



Cultivo de *Cordyceps militaris* e Divulgação Científica em Redes Sociais

Cultivation of *Cordyceps militaris* and Scientific Disclosure on Social Medias

Iane Maria Fonseca

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Eduardo Bittencourt Sydney

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Sofia Maniezzi Macre

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Maria Luísa Cerri

Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

RESUMO

O presente trabalho faz parte do projeto de extensão Desmistificando Cogumelos conduzido no laboratório de Fermentações da UTFPR-PG. O *Cordyceps militaris* é um fungo de crescente interesse comercial, industrial e medicinal por seu conteúdo de compostos bioativos. O cultivo laboratorial e industrial deste fungo tem grande dificuldade em propagá-lo, pois sua cepa sofre uma rápida degradação. Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de cultivo de *C. militaris* em larvas e pulpas de *Tenebrio molitor*, para geração de cepas mais resistentes contra a degradação genética do fungo, visando um melhor desempenho e reprodução de linhagens produtoras de corpos frutificados para extração e consumo do cogumelo medicinal. Este cultivo foi realizado inserindo 0,1 mL de cultivo basal do fungo no inseto por dois métodos: a inserção direta *in vivo* e utilização de larva estéril. Assim, desenvolveu-se uma metodologia que resulta em uma maior quantidade de micélio. Essa metodologia servirá como base para criação de um curso de cultivo de *Cordyceps militaris* para a comunidade. Também foram realizados roteiros de conteúdo para divulgação do projeto para comunidade através das redes sociais. Esta divulgação visa aumentar o número de seguidores da página e promover o conhecimento científico para a população em geral.

PALAVRAS-CHAVE: Produção. Cogumelo. Degradação.

ABSTRACT

This paper is part of the extension project "Desmistificando Cogumelos" conducted at the Fermentation's laboratory at UTFPR-PG. *Cordyceps militaris* is a fungus of growing commercial, industrial and medicinal interest due to its bioactive compounds. The laboratory and industrial cultivation of this fungus has great difficulty in propagating it, as its strain undergoes with a fast degradation. This paper aimed to develop a methodology for the cultivation of *C. militaris* in larvae and pulps of *Tenebrio molitor*, to generate resistant strains against the genetic degradation, focusing in a better performance and reproduction of strains that produce fruited bodies for the extraction and consumption of this medicinal mushroom. The cultivation was carried out by inserting 0.1 mL of basal culture of the fungus in the insect by two methods: direct insertion *in vivo* and use of sterile larvae. Therefore, a methodology was developed that resulted in a greater amount of mycelium in the pulps. This methodology will serve as the base for creating a *Cordyceps militaris* cultivation course for the community. Content scripts were also made to publicize the project to the community through



social medias. This dissemination aims to increase the number of followers of the page and promote scientific knowledge to general public.

KEYWORDS: Production. Mushroom. Degradation.

INTRODUÇÃO

O *Cordyceps militaris* é um cogumelo popular na medicina tradicional chinesa, sendo consumido pelo homem há vários séculos, é o principal substituto do *Codyceps sinenses* (Gui et al., 2008), ambos ainda não difundidos no Brasil. O *C. militaris* é um fungo parasita, de artrópodes, do gênero ascomiceto capaz de produzir diversos compostos bioativos, tais como a cordicepina (Kang et al., 2014), cordycerebrosídeo (Chiu et al., 2016), cordimina (Wong et al, 2011), polissacarídeos (Sun et al., 2018) e ergosteróis (Nallathamby et al., 2015), que conferem ao mesmo propriedades farmacológicas como anti-inflamatória (Jeong et al., 2010; Smiderle et al., 2014), antitumoral (Lim et al., 2004; Dong et al., 2013), antioxidante (Yu et al., 2007) e imunomodulatória (Liu et al. 2016).

Assim seu interesse comercial e industrial nas últimas décadas vem aumentando exponencialmente. Entretanto, no Brasil não há produtores desse cogumelo, então desenvolver uma metodologia não só de cultivo, mas que garanta uma cepa de qualidade para reprodução é essencial para a atividade econômica, desenvolvimento de novos produtos e para acesso deste cogumelo pela sociedade.

Visto que no estudo de Yin et al. (2017), revelou que cepas *in natura* apresentam taxas de degradação significativamente menores que as cultivadas em laboratório, realizar o estudo do cultivo em artrópodes é necessário, pois pode apresentar uma melhora da cepa ao retornar ao meio de cultivo natural (inseto). O inseto *Tenebrio molitor*, conhecido comumente como bicho-da-farinha, rico em nutrientes é muito utilizado para nutrição animal e avaliado para nutrição humana (Ravzanaadii et al., 2012; Heidari-Parsa et al., 2018).

Por este motivo, este inseto é propício para utilização como meio de cultivo para o *C. militaris*, como no estudo de Sato et al. (2002) e nas patentes CN108184540 e CN105557312A, que apresentaram resultados satisfatórios do crescimento do *Cordyceps*, porém sem avaliação genética para análise do desempenho da cepa, quanto à degradação. Portanto, o objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de uma metodologia de produção de *Cordyceps militaris*, em *T. molitor* capaz de ser resistente a degradação durante os repiques feitos em laboratório, gerando cepas com maior valor agregado e na produção de conteúdo para disseminação de conhecimento sobre cogumelos e seus benefícios.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em duas frentes devido a pandemia do COVID -19. A primeira foi relacionada à criação e divulgação de conteúdo nas redes sociais do projeto de extensão Desmistificando Cogumelos. E a segunda relacionada ao cultivo de *C. militaris*, que subdividiu-se em uma primeira etapa (fevereiro à maio de 2021) de estudo e formação do embasamento teórico para realização dos experimentos e cultivo do cogumelo *C. militaris* em *T. molitor* para obtenção de uma cepa resistente a degradação *in vitro* (a partir de Junho).



Cultivo de manutenção

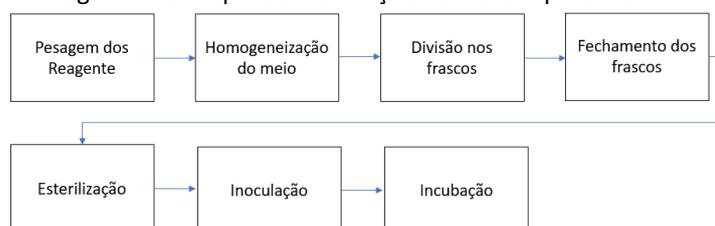
Para o preparo do meio de cultivo líquido (1 L) de Cerri (2021), utiliza-se 10 g de dextrose ($C_6H_{12}O_6$), 2 g de nitrato de sódio ($NaNO_3$), 1 g de fosfato de potássio (KH_2PO_4), 1 g de fosfato de sódio (NaH_2PO_4), 0,5 de sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e 2 g de extrato de levedura (Tabela 1). Primeiramente, todos os reagentes são pesados em balança analítica, e posteriormente são homogeneizados com água destilada, após, o meio é distribuído em 5 erlenmeyers de 500 mL, sendo 200 mL de meio em cada, os bocais são fechados e leva-se os mesmos para a autoclave por 121 °C durante 15 minutos, logo após o resfriamento, inocula-se, em fluxo laminar, as respectivas cepas, EST (CMIB - 202) da Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico – UTFPR/PG, C1 (92B3CZ3316#3 x 92B6CZ1316#5), C2 (CDRTPLOXCH3# ZLCTCST117), C3 (DR3XDX2AB5WLCCCP1118) e C4 (CUB292BBC21316# 55WL6COMB8D1118), adquiridas de *Terrestrial Fungi* (Warren, MI, Estados Unidos da América) e depois leva-se para a câmara de germinação (BOD) por 15 dias, à 21° C, sem luz, para o desenvolvimento e crescimento do micélio do fungo (Figura 1). É importante ressaltar que a propagação fungo é feita de 15 em 15 dias.

Tabela 1 – Quantidades dos Reagente Utilizados para o Meio Líquido de Manutenção

Reagentes	Quantidade (g/L)
Glicose	10
Nitrato de Sódio	2
Fosfato de Potássio	1
Fosfato de Sódio	0,4
Sulfato de Magnésio	0,5
Extrato de Levedura	2

Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 1 - Fluxograma de Preparo e Inoculação do Meio Líquido de Manutenção

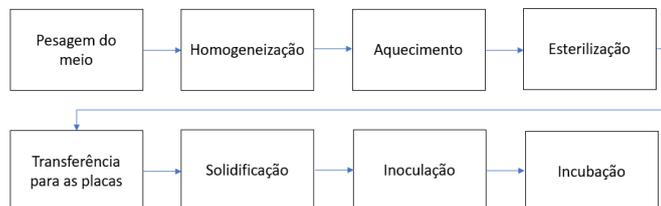


Fonte: Autoria própria (2021).

Para a manutenção em meio sólido, utilizou-se o meio ágar dextrose de batata (PDA) conforme instruções de preparo do reagente e assim é autoclavado; posteriormente, no fluxo laminar, é transferido para as placas de Petri, espera-se a solidificação e é feita a inoculação das cepas, EST, C1, C2, C3 e C4 e depois leva-se para a câmara de germinação (BOD) por 15 dias, à 21° C, sem luz, para o desenvolvimento e crescimento do micélio do fungo.



Figura 1 – Fluxograma de Preparo e Inoculação do Meio Líquido de Manutenção



Fonte: Autoria própria (2021).

Cultivo no inseto *Tenebrio molitor*

Para o cultivo em *T. molitor*, realizou-se 4 bateladas, utilizando a cepa C4, visto que a mesma apresentou melhor desenvolvimento dentre todas, tendo duas metodologias, sendo elas a inoculação *in vivo*, adaptado (Sato et al., 2002), consiste na inoculação *in vivo* do micélio do fungo na larva e na pulpa do inseto. Primeiramente, é feita a separação das larvas e pulpas do *Tenebrio*, colocando-os em placa de Petri (Figura 3).

Figura 3 – Larvas e pulpas de *T. molitor*



Fonte: Autoria própria (2021).

Posteriormente, com auxílio de uma seringa de 1 mL, é aplicado cerca de 0,1 mL do cultivo líquido de *Cordyceps militaris* nos mesmos, entre a primeira e segunda homocela (Figura 4) e assim os mesmos são colocados dentro de um recipiente com papel toalha úmido e levados para a câmara de germinação para incubação por 10 dias, à 21 ° C, para o desenvolvimento do micélio. Após 10 dias, transfere-se para um béquer com uma camada de musgo *Sphagnum sp.* úmido, fechado com papel filme e incubado novamente, entretanto com fotoperíodo setado para 12 horas de luz, na mesma temperatura por cerca de 45 dias.

Figura 4 – Aplicação de *Cordyceps militaris* na pulpa de *T. molitor*



Fonte: Autoria própria (2021).

A segunda metodologia, é realizada a partir da esterilização do *T. molitor* antes da inoculação do fungo, baseada na patente CN105557312A em recipientes de vidro com cerca de 3 mL de água destilada e



autoclavados por 15 minutos, à 121 °C, posteriormente é realizado a inoculação com auxílio de uma seringa de 1 mL, é aplicado cerca de 0,1 mL do cultivo líquido de *Cordyceps militaris* nos mesmos, entre a primeira e segunda homocela (Figura 4) e assim fechando-os em placa de Petri com parafilme (Figura 5), e levados para a câmara de germinação para incubação por 10 dias, à 21 ° C, para o desenvolvimento do micélio.

Figura 5 – Larvas de *Tenebrio* inoculadas



Fonte: Autoria própria (2021).

Ainda serão realizados pelo projeto a extração de DNA a partir dos corpos frutificados com o inseto como substrato, visando identificar os marcadores genéticos responsáveis pela degradação do cogumelo, de corpos frutificado *in natura* e produzidos em laboratório (da mesma cepa), afim de realizar um comparativo.

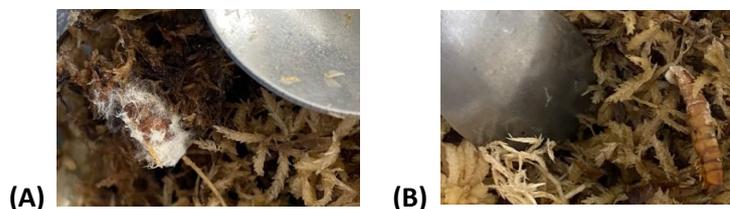
Divulgação do projeto

O desenvolvimento de conteúdo referente a divulgação do projeto Desmistificando Cogumelos para comunidade foi elaborado a partir do estudo teórico dos cogumelos cultivados. Desta forma, houve o desenvolvimento de roteiros para gravações de vídeos, educativos de até 5 minutos, inicialmente para o IGTV da rede social *Instagram*, com prospecção posterior para a rede *Facebook*. O roteiro foi elaborado contendo: nome do cogumelo, nome popular, características físicas que auxiliam na identificação pela comunidade, como presença de chapéu e suas características, presença de anel, estirpe, volva, substrato utilizado para crescimento, propriedades, curiosidade e uma aplicação culinária, disponibilizando duas receitas desses cogumelos (no caso de comestíveis).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas larvas e pulpas de *Tenebrio molitor*, a primeira batelada foi feita inoculando pulpas e larvas utilizando o método de (Sato et al., 2002). Pode-se observar crescimento do micélio nas pulpas após 10 dias (Figura 6). Contudo, após 23 dias de incubação, um enfraquecimento do crescimento foi observado. Um dos motivos para o ocorrido pode estar na degradação da cepa que passou por subcultivos (repiques) ao longo de 2 anos. É possível também, que a cepa em questão não esteja em suas condições ideais de cultivo, pois a frutificação depende de características muito específicas para que aconteça, sendo recomendado um estudo mais aprofundado dessas condições.

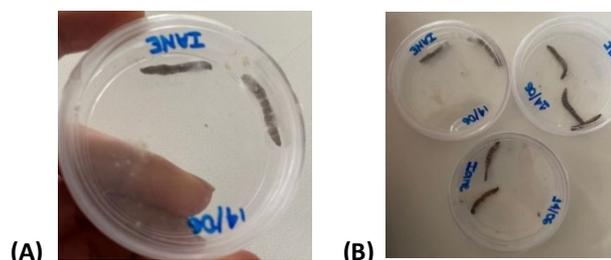
Figura 6 – Crescimento do micélio após 10 dias de incubação na pulpa (A) e em larva (B) de *T. molitor*



Fonte: Autoria própria (2021).

A segunda batelada foi feita utilizando a metodologia adaptada da patente CN105557312A, onde houve crescimento do micélio, após os 10 dias, em apenas em apenas uma das larvas. Existe a possibilidade da umidificação da incubação não ser suficiente para a necessidade do *C. militaris*, visto que o frasco para inoculação das cepas foi fechado com plástico filme e este pode não ter permitido a entrada efetiva de umidade.

Figura 7 – Placas de Petri com larvas inoculadas com *Cordyceps* após 10 dias, (A) larva a direita que teve crescimento significativo, (B) demais larvas inoculadas



Fonte: Autoria própria (2021).

Já na terceira batelada, pela resposta anterior, decidiu-se realizar as aplicações apenas em pulpas, realizando o mesmo processo de inoculação adaptado de Sato et al. (2002), tendo após 15 dias uma resposta satisfatória em comparação a primeira batelada (Figura 8).

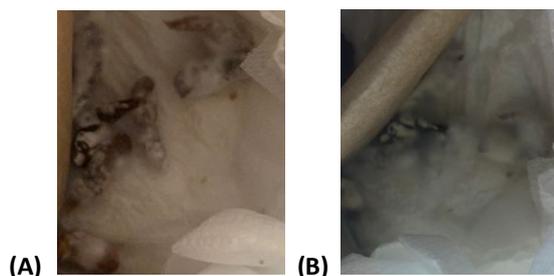
Figura 8 – Pulpas tomadas pelo micélio após 15 dias de inoculação



Fonte: Autoria própria (2021).

Na última batelada, somente com pulpas, foi feita uma modificação do método de Sato et al. (2002). Substituiu-se a injeção por uma incisão no inseto com agulha e sua imersão na cultura líquida contendo o fungo por cerca de 10 segundos. Os insetos inoculados foram colocados em papel toalha úmido e após 10 dias não foi realizada a mudança de recipiente. Neste método desenvolvido foi obtido melhor crescimento de micélio dentre todas as bateladas (Figura 9). Entretanto, assim como nas bateladas anteriores, o crescimento de corpo frutificado (cogumelo) não foi observado (Figura 10).

Figura 9 – Crescimento do micélio nas pulpas após (A) 9 dias e (B) 12 dias



Fonte: Autoria própria (2021).



Figura 10 – Redução do micélio após 24 dias de inoculação



Fonte: Autoria própria (2021).

Como resultados dos roteiros dos vídeos para divulgação do projeto, foram executados inicialmente 7 roteiros, um para cada cogumelo trabalhado na extensão, sendo eles o *Cordyceps militaris*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Hericium erinaceus*, *Rhizopus oligosporus*, *Ganoderma lucidum*. Os vídeos começarão a serem divulgados pela página a partir de outubro de 2021. Na figura 11, temos o exemplo do Juba de Leão (*Hericium erinaceus*).

Figura 11 – Exemplo dos primeiros tópicos do roteiro



Fonte: Autoria própria (2021).

CONCLUSÃO

Por meio do trabalho realizado até o presente momento, podemos considerar que a cepa estudada não demonstrou potencial para o desenvolvimento do cogumelo, o que indica que a mesma, possivelmente, atingiu um grau de degradação que compromete suas funções fisiológicas, se tornando obsoleta sem a realização do cruzamento com outra cepa. Assim, torna-se necessário a realização de testes com novas cepas para o cultivo de *Cordyceps militaris* em pulpas e em larvas no inseto *Tenebrio molitor*, para confirmação da metodologia desenvolvida, como também dar continuidade a realização do sequenciamento genético, visando os marcadores referentes a degradação do fungo, durante sua reprodução. E a partir da divulgação dos vídeos, considera-se interessante a criação de um canal do *YouTube* para melhor engajamento e expansão do projeto em diferentes plataformas, alcançando um maior número de pessoas e assim, promovendo a desmistificação dos cogumelos e suas propriedades. Isto colabora para um melhor entendimento da população sobre os cogumelos abordados, além de promover uma divulgação e curiosidade pelo consumo destes produzidos na região.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da UTFPR/PG e pela doação dos *Tenebrios* pelo Professor Dr. Igor de Paiva Affonso do DAENS – UTFPR/PG.



REFERÊNCIAS

- CERRI, Maria Luísa. **Otimização da produção de Cordyceps militaris em meio a base de melaço de cana e quantificação de compostos bioativos**. 2021. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, [S. l.], 2021.
- CHIU, Ching-Peng et al. Anti-inflammatory cerebrosides from cultivated Cordyceps militaris. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 7, p. 1540-1548, 2016.
- DONG, Jing Z. et al. Composition and characterization of cordyxanthins from Cordyceps militaris fruit bodies. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1450-1455, 2013.
- GUI, Zhong-Zheng; ZHU, Ya-Hong. Advance on cultivation, bioactive compound and pharmacological mechanism of Cordyceps militaris. **Sci Seri**, v. 34, p. 178-184, 2008.
- HEIDARI-PARSA, Shokooh. Determination of yellow mealworm (Tenebrio molitor) nutritional value as an animal and human food supplementation. **Arthropods**, v. 7, n. 4, p. 94, 2018.
- JEONG, Jin-Woo et al. Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 12, p. 1580-1586, 2010.
- JILIN UNIVERSITY (China). **Method for cultivating Cordyceps products by taking Tenebrio molitor (L.) larvae as carriers** 105557312A. Depósito: 13 jan. 2016. Concessão: 5 nov. 2016. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN105557312A/en>. Acesso em: 20 maio 2021.
- KANG, Chao et al. Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with Cordyceps militaris by liquid static culture. **The scientific world journal**, v. 2014, 2014.
- LIM, Hyun-Woo et al. Antitumor activity of Cordyceps militaris on human cancer cell line. **Korean Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 4, p. 364-367, 2004.
- LIU, Jing-yu et al. Immunomodulatory and antioxidative activity of Cordyceps militaris polysaccharides in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 594-598, 2016.
- NALLATHAMBY, Neeranjeni et al. Ergosterol of Cordyceps militaris attenuates LPS induced inflammation in BV2 microglia cells. **Natural product communications**, v. 10, n. 6, p. 1934578X1501000623, 2015.
- RAVZANAADII, Nergui et al. Nutritional value of mealworm, Tenebrio molitor as food source. **International Journal of Industrial Entomology**, v. 25, n. 1, p. 93-98, 2012.
- SATO, Hiroki; SHIMAZU, Mitsuaki. Stromata production for Cordyceps militaris (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. **Applied Entomology and Zoology**, v. 37, n. 1, p. 85-92, 2002.
- SMIDERLE, Fhernanda R. et al. Anti-inflammatory properties of the medicinal mushroom Cordyceps militaris might be related to its linear (1→3)-β-D-glucan. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110266, 2014.
- SUN, Jingbo et al. Extraction methods and sedative-hypnotic effects of polysaccharide and total flavonoids of Cordyceps militaris. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 498-505, 2018.
- TAI'AN INSTITUTE OF AGRICULTURAL SCIENCES (China). **A kind of method that Cordyceps militaris is cultivated using live body yellow meal worm larva as host** 108184540. Depósito: 29 jan. 2018. Concessão: 03 abr. 2020. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN108184540A/en?q=cn108184540>. Acesso em: 20 maio 2021.



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um
mundo em transformação

XI Seminário de Extensão e Inovação
XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica
08 a 12 de Novembro - Guarapuava/PR



WONG, Jack H. et al. Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 387-392, 2011.

YIN, Juan et al. Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0186279, 2017.

YU, Rongmin et al. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 4, p. 430-436, 2007.