. Apesar de se tratar de um material complexo, contém um alto potencial de introdução em diversos processos industriais como suplemento para elevar o nível de rendimento, além de auxiliar na reciclagem de resíduos vegetais.

No Brasil, a implementação de biomassas em bioprocessos já ocorre a alguns anos, o maior exemplo foi a ação do governo na década de 80 perante a iniciativa da produção de bioetanol através da cana-de-açúcar, atualmente o ramo já movimentava uma parte do mercado econômico, por meio de seus produtos principais como o álcool, açúcar e energia. Deste modo, demais estudos apontam que outras biomassas também possuem alto potencial (OLATUNJI; AKINLABI; MADUSHELE, 2020; RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

Diversos estudos mencionam a espécie *Macrocybe spp.* sobre sua utilidade para a área da saúde, entretanto pesquisas recentes demonstram um potencial em ascensão para a degradação de resíduos agrícolas, assim decompondo material celulolítico através de enzimas (DEVI; SUMBALI, 2021). O grupo de pesquisa NEMA (Núcleo Experimental de Micologia Aplicada) da UFPR – Setor Palotina, em parceria com pesquisadores da UFPR - Curitiba tem demonstrado que frações polissacarídicas isoladas de *M. titans* apresentam a capacidade de inibir a migração de células tumorais (MILHORINI et al, 2018; MILHORINI et al, 2021).

Voltado o foco para a produção de enzimas celulolíticas, nos últimos anos há um crescente interesse no desenvolvimento e produção de enzimas entrelaçadas a vários ramos industriais.

Dentre eles destaca-se a utilização da celulase para obtenção de ração animal, bebidas e alimentos (xaropes de glicose), têxtil, polpa e papel (reciclagem), detergentes, reagentes químicos/bioquímicos (ácidos cítricos e acéticos, aminoácidos) e degradação de biomassa para a produção do bioetanol (pré-tratamento e hidrólise) (ÂNGELO, 2010; COURI et al., 2008).

Diante de tantas possíveis aplicações, ressalta-se a importância da pesquisa básica de identificação de novos microrganismos com alta capacidade

de degradação de celulose para obtenção da enzima celulase, além de termos uma biodiversidade em território nacional ampla e pouco explorada, porém com um potencial não estimado até o momento.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

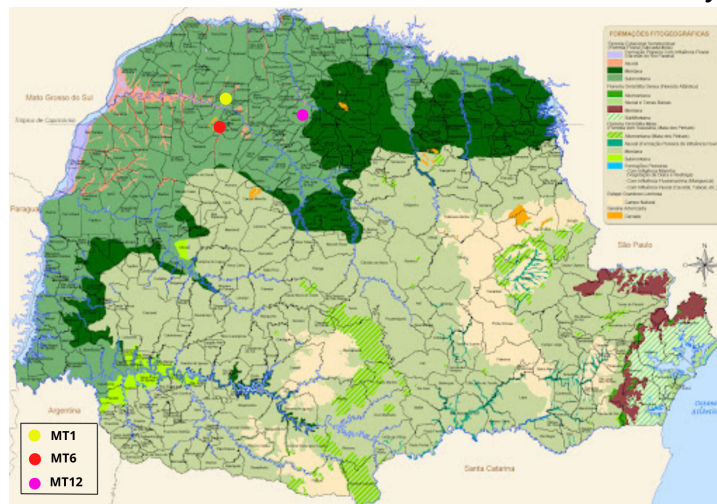
Os experimentos foram realizados no laboratório do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada – NEMA e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

#### 3.1 FONTE DOS COGUMELOS

Os cogumelos do gênero *Macrocybe* foram coletados em diversas cidades da região noroeste do Estado do Paraná. Os cogumelos pertencentes previamente ao gênero *Macrocybe* foram identificados previamente com base nas características macroscópicas, e posteriormente com base em identificação molecular.

Registro de 12 possíveis espécies de *Macrocybe spp.* foram apontadas e coletadas na região noroeste do Paraná pelo pesquisador Ednilson Clayton Rogério (2018), dentre elas, foram selecionadas três espécies para o andamento da fase experimental deste trabalho (FIGURA 4). O mesmo menciona o aparecimento dos fungos em solo, entre a primavera e o verão, com presença de chuvas volumosas e temperatura entre 22 a 32 °C. Atualmente esses isolados já pertencem a Coleção de Culturas de Fungos Basidiomicetos do NEMA.

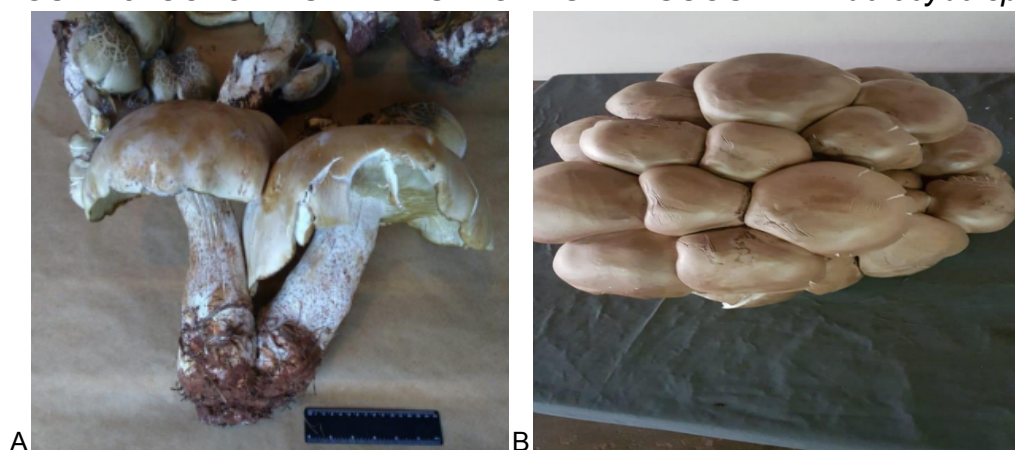
FIGURA 4. LOCAL DE COLETA ESPÉCIES DE *Macrocybe spp.*



Fonte: adaptado de Rogério (2018).

O local de coleta de cada microrganismo selecionado difere conforme observado na figura acima. O MT1 pertence à cidade de Paraíso do Norte e foi coletado em 2018, o MT6 está foi localizado e coletado em Indianópolis em 2019, e por último o MT12 coletado em Paraíso do Norte próximo ao Parque Buracão também em 2019. A Figura 5 demonstra imagens de alguns dos cogumelos no momento da coleta.

FIGURA 5. COLÔNIAS DE BASIDIOMAS FRESCOS DE *Macrocybe spp.*



Legenda: A - MT1 e B - MT6

Fonte: Rosado, 2019 (dados não publicados).

E o gênero *Pleurotus spp.* que já é amplamente conhecido pelo seu potencial de degradação da celulose, assim, optou-se por incluir um representante deste gênero, utilizado como padrão de comparação durante a fase experimental deste trabalho com as demais espécies de *Macrocybe spp.* testadas. O isolado do gênero *Pleurotus*, espécie *columbinus*, foi obtido da Coleção de Culturas de Fungos Basidiomicetos do NEMA.

### 3.1.1 Isolamento das linhagens em cultura axênica e manutenção das linhagens culturas

Fragmentos internos dos basidiomas foram retirados com auxílio de uma pinça fina estéril, submetidos uma breve descontaminação em Hipoclorito de sódio a 10% por 3 minutos, lavados em água destilada estéril e inoculados em uma placa de Petri com o meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA).

Essas culturas foram mantidas em uma estufa a 28°C por 20 dias. O desenvolvimento do crescimento foi verificado a cada 3 dias. As que não apresentavam contaminação foram repicadas em tubos com SDA inclinado e mantidas a 4°C, após o crescimento, já as que apresentaram contaminação por leveduras ou bactérias foram repicadas novamente em placas de Petri até que se obtivesse culturas axênicas (MELLO; REIS; SILVA, 2011).

### 3.2 ACLIMATAÇÃO DO INÓCULO PARA O ENSAIO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

Para o isolamento micelial dos fungos foram transferidos fragmentos do tecido vivo dos fungos (micélio) com alça estéril, em bico de Bunsen, para placas Petri contendo meio ágar Sabouraud, com pH 6,5 e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min. Após a inoculação dos fungos, as placas foram incubadas de 28 a 30°C por 7 a 14 dias para ocorrer o desenvolvimento do micélio na superfície do ágar (OLIVEIRA, 2020).

A etapa subsequente ocorreu o repique das linhagens que não obtiveram contaminação, o MT1, MT6, MT12 e *P. columbinus*. O meio de cultura utilizado foi o Sabouraud com a adição de celulose (CMC 0,2%), com o objetivo de condicionar aos poucos os microrganismos à presença da celulose, as placas foram incubadas a 28 a 30°C por 7 para ocorrer o desenvolvimento do micélio na superfície do ágar. Após o período de crescimento, foi realizado novamente o repique das placas inoculadas para uma nova placa contendo apenas o meio CMC nas mesmas condições anteriores.

### 3.3 PREPARO DAS PLACAS CONTENDO CMC

Após o período de crescimento, foi realizado o repique das placas inoculadas (Sabouraud-CMC) para novas placas contendo apenas o meio CMC (1% e 0,2%), as placas foram incubadas de 28 a 30°C por 7 dias para ocorrer o desenvolvimento do micélio na superfície do ágar.

O meio seletivo é composto por CMC como fonte de carbono, que foi preparado conforme: CMC (1% e 0,2%); 0,2 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 0,1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,05 g de KCl; 1,7 g de ágar; 100 mL de água destilada. Após a preparação o pH do meio encontra-se entre 5,2 a 5,9, uma vez estabilizado o pH, o meio é esterilizado em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 min (THEATER; WOOD, 1989; NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996).

As placas de Petri contendo o meio para crescimento adicionado de CMC foram preparadas e inoculadas com um disco de ágar colonizado em sua superfície com o micélio de cada linhagem a ser testada (placa de inóculo). Após a inoculação, as placas seguiram para incubação de 28 a  $30^\circ\text{C}$  por 8 dias para o acompanhamento do crescimento micelial e formação do halo de degradação. O protocolo de identificação de fungos celulolíticos escolhido foi o ensaio qualitativo modificado de Theater e Wood (1989), neste procedimento, avaliamos por meio de testes em placas de Petri, visando a melhor condição de identificação.

#### 3.4 PADRONIZAÇÃO DO VOLUME DE INÓCULO POR PLACA E AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA CELULOSE

Cada isolado a ser testado, após o crescimento na placa inóculo, foi coletado através de sua perfuração na superfície do meio de cultura sólido (CMC 1% e 0,2%), utilizando um perfurador metálico. Um disco de inóculo de 10 milímetros (mm) de diâmetro foi transferido assepticamente para a superfície de cada placa, contendo o meio CMC correspondente a cada concentração. As placas foram incubadas em duplicatas em estufa de 28 a  $30^\circ\text{C}$ , pelo período necessário para que o micélio do fungo atingisse cerca de 50-60 mm. Após esse crescimento, foi realizada a verificação do halo enzimático, por meio da coloração das placas com o corante Vermelho do Congo (2,5 mg/mL), interagindo por 30 min e lavada posteriormente com a solução de NaCl 1 M (THEATER; WOOD, 1989; NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996).

A análise do tamanho da colônia micelial e seu desenvolvimento foi realizada diariamente, por meio da medição dos diâmetros do crescimento por

meio de um paquímetro digital. Já a análise dos halos enzimáticos, também ocorreu através da medição por meio de um paquímetro digital, e seus dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram avaliadas pelo Teste de Tukey ( $p > 0,01$ ) (CRUZ, 2006).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ACLIMATAÇÃO DO INÓCULO

Para o início do crescimento das linhagens dos fungos selecionados optou-se pelo meio Sabouraud com e sem a suplementação de CMC, com o intuito de introduzir os microrganismos aos poucos a uma nova fonte de carbono, o CMC, que posteriormente será sua única fonte de carbono e foi avaliado o crescimento micelial do terceiro ao sétimo dia de crescimento do inóculo (QUADRO 1).

QUADRO 1 - CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS FÚNGICOS DE *Macrocybe spp.* EM MEIO DE CULTURA SABOURAUD COM CMC (+) E SEM CMC (-) APÓS 3 DIAS DE CRESCIMENTO DO INÓCULO.

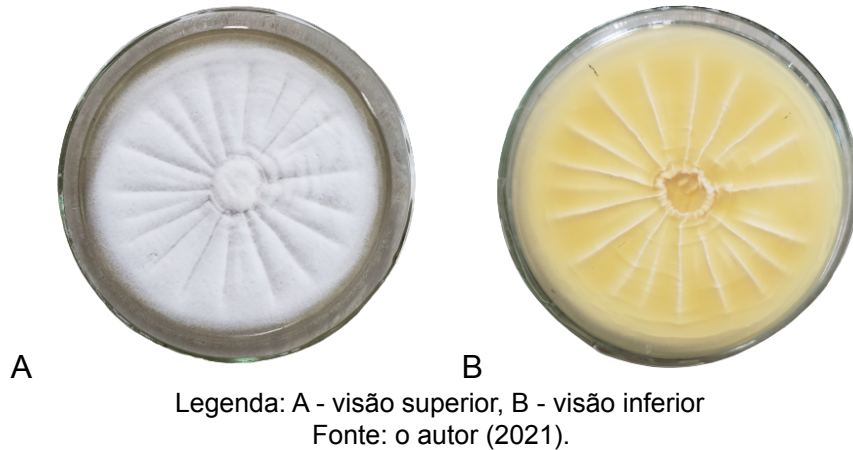
Linhagens	CMC	3º dia (mm)	4º dia (mm)	5º dia (mm)	6º dia (mm)	7º dia (mm)
MT1	+	35,00	58,25	67,00	71,75	80,00
	-	43,00	44,00	60,50	66,00	75,00
MT6	+	24,25	32,75	37,75	40,75	45,00
	-	21,75	30,00	37,50	45,75	50,75
MT12	+	33,00	46,50	60,75	71,75	75,00
	-	34,50	49,25	61,75	69,75	72,50
<i>P. columbinus</i>	+	42,29	59,33	80,00	80,00	80,00
	-	40,57	54,99	74,30	80,00	80,00

FONTE: O autor (2021).

Aparentemente, os dados apresentam um crescimento relativamente uniforme entre as linhagens, independente da suplementação com CMC em meio Sabouraud. A linhagem MT6, demonstrou um crescimento visivelmente mais lento quando comparado às demais linhagens, com colônias com cerca de metade do tamanho das demais. Destaca-se que o MT6 também apresenta uma morfologia de colônia diferente das outras linhagens (Figura 6), com bordas bem

definidas, coloração branca, elevações, e sua superfície apresenta um aspecto aveludado com protuberâncias.

FIGURA 6 - MORFOLOGIA MACROSCÓPICA DA LINHAGEM MT6 EM MEIO SABOURAUD.



A caracterização morfológica macroscópica das colônias de *Macrocybe spp.* foi relatada em meados de 1998 e em um aspecto geral, todos apresentam uma coloração branca e textura algodonosa/aveludado, entretanto, cada fungo estudando no experimento também contém suas peculiaridades. As colônias vegetativas do MT1 se caracterizam por uma superfície desuniforme após seu crescimento, exibindo algumas “falhas” na cobertura do micélio. Já os isolados MT12 e o *P. columbinus* apresentam uma morfologia macroscópica semelhante, superfície micelial uniforme, com hifas bem definidas durante o crescimento inicial e de fácil adaptação (FIGURA 7).

FIGURA 7 - MORFOLOGIA MACROSCÓPICA DAS LINHAGENS MT1, MT12 E *P. columbinus* EM MEIO SABOURAUD.

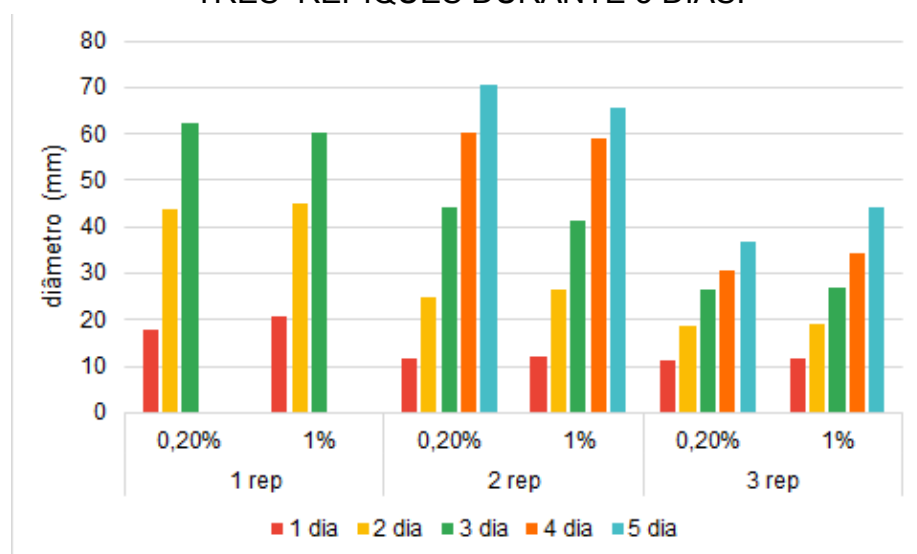


## 4.2 CRESCIMENTO DO INÓCULO EM MEIO CMC

A preparação do inóculo iniciou-se com a adaptação dos fungos do meio Sabouraud para o meio CMC, assim condicionando os microrganismos ao meio específico. Para uma melhor adequação foi realizado o repique 3 vezes perante o meio CMC, totalizando em cerca de 24 dias de condicionamento. O meio específico de CMC utilizado foi proposto perante duas concentrações diferentes, CMC a 1% (+2) e CMC a 0,2% (+1), para se obter um melhor entendimento da interação dos fungos filamentosos com a celulose, e conseqüentemente sua degradação (RUEGGER; TAU-K-TORNISIELO, 2004; OLIVEIRA, 2020; THIELE et al., 2019).

Dentre as linhagens, o MT1 foi a que demonstrou a maior variação de seu crescimento micelial conforme os repiques. Inicialmente apresentou um desenvolvimento rápido de suas hifas em comparação às demais em ambas concentrações de CMC adicionada (0,2% e 1%), entretanto, conforme os repiques seguintes o fungo começou a necessitar de um tempo maior para seu crescimento, conforme demonstra o Gráfico 1.

GRÁFICO 1 - CRESCIMENTO MICELIAL DO MT1 NO MEIO CMC, ENTRE OS TRÊS REPIQUES DURANTE 5 DIAS.



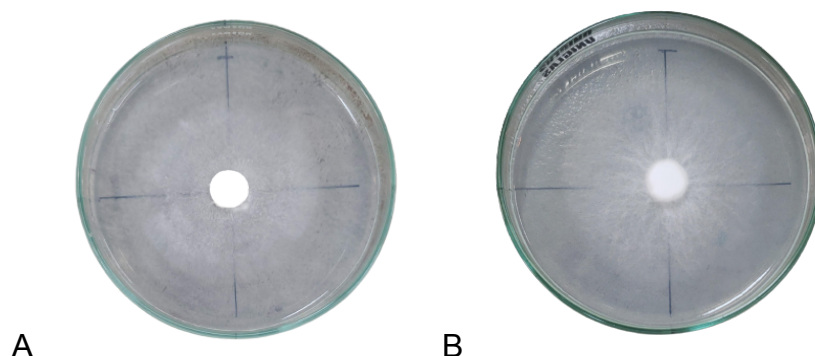
Fonte: o autor (2021).

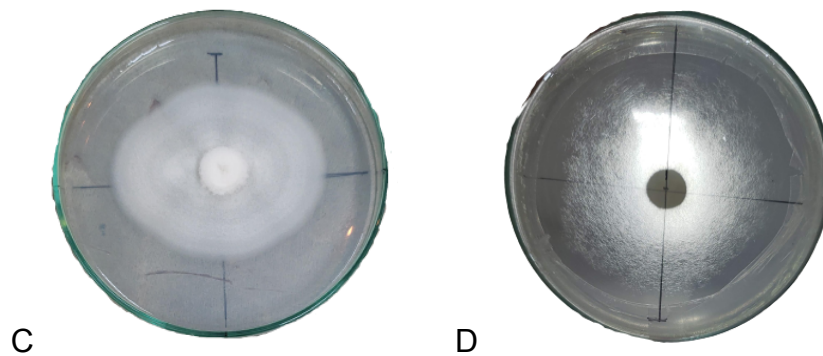
No decorrer da adaptação do MT1 ao meio CMC, o fungo demonstrou inicialmente um crescimento promissor com suas hifas aparentemente bem definidas e finas, contudo ao longo dos repiques estima-se que o mesmo apenas estava em busca de uma fonte de carbono mais acessível. Ao final do terceiro repique a colônia fúngica já apresentou um comportamento diferente, seu crescimento ocorreu de forma reduzida e suas hifas estavam mais aparentes na placa, assim demonstrando uma aderência ao meio seletivo.

O comportamento do fungo apresentou uma oscilação conforme os repiques em ambas concentrações de celulose no meio (1 e 0,2%), contudo, aparentemente se trata de uma diferença significativa, porém estes dados deverão ser confirmados estatisticamente em trabalhos posteriores. Em seu último repique, observou-se que o MT1 cresceu em uma velocidade semelhante ao do MT6, que até então é considerada a linhagem que apresentou o menor crescimento em quesito de tempo no meio CMC, como pode-se observar no Gráfico 2.

Já as demais linhagens sendo elas o MT6, MT12 e o *P. columbinus* manifestaram um crescimento substancialmente uniforme entre os repiques. Deste modo, suas adaptações ocorreram de forma eficaz em relação ao consumo da nova fonte de carbono (CMC), suas colônias demonstravam-se visíveis desde o primeiro repique, ao longo do tempo foram apenas se consolidando e obtendo aparência homogênea em ambas as concentrações de celulose (FIGURA 8).

FIGURA 8 - CRESCIMENTO MICELIAL DAS LINHAGENS EM MEIO CMC APÓS 5 DIAS.

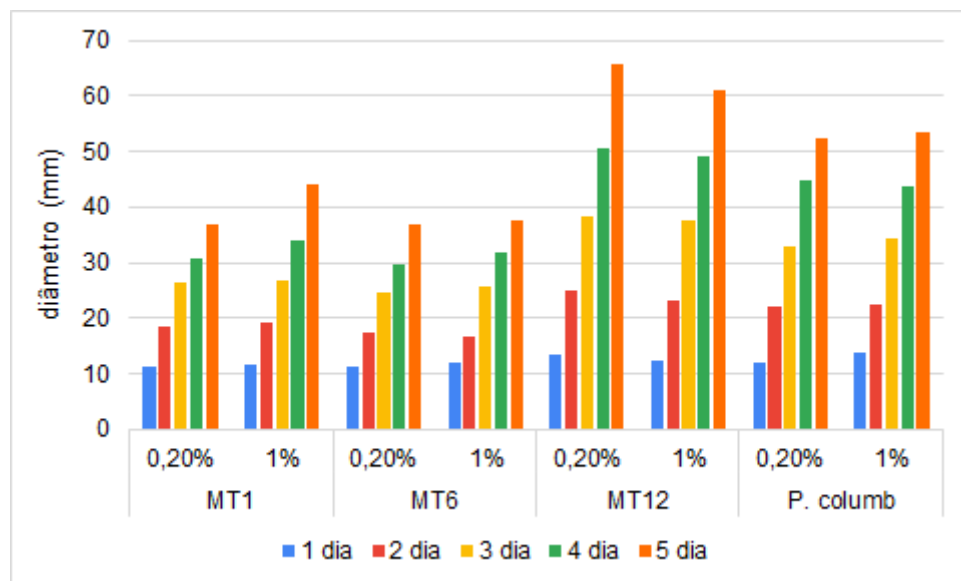




Legenda: A - *P. columbinus*, B - MT12, C - MT6, D - MT1  
Fonte: o autor (2021).

Ao final da adaptação no meio CMC (terceiro repique) observou-se o comportamento das linhagens perante o meio específico. Os fungos MT1 e MT6 demonstram um crescimento similar obtendo uma colônia em torno de 40 mm após 5 dias apesar de apresentar uma morfologia totalmente diferente. Após 5 dias de crescimento, o isolado com o maior crescimento micelial foi o MT12, atingindo um diâmetro acima de 60 mm, e o *P. columbinus* demonstra uma desenvoltura intermediária entre as linhagens anteriores alcançando aproximadamente 52 mm.

GRÁFICO 2 - CRESCIMENTO MICELIAL DAS LINHAGENS NO MEIO CMC DURANTE 5 DIAS.



Fonte: o autor (2021).

Em relação ao comportamento das cepas às diferentes concentrações de CMC no meio, o Gráfico 2 revela que o MT6 apresenta um desenvolvimento semelhante em ambas as concentrações. Contudo, nos demais fungos observou-se um comportamento a princípio correlativo, porém com uma sutil diferença, o MT1 e o *P. columbinus* demonstraram um crescimento maior perante o meio CMC 1%. No entanto, o MT12 se adaptou melhor ao meio CMC com menor proporção de celulose (0,2%).

#### 4.3 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE HALOS DE DEGRADAÇÃO DA CELULOSE

Para a verificação da degradação da celulose, foi utilizado o método de coloração Vermelho Congo, que consiste na interação do corante com o CMC ou com os produtos de hidrólise, diferenciando a zona de hidrólise por uma cor alterada, permitindo a visualização da hidrólise ocorrida (halo) (KASANA et al., 2008; JOHNSEN; KRAUSE, 2014).

Dentre as quatro linhagens submetidas, três delas apresentaram o halo de degradação, sendo elas o *P. columbinus*, MT1 e MT12, contendo uma visualização nítida da porção distinta. Entretanto, nas placas referentes ao MT6 foi desconsiderado a formação de halos, devido à dificuldade de interpretação visual da fração mais clara ao redor da colônia do fungo.

O método de controle utilizado durante essa fase experimental ocorreu de duas maneiras relacionada a dois parâmetros distintos: I) As quatro linhagens foram inoculadas em meio semi-sólido sem conter a fonte de carbono celulose (CMC 0%), tendo em vista a não formação de halos ou algum comportamento diferenciado nestas placas; II) A espécie *P. columbinus* foi abordada como parâmetro de comparação diante o possível potencial de degradação das linhagens *Macrobrybe spp.* O Quadro 2 demonstra as médias do desempenho de degradação da celulose baseada no aparecimento dos halos referente a cada linhagem submetida aos três meios de CMC, com concentrações distintas (1; 0,2 e 0%) realizadas em triplicatas.

QUADRO 2. FORMAÇÃO DE HALO DE DEGRADAÇÃO DA CELULOSE DAS LINHAGENS *Macrocybe spp.* E *P. columbinus*.

Linhagens	CMC 1% (mm)	CMC 0,2% (mm)	CMC 0% (mm)
MT1	40,06 ± 1,38	37,28 ± 0,59	27,99 ± 3,82
MT6	dnc	dnc	dnc
MT12	65,31 ± 0,53	71,91 ± 0,97	70,86 ± 0,83
<i>P. columbinus</i>	52,11 ± 3,47	39,42 ± 0,337	15,54 ± 0,49

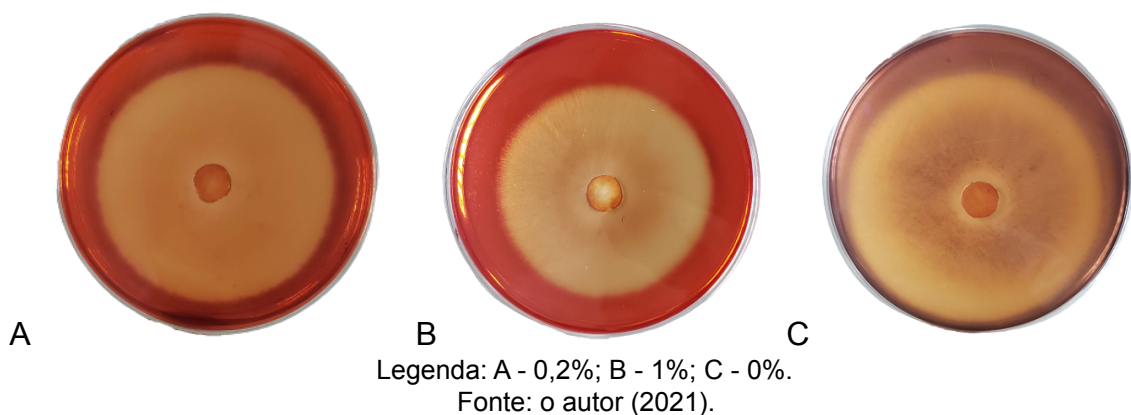
± intervalo de confiança  
dnc: dados não conclusivos

Fonte: o autor (2021).

A linhagem que apresentou a maior dimensão de halo foi o MT12, ocorrendo uma leve diferença entre o meio de 1 e 0,2%, tendo um maior índice de degradação no meio com a menor concentração de celulose (0,2%), atingindo um halo de 71,91 mm. Pode-se apontar que o fungo se adaptou com maior facilidade ao meio de CMC 0,2%, possivelmente secretando uma maior quantidade de enzimas celulolíticas (FIGURA 9).

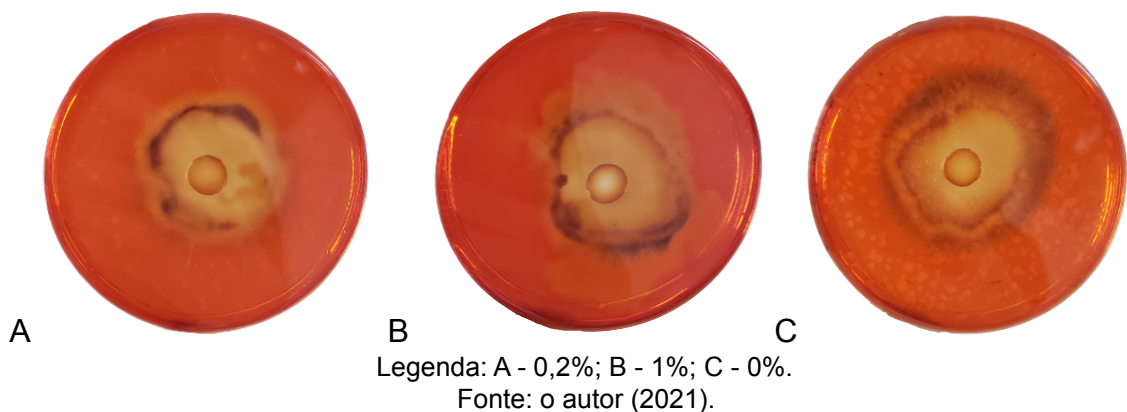
Contudo, o comportamento do MT12 no controle (CMC 0%) não foi o esperado, também demonstrando a formação de halo em grande dimensão (70,86 mm). Entretanto a placa manifestou uma coloração alterada em um tom de sépia, provavelmente devido à secreção micelial de metabólitos secundários que interagem com o corante ou a própria composição de sais do meio, assim ocorrendo o surgimento do halo. Outro fator relevante é referente ao corante Vermelho Congo ser usado como indicador de alteração de pH, e conforme a coloração da placa indica-se um pH alcalino (YOON et al., 2007).

FIGURA 9. FORMAÇÃO DE HALOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO CMC VIA MT12.



Outra linhagem de *Macrocybe spp.* que demonstrou a formação de halos foi o MT1, apesar de constatar um diâmetro menor em geral. O meio em que o microrganismo melhor se desenvolveu foi no CMC 1%, atestando um halo de 40,06 mm, portanto demonstrando uma melhor interação com uma quantidade maior de celulose. O MT1 foi o único isolado até o momento a ser previamente identificado molecularmente pelo grupo de pesquisa NEMA como espécie *M. titans* e o mesmo preliminarmente já possui cultivo em resíduos lignocelulolíticos (SAIKA, 2008) (FIGURA 10).

FIGURA 10. FORMAÇÃO DE HALOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO CMC VIA MT1.

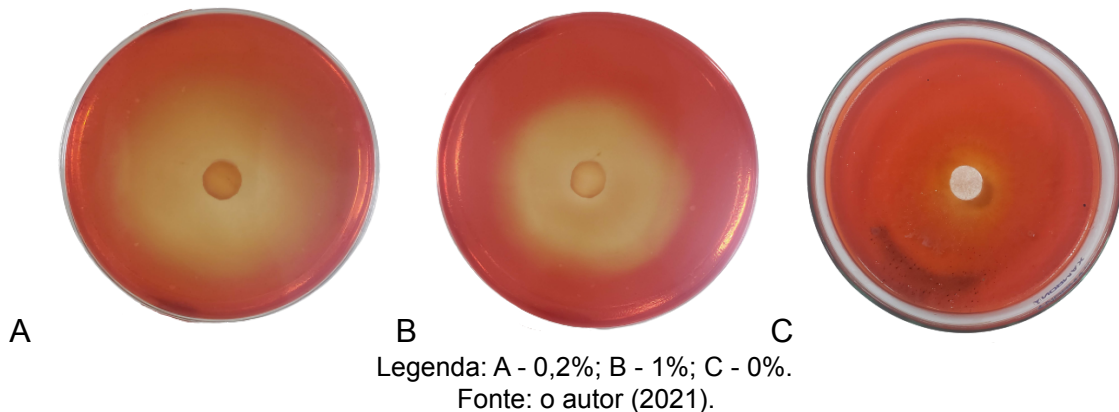


Por fim, foram avaliados os resultados do *P. columbinus*, considerado o controle diante a formação de halo de degradação, pois é um gênero de fungo filamentososo que apresenta propriedades de interações com diferentes materiais vegetais (LUNARDI, 2019; ISLAS, 2019). Seu comportamento perante as duas concentrações de CMC não apresentaram diferenças muito significativas, contudo, no meio de CMC 1% observa-se a formação de halo com maior diâmetro (52,11 mm).

E ao ser inoculado no meio sob a ausência de celulose (CMC 0%), o halo de formação foi consideravelmente menor, chegando em torno de 15,54 mm. Até então a menor porção destacada, o que demonstra o intuito da introdução deste controle desde o início, ou seja, a não formação de halo de degradação da celulose. Porém, o mesmo ainda demonstra uma pequena fração

de halo, detalhe metodológico que deve ainda ser ajustado em trabalhos subsequentes de nossa equipe (FIGURA 11).

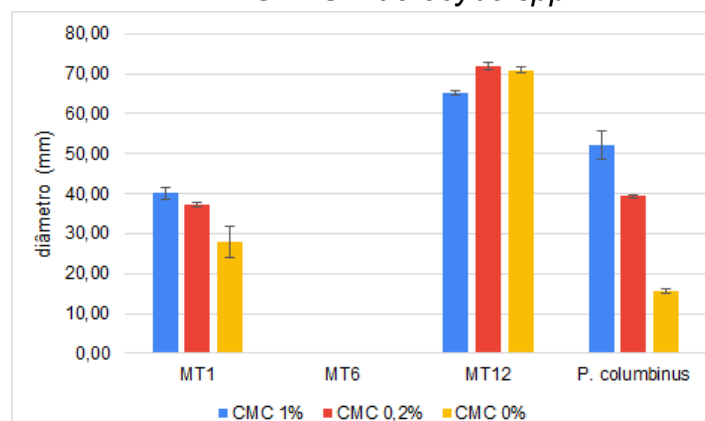
FIGURA 11. FORMAÇÃO DE HALOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO CMC VIA *P. columbinus*.



Ao final deste trabalho conta em anexo as demais fotos de outros ângulos referente às placas de cada isolado e seus respectivos meios de cultivo com concentrações diferentes de CMC. Portanto, o Anexo 1 contempla o isolado MT1, o Anexo 2 apresenta o isolado MT6, o Anexo 3 demonstra o isolado MT12, e por fim o Anexo 4 que exhibe o fungo *P. columbinus*.

Já a análise de comparação entre as linhagens ocorreu conforme o meio submetido (excluindo-se os dados referente ao MT6 pelos motivos supracitados) é apresentada no Gráfico 3., demonstrando um comparativo geral, levando em consideração o desvio padrão das repetições.

GRÁFICO 3. FORMAÇÃO DE HALO DE DEGRADAÇÃO DA CELULOSE DAS LINHAGENS *Macrocybe spp.*



Fonte: o autor (2021).

Como observado no gráfico acima, o MT12 consiste no fungo que obteve os melhores desempenhos nos três meios de CMC, aparentando ser um bom produtor de celulases, superando até mesmo o desenvolvimento do controle *P. columbinus*.

O comportamento das linhagens perante o meio de celulose em maior concentração (CMC 1%) destaca-se MT1 e o *P. columbinus*, com mais afinidade ao substrato em contraposição ao CMC 0,2%. Contudo, o crescimento do MT1 para ambas as concentrações de celulose foi bastante próximo, o que indica a possibilidade de utilizar essa linhagem com uma menor concentração de celulose (0,2%) e obter um crescimento de halo razoável. Já o MT12, aponta um melhor desempenho em concentrações menores de celulose (CMC 0,2%).

Em relação a comparação entre as linhagens aplicadas ao experimento conforme cada concentração de CMC (0,2 e 1%), os mesmos foram submetidos a análises estatísticas ANOVA e as médias avaliadas pelo teste Tukey. E diante o meio CMC 0,2%, apenas os isolados MT1 e *P. columbinos* não apresentam diferenças estatísticas significativas ao nível de confiança de 95%, ou seja, o comportamento de ambos são semelhantes e conseqüentemente seu potencial de degradação da celulose. Já as linhagens em meio CMC 1% sob comparação, todas apresentaram diferenças estatísticas significativas, como já mencionado anteriormente.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante o estudo proposto, ressalta-se a confirmação de um possível potencial do gênero *Macrocybe spp.* em comparação ao *P. columbinus* para a degradação de materiais celulolíticos, devido a demonstração de halos de hidrólise enzimática visíveis em meio de cultura contendo CMC como fonte de carbono. O teste com diferentes concentrações de celulose aponta que cada linhagem apresenta um aspecto único e particular em sua relação enzimática com a CMC. Enquanto MT1 mostra-se capaz de se desenvolver eficientemente em ambos os meios, com uma velocidade de crescimento micelial menor, MT12

apresenta uma preferência em meio de cultura com menor concentração de CMC (CMC 0,2 %). Estes dados preliminares individuais sugerem que linhagens diferentes devem ser empregadas em processos biotecnológicos distintos, dependendo do substrato empregado e da finalidade que se deseja alcançar. Dentre os microrganismos testados, destaca-se o MT12 com seus maiores diâmetros de halo, alcançando sua maior média de 71,91 mm, superando inclusive *P. columbinus*, o controle experimental deste experimento, conhecido por sua grande capacidade de degradação de celulose.

## 5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O estudo inicialmente apresentou resultados promissores para uma possível aplicação de linhagens de *M. titans* na degradação de CMC. Dentre as ideias iniciais do plano de trabalho incluíam-se a análise de crescimento em meio líquido, detecção de atividade enzimática e análise da expressão gênica em tempo real das linhagens. Entretanto, no curto período destinado a esse semestre, em decorrência das adaptações realizadas pela pandemia de Covid-19, não foi possível concluir todos os pontos da proposta.

Outro fator interessante a ser analisado, é o comportamento dos isolados referente a degradação de corantes com aplicação potencial na área de biorremediação, biodegradação de xenobióticos recalcitrantes, pesticidas ou produção de metabólitos secundários, diante as placas de controle (CMC 0%) que apresentarem a formação de halos. Estas áreas também serão objeto de trabalhos futuros por nossa equipe, em trabalhos de graduação e pós-graduação. Alguns destes trabalhos já estão em andamento por alunos de mestrado e doutorado, como por exemplo, a produção de PAMS (peptídeos antimicrobianos) por *M. titans*, para possível aplicação na indústria farmacêutica.

## REFERÊNCIAS

- ÂNGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. Org: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.
- BALDRIAN P., VALÁSKOVÁ V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiol Rev**, v. 32, p. 501–521, 2008.
- BATTISTIN, E.; PICCIOLA, P. Two particular taxa from Brazil: *Macrocybe titans* and *Marasmius leoninus*. **Rivista Micologica Romana. Bollettino dell'Associazione Micologica ed Ecologica Romana**, v. 96, n. 3, p. 31-38, 2015.
- CARVALHO, I. et al. Isolamento E Seleção De Fungos Filamentosos Com Atividade De Celulase Isolados Em Áreas De Floresta Amazônica Meridional. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.
- COURI, S. et al.. Enzimas na produção de alimentos e bebidas. Org: BOM, E. P. S; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência UJRJ-CAPES-FAPERJ-FCT, 2008.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes – estatística experimental e matrizes**. 1. ed. Viçosa: UFV, v. 1, p. 285, 2006.
- DEVI, S.; SUMBALI, G.. Efficacy of different agricultural wastes and casing materials on the growth and yield of *Macrocybe gigantea* (Masse) Pegler & Lodge. **Indian Phytopathology**, p. 1-7, 2021.
- DUONG P.N. et al. Studying identification and cultivation of *Macrocybe titans*, a new record species for Vietnam collected in Cat Tien National Park, south of Vietnam. **Tap Chi Sinh Hoc**, v. 39, p. 172–181, 2017.
- ESTEVAN, D. A. et al.. Estrutura e relações florísticas de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual, Londrina, Paraná, Brasil. **Ciência Florestal**, v. 26, p. 713-725, 2016.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter. New York: de Gruyter, 1986.
- HANSEN, G. H. et al.. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1327–1341, 2015.
- ISLAS, A. I. et al. **Aprovechamiento de residuos agroforestales en el cultivo de hongos Basidiomicetos**. Proyecto Terminal Que Para Obtener El Título De Ingeniero En Biotecnología. Universidad Abierta y a Distancia de México, 2019.
- JOHNSEN, H. R.; KRAUSE, K. Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant

tissue prints. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 830-838, 2014.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

LEITE, . C. L. Taxonomia dos fungos. Org: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

LUNARDI, J. S.. **Cultivo de Pleurotus ostreatus utilizando bagaço de malte, serragem e casca de arroz**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2019.

MADIGAN, M. T. et al.. Metabolismo microbiano. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia de Brock**. 14ª Edição. Artmed Editora, 2016.

MELLO, S. C. M.; REIS, A.; SILVA, J. B. T. Manual de curadores de germoplasma-micro-organismos: fungos filamentosos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011.

MILHORINI, S. da S. et al.  $\beta$ -Glucans from the giant mushroom *Macrocybe titans*: Chemical characterization and rheological properties. **Food Hydrocolloids**, p. 107392, 2021.

MILHORINI, S. da S. et al. Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration. **Carbohydrate polymers**, v. 190, p. 50-56, 2018.

MOOD, S. H. et al.. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p.7-9, 1996.

OLATUNJI, O.; AKINLABI, S.; MADUSHELE, N. Application of Lignocellulosic Biomass (LCB). In: DARAMOLA, M. O.; AYENI, A. O. **Valorization of Biomass to Value-Added Commodities**. Springer, Cham, p. 3-19, 2020.

OLIVEIRA, T. **Avaliação da produção de enzimas celulolíticas por fungos isolados da região dos Campos Gerais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2020.

ORESHEK, J. et al.. New carboxymethyl cellulose tosylate with low biodeterioration. **Carbohydrate Polymers**. v.113, p.16-21, 2014.

OSORIO-GONZÁLEZ, C. S. et al. Production and Processing of the Enzymes from Lignocellulosic Biomass. In: DARAMOLA, M. O.; AYENI, A. O. **Valorization of Biomass to Value-Added Commodities**. Springer, Cham, p. 221-243, 2020.

PALMIERI, G. et al.. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appl and Environmental Microbiology**. p.920-924, 2000.

PEGLER, D. N. et al.. The pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 494-504, 1998.

PORTAL FUNGOS SHOP. **Macrocybe titans**. Disponível em: <<https://www.fungoshop.com/wp-content/uploads/2019/11/Macrocybe-titans-Cogumelo-Gigante.pdf>>. Acessado em: 20 dez. 2021.

QINNGHE, C. et al.. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**. v.39, p. 561-1566, 2004.

RAMÍREZ, N. A. et al. First record of *Macrocybe titans* (Tricholomataceae, Basidiomycota) in Argentina. **Check List**, v. 13., n. 4, p. 153-158, 2017.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 330-340, 2017.

RODERJAN, C. V. et al. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná, Brasil. **Ciência & Ambiente**, v. 24, n. 1, p. 75-92, 2002.

ROGÉRIO, E. C. **Macrocybe spp. no Estado do Paraná**. 2018.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, p. 205-211, 2004.

SAIKA, R. A. **Determinação do perfil químico e bioquímico de *Macrocybe titans***. 83 f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

SHISHIDO, K. **The application of molecular genetics to oriental mushrooms. Applied molecular genetics of filamentous fungi**. London: Blackie Academic and Professional, Chap.9, p.201-213, 1992.

SILVA, P. et al. Identificação parcial de Fungos Celulolíticos Isolados de Solo da UEG Campus Palmeiras de Goiás. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC**, 2016.

SINGHANIA R. R. et al.. Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76–82, 2016.

STIJVE, T. The tropical giant mushroom *Macrocybe titans* is edible and can be cultivated. **Antwerpse Mycologische Kring. AMK Mededelingen** v. 3, p. 93–94, 2004.

THEATER, R. E WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, no. 4, p. 777-780, abr. 1998.

THIELE, S. et al. Estabelecimento de protocolo para identificação de bactérias com potencial celulolítico. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 8, n. 2, 2019.

WEI, H., XU, Q., TAYLOR, L. E. et al.. Natural paradigms of plant cell wall degradation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 330-338, 2009.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 289-297, 2008.

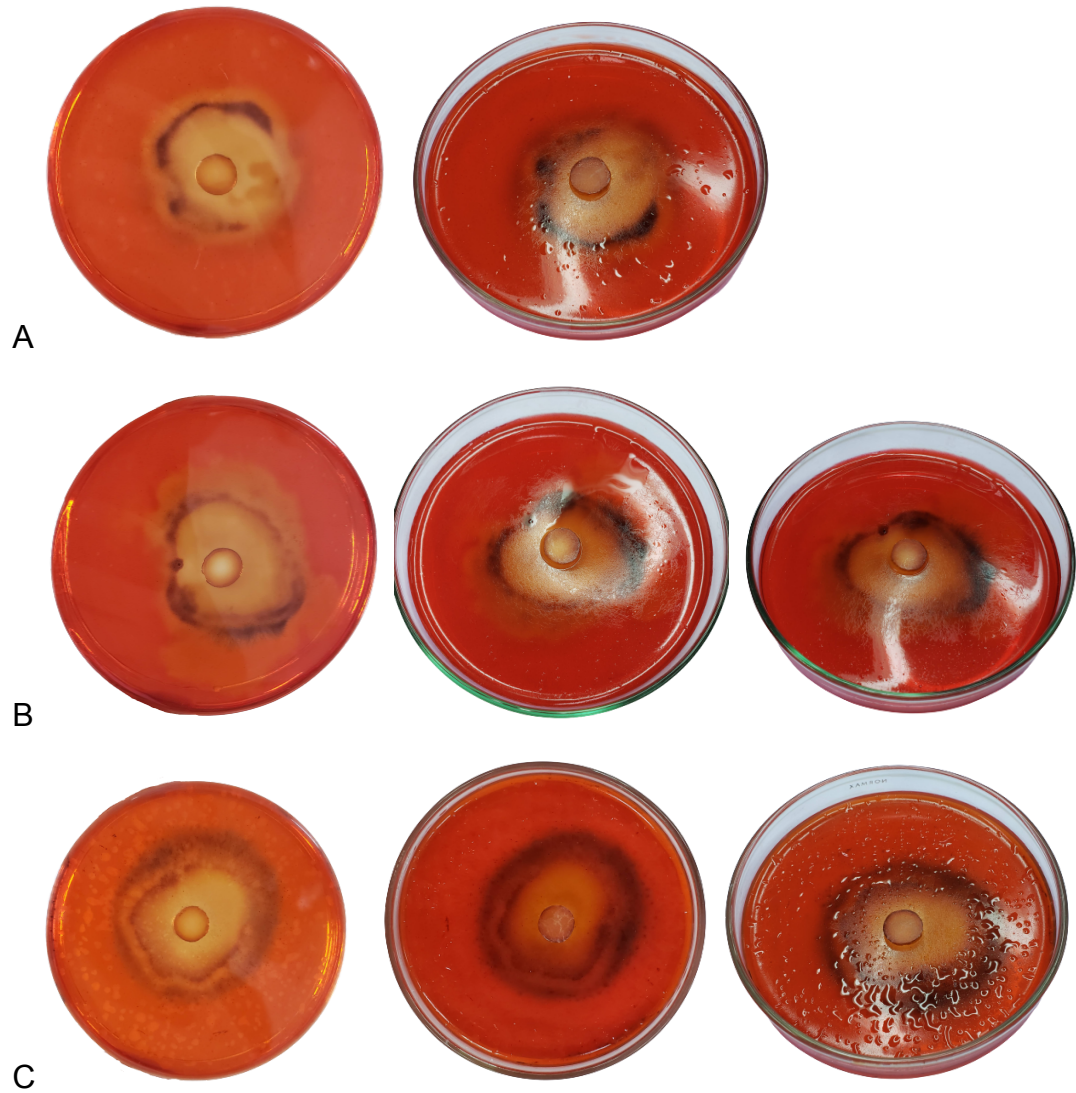
WISNIEWSKI A. C. **Produção de  $\alpha$ -amilase e glucoamilase por *Macrocybe titans* cultivado em resíduos sólidos agroindustriais**. Dissertação, Blumenau: Universidade Regional de Blumenau, 2009

WISNIEWSKI, A. C. et al. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, 2010.

WRIGHT, J. D. et al.. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 75-90, 1988.

YOON, J. W. et al. Comparison of Dyes for Easy Detection of Extracellular Cellulases in Fungi, **Mycobiology**, v.35, n. 1, p. 21-24, 2007.

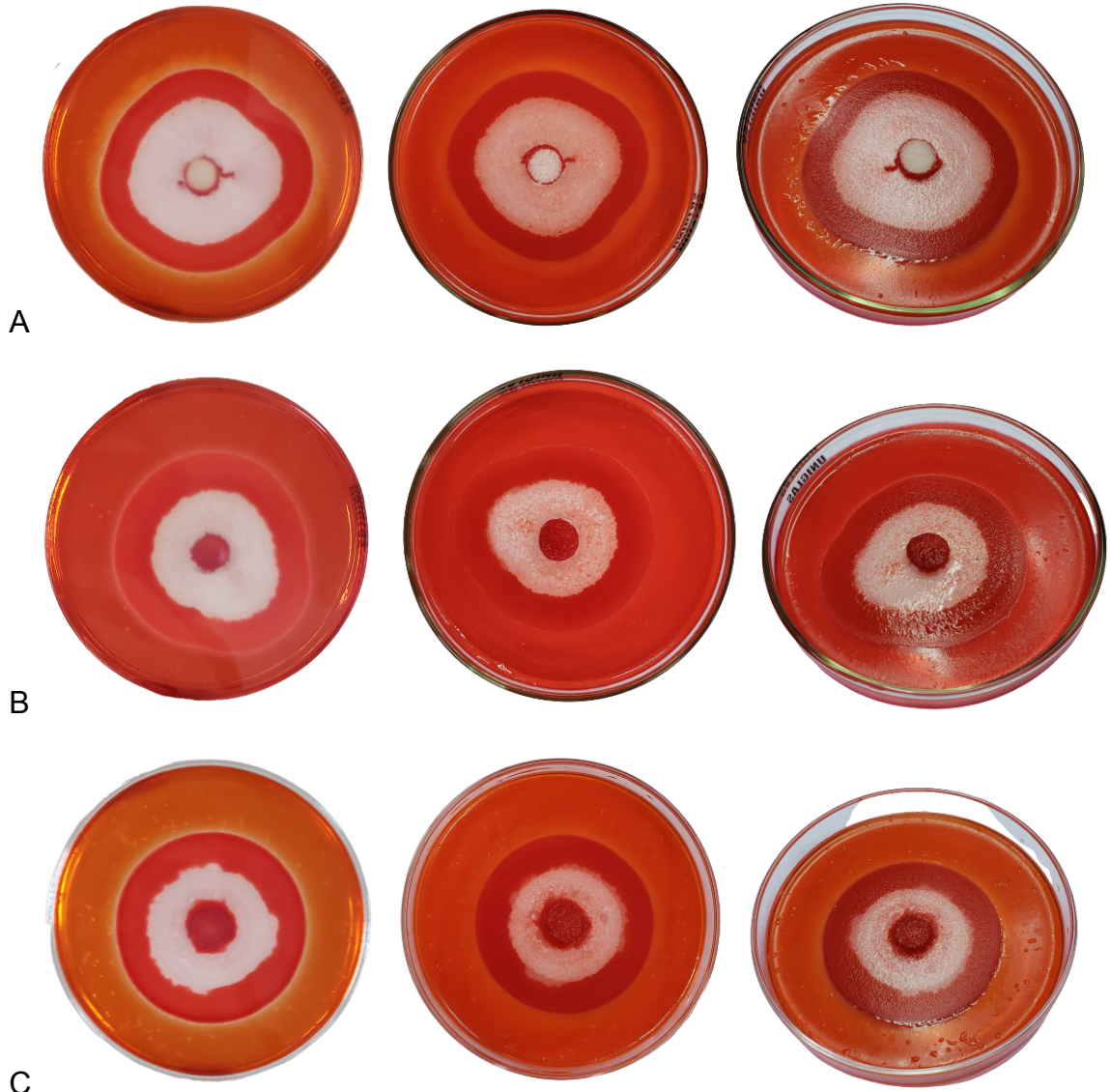
**ANEXO 1 – IMAGENS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO DE CELULOSE  
VIA LINHAGEM MT1**



Legenda: A - 0,2%, B - CMC 1% , C - CMC 0%

Fonte: o autor (2021).

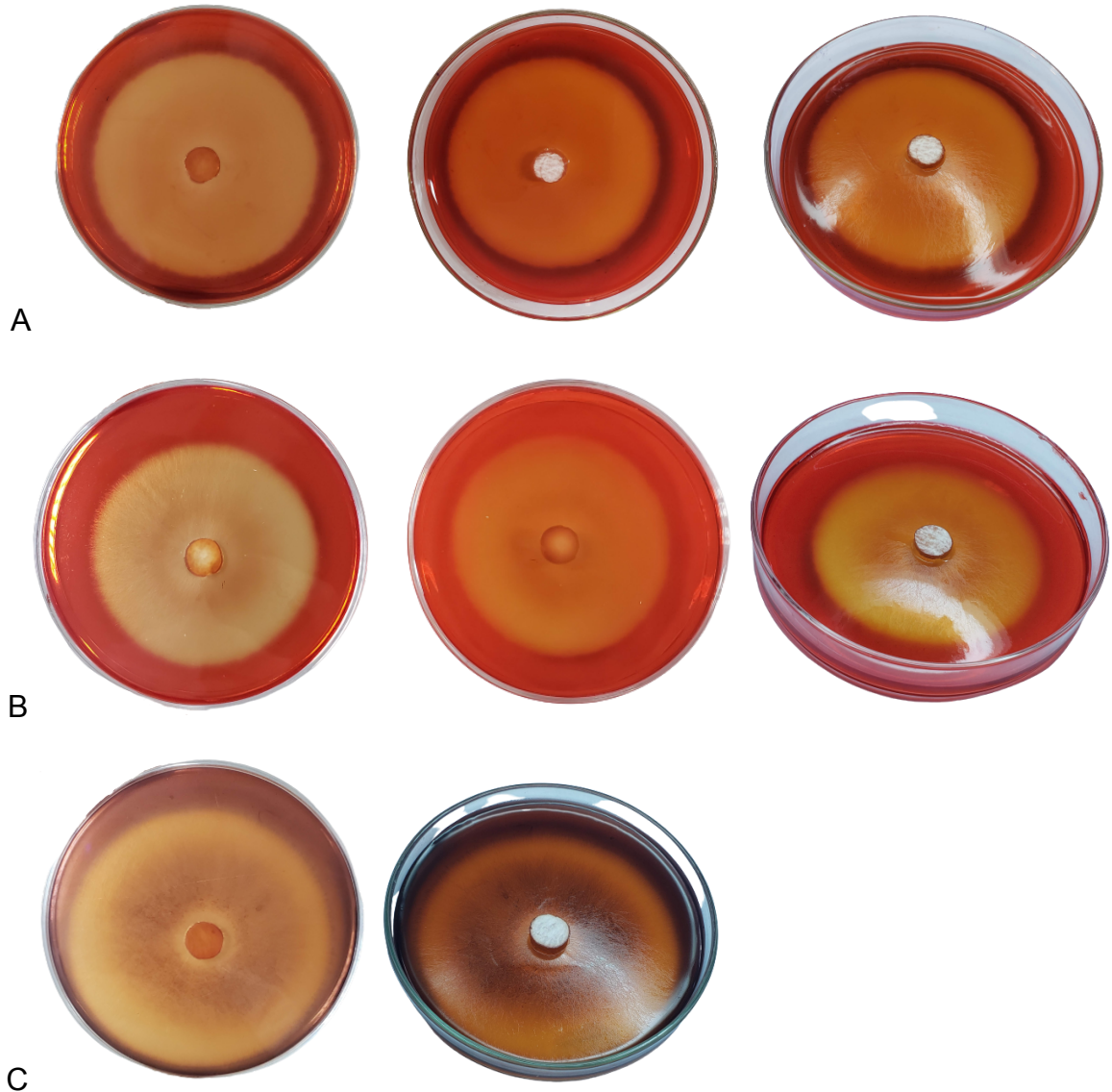
**ANEXO 2 – IMAGENS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO DE CELULOSE  
VIA LINHAGEM MT6**



Legenda: A - 0,2%, B - CMC 1% , C - CMC 0%

Fonte: o autor (2021).

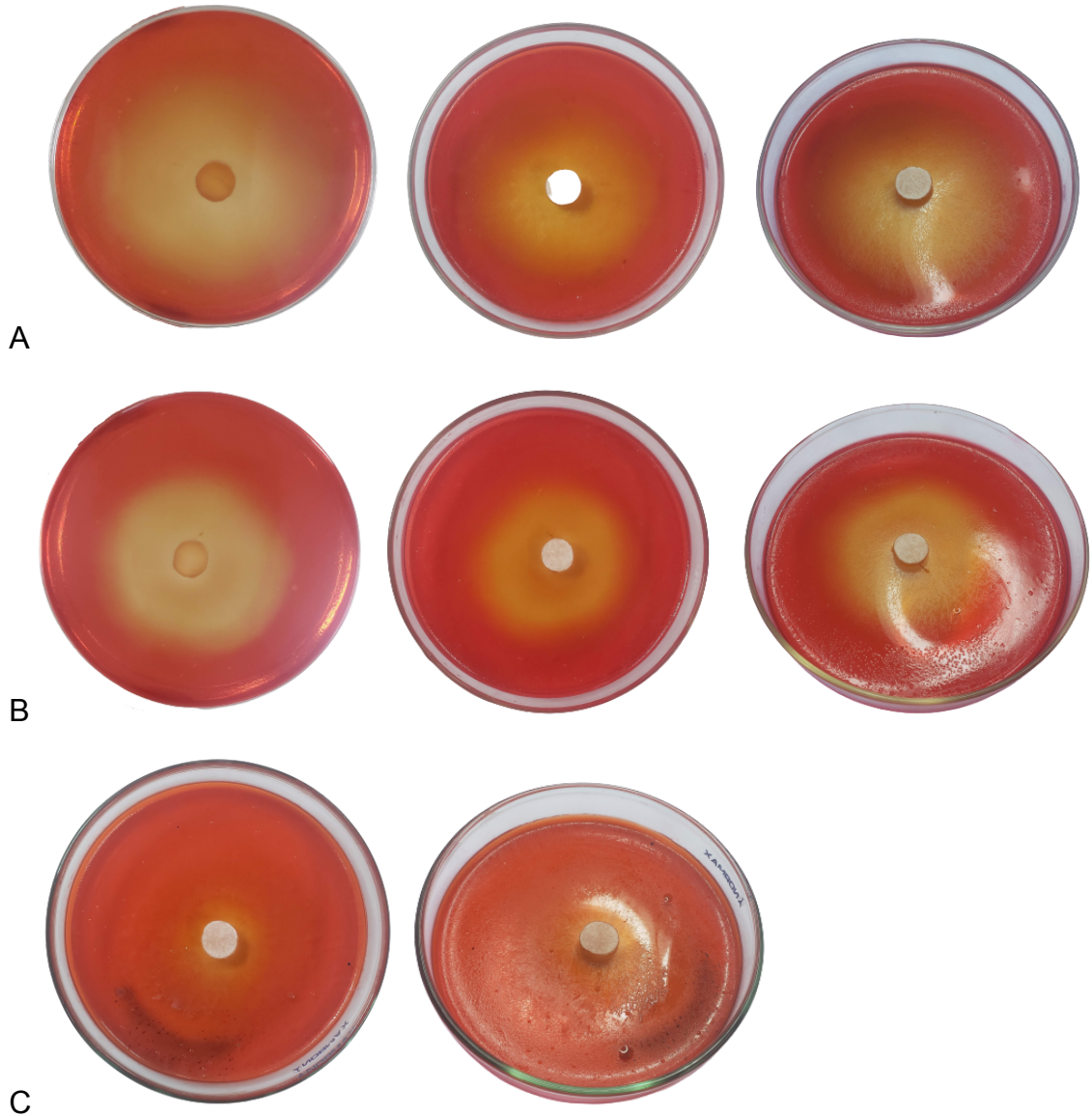
**ANEXO 3 – IMAGENS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO DE CELULOSE  
VIA LINHAGEM MT12**



Legenda: A - 0,2%, B - CMC 1% , C - CMC 0%

Fonte: o autor (2021).

**ANEXO 4 – IMAGENS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO DE CELULOSE  
VIA LINHAGEM *P. columbinus*.**



Legenda: A - 0,2%, B - CMC 1% , C - CMC 0%

Fonte: o autor (2021).