



Bioprospecção de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* visando a produção de enzimas celulolíticas para uso em extração de óleos essenciais

Bioprospecting of filamentous fungi of the *Trichoderma* genus aiming at the production of cellulolytic enzymes for use in essential oil extraction.

Renan Cortazzi Lopes da Silva¹, Viviane S. Lobo²

RESUMO

Os óleos essenciais são compostos aromáticos produzidos de plantas por meio de processos metabólicos secundários. No entanto, sua extração enfrenta desafios, como baixo rendimento e tempo prolongado, o que acarreta custos em sua produção. Uma solução inovadora envolve o uso de enzimas degradadoras de celulose para melhorar a extração. O gênero *Trichoderma* é conhecido por produzir celulases. Uma das opções para adquirir o fungo envolve a prática da bioprospecção, na qual envolve a seleção dos microrganismos presentes em um determinado habitat, a fim de utilizá-los para aplicações de interesse. O objetivo do estudo é a bioprospecção de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, a partir de uma amostra de solo, visando a produção de enzimas celulolíticas para futuro uso em extração de óleos essenciais. Dessa forma, os fungos bioprospectados foram cultivados e selecionados com base em análises morfológicas e índices enzimáticos. Amostras foram isoladas, purificadas e identificadas, mostrando crescimento em meio com celulose e secreção de enzimas celulolíticas, indicando potencial para uso em extração de óleo essencial.

PALAVRAS-CHAVE: bioprospecção; enzimas celulolíticas; gênero *Trichoderma*.

ABSTRACT

Essential oils are aromatic compounds produced by plants through secondary metabolic processes. However, their extraction faces challenges such as low yield and extended time, resulting in production costs. An innovative solution involves the use of cellulose-degrading enzymes to enhance extraction. The genus *Trichoderma* is known to produce cellulases. One option to acquire the fungus involves the practice of bioprospecting, which entails the selection of microorganisms present in a specific habitat for potential applications. The study's objective is the bioprospecting of filamentous fungi from the genus *Trichoderma*, sourced from a soil sample, with the aim of producing cellulolytic enzymes for future use in essential oil extraction. Thus, the bioprospected fungi were cultivated and selected based on morphological analyses and enzymatic indices. Samples were isolated, purified, and identified, demonstrating growth in cellulose-containing medium and secretion of cellulolytic enzymes, indicating potential for use in essential oil extraction.

KEYWORDS: bioprospection; cellulolytic enzymes; *Trichoderma* genus.

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são substâncias de grande valor, resultantes de processos metabólicos secundários durante o crescimento de plantas. Estes compostos aromáticos têm ganhado reconhecimento em escala global, encontrando aplicação em diversas indústrias, como a alimentícia, cosmética, farmacêutica e química. Em 2021, o mercado de óleos essenciais atingiu um valor estimado de US\$ 10,3 bilhões, abrangendo cerca de 253

¹ Discente do curso de engenharia de bioprocessos e biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil. E-mail: renan.cortazzi@gmail.com. ID Lattes: 1283788484632600

² Docente no curso de engenharia de bioprocessos e biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil. E-mail: vivianelobo@utfpr.edu.br. ID Lattes: 3219620885362801.



mil toneladas. Esses números expressivos ilustram não apenas a importância dos óleos essenciais, mas também o potencial de crescimento contínuo desse mercado, podendo alcançar um faturamento de 16 bilhões de dólares anuais e uma produção de 345 mil toneladas até o ano de 2026 (BIZZO; REZENDE, 2022).

No entanto, apesar do crescimento constante no mercado de óleos essenciais, a produção desses extratos naturais enfrenta desafios significativos. A extração de óleos essenciais é uma etapa crítica, normalmente realizada por meio de diferentes processos convencionais, como a hidrodestilação. No entanto, um dos principais desafios é obter quantidades adequadas desses produtos, uma vez que o teor dos óleos extraídos geralmente é baixo, muitas vezes inferior a 1% de massa seca em várias espécies vegetais (SERAFINI *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2012).

Uma alternativa com potencial é a utilização do tratamento enzimático associado aos métodos de extração de óleos essenciais. Nesse processo, as enzimas específicas são usadas para romper as paredes celulares, facilitando a extração, aumentando a velocidade e o rendimento do processo (SANTOS, 2008). Esse pré-tratamento enzimático pode ser aplicado no material vegetal fresco antes do processo de hidrodestilação, otimizando assim o tempo de extração, eliminando a etapa de secagem e reduzindo a energia necessária para o processo. A desvantagem é o custo das enzimas comerciais, mas a utilização de extratos enzimáticos brutos pode ser uma alternativa economicamente viável, produzidos a partir da fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar. (COSTA, 2018).

Nesse contexto, os microrganismos desempenham um papel crucial na produção de extratos enzimáticos, visto que eles produzem moléculas com características químicas específicas, em altas concentrações e com baixo impacto ambiental. Os fungos filamentosos, em particular do gênero *Trichoderma*, se destacam devido à sua capacidade de secretar enzimas, incluindo celulasas, em ambientes de cultivo. Eles são adaptáveis a diversos substratos, incluindo efluentes industriais, resíduos agrícolas e agroindustriais, e materiais alimentícios, o que os torna capazes de degradar a celulose e utilizá-la como fonte de carbono para sua reprodução (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Uma das opções para adquirir o fungo envolve a prática da bioprospecção. Essa abordagem de cultivo implica na seleção dos microrganismos presentes em um determinado habitat, a fim de utilizá-los para aplicações de interesse. Esse processo se torna particularmente viável devido ao baixo custo e à vasta extensão territorial do Brasil. Além disso, o fato de o país estar situado nos trópicos o coloca como um dos lugares do planeta com a maior biodiversidade, tornando-o um território propício para a bioprospecção (ALMEIDA *et al.*, 2015). Isso é relevante no caso do gênero *Trichoderma*, que possui uma distribuição bastante ampla em quase todos os tipos de solos e outros habitats naturais. Isso demonstra a riqueza potencial desse recurso no Brasil e o torna um alvo para a bioprospecção (ALMEIDA *et al.*, 2015; SANTOS, 2008).

Portanto, o objetivo do estudo é a bioprospecção de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, a partir de uma amostra de solo, visando a produção de enzimas celulolíticas para futuro uso em extração de óleos essenciais.

METODOLOGIA

Para a obtenção de fungos filamentosos degradadores da matéria vegetal foram analisadas amostras de solo recolhidas em uma região florestal da cidade de Toledo – PR,



sendo as coordenadas de localização em -24.731268 Sul, -53.764026 Leste, obtendo-se 100 g de amostra de solo para uma maior variedade de microrganismos.

No processo de isolamento, foi empregada a técnica clássica de diluição seriada seguida pelo plaqueamento, conforme descrito por Clarck (1965). Inicialmente, 25 g de solo foram acondicionados em frascos erlenmeyer contendo 225 mL de água destilada estéril e 5 gotas de Tween 80. A amostra de solo foi agitada em uma mesa agitadora (modelo SL-180/A) por 30 minutos a 150 rpm.

Após a agitação, realizaram-se diluições seriadas até alcançar uma diluição de 10^{-4} . Posteriormente, as diluições foram plaqueadas em ágar Sabouraud e incubadas a 30 °C por 7 dias. Após o período de incubação, as amostras foram examinadas em busca de colônias distintas que apresentassem características próximas às dos fungos do gênero *Trichoderma*, de acordo com a literatura.

As colônias selecionadas foram isoladas por meio da introdução de pequenas amostras dos microrganismos no centro das placas contendo meio ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e incubadas por 3 dias a 30 °C, conforme descrito por Silva e Souza (2013).

Após a etapa de purificação, as colônias fúngicas foram transferidas para um meio específico conhecido como BDA (Ágar Batata Dextrose) em tubos de ensaio. Essa transferência tinha como objetivo permitir a identificação com base em características macroscópicas, incluindo coloração, textura e diâmetro das colônias, além de análises microscópicas para a observação das microestruturas filamentosas.

As colônias selecionadas foram posteriormente inoculadas em meio CMC (Carboximetilcelulose) com a seguinte composição: $NaNO_3$: 3,0 g/L; K_2HPO_4 : 1,0 g/L; $MgSO_4$: 0,5 g/L; KCl : 0,5 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 10,0 mg/L; CMC: 10,0 g/L; ágar: 20,0 g/L. Para a avaliação do índice enzimático dos microrganismos produtores de celulase, foi adicionada uma solução de Vermelho Congo até cobrir completamente a superfície do meio nas placas de CMC. Após um período de 15 minutos em temperatura ambiente, o excesso da solução foi cuidadosamente descartado, e as placas foram lavadas por três vezes com uma solução de NaCl.

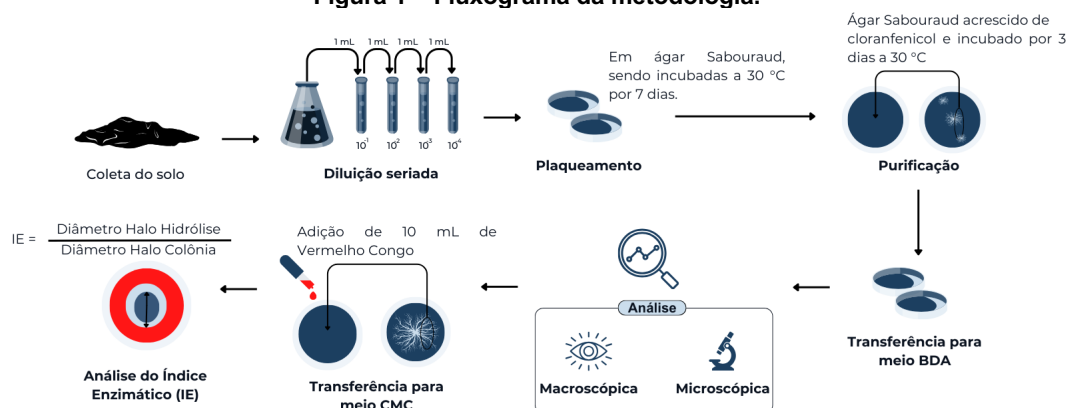
Para a determinação do índice enzimática, foi utilizada a relação entre o diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia, Equação 1, de acordo com a método de Maciel (2006).

$$IE = \frac{\text{Diâmetro do Halo de degradação}}{\text{Diâmetro do Halo da colônia}} \quad (1)$$

Uma amostra do fungo foi selecionada e armazenada em microtubos de 2 mL, contendo água destilada estéril, e conservada em uma geladeira convencional a 5 °C, seguindo o método de Castellani (1939).

O fluxograma da metodologia completa aplicada nesse estudo está apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma da metodologia.



Fonte: Próprio Autor (2023)

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Mediante o emprego de diluição seriada e posterior plaqueamento em meio Sabouraud (Figura 2a), quatro fungos com características que se assemelham ao gênero *Trichoderma* foram identificados e selecionados entre uma variedade de fungos presentes no meio de cultura. Esse processo culminou na obtenção de oito placas cultivadas contendo esses fungos, as quais foram destinadas ao processo de purificação.

O processo de isolamento inicial foi conduzido no meio Sabouraud, o qual é caracterizado por sua menor seletividade, permitindo o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, abrangendo fungos, bactérias e leveduras. A escolha do desse meio para o isolamento inicial visa assegurar a representatividade da amostra, considerando que ambientes naturais podem conter diversas espécies de fungos, incluindo o gênero *Trichoderma*.

Para evitar o crescimento bacteriano de microrganismos competidores de espécimes mistos, como bactérias, foi adicionado cloranfenicol ao meio Sabouraud, atuando como um agente seletivo. Isso permitiu o isolamento de fungos, incluindo potenciais candidatos do gênero *Trichoderma*. Posteriormente, as culturas obtidas no meio Sabouraud foram purificadas em meio BDA. Este meio é mais seletivo e propício ao crescimento de fungos filamentosos, como o gênero de interesse, ao mesmo tempo em que inibe o crescimento de outros microrganismos indesejados. Os resultados das análises foram consistentes com a literatura, mas para uma identificação precisa do gênero e da espécie do fungo estudado, é fundamental realizar uma caracterização mais detalhada, através das técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento de DNA.

Entre os fungos presentes no meio BDA, apenas três apresentaram as características semelhantes ao *Trichoderma*. Essas culturas exibiram um crescimento micelial de rápido desenvolvimento, resultando em conidióforos agrupados e aglomerados. Além disso, as células têm uma forma semelhante a balões e estão organizadas em grupos dispersos em colônias de cor branca e verde, conforme também observado por Castle *et al.* (1998).

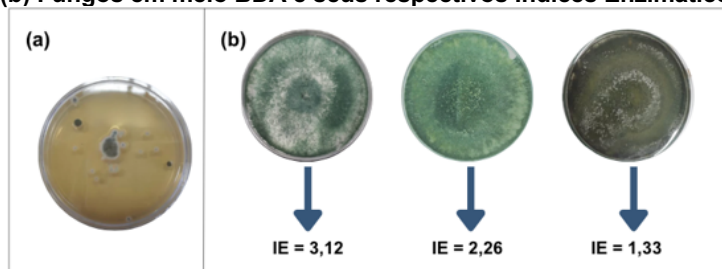
Os selecionados foram transferidos para o meio CMC. Esse meio de cultura é preferencialmente utilizado como substrato para a atividade das enzimas pertencentes ao complexo celulolítico, que têm a responsabilidade de iniciar a hidrólise da molécula de

celulose. Essa preferência se deve às características específicas deste meio, que incluem um elevado grau de polimerização e uma baixa cristalinidade (ZHANG *et al.*, 2006).

O uso de corantes, como o Vermelho Congo, foi uma abordagem indireta para a seleção de microrganismos com potencial para produção de celulases. Esse corante interage de maneira intensa com polissacarídeos que contêm ligações β -1,4-D-glucopiranosil, proporcionando uma detecção sensível fungos produtores de celulases (TEATHER; WOOD, 1982).

Através da Equação 1, foram obtidos os índices enzimáticos. Segundo Maciel (2008) para que um microrganismo seja considerado um potencial produtor de celulase, suas linhagens devem exibir uma relação entre o diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia maior que 1,50. Os resultados revelaram um cenário promissor, como evidenciado na Figura 2b. Assim, dois dos fungos selecionados demonstraram um potencial significativo como produtores de celulases, tornando-os candidatos ideais para a obtenção de um extrato enzimático bruto. Esse extrato enzimático bruto pode, por sua vez, ser aplicado de maneira eficaz no processo de extração dos óleos essenciais.

Figura 2 – (a) Fungos isolados no meio Sabouraud;
(b) Fungos em meio BDA e seus respectivos Índices Enzimáticos



Fonte: Próprio Autor (2023)

CONCLUSÃO

Conclui-se que os fungos obtidos na bioprospecção demonstraram características que os tornam candidatos ideais para a obtenção de extratos enzimáticos brutos. Contudo, para uma identificação precisa do gênero e da espécie do fungo, será necessário o uso de técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento de DNA.

Agradecimentos

Agradeço ao BioPark e à UTFPR pelo apoio que proporcionaram neste estudo. Além disso, expresse minha gratidão à minha professora orientadora, Viviane S. Lobo, por ter acreditado no meu potencial para conduzir esta pesquisa.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS



ALMEIDA, J. M I *et al.* Canola meal as a novel substrate for β -glucosidase production by *Trichoderma viride*: application of the crude extract to biomass saccharification.

Bioprocess Biosyst Eng., v. 38, n. 10, p. 1889-1902, 2015.

BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, [S. l.], v. 45, n. 8, p. 949-958, 2022.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.

CASTLE, A. *et al.* Identificação morfológica e molecular de isolados de *Trichoderma* em fazendas de cogumelos na América do Norte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 133-137, jan. 1998.

CLARK, F.E. Agar-plate method for total microbial count. In Methods of soil analysis, Part 2. **Chemical and microbiological properties**. Madson, Nova York, p. 1460-1466, 1965.

COSTA, M. A. R. **Utilização de extratos enzimáticos no processo de extração do óleo essencial de *Croton argyrophyllus***. Dissertação de Mestrado. UESB, Iltaipetinga, Bahia, 2018.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Tese de Mestrado. UFPR, Curitiba, 2006.

SANTOS, E. **Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais**. Dissertação de mestrado, 127p., 2008.

SERAFINI, L. A *et al.* Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. Caxias do Sul: **EDUCS**, 2002.

SILVA, E. R.; SOUZA, A. S. Introdução ao estudo da microbiologia: teoria e prática. **Editora IFB**, ISBN 978-85-64124-22-6, p. 66, 2013.

SILVEIRA, J. C *et al.* Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 2038-2052, 2012.

SOLIMAN, F. M, *et al.* Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Egypt. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 9, n. 1, p. 29-33, 1994.

TEATHER, R.M.; 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, n. 4, p. 777-789, 1982.

ZHANG, Y.H.P *et al.* Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.