

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DABS – Diretoria de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde
COGEC – Coordenação do Programa de Pesquisa em Gestão de Ecossistemas

Anexo II – Chamada 2 - Pesquisa em Redes Temáticas para Ampliação do Conhecimento sobre a Biota, o Papel Funcional, Uso e Conservação da Biodiversidade Brasileira

MODELO ESTRUTURADO – PROJETO COMPLETO

TÍTULO DA PROPOSTA DE REDE DE PESQUISA:	Bioprospecção de Fungos Filamentosos Visando Aplicação de Holoenzimas em Biorefinaria
COORDENADOR DA PROPOSTA DE REDE DE PESQUISA:	Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli
INSTITUIÇÃO EXECUTORA:	- Universidade de São Paulo/USP/FFCLRP/Departamento de Biologia
INSTITUIÇÃO (ÕES) COLABORADORA (S):	1- Centro de Ensino Superior Nilton Lins/CESNL/Manaus, Amazonas 2- EMBRAPA-Florestas de Colombo, Paraná 3- Instituto de Tecnologia e Pesquisa/ITP/Aracaju, Sergipe 4- Universidade de Brasília/UnB/Departamento de Biologia Celular, Distrito Federal 5- Universidade de São Paulo/USP/FCFRP/ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, São Paulo 6- Universidade de São Paulo/USP/FFCLRP/ Departamento de Química, Ribeirão Preto, São Paulo 7- Universidade do Estado de Mato Grosso/UNEMAT/ Campus de Tangará da Serra/Departamento de Ciências Biológicas, Mato Grosso 8- Universidade Estadual de Maringá, PR/UEM/ Departamento de Bioquímica, Paraná 9- Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC/ Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus, Bahia 10- Universidade Estadual do Oeste do Paraná/ UNIOESTE/Campus de Cascavel/Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Paraná

	11- Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE/Campus de Foz do Iguaçu/ Centro de Educação e Letras, Paraná 12- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/UNESP/ Campus de Ilha Solteira/ Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia, São Paulo 13- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/UNESP/ Campus de São José do Rio Preto/Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/Departamento de Biologia, São Paulo 14- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS/ Campo Grande, MS/Departamento Morfofisiologia, Mato Grosso do Sul 15- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS/ Campus do Pantanal, Corumbá, MS/Departamento de Ciências do Ambiente, Mato Grosso do Sul	
EDITAL:	Edital MCT/CNPq/MEC/CAPES/FNDCT – Ação Transversal/FAPs Nº 47/2010 – Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade - SISBIOTA BRASIL, visando ampliar o conhecimento e entendimento da biodiversidade brasileira, melhorar a capacidade preditiva de respostas a mudanças globais, particularmente às mudanças de uso e cobertura da terra e mudanças climáticas; associando as pesquisas à formação de recursos humanos, educação ambiental e divulgação do conhecimento científico.	
SITUAÇÃO DA PROPOSTA: Obs. Assinalar uma das opções (subitem II.1.1.4.1 do Edital) e informar o programa, se aplicável	(x)	Proposta nova para financiamento integral
	()	Proposta que integra programa já existente e com financiamento vigente do MCT/CNPq e/ou FAPs. Em caso afirmativo, informe o Programa (e.g.: PPBio, GEOMA, PELD, RENORBIO, COMCERRADO, BIONORTE, Biota estaduais, LBA, INCTs, PROBIO):

ADERÊNCIA TEMÁTICA:

Obs. Descrever a aderência da proposta à chamada 2 (subitem II.1.1.4.1 do Edital)

A proposta guarda aderência segundo o subitem II.1.1.4.1 do Edital, principalmente, as seguintes linhas temáticas:

- ampliação do conhecimento sobre a diversidade brasileira – catalogação de fungos filamentosos isolados correlacionando-os com o local de coleta;
- diversidade filogenética - análise por ITS, Internal Transcribed Spacer;
- diversidade funcional – produção enzimática;
- diversidade morfológica de fungos filamentosos;
- processos relacionados à biodiversidade – produção enzimática correlacionada com o local de coleta;
- processos relacionados à biodiversidade – efeito de herbicidas sobre o crescimento e produção de enzimas ligninolíticas. Avaliação de toxicidade;
- isolamento de fungos filamentosos pouco conhecidos ou estudados. Metagenômica;
- valorização da biodiversidade e dos produtos relacionados (enzimas fibrinolíticas) através de estudos de bioprospecção de fungos filamentosos;
- em todos os aspectos deve-se considerar que fungos filamentosos são degradadores naturais de matéria orgânica em decomposição, o que afeta a biodiversidade e o meio ambiente.

A proposta deste projeto está estruturada no estudo de fungos filamentosos com potencial produção de enzimas com aplicação em biorefinaria, como celulasas, xilanases e ligninases (grupo taxonômico funcional – chamada 2).

As coletas vão abranger biomas de todas as regiões do Brasil, como Amazônia (Região Norte), Pantanal, Cerrado do Mato Grosso do Sul e demais regiões do Mato Grosso e do Distrito Federal (Região Centro Oeste), Regiões de Sergipe e Bahia (Região Nordeste), Florestas e Parques Estaduais Paulistas (Região Sudeste), além de Florestas e Parques do Paraná (Região Sul).

II. DETALHAMENTO DE CADA PROJETO DE PESQUISA QUE INTEGRA A REDE:

Este projeto está inserido dentro dos onze subprojetos da Rede de Pesquisa.

Subprojeto 10: Bioprospecção da microbiota fúngica das florestas de Mata Atlântica da região Oeste do Paraná

Resumo: A região Oeste do Paraná destaca-se pela presença de Unidades de Conservação Federais e Estaduais, remanescentes do bioma de Mata Atlântica: que é um candidato ideal para dar início aos trabalhos de investigação da composição e do potencial biotecnológico desta parcela da rica biodiversidade regional, até então inteiramente negligenciada. A integração de áreas localizadas nos remanescentes florestais da região Oeste da Mata Atlântica do Paraná à rede de bioprospecção da microbiota fúngica representa, neste contexto, uma nova fronteira para o conhecimento de espécies deste grupo. Dessa forma, o presente projeto tem como objetivo coletar, isolar os fungos terrestres e aquáticos produtores de hemicelulases das unidades de Conservações Federais e Estaduais da Região Oeste do Paraná-PR. Este objetivo será alcançado através de coletas trimestrais de amostras de solo e água; triagem, seleção e análise das linhagens seguida de caracterização bioquímica visando uma aplicação dos mesmos em processos biotecnológicos quanto à capacidade de produzir enzimas hemicelulolíticas assim como isolamento e caracterização química de polissacarídeos com propriedades funcionais a partir de basidiomicetos lignocelulósicos ou de fungos filamentosos.

II.1 Nome do coordenador do projeto de pesquisa e dos demais participantes da equipe, descrevendo, para cada um deles, as atividades no projeto:

Integrante	Função	Atividades	Dedicação em horas/Mês
Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki	Coordenadora local-Unioeste/PR	Coordenar atividades e acompanhar as atividades do projeto: coleta, seleção e caracterização enzimática de hemicelulases, testar cultivo com resíduos agroindustriais e participação nas reuniões anuais internas de avaliação da Rede	20 horas/mês
Profa. Dra. Clarice Aoki Osaku	Colaboradora-Unioeste/PR	Isolamento e caracterização de polissacarídeos a partir de basidiomicetos lignocelulolíticos	10 horas/mês
Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão	Colaboradora - Unioeste/PR	Caracterização enzimática da xilanase e B-xilosidase	10 horas/mês
Msc. Caroline Henn	Colaboradora – Itaipu Binacional/PR	Coleta e isolamento das cepas fúngicas na área do Refúgio Biológico Bela Vista, em Foz do Iguaçu-Paraná	10 horas/mês

APOIO TÉCNICO:

1) EQUIPE TÉCNICA

01 – Técnico de nível médio com dedicação de 15 horas /semanais

04 – Alunos de Iniciação científica/ano com dedicação de 20 horas/semanais

03 – Mestrandos do programa de Conservação e Manejo de Recursos Naturais com dedicação em tempo integral

II.2 Objetivos e metas a serem alcançados:

Objetivo: Coletar, isolar e identificar fungos filamentosos a partir de solo, material em decomposição, húmus e compostagem, em diversos biomas, compreendendo matas nativas e reflorestamentos, etc. A celulose é o principal componente estrutural da parede celular de plantas, sendo um polímero linear composto por unidades de glicose unidas por ligações do tipo $\beta(1-4)$. A síntese coordenada das cadeias de glicose é orquestrada por complexos específicos ligados à membrana plasmática que auxiliam a formação das microfibras. A degradação da celulose ocorre com a ação sinérgica de um complexo de enzimas, formado por endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) e β -glucosidase (EC 3.2.1.21). Hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, xilanas, galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglucurono xilanas, arabino-4-metil-glucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilanas, galactosanas, galacto-arabino-glucurono-xilana, são diferentes denominações em função da estrutura química que as compõem. Xilana é o principal heteropolíssacarídeo das hemiceluloses. É composta por resíduos de D-xilanopiranosil, unidos por ligações β -1,4, com ramificações arabinosil e/ou acetil. As xilanas correspondem a 20-35 % e 8 % da massa seca de madeiras duras, como do eucalipto, e de madeiras moles como Pinos, cereais e gramíneas, respectivamente. A degradação da xilana, devido a sua heterogeneidade estrutural, requer a ação de um sistema enzimático. As enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- β -1,4 xilanase e β -xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais (α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase, acetilesterase, ácido ferúlico esterase e ácido p-coumárico esterase) (Polizeli et al., 2005, Polizeli, 2009).

Meta 1: Isolamento e seleção de microrganismos eficientes na obtenção de holoenzimas, especialmente enzimas do complexo hemicelulolítico/celulolítico;

Meta 2: Identificação dos fungos bons produtores de celulasas e hemicelulasas;

Meta 3: Catalogação dos isolados identificados ou não, manutenção das espécies visando a formação de coleções de fungos mesófilos, termófilos e termotolerantes oriundos de diferentes biomas e que poderiam ser disponibilizadas futuramente para outros pesquisadores com enfoque em diferentes estudos, como formação e liberação de pigmentos para indústria de alimentos e cosméticos, ou estudo de metabólitos secundários, com vistas a descoberta de novos fármacos.

Meta 4: Caracterização bioquímica das enzimas xilanases, celulasas ou outras polissacaridasas produzidas por fungos isolados;

Meta 5: Isolamento e caracterização de Polissacarídeos de basidiomicetos isolados;

II.3 Metodologia a ser empregada:

3.1 Coleta e isolamento de fungos. A busca de novos microrganismos será realizada através de coleta em diferentes locais. As coletas serão geo-referenciadas, anotando-se latitude, longitude, precisão do GPS e altitude. Além disso, serão registradas a data, hora e temperatura ambiente do momento da coleta, dados do local, como montanha, pasto, rio, etc., de acordo com ficha previamente indicada para coleta e registro do Programa Sisbiota.

Durante as coletas, as amostras serão recolhidas em placa de Petri contendo meio complexo de aveia descrito por Emerson (1941) e incubadas em temperaturas entre 35-40°C até o surgimento das colônias. O Isolamento dos fungos coletados será realizado no mesmo meio e incubado na mesma temperatura, mediante a técnica de esgotamento por estrias. Esse processo será realizado até a obtenção de culturas puras, de acordo com observação macroscópica, quanto a cor, forma, tamanho e textura dos esporos, além de outras características celulares. Cada cultura receberá uma identificação baseada no local e material de coleta, sendo armazenada em câmara fria em tubos, contendo meio de cultura, vedados com algodão e parafilme, e em sílica. Para estudo de fungos endofíticos serão coletadas amostras de folhas, caules e raízes e, após desinfecção, serão retirados discos foliares (5 mm de diâmetro) e fragmentos de caule e raiz (5 mm de comprimento), os quais serão transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com cloranfenicol e ampicilina (0,2 g/L cada) e incubados a 30°C. As colônias serão purificadas e estocadas. A produção das enzimas será avaliada qualitativamente em placas de Petri contendo meio basal e a fonte de carbono indutora, utilizando-se soluções reveladoras para a identificação dos halos de hidrólise (Hankin e Anagnostakis, 1975; Neiroti e Azevedo, 1988). Para a análise microscópica o material será preparado em lâminas utilizando diferentes líquidos de montagem (i.e. azul de algodão, hidróxido de potássio 3% ou água). Após a caracterização inicial dos isolados, estes serão identificados com base em manuais gerais de identificação de fungos (Domsch *et al* 1980; Samson *et al* 2000) e através de chaves taxonômicas específicas para fungos termofílicos (Zycha *et al* 1969; Tansey e Jack 1976; Schipper, 1975, 1978; O'Donnell, 1979, dentre outras). As cepas serão mantidas em meio complexo de aveia (Emerson, 1941), anteriormente preparado e autoclavado (1,5 atm por 15 min) em tubos de ensaio e inclinados. Os repiques serão realizados periodicamente, e mantidos a 35°C durante uma semana e posteriormente guardados em geladeira, à temperatura de 4°C. As cepas poderão ser mantidas ainda em sílica gel, glicerol, água, sendo que periodicamente será testada a viabilidade das culturas.

3.2 Coleta e isolamento de fungos. Amostras de madeira em decomposição e amostras de basidiocarpos e micélio nos diversos pontos de coleta pré-estabelecidos serão coletadas e transportadas até o laboratório de Bioquímica de Microrganismos (Unioeste), onde será realizado o isolamento para obtenção de culturas de fungos. Nesse sentido, objetivando o isolamento direto dos fungos a partir dos basidiocarpos, fragmentos de seu tecido interno serão transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio ágar batata dextrosado (BDA) previamente esterilizado à 121°C por 15 minutos. O meio de isolamento poderá ainda ser suplementado com 1 mL de tetraciclina 0,1% (previamente esterilizado em membrana Millipore) ou cloranfenicol (200 µg/l) a fim de evitar o crescimento de bactérias. 1g de material coletado será acondicionado em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9% + Tween 80 0,1%), e levado à agitação em shaker à 120 rpm por 30 minutos. Serão realizadas diluições seriadas do material processado e então será realizado o

plaqueamento no meio BDA. As placas de Petri serão mantidas em incubadora à 25°C até observação de crescimento micelial, quando as culturas serão sucessivamente repicadas até obtenção de culturas axênicas. As culturas puras serão mantidas em tubo inclinado contendo meio PDA ou meio Ágar Extrato de Malte (AEM) e também preservadas como “plugs” de ágar em água destilada (Castellani, 1967) por até 6 meses sob refrigeração (4°C). Os fungos serão cultivados à 30° C em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (BDA) por 3 a 7 dias, sendo então conservados em geladeira. Nestas condições os microrganismos são preservados com eficiência, sendo utilizados com até 30 dias de idade. Discos com 10 mm de diâmetro obtido a partir das culturas em BDA serão utilizados como inóculos para as culturas submersas e em estado sólido.

3.3 Identificação dos isolados. A identificação taxonômica primária das linhagens selecionadas será realizada macro e microscopicamente de acordo com as metodologias propostas por Taylor (1974), Ryvarden (1987, 1991) e Bononi (1999). A seleção de linhagens produtoras de altos níveis de xilanases e/ou celulasas será realizada entre os fungos filamentosos coletados de acordo com Guimarães et al. (2006). O microrganismo selecionado será identificado por Fundações específicas do setor (como, por exemplo, a Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, em Campinas-SP, Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, ou em nível molecular por ITS). A variação da sequência genética oferece uma alternativa ao cultivo para detecção e identificação de fungos.

3.4 Avaliações preliminares das espécies dos basidiomicetos. Serão realizadas avaliações preliminares da capacidade dos basidiomicetos em crescer em meio à base de resíduos lignocelulósicos (cana de açúcar e sabugo de milho) bem como seu potencial como produtor de enzimas em cultivos em placas de Petri contendo os resíduos como substrato. Um disco de 10 mm de diâmetro será inoculado no centro da placa e o crescimento da colônia será monitorado periodicamente com o auxílio de uma régua. Para avaliar a produção de enzimas oxidativas, guaiacol a 0,02% será adicionado ao meio de cultivo. O aparecimento de halo avermelhado sugere a produção de enzimas oxidativas. Na avaliação preliminar da potencialidade produtora das enzimas, serão utilizadas placas contendo os corantes remazol brilliant blue, vermelho do congo e Poly R-478, avaliando-se os halos de descoloração e comparando-os com os obtidos com as cepas referências.

3.5 Condições de cultivo. Os isolados selecionados serão cultivados em meios líquidos e em estado sólido visando a produção das diferentes enzimas. Os conídios serão suspensos em água destilada esterilizada, contados em câmara de Neubauer, e um volume de 1 mL da suspensão de esporos será inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido composto por 1% de fonte de carbono, 20 µL de biotina e 2 mL de solução de sais de Vogel (Vogel, 1964), pH inicial 8,0. A fonte de carbono irá variar entre padrões específicos para cada sistema em estudo (hemicelulolítico: xilana birchwood; celulolítico: celulose/Avicel); resíduos *in natura* (Peixoto-Nogueira et al., 2009; Betini et al., 2009); frações oriundas dos tratamentos químicos realizados nos resíduos (sistema hemicelulolítico: licor hemicelulósico; sistema celulolítico: resíduo sólido de celulose); e também por misturas oriundas dos resíduos *in natura* com os provenientes dos tratamentos. As culturas serão incubadas inicialmente a 40°C, em shaker a 100 rpm, por até 7 dias, ou conforme padronizado.

Os Basidiomicetos serão cultivados em condições submersas ou estáticas em meios suplementados com resíduos lignocelulósicos (como fonte única de carbono e nitrogênio ou associada a outros resíduos agrícolas como bagaços e cascas de frutas, bagaço de mandioca, etc.) serão adicionadas a um meio mineral contendo por litro: 2,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,6 g KH_2PO_4 , 0,4 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 74 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12 mg citrato férrico, 6,6 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,0 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,0 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 mg tiamina. O pH será ajustado para 5,5. Os fungos serão mantidos em condições estacionárias ou sob agitação por períodos variáveis. Cultivos sólidos também serão realizados utilizando-se técnicas de compostagem largamente descritas na literatura, tendo como base, diferentes resíduos lignocelulósicos (farelo de trigo, bagaço de cana, serragem, palha de milho, bagaço de cana, palha de arroz, farelo de soja, resíduos de frutas suplementados com solução mineral).

3.6 Obtenção das preparações enzimáticas. As culturas, após crescimento nas condições determinadas, serão filtradas à vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro, onde um filtrado de meio de cultivo livre de células e um micélio serão obtidos. Para os ensaios enzimáticos será utilizado o filtrado não dialisado ou dependendo do experimento, dialisado durante uma noite a 4°C, contra tampão otimizado para o ensaio enzimático. Às culturas em meio sólido será adicionado um volume de solução tampão pH 6,0 (fosfato ou citrato) na proporção de 1:10 e as misturas serão agitadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, as frações extraídas pelo tampão serão separadas por filtração.

3.7 Métodos Analíticos

3.7.1 Dosagem enzimática

3.7.1.1 Celulase e Xilanase. As atividades de endoglucanase ou carboximetilcelulase (CMCase), exoglucanase ou avicelase e endoxilanase serão detectadas pela formação de açúcares redutores a partir dos substratos carboximetilcelulose, celulose microcristalina (Avicel) e xilana birchwood, respectivamente, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959). As leituras espectrofotométricas serão realizadas a 540 nm, utilizando-se como padrão glicose ou xilose (0 – 1 mg/mL) para as dosagens de celulase e xilanase, respectivamente. A unidade de atividade enzimática será definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 micromol de açúcar redutor por minuto. A atividade específica será expressa em unidade de atividade total por mg de proteína total (U/mg proteína). Outra metodologia é a dosagens de celulase utilizando-se papel de filtro (FPase): O ensaio será realizado em tubos de ensaio de 150 mm x 15 mm, em duplicata, contendo uma fita de papel Whatman n.1, de 10 cm², como única fonte de carbono e 10 mL de caldo sintético (Na No: 3,0 g L⁻¹; K_2HPO_4 : 1,0 g L⁻¹; MgSO_4 : 0,5 g L⁻¹; KCl: 0,5 g L⁻¹ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 10,0 mg L⁻¹, pH 5,0, cobrindo 2/3 das fitas. Os tubos serão esterilizados e inoculados com uma alçada de esporos das cepas selecionadas previamente, e serão incubados por 14 dias a 28°C. A atividade de celulase será determinada no caldo de cultivo obtido no final da incubação, usando-se uma fita de papel de filtro de 6 cm² em tubo de ensaio contendo 0,5 mL do caldo e 1 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. Após a incubação por 60 min a 50°C, a reação será interrompida pela adição de 1mL de reagente Sumner (ácido dinitro salicílico: 10g L; NaOH: 16,0 g L⁻¹); tartarato duplo de sódio e potássio: 300,0 g L⁻¹) Para desenvolvimento da cor, os tubos serão aquecidos

por cinco minutos em banho de água fervente. Os açúcares redutores serão determinados em espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda (λ) de 540 nm. As leituras serão obtidas comparando-se com o tubo branco do ensaio, obtido nas mesmas condições, contudo, sem inóculo (Guimarães et al 2008).

3.7.1.2 β -xilosidase e β -glucosidase. As atividades de β -glucosidase e β -xilosidásica serão detectadas através do método descontínuo (Kerstens-Hilderson et al., 1982, Lenartovicz et al., 2003) utilizando os substratos sintéticos como p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNF-xil) e p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNF-glu) ou outros aril-glicosídeos semelhantes aos glicosídeos que liberam o- ou p-nitrofenol. Solução saturada de tetraborato de sódio será utilizada para interromper a reação. As leituras espectrofotométricas serão realizadas a 405 nm, utilizando-se como padrão p-nitrofenol de 0 a 0,6 μ mol/mL. A unidade de atividade será definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de p-nitrofenol por minuto.

3.11.1.3. Outras polissacaridases. Serão utilizados os protocolos descritos em Kadowaki et al. (1997). A metodologia envolve o uso dos diferentes polissacarídeos (mananases, pectinases, poligalacturonases, quitinases e amilases) como substrato. As atividades enzimáticas serão determinadas medindo-se o surgimento de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller, 1959).

3.7.1.4 Determinação de proteínas. As proteínas extracelulares serão dosadas pelo método de Bradford (1982) que utiliza albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A unidade será definida como mg de proteína por mL.

3.7.1.5 Determinação de carboidratos. Os carboidratos neutros totais serão calculados pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). Açúcares redutores fermentecíveis serão determinados pelo método de Miller (1959).

3.8 Extração, isolamento e análise dos polissacarídeos dos fungos basidiomicetos. Os polissacarídeos serão extraídos do corpo de frutificação dos fungos basidiomicetos, o micélio residual passará por processo de extração a quente, filtrados e precipitados com 3 volumes de etanol. Seguido por deslipidificação em uma mistura de CHCl_3 :MeOH, 2:1, v/v, 60°C por 3 horas (1 vez) resultando em um extrato apolar. A este resíduo será adicionado NaBH_4 para reduzir as extremidades redutoras e, assim, evitar a degradação das cadeias polissacarídicas durante as extrações alcalinas com 2, 5, 10% de KOH. Todos os precipitados serão submetidos ao processo de gelo/degelo para a obtenção das frações solúveis e insolúveis em água fria. Os polissacarídeos obtidos serão quantificados quanto ao açúcar neutro total (Dubois et al., 1956) e dosagem de ácidos urônicos (Filisetti-Cozzi e Carpita, 1991). Os polissacarídeos serão purificados por congelamento e degelo (Gorin e Iacomini, 1984) e em coluna de Sepharose 6B. A verificação quanto à pureza das amostras serão realizadas através do cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. A análise estrutural do carboidrato será feita através da metilação de acordo com o método de Ciucanu e Kerek (1984), e acetilado conforme descrito por Blakeney et al. (1983), Churms (1982), Wolfrom e Thompson (1963). Os alditóis acetatos parcialmente metilados, serão analisados por cromatógrafo a gás acoplado a

espectrometria de massa. Será também realizado ensaio através de ressonância nuclear magnética (RMN). Os espectros serão obtidos pelo uso do espectrômetro de ressonância nuclear magnética BRUKER DRX 400 incorporados ao transformador de Fourier, em 400 e 100 MHz respectivamente, em relação ao núcleo de ^1H e ^{13}C a 30 $^{\circ}\text{C}$.

II.4 Cronograma físico-financeiro, contendo a descrição das atividades e respectivos valores ao longo do período de execução do projeto:

Período (Trimestre)	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º
Aquisição de material de consumo e permanentes (equipamento)	X	X	X									
Coleta do material (Coleta fungos)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cultivo e Isolamento dos fungos filamentosos			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Screening dos fungos produtores de xilanase e celulasas			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cultivo dos produtores da xilanasas e celulasas na presença de resíduos agroindustriais						X	X	X	X	X		
Caracterização bioquímica das enzimas								X	X	X	X	X
Isolamento e caracterização de Polissacarídeos de basidiomicetos						X	X	X	X	X	X	X
Redação de relatório				X				X				X
Divulgação dos resultados					X							X

II.5 Orçamento detalhado, incluindo previsão de recursos para a participação nas reuniões anuais internas de avaliação da Rede e de participação em reuniões de acompanhamento e avaliação anuais do **SISBIOTA-Brasil**:

(Material Permanente)	Quantidade (Unidade)	Valor (R\$)	Justificativa
Estufa bacteriológica	01	1.870,00	O equipamento é essencial para o cultivo de fungos
Freezer vertical	01	1.450,00	Armazenamento de reagentes
Geladeira vertical 450l	01	1.650,00	Manutenção de fungos isolados sob refrigeração
Espectrofotometro Uv/Visível microprocessado, Faixa 200 a 1000nm (importação)	01	18.642,00	Este equipamento será utilizado para dosagens enzimáticas e de proteínas
Medidor de pH de bancada digital	01	708,00	Preparo de soluções tamponadas e meio de cultivo
(Material de consumo)	Quantidade (Unitário)	Valor (R\$)	Justificativa
Vidrarias (tubos de ensaio, Becker, Erlenmeyer,	Variada	4.500,00	Estas vidrarias serão utilizadas para realizar diferentes etapas

pipetas, provetas, etc) e plásticos (ponteira de micropipetas, tubos falcon, tipo eppendorf, placa de petri descartável, etc)			nos procedimentos descritos no item “metodologia”, tais como: (Cultivo dos fungos, ensaios enzimáticos, purificação e caracterização enzimáticas e de carboidratos)
Meios de cultura, reagentes para dosagens enzimáticas, reagentes para eletroforese, reagentes para purificação de enzimas.	Variada	9.500,00	Todos estes reagentes são indispensáveis para realizar diferentes etapas nos procedimentos descritos no Item “metodologia”
Combustível para transporte	600 litros	1.680,00	Combustível para realização das coletas das amostras
Passagens e diárias	Variada	10.000,00	Recursos para a participação nas reuniões anuais internas de avaliação da Rede
Valor total R\$		50.000,00	

II.6 Descrição de como o projeto de pesquisa está inserido no Plano de Integração da Rede, ou seja, a integração com os outros projetos de pesquisa para atingir os objetivos da Rede:

O Brasil é o país de maior biodiversidade do Planeta (15 a 25% da biodiversidade mundial). Devido a sua dimensão continental e à grande variação geomorfológica e climática, o Brasil abriga sete biomas (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Costeiros, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos), sendo estes portadores de diversas espécies de animais, vegetais e microrganismos, com destaque para os fungos. No entanto, apenas 10% das espécies que possuímos são conhecidas. A insuficiência de conhecimento científico de vários aspectos importantes da biota brasileira, contrastando com a perda acelerada de habitats e com outras mudanças ambientais globais, é particularmente preocupante.

Como extensão do conhecimento da biodiversidade, há uma crescente demanda para o desenvolvimento de produtos e a valorização de serviços ambientais. Neste contexto, os resultados esperados para este projeto vêm de encontro inicialmente com a necessidade e importância de novas estratégias que potencializem e ampliem os estudos sobre a biota brasileira, neste caso por intermédio da identificação de novos e promissores microrganismos produtores de enzimas do sistema hemicelulolítico, celulolítico e ligninolítico, através de pesquisas de prospecção de bioprodutos a partir de espécies coletadas como fonte potencial de substâncias de interesse econômico para a exploração sustentável. Além disso, no sentido de integração da rede, objetiva-se ainda ampliar e consolidar um banco de dados, incluindo a descrição de metodologias, protocolos, coletas e coleções.

Como complemento, outra contribuição científica e de inovação que esta proposta apresenta está relacionado à utilização de resíduos ricos em materiais lignocelulósicos que são amplamente produzidos pela atividade agrícola e industrial, e que acabam acarretando um grande problema ambiental, visto que grande parte desses resíduos gerados não é aproveitada, sendo transformados em poluentes do meio ambiente. Assim, a utilização

desses resíduos, seja através de alternativas viáveis de pré-tratamentos/tratamentos físico-químicos para que as diferentes frações lignocelulósicas disponibilizadas sejam utilizadas como um substrato mais eficiente e viável na expressão e produção das enzimas de interesse torna-se uma solução vantajosa, auxiliando na ampliação do conhecimento e entendimento sobre a biodiversidade brasileira e melhorando a capacidade preditiva de respostas às mudanças globais, como a busca de inovações em processos produtivos sustentáveis.

Portanto, no campo sócio-econômico, este projeto pretende auxiliar no desenvolvimento de alternativas para melhor uso dos recursos ambientais, por intermédio da utilização de resíduos como agentes de bioprospecção, bem como uma melhor caracterização dos resíduos e das técnicas de extração e separação de suas frações. Neste sentido, a coleta e isolamento de microrganismos, visando estudos relacionados à identificação de melhores produtores de enzimas do sistema hemicelulolítico, celulolítico e ligninolítico, por intermédio de matérias-primas oriundas de resíduos agrícolas ou agro-industriais, como a casca e a fibra de coco ou resíduos da produção de milho, juntamente com a necessidade de novos processos de inovação para a obtenção de enzimas, de forma conjunta indicarão um provável e promissor processo de utilização para fins industriais. Com esta comprovação alcançada nos resultados, o objetivo estaria cumprido, contribuindo na diminuição das lacunas de conhecimento ainda existentes sobre o conhecimento da biodiversidade dos biomas brasileiros.

Além disso, cabe-se destacar que nos últimos anos, dado a grandeza da biodiversidade brasileira, várias pesquisas e levantamentos sobre a biota foram conduzidos, causando um ganho de competência científica relacionado a valorização e conservação dos recursos naturais. Entretanto, o uso de agro-resíduos, *in natura* ou pós-tratamentos físico-químicos, como agentes de bioprospecção de enzimas hemicelulolíticas, celulolíticas e ligninolítica em fungos coletados nestas várias regiões, poderia ser uma alternativa promissora ao melhoramento de processos ou a obtenção de produtos de maior valor agregado.

Demais objetivos a serem alcançados junto a Rede com a presente proposta está relacionado a maior formação de recursos humanos, educação ambiental e divulgação do conhecimento científico, bem como valorização e a conservação dos recursos naturais, com ênfase na questão ambiental, destacando a biodiversidade como um patrimônio nacional estratégico dentro de um contexto regional, nacional e internacional, o que certamente poderá ser obtido com a integração com os outros projetos de pesquisa relacionados a Rede, fornecendo novas perspectivas e oportunidades para a biodiversidade brasileira.

II.7 Disponibilidade efetiva de infra-estrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto:

INFRA-ESTRUTURA UNIOESTE, Campus de Cascavel, PR: O Laboratório de Bioquímica da UNIOESTE de Campus de Cascavel conta com o espaço físico que compreende com salas conforme especificado abaixo. Estas salas com exceção das salas de docentes apresentam instalação de gás, luz, água, pias e bancadas, ainda um Laboratório de Proteoma; dois Laboratórios com bancadas e equipamentos específicos para pesquisa (70 m²) e um Laboratório de Bioensaio específico para pesquisa com certificado de qualidade em Biossegurança NB1 e NB2 com CQB-1162/02. O Laboratório de Bioquímica é dotado de bancada e possui os seguintes equipamentos: Aparelhos de ar condicionado; Agitador de tubos tipo Vórtex, Agitador magnético com aquecimento, Autoclaves Verticais, Aparelho de micro-ondas, Balanças eletrônicas semi- analíticas,

Balança eletrônica de precisão, Banhos Maria sorológicos, Banhos Maria ferventes Fisaton, Bombas de Vácuo, Capela de Fluxo Laminar, Capela para exaustão de substâncias voláteis, Centrífuga clínica de mesa, Centrífuga Refrigerada marca Eppendorf, modelo 5810, Microcentrífuga de mesa marca Eppendorf, Computadores, Deionizador de água, Destilador de água, Destilador de proteínas, Espectrofotômetro digital Metrolab, Estufas bacteriológicas, Estufas para secagem e esterilização de material, Evaporador rotativo Fisaton Mod. 802, Fontes para eletroforese, Freezers -20°C, Geladeiras, Incubador tipo shaker com regulação de temperatura, Sistemas para eletroforese, Medidor de pH, Sistema de fotodocumentação com luz ultra violeta, Termociclador marca Eppendorf, Plataforma completa para eletroforese bidimensional. APOIO TÉCNICO: 01 – Técnico de nível médio com dedicação de 15 horas /semanais.

II.8 Outras considerações:

II.9 Principais referências bibliográficas:

- Betini, J.H.A.; Michelin, M.; Peixoto-Nogueira, S.C.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F.; Polizeli, M.L.T.M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced by solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 32, p. 819-824, 2009.
- Blakeney, A.; Harria, P.; Henry, R.; Stones, B. A simple and rapid preparation of alditol acetate for monosaccharides analysis. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 113, p. 291-299, 1983.
- Bononi, V.L.R. Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos-noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. **São Paulo: Instituto de Botânica**, 1999, 181 p..
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1982.
- Castellani, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further Researches. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.42, p. 181-184, 1967.
- CHURMS, M.F. Handbook of Chromatography Carbohydrates, v. I. Florida, C. R.C. Press, 1982, 272 p.
- Domsch, K.H.; Gams, W; Anderson, T.H. Compendium of soil fungi. New York: **Academic Press**, 1980.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.
- Emerson, R. An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces. **Lloydia**, v. 4, p. 77-144, 1941.
- Filiseti-Cozzi, T.M.C.C.; Carpita, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.
- Gorin, P. A.; Lacomini, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 128, p. 119-132, 1984.
- Guimarães, L.H.S.; Peixoto-Nogueira, S.C.; Michelin, M.; Rizzatti, A.C.S.; Sandrim, V.C.; Zanoelo, F.F.; Aquino, A.C.M.M.; Barbosa Junior, A.; Polizeli, M.L.T.M. Screening of filamentous fungi with potential of production of enzyme with biotechnological applications. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 474-480, 2006.

- Hankin, L.; Anagnostakis, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycol.**, v.67, p.597-607, 1975.
- Kerstens-Hilderson, H. β -D-xylosidase from *Bacillus pumilus*. **Meth. Enzymol.**, v. 83, p. 631-639, 1982.
- Lenartovicz, V.; Souza, C.G..M.; Moreira, F.G.; Peralta, R.M. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable beta-xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1775-1780, 2003.
- Miller, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- Neirotii, E.; Azevedo, I.L. Técnicas semiquantitativas de avaliação de produção de celulase em *Humicola* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 19, p. 78-81, 1988.
- O'Donnell, K.L. Zygomycetes in culture. **Palfrey Contributions in Botany**. N°. 2.
- Peixoto-Nogueira, S.C.; Michelin, M.; Betini, J.H.A.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F.; Polizeli, M.L.T.M. Production of xylanase by Aspergilli using alternative carbon sources. Application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 149-155, 2009.
- Polizeli, M.L, Rizzatti A.C, Monti, R.; Terenzi, H.F., Jorge, J.A, Amorin, D.S.. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, p. 67, v. 577-591, 2005.
- Polizeli, M.L.T.M. Properties and Commercial Applications of Xylanases from Fungi. In: Rai, M. (Ed.). Fungal Biotechnology. New Delhi: **I.K. International**, 2009. 507 p.
- Ryvarden, L. Genera of Polypores. Nomenclature and Taxonomy. **Fungiflora**, Oslo, 1991, 363 p.
- Ryvarden, L. New and noteworthy polypores from Tropical America. **Mycotaxon**, v. 28, p. 525-542, 1987.
- Samson, R. A.; Hoeskstra, E.S.; Frisvad, J.C. **Introduction to food and airborne fungi**. 6th ed., Baarn: CBS, 2000. 389 p.
- Schipper, M.A.A. On *Mucor mucedo*, *Mucor flavus* and related species. **Stud. Mycol.**, v. 10, p. 1-33, 1975.
- Schipper, M.A.A. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. **Stud. Mycol.**, v. 17, p. 1-52, 1978.
- Tansey, M. R.; Jack, M.A. Thermophilic fungi in sun-heated soils. **Mycologia**, v. 68, p. 1061-1075, 1976.
- Taylor, J.B. Biochemical tests for identification of mycelial cultures of basidiomycetes. **Ann. Appl. Biol.**, v.78, l. 2, p. 113-123, 1974.
- Vogel, H.F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **Am. Nat.**, v. 98, p. 435-446, 1964.
- Wolf from, M. L.; Thompson, A. Acetylation. In: Whistler, R. L.; Wolf from, M. L. (Ed.). **Meth. Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v.2, p. 211-215, 1963.
- Zycha, H., Siepmann, R., Linnemann, G. Mucorales. **J. Cramer**, Lehre. 1969.

Resultados esperados da Rede:

- Formação de uma Rede Nacional de Pesquisa de Prospecção de Fungos Filamentosos produtores de celulases, xilanases e ligninases, visando a aplicação em Biorefinaria;
- Considerando que se trata de uma proposta multidisciplinar e inter-institucional, espera-se que como resultado da Rede haja apoio científico integrado baseando-se no potencial científico de cada membro integrante. O grupo apresenta microbiologistas, biólogos, bioquímicos, biólogos moleculares, agrônomo, fisiologista e engenheiros químicos;

- Devido à abrangência inter-regional, será realizada uma catalogação dos fungos isolados dos diferentes biomas, correlacionando dados morfológicos e locais geo-referenciados;
- Descobrir novas exoglucanases provenientes de amostras ambientais que sejam termo-estáveis e eficientes em pHs ácidos (pH 4-5)
- Formação de Recursos Humanos em diferentes graus acadêmicos: Iniciação Científica, Especialização, Mestrados, Doutorados e Pós-Doutorados;
- Difusão de conhecimento com divulgação dos Resultados obtidos em simpósios, palestras, conferências e congressos em nível nacional e internacional.
- Conscientização sobre a biodiversidade;
- Difusão de conhecimento através da divulgação dos resultados obtidos em periódicos especializados indexados e com circulação internacional;
- Desenvolver atividades acadêmicas junto as redes de ensino médio e fundamental, como parte integrante das atividades de estágio supervisionado de discentes do curso de licenciatura em Ciências Biológicas, FEIS, UNESP;
- Formação de coleções de fungos filamentosos que possam ser disponibilizados para outros estudos, como por exemplo, formação e liberação de pigmentos para indústria de alimentos e cosméticos, ou estudo de metabólitos secundários, com vistas a descoberta de novos fármacos;
- Com os resultados desta proposta, espera-se contribuir com a ampliação e consolidação de competências científicas e tecnológicas nacionais em estudos da biodiversidade de fungos filamentosos com interesse econômico.

- I.3 Principais contribuições científicas e/ou tecnológicas da proposta:

- Trabalhos publicados em periódicos indexados e de circulação internacional;
- Divulgação dos resultados em reuniões científicas e/ou tecnológicas;
- Orientação de monografias, trabalhos de Conclusão de Curso, Estágios Supervisionados, Mestrados e Doutorados. Supervisão de Pós-doutorados;
- Propõem-se reuniões científicas internas anuais com apresentação dos resultados obtidos, possibilitando:
 - fluxo de informações;
 - criar condições para facilitar a associação e colaboração entre os membros da rede,
 - agregar esforços,
 - compartilhar metodologias, visando a inovação e o desenvolvimento de novos conhecimentos científicos e biotecnológicos;
 - As reuniões internas também visam ampliar a capacidade de realização de trabalhos conjuntos baseados em interesses convergentes e projetos comuns entre grupos consolidados e grupos oriundos de regiões menos favorecidas, onde a biodiversidade é abundante, mas ainda pouco explorada.

I.4 Atividades de formação de recursos humanos, acadêmica e técnica:

- Considerando que todos os membros que agregam a Rede Nacional de Fungos Filamentosos são integrantes de Instituto de Pesquisa e/ou docentes vinculados à Universidades Estaduais ou Federais, já há uma estrita relação da equipe com a formação de recursos humanos nos distintos graus acadêmicos. A maioria dos pesquisadores supervisiona alunos em estágio Pós-doutoral e/ou orienta teses de doutorados e dissertações de mestrados acadêmicos.
- Todos os membros da equipe orientam trabalhos de Iniciação Científica, Monografias e/ou estágios supervisionados para Conclusão de Curso de Graduação.

- A formação de técnicos especializados também é uma realidade para alguns membros da equipe, com bolsas de Treinamento Técnico, financiadas por alguns órgãos subvencionadores.

Como atividades:

- pretende-se durante a vigência da Rede oferecer Cursos de extensão ou palestras voltadas para a Biodiversidade de fungos filamentosos com interesse econômico;
- disciplinas de Pós-graduação de interesse coletivo voltadas para o tema proposto;
- estágios inter-laboratoriais de alunos e docentes envolvendo os membros da rede;
- visita/estágio de docentes e alunos de doutorado e Pós-doutorado em laboratórios estrangeiros, dada parcerias já consolidadas.

I.5 Estratégias de divulgação científica/educação ambiental, entendida como um conjunto de ações para atingir de modo adequado o público beneficiário, com envolvimento de equipe interdisciplinar desde o início da pesquisa:

- A divulgação científica/educação ambiental será realizada através da formação de uma Home Page, com informações dos objetivos da Rede, membros constituintes, projetos apresentados, atividades em destaque, publicações recentes, link importantes, etc. Informes e comunicados serão passados para os membros da Rede por correio eletrônico próprio (formado pela coordenadora para atendimento da equipe).
- Palestras e conferências divulgando o papel da Rede frente à comunidade científica serão realizadas periodicamente.
- Divulgação da Rede para atingir o público beneficiário será realizada também através de entrevistas a jornais, revistas especializadas e entrevistas a televisão.