



**CIBELLI PAULA DE CASTRO**

**CARACTERIZAÇÃO E DIGESTIBILIDADE ILEAL DE  
TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO PRÉ-TRATADA PELO  
MACRO-BASIDIOMICETO *Fistulina hepatica* CC102 EM  
DIETAS PARA SUÍNOS**

**LAVRAS - MG**

**2018**

**CIBELLI PAULA DE CASTRO**

**CARACTERIZAÇÃO E DIGESTIBILIDADE ILEAL DE TORTA DE  
CAROÇO DE ALGODÃO PRÉ-TRATADA PELO MACRO-BASIDIOMICETO  
*Fistulina hepatica* CC102 EM DIETAS PARA SUÍNOS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do Título de Mestre.

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias  
Orientador

Prof. Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu  
Coorientador

**LAVRAS, 2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Castro, Cibelli Paula de.

Caracterização e digestibilidade ileal da torta do caroço de algodão pré-tratada pelo macro-basidiomiceto *Fistulina hepatica* CCI02 em dietas para suínos / Cibelli Paula de Castro. - 2018.  
103 p.

Orientador(a): Eustáquio Souza Dias.

Coorientador(a): Márvio Lobão Teixeira de Abreu.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Fistulina hepatica*. 2. Biodestoxificação. 3. Digestibilidade Ileal. I. Dias, Eustáquio Souza. II. Abreu, Márvio Lobão Teixeira de. III. Título.

**CIBELLI PAULA DE CASTRO**

**CARACTERIZAÇÃO E DIGESTIBILIDADE ILEAL DE TORTA DE CAROÇO DE  
ALGODÃO PRÉ-TRATADA PELO MACRO-BASIDIOMICETO *Fistulina hepatica*  
CC102 EM DIETAS PARA SUÍNOS**

**CHARACTERIZATION AND ILEAL DIGESTIBILITY OF COTTON SEED  
CAKE PRE-TRADED BY THE MACRO-BASIDIOMYCETE *Fistulina hepatica* CC102  
IN SWINES DIETS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do Título de Mestre.

APROVADA em 17 de Julgo de 2018.

Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira

EMBRAPA AGROENERGIA

Prof. Dr. Leonardo, de Figueiredo Vilela

UFLA

Prof. Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu

UFLA

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

Orientador

**LAVRAS, 2018**

*A Deus,  
Aos meus pais José Tiago e Maria Fátima,  
Aos meus irmãos Janaína e Thiago,  
À Welma, Ricardo, Maria Luísa e Maria Clara,  
A todos os meus amigos, colegas e professores*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é a realização de um dos meus grandes sonhos: me tornar mestre. Sou privilegiada por ter minha família, meus amigos e parentes, os quais estiveram comigo nessa caminhada e que, sem eles, nada disso seria possível.

A Deus, por estar comigo em cada momento, em cada luta e em cada vitória. Sei que Ele acreditava em mim! A ELE toda honra e toda glória!

Aos meus pais, José Tiago e Maria Fátima (meus heróis) que mesmo com tantas dificuldades durante o curso nunca deixaram de acreditar que esse momento chegaria. À minha irmã Janaína, a maior precursora da minha história e que com certeza é meu exemplo de vida. Ao Thiago, meu irmão querido, que sempre me ajudou durante as dificuldades. Obrigada por tudo!

Aos meus queridos padrinhos Glória e Sebastião. Eu amo vocês! Obrigada pelo apoio. Todas as vezes que choravam quando eu partia, lembrem-se que a recompensa está aqui: este trabalho!

Ao meu querido vovô João Batista (in memoriam) o meu maior exemplo em prosseguir no curso. Ele amou o campo, alimentou famílias, e me fez ver, assim como também, valorizar ainda mais o trabalhador rural.

Ao professor Eustáquio, por seu profissionalismo, ética, boa vontade, disponibilidade, serenidade e pelos inestimáveis conhecimentos transmitidos e orientação. Obrigada pelo acolhimento e por ter me incentivado na pesquisa desde o começo da minha graduação.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo acolhimento e oportunidade oferecida, estendendo-se a todos os professores e funcionários.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Aos professores Whasley, Roberto e Geraldo, por me ajudarem na confecção deste trabalho durante a qualificação.

Ao professor Márvio por acreditar na minha capacidade, por sua boa vontade, disponibilidade e pelo apoio e incentivo incondicional na coorientação. Obrigada pela oportunidade em desenvolver esse projeto e por me fazer encantar a cada dia mais pela suinocultura.

À Simone, por toda disponibilidade em me ajudar! Obrigada pelo carinho, paciência e eficiência!

Ao professor Félix por também acreditar em mim. Obrigada por me guiar e me auxiliar nas pesquisas sem medir esforço algum. Obrigada por me mostrar esse mundo maravilhoso chamado SMS. Tenho um prazer imenso de estar na sua equipe!

À toda equipe da Veterinária da UFLA, alunos e residentes, em especial aos queridos Isabela e Arthur, que cuidaram tão bem dos meus porquinhos antes e após a cirurgia.

Aos professores Rodrigo Norberto e Rosa. Não imaginam quanta gratidão cabe no meu peito! Tenho vocês com muito carinho na minha vida e esse trabalho não seriam possíveis sem vocês.

A todos da equipe da EMBRAPA AGROENERGIA e a todos do NESUI UFLA, parcerias especiais na confecção desse trabalho. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pela paciência comigo e por toda disponibilidade.

À querida Melissa, chave fundamental deste projeto. O meu muito obrigada por toda ajuda! Você me ensinou a amar a suinocultura!

Aos meus queridos amigos que fiz no mestrado, principalmente Rafael, Daelen e Suzana. Obrigada por tudo! Por cada risada, por me ouvirem, por me ajudarem, por irem na suinocultura de madrugada me ajudar, por torcerem por mim e por nunca me deixarem. Eu amo vocês!

Aos queridos Jorge, Charles, Luciano, Letícia e Cátia que tanto me ajudaram na Suinocultura.

Mariana, Marina, Aline, Andressa, Vítor! Obrigada por cuidarem tão bem dos meus porquinhos. O Rubinho principalmente, o nosso eterno Rubinho! Sempre serei grata!

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Cogumelos Comestíveis, Tatiana, Joice, Lídia, Carlos, Lívia, Jéssica, Tamara, Leonardo, Thiago, Milene, Mateus, Roberta, Carol. Sou muito feliz por ter convivido com vocês!

À Tatiana, Juliana, Alex e Tequila! Obrigada por me acolherem no lar de vocês.

À querida Joice, meu anjo! Obrigada por estar comigo em todos os momentos! Sem você nada seria possível!

Ao querido Agenor, meu outro anjo da EMBRAPA AGROENERGIA. Obrigada por todo auxílio e pela preparação dos materiais. Obrigada por me ouvir e me ajudar, sem me conhecer.

À Moysa, minha amiga-irmã que nunca mediu esforços para me ajudar durante o trabalho. Nunca me esquecerei desse coração tão bom e tão raro que encontrei em Lavras.

Aos queridos técnicos do Laboratório de Pesquisa Animal, Márcio e Eliane. Obrigada por todo apoio técnico e disponibilidade em me ajudar.

À querida Rose por toda paciência, boa vontade e competência. Serei eternamente grata a você! Você é incrível!

Aos queridos técnicos Paulinho e Danilo, obrigada por toda boa vontade em me ajudar.

À minha segunda família, Welma, Ricardo, Marias, Lucy e família, vocês são meu combustível, a minha razão de seguir nos estudos.

A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente pela realização deste trabalho, obrigada!

*Ora, a fé o firme fundamento das coisas que se esperam,  
e a prova das coisas que não se vêem.*

*Hebreus 11:1*

## RESUMO

Cogumelos podem ser promissores agentes biodestoxificadores do gossipol presente na torta do caroço de algodão, tornando este resíduo como um futuro constituinte na alimentação de suínos. Diante disso, foram conduzidos experimentos com o objetivo de avaliar a capacidade biodestoxificadora de macrofungos em torta do caroço de algodão e a digestibilidade da proteína e aminoácida deste material em suínos. No primeiro experimento, foram testados 35 fungos pertencentes da coleção de cogumelos comestíveis da Embrapa Agroenergia e inoculados em meio sólido em placas de petri usando, torta de caroço de algodão 10% (ATCA), torta de caroço de algodão triturado 100% (TCA) e meio CAT que é um meio de caroço de algodão triturado. Após esse processo, os fungos com melhor crescimento em TCA foram testados quanto a degradação do gossipol. Apenas 13 fungos foram promissores na colonização do substrato à base da torta de caroço de algodão. Destes, apenas, *Fistulina hepatica*, mostrou-se eficiente na degradação do gossipol. Além disso, o substrato colonizado desta espécie apresentou características bromatológicas com alto valor proteico. Testes com *Artemia salina* e roedores não constataram anomalias ou efeito de toxicidade associados ao gossipol livre. As enzimas quantificadas no presente estudo mostraram-se eficientes na degradação do gossipol, mesmo em baixas concentrações. Os resultados obtidos neste trabalho apontaram para uma eficiência de *F. hepatica* CC102 na destoxificação da torta de caroço de algodão, abrindo assim possibilidades de integração das cadeias produtivas de biodiesel, fungicultura e a indústria de rações animais. No segundo experimento, foram realizadas cirurgias com implantação de uma cânula T na porção final do íleo em 4 suínos com peso de 80 kg cada. Os animais passaram pelo período pós-operatório e alimentados durante 6 dias com uma dieta isenta de proteína (DIP) e uma dieta DIP contendo 25% de SMS da torta do caroço de algodão. No sexto dia de alimentação, foram retiradas digestas em sacos plásticos acoplados a cânula, durante 24 horas. As digestas foram armazenadas em freezer e liofilizadas para análise de HPLC (High performance liquid chromatography) para a quantificação dos aminoácidos. Os valores de proteína bruta e fibra do SMS foram compatíveis com os valores exigidos para a produção de suínos. Os coeficientes de digestibilidade da proteína aparente (CDPBap), verdadeira (CDPB), coeficiente de digestibilidade ileal aparente dos aminoácidos (CDAAap) e verdadeira (CDAAv) foram semelhantes a alguns relatados na literatura (maiores que 80%), mostrando-se um alimento promissor na nutrição de suínos.

**Palavras-chave:** *Fistulina hepatica*, digestibilidade ileal, atividade enzimática, SMS, cânula T, HPLC.

## ABSTRACT

Mushrooms may be promising biodegradable agents of gossypol present in cotton seed cake, making this residue as a future constituent in pig feed. Therefore, experiments were carried out with the objective of evaluating the biodegradation capacity of macrofungi in cotton seed cake and the protein and amino acid digestibility of this material in swine. In the first experiment, 35 fungi belonging to the Embrapa Agroenergia edible mushroom collection were inoculated in solid medium in petri dishes using 10% cotton seed cake (ATCA), 100% cotton seed cake (TCA) and CAT medium which is a crushed cotton core medium. After this process, the fungi with the best growth in TCA were tested for the degradation of gossypol. Only 13 fungi were promising in colonization of the substrate with cotton seed cake. Of these, only, *Fistulina hepatica*, proved to be efficient in the degradation of gossypol. In addition, the substrates colonized by this species presented bromatological characteristics with high protein value. Tests with salty artemia and rodents did not detect anomalies or toxic effects associated with free gossypol. The enzymes quantified in the present study proved to be efficient in the degradation of gossypol, even at low concentrations. The results obtained in this work pointed to an efficiency of *P. ostreatus* CC389 and *F. hepatica* CC102 in detoxification of cotton seed cake, thus opening possibilities of integration of the production chains of biodiesel, fungiculture and the industry of animal rations. In the second experiment, surgeries were performed with implantation of a T-cannula in the final portion of the ileum in 4 pigs weighing 80 kg each. The animals went through the postoperative period and fed for 6 days with a protein-free diet (DIP) and a DIP diet containing 25% SMS from the cotton seed pie. On the sixth day of feeding, digests were withdrawn in plastic bags attached to the cannula for 24 hours. The digests were stored in freezer and lyophilized for high performance liquid chromatography (HPLC) for amino acid quantification. The apparent digestibility coefficients of the apparent protein (CDPBap), apparent ileal digestibility coefficient of the amino acids (CDAAap) and true (CDAAv) were similar to those reported in the literature (greater than 80%), showing a food promising in pork nutrition.

**Key words:** *Fistulina hepatica*, ileal digestibility, enzymatic activity, SMS, T-cannula, HPLC.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1 - Produção estimada de cogumelos comestíveis no Brasil.....	29
--	----

### Capítulo 2

Tabela 1 - Espécies de macrofungos e diferentes isolados pertencentes a coleção de cogumelos comestíveis – Embrapa Agoenergia.....	44
--	----

Tabela 2 - Isolados de fungos utilizados durante as etapas dos experimentos.....	47
--	----

Tabela 3 - Análise bromatológica do substrato à base de torta do caroço de algodão e após o pré-tratamento de <i>F. hepatica</i> CC102.....	74
---	----

### Capítulo 3

Tabela 1 - Composição centesimal das dietas experimentais.....	89
--	----

Tabela 2 - Níveis e aminoácidos nas dietas experimentais.....	89
---	----

Tabela 3 - Composição bromatológica do SMS a base de torta de caroço de algodão bagaço de cana .....	92
--	----

Tabela 4 - Composição dos aminoácidos com base na MS do SMS.....	93
--	----

Tabela 5 - Perdas endógenas da proteína e aminoácidos pela DIP.....	95
---	----

Tabela 6 - Digestibilidade ileal aparente e verdadeira da PB e aminoácidos.....	97
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1- Volume total do consumo de carne suína em toneladas.....19
- Figura 2 - *Fistulina hepatica* .....33

### Capítulo 2

- Figura 1 - Desenvolvimento micelial dos fungos em meio ágar-torta-de-caroço-de-algodão.....60
- Figura 2 - Placa com meio de cultivo ATCA após 7 dias de inoculação dos fungos.....61
- Figura 3 - Cultivo em torta de caroço de algodão após 20 dias de inoculação dos fungos, evidenciado as diferenças no comportamental dos diferentes gêneros e espécies ao serem submetidos a um meio tóxico.....62
- Figura 4 - Crescimento micelial em cultivo em pote com torta de caroço de algodão após 20 dias de inoculação dos fungos.....63
- Figura 5- Concentração de gossipol na torta e caroço de algodão, ambo submetidos a tratamento com calor úmido.....65
- Figura 6 - Teor de degradação da torta e do caroço de algodão por ação de macrofungos.....66
- Figura 7- Degradação de gossipol livre (GL) por estirpes de macrofungos ao final de quinze dias de cultivo por fermentação estado sólido contendo apenas caroço de algodão como fonte de substrato (CAT-100%) .....68
- Figura 8 - Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividades enzimáticas de celulases (FPase, CMCase, Beta-glicosidase) e Xilanases obtidos no cultivo de *CC 102* quando cultivado em torta de caroço de algodão 100% durante 15 dias.....69
- Figura 9 - Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividades enzimáticas de celulases (FPase, CMCase, Beta-glicosidase) e Xilanases obtidos no cultivo de *CC 102* quando cultivado em caroço de algodão 100% durante 20 dias.....69
- Figura 10 - Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividades enzimáticas de ligninases (Lacase - LAC e Manganês peroxidase - MnP) obtidos no cultivo de *CC 102* quando cultivado Torta de caroço de algodão 100% durante 20 dias.....71
- Figura 11- Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividades enzimáticas de ligninases (Lacase - LAC e Manganês peroxidase - MnP) obtidos no cultivo de *CC* quando cultivado C de caroço de algodão 100% durante 15 dias.....71

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	17
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	17
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
2.1 A produção de suínos no Brasil.....	19
2.2 A digestibilidade na produção de suínos .....	20
2.3 Digestibilidade dos aminoácidos .....	22
2.4 Aproveitamento de resíduos da indústria do biodiesel na fungicultura.....	23
2.5 Aproveitamento da torta do caroço de algodão.....	24
2.6 Biodestoxificação do gossipol por macrofungos .....	26
2.7 Cogumelos .....	27
2.8 O composto pós-cultivo de cogumelos comestíveis .....	28
2.9 Uso do composto pós-cultivo de cogumelos comestíveis na alimentação animal.....	31
2.10 O cogumelo comestível da espécie <i>Fistulina hepatica</i> .....	32
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	34
<b>4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	35
<b>CAPITULO 2</b> .....	40
<b>CULTIVO DE <i>Fistulina hepatica</i> CC102 COMO AGENTE DEGRADADOR DE GOSSIPOL EM TORTA DO CAROÇO DE ALGODÃO</b> .....	40
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	42
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
2.1 Origem e manutenção da coleção dos macrofungos.....	44
2.2 Obtenção e processamento de co-produtos do algodão.....	45
2.3 Meios de culturas: sólido à base de caroço de algodão 10% e semi-sólido à base de caroço de algodão 100% .....	45
2.4 Inoculações dos macro-basidiomicetos nos meios ATCA e TCA.....	46

2.5 Inoculações de macro-basidiomicetos para avaliação de degradação de gossipol .....	46
2.6 Extração de gossipol livre e quantificação via RP-UHPLC-DAD.....	47
2.7 Atividades enzimáticas .....	48
2.7.1 Obtenção do extrato bruto a partir do crescimento dos fungos .....	48
2.7.2 Açúcares Redutores – DNS.....	49
2.7.3 Atividades de holocelulases.....	49
2.7.4 Atividades $\beta$ Glicosidase .....	50
2.7.5 Atividades de proteases.....	50
2.7.6 Lacases.....	51
2.7.5 Peroxidases totais.....	51
2.7.6 Atividade de Lignina peroxidase (Lip).....	52
2.7.7 Manganês peroxidases.....	52
2.7.8 Atividade de lipase.....	53
2.8 Cultivo de <i>F. hepatica</i> CC102 .....	53
2.9 Análise bromatológica.....	53
2.9.1 Matéria seca .....	54
2.9.2 Cinzas.....	54
2.9.3 Extrato Etéreo.....	55
2.9.4 Fibra em Detergente Neutro (FDN).....	55
2.9.5 Determinação de Fibra em Detergente Ácido (FDA).....	56
2.9.6 Proteína Bruta .....	57
2.10 Ensaio de <i>Artemia salina</i> para avaliação toxicológica dos substratos.....	57
2.11 Análises estatísticas .....	58
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
3.1 Seleção de basidiomicetos capazes de degradar o gossipol livre .....	60
3.2 Extração e determinação dos agentes destoxificadores do gossipol livre.....	64

3.3 Curva de degradação de gossipol livre versus enzimas do macrofungo <i>Fistulina hepatica</i> CC102.....	68
3.4 Ensaios toxicológicos .....	73
3.5 Análise bromatológica.....	73
3.6 Obtenção do substrato pré-tratado por <i>Fistulina hepatica</i> CC102 para a alimentação animal.....	75
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
5. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	78
CAPÍTULO 3.....	82
DIGESTIBILIDADE ILEAL DA TORTA DO CAROÇO DE ALGODÃO PRÉ-TRATADA PELO MACRO-BASIDIOMICETO <i>Fistulina hepatica</i> CC102 EM DIETAS PARA SUÍNOS .....	82
1. INTRODUÇÃO .....	84
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 Obtenção do substrato pré-tratado por <i>Fistulina hepatica</i> CC102 (SPT <i>Fistulina hepatica</i> CC102).....	85
2.2 Cirurgia para implantação da cânula T.....	85
2.2 Manejo pós-operatório.....	86
2.2 Dietas experimentais .....	87
2.4 Coleta e análises.....	89
2.5 Fórmulas para determinação da Digestibilidade Ileal.....	89
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	91
3.1 Composição química da torta do caroço de algodão tratada com <i>Fistulina hepatica</i> e dietas.....	91
3.2 Perdas endógenas dos aminoácidos .....	94
3.3 Digestibilidade ileal aparente e verdadeira .....	95
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
5. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	100

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de suínos é uma atividade econômica que vem crescendo aceleradamente ao longo dos anos, em função da grande demanda desse tipo de carne. No entanto, a criação dos animais exige alimentos ricos em energia e proteínas, como por exemplo, o farelo de soja e o milho, os quais são de alto custo no mercado. Dessa forma, os produtores buscam novas alternativas de produção e novas estratégias para manter a produção e assim superar a competitividade do mercado.

A busca por alimentos alternativos é uma boa estratégia para os criadores. Um bom alimento alternativo é considerado aquele que não compromete o desempenho dos animais e minimiza gastos com alimentos de custo elevado. Neste contexto, a utilização de subprodutos de outras atividades agroindustriais é uma estratégia interessante o ponto de vista econômico. A indústria do biodiesel gera grandes volumes de tortas, as quais são decorrentes do processamento da retirada de óleo, as quais tem sido utilizada como bons substituintes de ingredientes usuais na alimentação animal.

A torta de caroço de algodão, a qual é também um subproduto da cadeia de produção do biodiesel é um exemplo de alimento alternativo, convencionalmente utilizado na produção de ruminantes, pelo seu alto teor de proteína e energia. Além do mais, a torta do caroço de algodão possui uma quantidade significativa de fibras, o que auxilia na digestão de outros alimentos e na modulação microbiana do trato gastrointestinal. Esta modulação caracteriza-se por uma competição de bactérias comensais sobre as espécies patogênicas, estabelecendo uma saúde intestinal positiva. No entanto, para animais não ruminantes, como os suínos, a torta do caroço de algodão tem uso limitado na alimentação animal, uma vez que esses animais apresentam maior sensibilidade na presença das altas concentrações de gossipol, um composto antinutricional que causa problemas tóxicos e reprodutivos nesses animais.

Várias técnicas já foram estudadas no intuito de eliminar o gossipol livre de subprodutos para transformá-los em alimentos viáveis na produção animal. Tratamentos térmicos e químicos possuem eficiência na eliminação do gossipol, mas podem gerar complexos antinutricionais ao final do processo, igualmente indesejáveis para animais não ruminantes. Fungos da podridão branca, conhecidos como cogumelos ou macrofungos já foram relatados como microrganismos eficazes na degradação de fatores antinutricionais em resíduos agroindustriais. Gomes et al. (2015) trataram torta de pinhão manso com fungos de podridão branca, obtendo ao final do

processo um substrato seguro quanto aos níveis de gossipol livre, sendo assim destinado para a alimentação de suínos.

Apesar disso, poucos trabalhos têm sido conduzidos a respeito da eliminação do gossipol em tortas do caroço de algodão e sua utilização na alimentação de animais não ruminantes. Neste processo, o cultivo destes cogumelos com a torta de caroço de algodão resulta em um substrato que pode apresentar potencial para ser utilizado na alimentação de suínos com características proteicas, energéticas e fibrosas de interesse nutricional.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo geral de avaliar a capacidade de *Fistulina hepatica* CC102 na degradação do gossipol em torta do caroço de algodão. Diferentes experimentos e ensaios foram conduzidos de acordo com objetivos específicos, tais como: avaliar a atividade enzimática do fungo, características bromatológicas do substrato colonizado e parâmetros de digestibilidade ileal aparente e verdadeira da proteína e aminoácidos em suínos na fase de terminação alimentados com o substrato pós cultivo de *Fistulina hepatica* CC102 na formulação das rações.

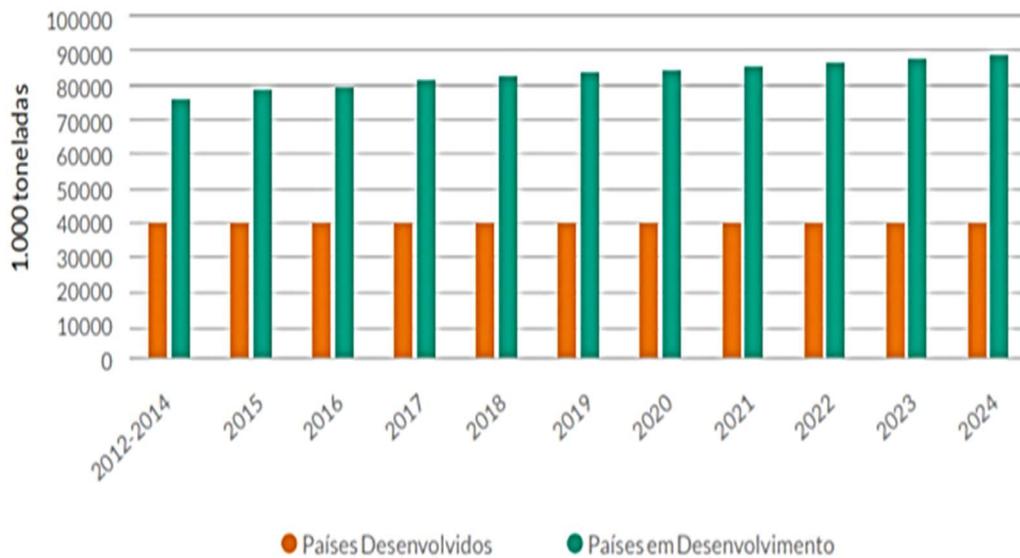
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A produção de suínos no Brasil

A carne suína é um dos alimentos mais consumidos no mundo devido a sua qualidade nutricional e aspectos culinários de boa aceitação pelo público. Até o ano de 2024, estima-se um aumento do consumo deste alimento por países principalmente em desenvolvimento, já que a maior parte da população mundial se encontra nestas localidades (Figura 2) (ABCS, 2016).

O Brasil é o único país da América do Sul entre os dez maiores produtores de carne suína, sendo que a região Sul do país se destaca pelo maior consumo de carne e pela produção em plantéis tecnificados. No contexto mundial, o Brasil perde em produção apenas para China, Alemanha, EUA e Espanha. Em 1995, a participação do Brasil no total mundial era de 1,82 % e cresceu para 3,1 % no ano de 2012 (ROPPA, 2013)

Figura 1: Volume total do consumo de carne suína em toneladas



Fonte: OECD/FAO 2016

Mesmo com a situação crítica que o Brasil se encontra financeiramente, o consumo de carne suína ainda se mostra com tendência de crescimento. Somente em 2016, o crescimento estimado de carne suína foi de 3,0 % comparado ao ano anterior, atingindo assim 39,26 milhões de animais abatidos, totalizando aproximadamente 3,43 milhões de toneladas de carne (ABPA, 2018).

O aumento da produção de carne suína deve-se não apenas à implantação de novas granjas, mas também ao aumento da produtividade. Para isto, há uma seleção minuciosa de animais que possuem uma aptidão para ganho de peso, aproveitamento de carcaça e melhoria da qualidade desta para atender as exigências do mercado. A nutrição correta e a gestão dos plantéis são fatores cruciais, que também fazem com que os índices de produtividade aumentem cada vez mais no Brasil. No mercado interno, cerca de 85% da carne suína é destinada para o comércio. A situação econômica das famílias pode reduzir o consumo de proteína animal, ou favorecer o consumo de carne mais barata, como é o caso da carne de frango. Portanto, o conhecimento das exigências, preferências ou limitações do mercado consumidor, é muito importante em um panorama no qual a competição entre os diferentes setores de produção de proteína animal deverá ser ainda mais acirrada (ABCS, 2014).

Em qualquer sistema de produção de suínos, seja uma microempresa ou uma empresa de larga escala, uma das principais preocupações do produtor é em relação ao preço de insumos necessários para atender a demanda energética dos animais, principalmente o milho e a soja. Neste aspecto a possibilidade de obter lucros com a suinocultura depende fundamentalmente de um adequado planejamento da alimentação dos animais. Isso envolve a disponibilidade de ingredientes em quantidade e qualidade adequada, a preços que viabilizem a produção de suínos. O produtor deve, no entanto, conhecer o conteúdo energético dos diversos alimentos ou subprodutos agroindustriais, encaixando-os na dieta dos animais de tal forma que as exigências sejam as mesmas propostas pelas tabelas padrões de nutrição dos suínos. Isso envolve a possibilidade de encontrar ingredientes que se encontram próximo aos locais das granjas, facilitando também na logística destes alimentos (EMBRAPA, 2018).

## **2.2 A digestibilidade na produção de suínos**

Com o aumento da produtividade dos suínos, veio também o desenvolvimento de alimentos alternativos, principalmente de alimentos proteicos que interferem no crescimento animal, influenciando parâmetros como o ganho de peso, o consumo diário de ração e a conversão alimentar. Um alimento só é considerado adequado para a alimentação animal, se este for digerível no trato gastrointestinal dos mesmos (HUEPA, 2017). O conceito de digestibilidade se define como o balanço de matéria perdida na passagem através do trato digestivo. Existem, portanto, dois conceitos de digestibilidade: a verdadeira e a aparente. A digestibilidade aparente é o balanço dos alimentos menos as fezes, enquanto que a digestibilidade verdadeira é o balanço entre a dieta e os respectivos resíduos alimentares que

escaparam da digestão e chegaram nas fezes, excluindo os produtos metabólicos, o que faz com que o coeficiente de digestibilidade verdadeira é sempre mais alto que o da digestibilidade aparente (VAN SOEST, 2018).

Os parâmetros de digestibilidade têm grande valor prático para a alimentação animal, uma vez que a digestão incompleta normalmente representa maior perda no processo da utilização da dieta consumida (RODRIGUEZ et al., 2006). Visto isso, é importante além da composição química, uma avaliação nutricional dos alimentos e dos seus efeitos sobre o consumo.

As fibras presentes na alimentação de suínos apresentam uma digestibilidade menor que outros tipos de componentes. Em animais ruminantes, isto não é um problema, pois estes animais possuem uma microbiota ruminal rica em bactérias celulolíticas altamente eficazes na degradação do material fibroso, (VAN SOEST, 2018). Urriola (2013) descreveu que um elevado teor de fibra na dieta de suínos está associado a uma baixa digestibilidade proteica, pois a fibra pode prejudicar o acesso das bactérias intestinais sobre a porção proteica. Neste caso, o teor de fibra possui uma correlação direta com a digestibilidade dos outros nutrientes da dieta.

Um estudo feito por Le Goff & Noblet (2001) avaliou as diferenças de digestibilidade de nutrientes entre suínos em crescimento (61,00 Kg) e porcas (não gestantes e não lactantes) e observou-se que maiores coeficientes de digestibilidade da energia, proteína bruta, extrato etéreo e da fibra eram de animais adultos. Isso explica o fato de que nesta categoria animal, o trato gastrointestinal sendo maior, há mais área de absorção principalmente da fibra que está presente na dieta.

Um dos indicadores mais utilizados para aferir a digestibilidade é o óxido crômico do grupo dos óxidos metálicos, por ser insolúvel em água, álcool ou acetona ligeiramente solúvel em ácido e álcalis. Dessa forma, a ração é marcada ao ser ingerida e revelada nas fezes, através da coloração desses indicadores. Ele apresenta algumas limitações, tais como taxas de recuperação variáveis, dependendo da composição do alimento; influência negativa no consumo de alimento pelos animais e por fim, valores encontrados podem variar dependendo do método analítico utilizado (SALES; JANSSENS, 2003). O dióxido de Titânio ( $TiO_2$ ) também é utilizado nas pesquisas para estimar a produção fecal, consumo de matéria seca do concentrado e ainda em substituição ao óxido de crômico.

Os métodos mais utilizados para determinação da digestibilidade de dietas e/ou alimentos em suínos são o método direto de coleta total das fezes e o método indireto por meio do uso de indicadores de digestibilidade baseado na diferença entre a alimentação e a eliminação desta dieta através das fezes. Através do método de coleta total determina-se a digestibilidade

in vivo da dieta, utilizando gaiolas metabólicas com dispositivos que permitem separação de urina e fezes, e com reduzida volatilização de nitrogênio. Na determinação da digestibilidade pelo método indireto, os pesquisadores recomendam o emprego de substâncias inertes conhecidas como indicadores. Este último método é considerado mais simples e podem proporcionar uma série de informações, incluindo a quantidade ingerida de alimentos ou nutrientes específicos, a taxa de passagem de digesta por todo trato digestivo e a digestibilidade do alimento ou de nutrientes específicos (SILVA, 2009).

### **2.3 Digestibilidade dos aminoácidos**

As proteínas são nutrientes orgânicos nitrogenados presentes em todas as células vivas; portanto, são essenciais à vida de todo animal. Todos os animais necessitam receber uma quantidade de proteína e, além disso, para o homem, suínos, aves, cães entre outros, a quantidade é tão importante quanto a qualidade. Os aminoácidos por sua vez são os componentes básicos das proteínas e podem ser essenciais ou não essenciais. Os aminoácidos essenciais não são sintetizados ou são em quantidades muito inferiores às necessidades do animal, enquanto os aminoácidos não essenciais são sintetizados a partir do esqueleto de carbono da glicose ou de outros aminoácidos e dos grupos amino de aminoácidos em excesso. Os aminoácidos são considerados indispensáveis na dieta animal, devendo ser adicionados às rações, pois cada categoria animal necessita de quantidades e especificações de acordo com suas exigências nutricionais (SAKOMURA, N. & ROSTAGNO, H., 2014).

Quando se refere ao valor nutritivo da proteína para animais não ruminantes, leva-se em conta que ele não é determinado apenas pela composição de aminoácidos, mas por sua digestibilidade, principalmente para os aminoácidos limitantes. Dessa forma, para a formulação de dietas, os valores de aminoácidos digestíveis devem ser considerados em detrimento do valor de aminoácidos totais, visando aumentar a eficiência, otimizar o uso de matérias-primas de alto custo e facilitar a substituição do milho e do farelo de soja por ingredientes alternativos (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2016).

A definição da digestibilidade dos aminoácidos é dividida em dois conceitos: aparente e verdadeira. A digestibilidade aparente é definida como sendo a diferença da quantidade de aminoácidos administrada na dieta e a quantidade destes nas fezes ou na digesta ileal. Neste caso, a palavra aparente, segundo Stein et al. (2007) é utilizada para enfatizar o conteúdo não digestível de aminoácidos e a não correção para as contribuições de origem endógena nesse valor de digestibilidade. A digestibilidade verdadeira, por sua vez, é determinada pela diferença

entre a quantidade de aminoácidos na dieta e nas fezes ou digesta ileal, sendo consideradas as perdas endógenas dos aminoácidos, que são subtraídas da quantidade total de aminoácidos presentes nas fezes ou na digesta ileal (SAKOMURA; ROSTAGNO, 2007).

Estudos realizados também por Stein et al. (2007) apontaram que a digestibilidade ileal é mais segura em relação àquela determinada utilizando-se das fezes para a estimativa da biodisponibilidade de aminoácidos. Dessa forma, os efeitos da microbiota do intestino grosso sobre os aminoácidos são eliminados.

Para a realização do método que determina a digestibilidade ileal, e para que se tenha acesso ao conteúdo do íleo, usa-se com mais frequência a Cânula T simples, que consiste na implantação de uma cânula de 10-15 cm da válvula íleo-cecal, permitindo o acesso à digesta ileal. Esta técnica tem apresentado vantagens, como: simplicidade da cirurgia, menor período de recuperação pós-cirúrgico e menor alteração da fisiologia digestiva, quando comparada a outras técnicas de avaliação nutricional como a implantação da cânula reentrante e anastomose íleo-retal (APOLÔNIO et al., 2003). A cânula T assim como os outros procedimentos que são usados para a coleta de fluido ileal, não permite a coleta total do conteúdo ileal do animal, sendo necessário incluir um marcador indigestível para calcular as mudanças nas concentrações dos aminoácidos.

Quando usamos um marcador para aferir a digestibilidade de um aminoácido, devemos levar em conta que estes são considerados como substâncias inertes que não são absorvidos. Desse modo, como aminoácidos e outros nutrientes são absorvidos no intestino delgado, a concentração do indicador na digesta tende a aumentar, em comparação com a sua concentração na dieta avaliada. Estes marcadores podem ser divididos em internos, representada por substâncias indigestíveis presentes na dieta, ou externos, quando eles são intencionalmente adicionados à dieta. Muitas substâncias podem ser usadas e entre os indicadores externos, o óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) é o mais usado entre os pesquisadores (POZZA, 2013).

No trato intestinal, os aminoácidos são divididos de acordo com o local de origem. Aqueles que são oriundos de secreções endógenas basais (aminoácidos que são secretados dentro do trato gastrointestinal de animais em jejum e independem da dieta), e os que são secretados em resposta ao consumo de matéria seca e características da dieta (JANSMAN et al., 2002). Dessa forma, é necessário avaliar a digestibilidade verdadeira, onde este último considera as perdas endógenas basais, proporcionando valores mais confiáveis em comparação com a digestibilidade ileal aparente (POZZA et al., 2013).

#### **2.4 Aproveitamento de resíduos da indústria do biodiesel na fungicultura**

O biodiesel é uma forma de combustível que pode substituir o diesel convencional de motores em geral e pode ser extraído de fontes vegetais ou até mesmo de gordura animal. Depois de um resultado negativo em 2016, a indústria do biodiesel reencontrou o caminho do crescimento. Segundo dados recém divulgados pelas usinas ao longo do ano de 2017, a produção atingiu a marca inédita de 4,29 bilhões de litros fabricados. O Conselho Nacional de Política Energética poderá aumentar após março de 2019, 15% da produção do biodiesel, devido à grande demanda nos ramos industriais e de transportes (BIODIESEL BR., 2018).

Dentre as muitas espécies vegetais no Brasil, as mais usadas na produção do biodiesel são o girassol, o amendoim, a mamona e a soja. Também, 20% do biodiesel é feito com gordura animal e o restante com diversas outras fontes, como o dendê, o óleo de algodão e a canola. A concentração de agroindústrias do biodiesel ocorre principalmente em localidades onde são produzidas as oleaginosas. Na região Sudeste, por exemplo, por meio de uma parceria entre o Governo do Estado e a empresa Italiana Novabra Energia, foi assinado um protocolo de intenção de produção de pinhão-manso. Os produtores da região de Colatina no Espírito Santo, firmaram um contrato com a empresa para exploração de mil hectares de plantação (BIODIESEL BR, 2018). A criação do “Polo Pinhão-manso” é um exemplo de elo entre o aproveitamento de resíduos da indústria do biodiesel que desenvolve planos de sustentabilidade, visando a produção de uma energia limpa e também renovável na região em que se encontra (SOUZA et al., 2016).

Para produzir biodiesel, a oleaginosa é misturada com o álcool e a reação formada é estimulada por um catalisador específico, que provoca uma reação entre o óleo e o álcool. Para separar o óleo usa-se glicerina, a mesma utilizada na fabricação de sabonetes. O óleo é então filtrado e a sobra de restos vegetais constitui no que chamamos de torta, um material muito rico em fibras e comumente utilizada na alimentação animal (BIODIESEL BR, 2018).

O estudo de várias fontes alternativas de alimentos, como os subprodutos da indústria do biodiesel é necessário para auxiliar o pesquisador, no que diz respeito à substituição destes aos alimentos convencionais de alto custo no mercado. Além disso, conduzindo o aproveitamento de subprodutos da indústria do biodiesel para a alimentação animal, ocorre também a diminuição do impacto ambiental desses materiais quando estes são descartados de forma indevida (AMORIM et al., 2015).

## **2.5 Aproveitamento da torta do caroço de algodão**

O algodão é uma planta oleaginosa do gênero *Gossypium* L., da família *Malvaceae*, onde cerca de 40 espécies são arbustivas e nativas das regiões subtropicais e tropicais. Além da

utilização prioritária na indústria têxtil, esta oleaginosa emerge agora também como matéria-prima de uso biotecnológico, em especial na produção de biodiesel. Com o avanço da tecnologia agrícola, o aumento da produtividade do algodão no Brasil permitiu que o país migrasse da categoria de maior importador mundial de algodão para o terceiro maior exportador do produto em 12 anos (MAPA, 2017).

A produção interna de algodão está concentrada na região Nordeste e possui uma importância socioeconômica relevante para a economia do país. Estima-se que cerca de 1,38 milhões de toneladas de algodão foram produzidos no período de 2016 e 2017, no entanto, em 2015 houve uma redução na área plantada de 2,5% comparada com as safras anteriores. Isso mostra que os elevados custos e o índice pluviométrico deficiente interferem negativamente na oferta anual desta cultura (CONAB, 2016).

No processamento do algodão para a fabricação de biodiesel, inicialmente há uma separação da fibra longa das sementes (descaroçamento), que resulta em caroço com línter, caracterizado por apresentar fibras finas e curtas, que permanecem ligadas ao caroço. Os produtos resultantes deste processamento são o próprio caroço de algodão que moído libera o óleo destinado ao consumo humano, o farelo de algodão, muito utilizado na alimentação animal, e a torta de algodão. O farelo distingue-se da torta em função do processamento, sendo que, ao passo em que a torta é obtida apenas pela prensagem do material, o farelo é obtido quando são utilizados processos químicos e físicos para a extração do óleo (SANTOS et al., 2009).

A composição da torta de algodão apresenta 89,1 a 94,2% de matéria seca; 25,9 a 47,6% de proteína bruta; 1,2 a 11,4% de extrato etéreo; 28,4 a 33,1% de fibra em detergente neutro; 17,7 a 21,6% de fibra em detergente ácido e 4,4 a 15,1% de lignina (VALADARES FILHO et al., 2006; BRITO et al., 2007).

A torta de caroço de algodão na alimentação de animais ruminantes é uma realidade presente em quase todos os sistemas de criação, pelo fato de que esse subproduto possui um alto valor nutricional, principalmente proteico e pelos grandes volumes produzidos pela indústria do biodiesel, o que facilita a oferta para os produtores. Estudos apontam para uma inclusão da torta de algodão numa proporção de 20 a 30% na ração, aumentando a energia líquida ingerida e a produtividade de leite e o extrato etéreo da dieta, responsável pela qualidade organoléptica do leite (ROGERIO et al., 2013).

A inclusão da torta de caroço de algodão na produção de suínos ainda não foi possível, pois existe a limitação destes animais quanto a toxicidade do gossipol, presente neste alimento. A inclusão deste subproduto na alimentação só seria possível se procedimentos de pré-tratamento e destoxificação fossem realizados previamente (ANDRADE et al., 2014).

## 2.6 Biodestoxificação do gossipol por macrofungos

O gossipol ( $C_{30}H_{30}O_{80}$ ) é um pigmento polifenólico tóxico, encontrado em sementes da família *Malvaceae* e é responsável pela proteção natural contra insetos invasores. A disponibilidade do gossipol no caroço de algodão está relacionada com a forma na qual se encontra, se livre ou ligado, que é quando o mesmo se complexa com proteínas circundantes. Quando está na forma livre, ele apresenta maior toxicidade do que na forma ligada. A forma ligada, no entanto, se dá após o processamento do caroço do algodão, onde há uma ligação do gossipol livre, onde o grupo aldeído presente nessa molécula se liga com aminas dos aminoácidos de proteínas que se encontram no meio. Gadelha (2014) relatou maior concentração de gossipol em caroço de algodão (0,7% ou 7000 ppm) em comparação com a torta do caroço de algodão, o que é explicado, conforme mencionado anteriormente, ao fato deste último ter passado pelo processamento para a retirada do óleo. Portanto, o gossipol livre é o maior problema na alimentação animal, sendo, portanto, o foco de pesquisas quanto à sua eliminação (OECD, 2009).

Fungos de podridão branca são conhecidos por produzir estruturas reprodutivas macroscópicas, sendo por isso também conhecidos como macrofungos ou macromicetos. Esses fungos são o alvo do presente projeto de pesquisa, uma vez que os mesmos atuam como degradadores de compostos antinutricionais. Essa capacidade desses microrganismos permite que substratos contendo essas substâncias sejam transformados em subprodutos viáveis para a alimentação animal, graças ao extenso arsenal enzimático que possuem. O processo que estes fungos realizam na retirada dos componentes indesejáveis é denominado de biodestoxificação ou detoxificação. Quando acontece a biodestoxificação pela ação das enzimas produzidas por estes microrganismos, o composto após o cultivo pode ser utilizado para a alimentação animal. Por exemplo, em tortas de pinhão manso, a degradação dos ésteres de forbol depende de enzimas como as esterases, que hidrolisam ésteres de cadeia curtas e lipases que hidrolisam diterpeno seus derivados (JOSHI et al., 2011).

Pesquisas com métodos químicos e físicos têm sido utilizadas na eliminação eficaz do gossipol livre tanto no caroço como na torta do caroço de algodão. Conceição (2018), testando autoclavagem concluiu que este método é eficaz na eliminação do gossipol livre, através da quantificação cromatográfica. Portanto, sabe-se que este método não é totalmente eficaz quando se trata de uso do resíduo deste processo na alimentação animal, pois o calor pode complexar o gossipol a proteínas, impossibilitando sua eliminação (CHAI & SUN 2016). Fungos da

podridão branca estão sendo testados pela Embrapa Agroenergia quanto ao seu poder biodestoxicador em tortas de caroço de algodão, mostrando resultados eficazes de eliminação e garantia de segurança deste subproduto (ARAÚJO et al., 2016).

Constituintes de interesse de plantas, microrganismos e outros tipos de organismos podem ser aferidos nas pesquisas científicas através de técnicas cromatográficas que revelam através de picos (cromatogramas) a ausência ou presença desses em determinada amostra. A técnica de cromatografia se baseia no princípio de separação individual dos diversos constituintes de uma mistura por meio de uma interação entre as moléculas da amostra e de duas fases, uma estacionária e outra móvel. Os seus principais componentes são um sistema de bombas, um sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica e o detector e um sistema que permite registrar e fazer o tratamento da resposta analítica desse detector a um software (USLU et al, 2012).

## 2.7 Cogumelos

A produção de cogumelos comestíveis tem se disseminado em vários locais do Brasil. Atualmente, os estados que mais se destacam na produção de cogumelos são São Paulo (Mogi das Cruzes, Pinhalzinho, Ibiúna, Sorocaba, Salto, Cabreúva, Juquitiba e Valinhos) e Paraná (Castro, Tijucas do Sul e Curitiba). Além desses, também há cultivos em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sul da Bahia, Pernambuco, Brasília e no Rio Grande do Sul (ABPC, 2018).

De acordo com Wasser et (2014), os cogumelos comestíveis possuem diversas propriedades envolvidas na imunoterapia, nutrição e prevenção de doenças tumorais. Os polissacarídeos presentes na parede desses fungos, principalmente as betaglucanas são descritas por melhorarem respostas imunes inatas e antitumorais em animais e humanos.

São conhecidas mais de dez mil espécies de cogumelos, podendo considerados comestíveis aqueles que não trazem risco a saúde, enquanto que nos não comestíveis, são encontradas propriedades alucinógenas e/ou tóxicas que podem ser letais se consumidos (FROUFE et al., 2011).

Somente mil espécies são conhecidas cientificamente como sendo cogumelos comestíveis. *Lentinula edodes* (Shitake) *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), e *Pleurotus ostreatus* (Shimeji), destacam-se dentre as espécies mais cultivadas no mundo. Dentre as três espécies, o *A. bisporus* é a espécie mais cultivada no Brasil (Tabela 1).

Graças as suas qualidades gastronômicas e potenciais propriedades como alimento funcional, há uma crescente demanda pelos cogumelos no Brasil, resultando na expansão do

seu cultivo. No entanto, há uma grande necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo que se enquadrem nas condições climáticas do país, o que chega a ser um fator limitante para várias regiões para o cultivo pouco tecnificado (DIAS et al, 2010).

O cultivo de cogumelos requer substratos constituídos, na sua maioria, por resíduos agroindustriais, ricos em celulose e lignina e considerados ideais como fontes nutricionais para estes microrganismos. Cada espécie é específica quanto a formulação de substratos, pois as enzimas presentes na degradação dos compostos lignificados, variam de acordo com o cogumelo de interesse (SAAD et al, 2017). A temperatura de cultivo pode variar em função da espécie, principalmente para a fase de frutificação. Para a grande maioria dos cogumelos, a frutificação pode ocorrer entre 18 e 22°C, como ocorre com o champignon, o shiitake e o shimeji. Muitas espécies de origem tropical frutificam bem em temperaturas mais elevadas, como é o caso do cogumelo do sol (*Agaricus subrufescens*) e algumas espécies do gênero *Pleurotus* e até mesmo linhagens da espécie *P. ostreatus*. Curiosamente, para a colonização do substrato, a temperatura não varia muito, sendo 25°C a temperatura mais comumente utilizada. Para uma frutificação eficiente, outros dois fatores são muito importantes: umidade relativa do ar e ventilação, sendo que, para esses dois fatores, não há também grandes variações entre as diferentes espécies de cogumelos. De modo geral, utiliza-se umidade acima de 90%±5, apesar de que algumas espécies podem ser um pouco menos exigentes. Para o fator ventilação, trabalha-se como referência com um teor de CO<sub>2</sub> de 1000 ppm, como sendo o máximo permitido para a fase de frutificação. Por estes fatores, o produtor necessita ter um investimento inicial onde a tecnificação possa ser implantada no local de produção (FIGUEIREDO & DIAS, 2014).

Tabela 1 – Produção estimada de cogumelos comestíveis no Brasil

<b>Principais cogumelos produzidos no Brasil</b>	<b>Produção estimada (Ton/ano)</b>
<i>Agaricus bisporus</i> (Cogumelo de Paris)	8.000
<i>Pleurotus spp.</i>	2.000
<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	1.500
<i>Agaricus subrufescens</i>	500
Outros	50

Fonte: Adaptado de Associação Nacional de Produtores de Cogumelos (ANPC)

## 2.8 O composto pós-cultivo de cogumelos comestíveis

Após o fluxo de produção do cogumelo, resta o substrato pós cultivo ou do inglês SMS (Spent Mushroom Substrate), cuja destinação tem sido objeto de estudo em países como China, Estados Unidos e Holanda. A produção mundial de cogumelos frescos em 2013 foi de, aproximadamente, 10 milhões de toneladas, de modo que, poderia se estimar um volume gerado de 50 a 100 milhões de toneladas de SMS. Dessa forma, há uma necessidade ambiental e econômica do aproveitamento deste subproduto da fungicultura, visando a minimização dos impactos ambientais que este gera, em função da sua destinação. (FONSECA et al., 2017). Por outro lado, quando se tem o uso de microrganismos que podem incorporar nutrientes de interesse farmacológico ou mesmo na nutrição animal em um determinado substrato, sem que haja produção deste organismo para um consumo, como é o caso da produção de cogumelos, o processo é denominado de “pré-tratamento” ou “fermentado”. O substrato pré-tratado por algum microrganismo é um passo crucial na conversão de biomassas lignocelulósicas em biodiesel ou alimentos ricos em nutrientes para a alimentação animal e são cientificamente melhores, quando comparados aos tratamentos térmicos e químicos (WAN & LI, 2012).

A composição do SMS ou compostos pré-tratados varia de acordo com a espécie cultivada, bem como da diversidade de materiais utilizados (palha de trigo e de arroz, resíduos de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, serragens, polpa e casca de frutas, folha de bananeira, polpa de café, entre outros) (SAAD et al, 2017).

De um modo geral, todos os cogumelos possuem propriedades farmacêuticas e nutracêuticas, de interesse tanto na alimentação humana quanto animal. O consumo de *Pleurotus ostreatus*, por exemplo, oferece proteção antioxidante aos danos do sistema oxidativo, por ser importante fonte de compostos fenólicos capazes de combater, suprimir e inibir a formação de radicais livres (BRUGNARI et al, 2018). Antioxidantes ativos encontrados em cogumelos incluem vitaminas tais como ácido ascórbico, carotenóides, tiamina, riboflavina, biotina e piridoxina, além do ergosterol. Cogumelos comestíveis como *Agaricus bisporus*, *Cantharellus*, *Cibarius*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Boletus edulis* são uma fonte rica dessas vitaminas (Nakalembe et al., 2015). Outro composto de interesse farmacológico é a ergotionina, substância oxidante que foi quantificada em 0,93mg/g em *Agaricus bisporus* (CHEN et al. (2012). Estes compostos não são sintetizados por animais, sendo, portanto, estudados como futuras fontes na incrementação de dietas.

Um dos aspectos mais importantes dos cogumelos comestíveis é a sua capacidade de degradação da lignina. O arsenal enzimático dos fungos de podridão branca envolve as lacases, manganês peroxidases e aril-álcool-oxidase, que produz o peróxido de hidrogênio requerido pelas peroxidases (SÁNCHEZ, 2009). Destacando o gênero *Pleurotus*, este fungo possui uma

grande capacidade de produzir eficientes enzimas lignocelulolíticas. Tais enzimas são excelentes quanto ao seu potencial de degradação da lignina, facilitando o acesso às celulasas e hemicelulasas, também produzidas por esses fungos (LOMASCOLO et al., 2011). Kaffenberg (2015) observou a perda de lignina em 40% no substrato feito de palha de milho, testando cinco fungos de podridão branca, dentre eles o *Pleurotus ostreatus*. Pensando na alimentação animal, principalmente de não ruminantes, a degradação de compostos lignificados por macrofungos é um passo importante para a nutrição desses animais, já que muitos alimentos com alto teor proteico são limitados por conter grande quantidade desses compostos, não disponibilizando a proteína. Em animais não ruminantes por exemplo, há uma limitação ao uso de matérias primas com elevado teor de lignina, pela falta de microrganismos responsáveis por essa degradação, como ocorre nos ruminantes (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2016)

Na degradação de materiais fibrosos, as enzimas capazes de promover a quebra da celulose são as pertencentes ao complexo de celulasas, as quais são capazes de realizar hidrólise da celulose em glicose. As endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanases hidrolisam ligações internas ( $\beta$ -1,4), preferencialmente nas regiões amorfas, expondo regiões terminais e não terminais. As exo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanases dão sequência à ação das endoglucanases, removendo monômeros ou dímeros das porções terminais das cadeias, enquanto que as  $\beta$ -glucosidades hidrolisam celobioses e, raramente, alguns oligossacarídeos a glicose (FUKUDA et al., 2009). As enzimas lignolíticas oxidativas (lacase, manganês-peroxidase e lignina-peroxidase) atuam na degradação da lignina (SOUZA, 2012). As holocelulasas são as enzimas que degradam a holocelulose (celulose com hemicelulose) da estrutura lignocelulósica da parede celular das plantas (GASPAR, 2014). O basidiomiceto *Coprinopsis cinerea*, cultivado em palha de arroz sem quaisquer aditivos, produziu uma série de enzimas (lacase, celulase e xilanase). Observou-se também que a microestrutura e os constituintes da palha de arroz mudaram significativamente após serem transformados por este microrganismo. Portanto, o subproduto do cultivo deste microrganismo pode ser considerado bastante apropriado para a inclusão na cadeia de alimentação animal (ZHANG, 2018). Whang (2018) inoculando 12 espécies do gênero *Aspergillus* em folhas de *Ginkgo biloba* observaram o aumento de aminoácidos essenciais e aminoácidos totais de 96,41% e 16,49% respectivamente maiores que o controle. Além das enzimas envolvidas no processo de degradação, os cogumelos produzem, como parte da estrutura da sua parede células, a  $\beta$ -glucana, um importante polissacarídeo que capaz de apresentar um papel imunomodulador em animais, além de atividade antitumoral, antiinflamatória, antimutagênica, hipocolesterolêmica e hipoglicêmica.

## 2.9 Uso do composto pós-cultivo de cogumelos comestíveis na alimentação animal

O crescente uso de alimentos alternativos na alimentação de suínos é realizado afim de viabilizar novas opções na dieta destes animais. Se estes subprodutos são provenientes de agroindústrias que se encontram na região de produção, tem-se a vantagem de custos menores, o que traz grande benefício para os produtores de suínos.

Quando há uma utilização de materiais provenientes do setor agroindustrial para a alimentação animal, conseqüentemente, há também uma diminuição dos impactos ambientais que estes materiais causariam se fossem lançados no meio ambiente, em especial aqueles que contém um alto teor de elementos químicos poluentes (REZZADORI; BENEDETTI, 2009). Na alimentação animal, estes resíduos podem ser usados como fonte de energia, proteína, minerais e vitaminas. Além disso, esses subprodutos apresentam a vantagem de proporcionar uma utilização que não compete com a alimentação humana, como é o caso da utilização do milho e farelo de soja, principais ingredientes da ração de suínos, mas que também são utilizados na alimentação humana.

No caso do SMS, este era considerado um problema para a cadeia produtiva de cogumelos, porque, além de poder causar problemas de contaminação de novos cultivos, gerava problemas de contaminação dos cursos d'água se disposto de forma inadequada no ambiente. Mas, atualmente, pode ser utilizado na produção de enzimas, biorremediação, alimentação animal e geração de bioenergia (PHAN; SABARATNAM, 2012).

Vários trabalhos têm apontado a viabilidade da utilização de SMS ou do composto pré-tratado por microrganismos na alimentação animal. A suplementação dietética com o fermentado de *Hericium caput medusae* em frangos de corte, aumentou as contagens de bactérias benéficas no intestino e inibiu o crescimento de *E. coli*, além de melhorar a utilização de nutrientes da dieta e aumento da estrutura das vilosidades intestinais (SHANG, 2016). Outros trabalhos demonstraram o potencial de utilização do SMS de *Agaricus bisporus* na alimentação de bagres juvenis, bem como da utilização do fermentado de *Pleurotus ostreatus* como substituto da farinha de peixe (KATYA, 2014). Quantidades aumentadas de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* no jejuno e quantidades menores de *Escherichia coli* no jejuno e no íleo foram observadas com a administração de dietas contendo *Armillariella tabescens* como aditivo em dietas para leitões em fase de desmame (CHEN, 2017). A adição de fungos em substratos contendo palha de milho mostraram a degradação da lignina nas primeiras 8 horas de cultivo, concluindo assim que os fungos podem ser potentes

deslignificantes de materiais fibrosos, aumentando assim a digestibilidade desses resíduos para a alimentação animal (HUANG, 2017).

O sucesso do uso do SMS e de compostos pré-tratados na alimentação de animais, está relacionado, além do valor nutricional do mesmo, à melhor digestibilidade do produto final. Desse modo, a utilização desses substratos tem se mostrado viável para o aproveitamento na alimentação animal, formando um elo importante de aproveitamento entre a fungicultura, a agricultura e indústria do biodiesel com a produção animal.

## 2.10 O cogumelo comestível da espécie *Fistulina hepatica*

*Fistulina hepatica* é um cogumelo comestível pertencente ao filo Basidiomycota, ordem Agaricales, família Fistulinaceae e gênero *Fistulina*. É parasita de troncos de madeiras mais maduras como castanheiros e carvalhos. Seu corpo de frutificação possui um diâmetro que pode variar de 7 a 20 centímetros e seu formato é semelhante a um fígado, o que dá origem ao seu nome (Figura 1). A coloração deste fungo varia do rosa à laranja no início da frutificação e torna-se de cor vermelha até marrom no decorrer do tempo. Um fato interessante é que ao ser cortado, o basidiocarpo de *Fistulina hepatica* produz um exsudato vermelho-sangue (SONG, 2015). De acordo com Moura (2008), o consumo de *Fistulina hepatica* ainda não é estabelecido na população urbana, porém é um alimento muito procurado por pequenas populações que residem próximas a matas selvagens.

Figura 1: *Fistulina hepatica*



FONTE: [http://mushroomobserver.org/name/show\\_name/4](http://mushroomobserver.org/name/show_name/4)

*Fistulina hepatica* destaca-se como um dos cogumelos que apresentam teores de ácidos fenólicos, os quais são conhecidos pela sua ação antioxidante em alimentos (VAZ et al., 2011). Além do perfil antioxidante, Palazzolo (2012) observou uma maior concentração de vitamina

B12 e outras vitaminas neste cogumelo, quando comparado a cogumelos do gênero *Pleurotus* e outras espécies de cogumelos. Alves et al (2014) observaram um potencial antibiótico usando *Fistulina hepatica* no controle de bactérias patogênicas do trato gastrointestinal, o que demonstra outras potencialidades de aplicação deste cogumelo.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O uso da torta de caroço de algodão como um subproduto alternativo para a alimentação de animais ruminantes já é uma realidade, uma vez que esses animais são tolerantes aos níveis de gossipol presentes nesse material. Entretanto, para suínos, a inclusão deste alimento só é possível se um tratamento de destoxicação do gossipol. Dentre as diferentes possibilidades, o processo de biodestoxificação realizado por cogumelos comestíveis é uma das estratégias mais promissoras. Neste processo, obtendo o SMS (Spent Mushroom Substrate) como produto da colonização deste fungo, a inclusão do mesmo na alimentação de suínos contribuiria como elo entre a fungicultura e a cadeia do biodiesel, na qual o produtor rural teria acesso, a baixo custo, a um subproduto de alta qualidade nutricional.

#### 4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABCS. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS: Produção de suínos: teoria e prática / Coordenação editorial Associação Brasileira de Criadores de Suínos; Coordenação Técnica da Integrall Soluções em Produção Animal. Brasília, DF, 2014.

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL Estatísticas da Carne Suína. Associação Brasileira de Proteína Animal, 2014. Acesso em: 08 de fevereiro de 2018.

ALVES, M. J., FERREIRA, I. C., LOURENÇO, I., CASTRO, A., PEREIRA, L., MARTINS, A., & PINTADO, M. Wild mushroom extracts potentiate the action of standard antibiotics against multiresistant bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 116, n. 1, p. 32-38, 2014.

ANPC. ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE COGUMELOS. Disponível em: <https://www.anpccogumelos.org/cogumelos>. Acesso em 23 de abril de 2018.

ANDRADE, I. R. A. D., CÂNDIDO, M. J. D., POMPEU, R. C. F. F., GUIMARÃES, V. P., SILVA, L. V. D., & EVANGELISTA, M. E. S. Desempenho produtivo e econômico do confinamento de ovinos utilizando diferentes fontes proteicas na ração concentrada. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 3, 2014.

AMORIM, A.F.; SILVA, G.F.; RODRIGUES, K.F.; SOUZA, J.P.L.; SOARES, J.A.R. Subprodutos utilizados na alimentação de frango de corte. **Pub Vet Maringá**, v. 9, n. 5, p. 195-210, 2015.

APOLÔNIO, L.R.; DONZELE, J.L.; OLIVEIRA, R.F.M. Digestibilidade ileal de aminoácidos de alguns alimentos, determinada pela técnica da cânula simples com suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.3, p.605-614, 2003.

ARAÚJO, A.P.F.; GOMES, T.G.; MACHADO, A.E.V.; CONCEIÇÃO, A.A.; RIBEIRO, J.A.A.; CAMPANHA, B.R.; URBEN, F. A.; MENDONÇA, S.; SIQUEIRA, F.A. Fungos como agentes destoxificadores de torta de caroço de algodão (Gossipol). **Embrapa Agroenergia**, Brasília – DF, 2016.

BRITO, R.M.; SAMPAIO, A.A.M.; FERNANDES, A.R.M. et al. Degradabilidade in situ e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas balanceadas para diferentes ganhos de peso e potenciais de fermentação microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1639-1650, 2007.

BRUGNARI, T., KATO, C. G., CORREA, V. G., DE FREITAS, E. N., NOLLI, M. M., & DE SOUZA, C. G. M. Atividade antioxidante do extrato aquoso do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus*. **Revista Uningá Review**, v. 25, n. 3, 2018.

CHAI, XIUHANG; BI, YANLAN; SUN, Shangde. Free fatty acids increase gossypol losses in soybean oil during heating. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 4, p. 584-591, 2016.

CHEN, S. Y., HO, K. J., HSIEH, Y. J., WANG, L. T., MAU, J. L. Contents of lovastatin,  $\gamma$ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. **LWT-Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 274-278, 2012.

CHEN, W. B., CHENG, M. J., TIAN, Y. B., WANG, Q. H., WANG, B., LI, M. J., & FANG, R. J. Effects of *Armillariella tabescens* mycelia on the growth performance and intestinal immune response and microflora of early-weaned pigs. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 9, p. 1388-1397, 2017.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2017.

CONCEIÇÃO, A. A., NETO, C. B. S., DE AQUINO RIBEIRO, J. A., DE SIQUEIRA, F. G., MILLER, R. N. G., & MENDONÇA, S. Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. **PLoS one**, v. 13, n. 5, p. e0196164, 2018.

DIAS, E.S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 795-803, 2010.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2016. Disponível em: <http://www.embrapa.br/suinos-e-aves>. Acesso em: 08 de Fevereiro de 2018.

FONSECA, L. S., ARAÚJO, A., MACHADO, A., DE SIQUEIRA, F. G., LEMOS, M., ; MENDONÇA, S. Caracterização química do resíduo pós-cultivo de cogumelos destoxicantes em torta de algodão. In **Embrapa Agroenergia-Artigo em anais de congresso**. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 4., 2017.

FROUFE, Hugo JC; ABREU, Rui; FERREIRA, Isabel CFR. Valorização de cogumelos silvestres como alimentos funcionais: estudos de química computacional. In: **IV Workshop em Bioinformática. Escola Superior Agrária de Bragança, 27 e 28 de Abril de 2011**. Escola Superior Agrária de Bragança, 2011.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 2-12, 2009.

GASPAR JÚNIOR, PASCOAL JOSÉ. **Caracterização de holocelulases fúngicas na otimização da biomassa lignocelulósica**. 157 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2014.

GOMES, T. G., MACHADO, A. E. V., ARAÚJO, A. P., LAVIOLA, B., RIBEIRO, J. D. A., CAMPANHA, R. & DE SIQUEIRA, F. G. Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-mansão por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis. In: **Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso** In: Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, 2., 2015, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2015.

HUANG, H., WANG, Z., PAN, S. C., SHOUP, L. M., FELIX, T. L., PERKINS, J. B., SINGH, V. Fungal pretreatment to improve digestibility of corn stover for animal feed. **Transactions of the ASABE**, v. 60, n. 3, p. 973-979, 2017.

HUEPA, L. M. D., SATO, J., TOLEDO, J. B., MONTEIRO, A. N. T. R., & POZZA, P. C. Aminoácidos de cadeia ramificada na alimentação de suínos: Revisão. **PUBVET**, v. 11, p. 1074-1187, 2017.

GADELHA, I. C. N., FONSECA, N. B. S., OLORIS, S. C. S., MELO, M. M., & SOTO-BLANCO, B.

LOMASCOLO, A., UZAN-BOUKHRIS, E., HERPOËL-GIMBERT, I., SIGOILLOT, JC., LESAGE-MEESSEN, L. Peculiarities of Pycnoporus species for applications in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1129-1149, 2011.

JOSHI, C.; MATHUR, P.; KHARE, S.K. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. **Bioresource technology**, v. 102, n. 7, p. 4815-4819, 2011.

KAFFENBERGER, JUSTIN T.; SCHILLING, JONATHAN S. Comparing lignocellulose physiochemistry after decomposition by brown rot fungi with distinct evolutionary origins. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 12, p. 4885-4897, 2015.

KATYA, K., YUN, Y. H., PARK, G., LEE, J. Y., YOO, G., & BAI, S. C. Evaluation of the efficacy of fermented by-product of mushroom, *Pleurotus ostreatus*, as a fish meal replacer in juvenile Amur catfish, *Silurus asotus*: effects on growth, serological characteristics and immune responses. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 27, n. 10, p. 1478, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2017. Disponível em: <http://www.mapa.gov.br>. Acesso em 12 de fevereiro de 2017.

MOURA, P. L. D. C Determinação de elementos essenciais e tóxicos em cogumelos comestíveis por análise por ativação com nêutrons. **São Paulo: Autarquida associada à Universidade de São Paulo**, 2008.

NAKALEMBE, I., KABASA, J. D., OLILA, D. Comparative nutrient composition of selected wild edible mushrooms from two agro-ecological zones, Uganda. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 433, 2015.

NOBLET, J. Estimativas do valor energético em rações de suínos. In: **WORKSHOP LATINO-AMERICANO AJINOMOTO BIOLATINA**. p. 2-16, 2001.

OECD - FAO. Agricultural outlook – Meats, 2012 -2021.

PALAZZOLO, ERISTANNA; LETIZIA GARGANO, MARIA; VENTURELLA, GIUSEPPE. The nutritional composition of selected wild edible mushrooms from Sicily (southern Italy). **International journal of food sciences and nutrition**, v. 63, n. 1, p. 79-83, 2012.

PHAN, CHIA-WEI; SABARATNAM, VIKINESWARY. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 863-873, 2012.

POZZA, P.C.; GOMES, P.C; POZZA, M.S.S.; NUNES, R.V.; FERREIRA R.A.; RODRIGUEIRO, R.J.B. Uso de indicadores para determinar a digestibilidade ileal de aminoácidos para suínos **Ciênc. Agrotec.**, v. 37, n. 3, p. 259-265, 2013.

REZZADORI, K; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, São Paulo, 2009.

RODRÍGUEZ, M.L.; ORTIZ, L.T.; ALZUETA, C.; REBOLÉ, A.; TREVIÑO, J. Nutritive value of high-oleic acid sunflower seed for broiler chickens. **Poultry Science**, v.84, p.395-402, 2006.

ROPPA, L. Perspectivas da produção mundial de carnes, 2007 a 2015. Disponível em: <http://www.sossuinos.com.br/mercado/info15.htm>. Acesso em: 21/04/2018

SAAD, A. L. M., VIANA, S. R. F., SIQUEIRA, O. A. P. A., SALES-CAMPOS, C., & DE ANDRADE, M. C. N. Aproveitamento de resíduos agrícolas no cultivo do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* utilizando a tecnologia chinesa “JunCao” Use of agricultural residues in the cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* using the “Jun-Cao” Chinese technology. **AMBIÊNCIA**, v. 13, n. 3, p. 572-582, 2017.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal, SP: Editora Funep, p.676, 2016.

SAKOMURA, N., ROSTAGNO, H. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal, SP, 2014.

SALES, J.; JANSSENS, G. P. J. The use of markers to determine energy metabolizability and nutrient digestibility in avian species. **World's poultry science journal**, v. 59, n. 3, p. 314-327, 2003.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANTOS, I. D. S., WANDERLEY JÚNIOR, J. S. A., SANTOS, F. D. N., da SILVA, M. N. B., GONZAGA, L. In: Congresso Brasileiro do Algodão, Foz do Iguaçu, 7., 2009.

SHANG, H. M., SONG, H., XING, Y. L., NIU, S. L., DING, G. D., JIANG, Y. Y., & LIANG, F. Effects of dietary fermentation concentrate of *Hericium caput-medusae* (Bull.: Fr.) Pers. on growth performance, digestibility, and intestinal microbiology and morphology in broiler chickens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 1, p. 215-222, 2016.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 235, 2009.

SONG, JIE; HAN, MEI-LING; CUI, BAO-KAI. *Fistulina subhepatica* sp. nov. from China inferred from morphological and sequence analyses. **Mycotaxon**, v. 130, n. 1, p. 47-56, 2015.

SOUZA, Gleison. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes**. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SOUZA V.H. A.; SANTOS, L.T.; CAMPOS A.D.; CAROLINO. Um panorama do biodiesel no Brasil e no mundo: Esforço para a amplificação do setor e desafios. **Rev. Augustus**, v. 21, n. 41, p. 117-130, 2016.

STEIN, H. H.; FULLER, M.F.; MOUGHAN, P. J. Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. **Livestock Science**, v. 109, p. 282-285. 2007.

URRIOLA, P. E., S. K. CERVANTES-PAHM, STEIN H. H. Fiber in Swine Nutrition. Sustainable Swine Nutrition. L. I. Chiba, editor. **Wiley-Blackwell**, IA. p. 255-276, 2013.

USLU, B., LINGEMAN, H., OZKAN, S. A., PALIT, M., DOGAN-TOPAL, B. Analytical Method Development and Validation of Pharmaceutical Analysis Using Chromatographic Techniques. **Chromatography Research International**, v. 2012, 2012.

VALADARES FILHO, S.C.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JÚNIOR, V.R. Tabelas Brasileiras de composição de alimentos para ruminantes. 2. ed. Viçosa – MG, 2006.

VAN SOEST, Peter J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Cornell university press, 2018.

VAZ, J. A., BARROS, L., MARTINS, A., MORAIS, J. S., VASCONCELOS, M. H., FERREIRA, I. C. Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 343-346, 2011.

WASSER, SOLOMON. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. **Biomedical journal**, v. 37, n. 6, 2014.

WANG, J., CAO, F., SU, E., ZHAO, L., & QIN, W. Improvement of Animal Feed Additives of Ginkgo Leaves through Solid-state Fermentation using *Aspergillus niger*. **International journal of biological sciences**, v. 14, n. 7, p. 736, 2018.

ZHANG, W., WU, S., CAI, L., LIU, X., WU, H., XIN, F., JIANG, M. Improved Treatment and Utilization of Rice Straw by *Coprinopsis cinerea*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, n. 2, p. 616-629, 2018.

## CAPITULO 2

### CULTIVO DE *Fistulina hepatica* CC102 COMO AGENTE DEGRADADOR DE GOSSIPOL EM TORTA DO CAROÇO DE ALGODÃO

#### RESUMO

*Fistulina hepática* é um cogumelo comestível com capacidade de degradação do gossipol, um composto tóxico, presente na torta de caroço de algodão. O gossipol é um fator antinutricional, o qual limita a utilização da torta de caroço de algodão na alimentação de animais não ruminante. Por isso, o cultivo de cogumelo é um potencial elo de ligação entre a produção de biodiesel, usando o óleo de algodão, e a produção de carne suína. Neste contexto, a biodestoxificação do gossipol seria resolvida ao se utilizar a torta de caroço de algodão como substrato para o cultivo de cogumelos, cujo subproduto, o substrato pós-cultivo destoxificado, poderia ser utilizado como ingrediente da ração animal. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial de utilização de *Fistulina hepatica* CC102 como agente de biodegradação do gossipol. Este fungo foi selecionado em experimento preliminar quando foram testados 35 fungos pertencentes a coleção de cogumelos comestíveis da Embrapa Agroenergia. O ensaio de seleção dos fungos foi conduzido em placas de Petri, em meio sólido contendo torta de caroço de algodão em diferentes proporções. Após este processo, os fungos com melhor crescimento foram avaliados quanto à degradação do gossipol, por meio de análises de HPLC e de atividade enzimática. Apenas 13 fungos foram considerados promissores em função do seu crescimento em meio à base da torta de caroço de algodão. Destes, apenas dois, *Fistulina hepática* CC102 e *Pleurotus ostreatus* CC389 mostraram-se eficientes na degradação do gossipol, além de apresentarem características bromatológicas dos substratos com alto valor proteico e fibra ideal para alimentação animal. *Fistulina hepatica* CC102 foi o fungo escolhido para produção do substrato em larga escala para ser usado na alimentação de suínos. Desta forma, testes com *Artemia salina* e roedores não apresentaram anomalias ou efeito quanto a toxicidade do gossipol livre. As enzimas de *Fistulina hepatica* CC102 quantificadas no presente estudo mostraram eficientes e podem ter participação na degradação do gossipol até o nível de 97% avaliada aos 15 e 20 dias de cultivo. Os resultados obtidos neste trabalho são satisfatórios ao que se refere a eficiência de *F. hepatica* CC102 na destoxificação de torta de caroço de algodão, abrindo assim possibilidades da integração de cadeias produtivas de biodiesel, fungicultura e a indústria de rações animais.

**Palavras chave:** *Fistulina hepatica*, gossipol, atividade enzimática, HPLC, biodegradação

## ABSTRACT

*Fistulin hepatic* is an edible mushroom with the ability to degrade gossypol, a toxic compound, present in cotton seed cake. Gossypol is an antinutritional factor, which limits the use of cotton seed cake in the feeding of non-ruminant animals. Therefore, mushroom cultivation is a potential link between biodiesel production, using cotton oil, and pork production. In this context, the biosorption of gossypol would be solved by using cotton seed cake as a substrate for the cultivation of mushrooms, whose by-product, the detoxified post-culture substrate, could be used as an ingredient in animal feed. Based on this, the objective of this work was to evaluate the potential of using *Fistulin hepatic* CC102 as gossypol biodegradation agent. This fungus was selected in a preliminary experiment when 35 fungi belonging to the collection of edible mushrooms of Embrapa Agroenergia. The fungi selection assay was conducted in Petri dishes, in solid medium containing cotton seed cake in different proportions. After this process, the best growing fungi were evaluated for gossypol degradation by means of HPLC analysis and enzymatic activity. Only 13 fungi were considered promising due to their growth in the base of the cotton seed cake. Of these, only two, *Fistulin hepatic* CC102 and *Pleurotus ostreatus* CC389 showed to be efficient in the degradation of gossypol, besides presenting bromatological characteristics of the substrates with high protein and fiber ideal for animal feed. *Fistulin hepatic* CC102 was the fungus chosen for large-scale substrate production to be used in pig feed. Thus, tests with *Artemia saline* and rodents showed no anomalies or effect on the toxicity of free gossypol. *Fistulin hepatic* enzymes CC102 quantified in the present study were efficient and may participate in the degradation of gossypol up to the 97% level evaluated at 15 and 20 days of culture. The results obtained in this work are satisfactory as regards the efficiency of *F. hepatic* CC102 in the detoxification of cotton seed cake, thus opening possibilities for the integration of productive chains of biodiesel, fungiculture and the animal feed industry.

**Key words:** *Fistulin hepatic*, gossypol, enzymatic activity, HPLC, biodegradation.

## 1. INTRODUÇÃO

O algodão é uma planta oleaginosa do gênero *Gossypium* L., da família *Malvaceae*, onde cerca de 40 espécies são arbustivas e nativas das regiões subtropicais e tropicais. Com o avanço tecnológico da agricultura, o aumento da produtividade do algodão no Brasil permitiu que o país migrasse da categoria de maior importador mundial para o terceiro maior exportador de algodão em 12 anos (MAPA, 2017). Considerando que o mercado interno do produto é também bastante elevado, a produção do algodão gera grandes volumes de caroço, o qual pode ser considerado um subproduto, uma vez que o mesmo pode ser utilizado para a produção de óleo comestível, na alimentação animal e mais recentemente, para a produção de biodiesel.

Para a extração do óleo, o caroço de algodão pode ser moído ou prensado, resultando no farelo de algodão ou na torta de algodão, respectivamente, os quais são muito utilizados na alimentação animal. O farelo distingue-se ainda da torta em função do processamento, sendo que, ao passo em que a torta é obtida apenas pela prensagem do material, o farelo é resultante de processos químicos e físicos para a extração do óleo (SANTOS et al., 2009).

A torta de caroço de algodão já é bastante utilizada na alimentação de animais ruminantes, graças ao seu elevado valor nutricional e baixo custo em função da grande oferta no mercado. Estudos apontam para uma inclusão da torta de algodão numa proporção de 20 a 30% na ração, contribuindo para um aumento da energia líquida ingerida e o extrato etéreo da dieta, resultando em maior produtividade e melhor qualidade organoléptica do leite (ROGERIO et al., 2013).

Entretanto, a inclusão da torta de caroço de algodão na produção de suínos ainda não foi possível, pois estes animais são mais sensíveis à presença do gossipol neste alimento. Portanto, a sua inclusão na alimentação de suínos só seria possível se procedimentos de pré-tratamento e destoxificação fossem realizados previamente (ANDRADE et al., 2014).

Dentre as diferentes possibilidades de destoxificação, o processo de biodestoxificação é uma das estratégias mais promissoras. Primeiro, porque a torta pode ser utilizada como substrato para a geração de outro produto, de origem microbiana e, ao final do processo, a torta transformada pelo microrganismo e agora destoxificada, torna-se em outro subproduto importante, que pode ser utilizado na alimentação de suínos. Neste contexto, o cultivo de cogumelos é uma atividade que se adequa perfeitamente a este propósito, uma vez que os fungos basidiomicetos apresentam um arsenal enzimático que os capacitam a degradar diferentes tipos de compostos fenólicos. Portanto, é possível encontrar espécies de cogumelos capazes de crescer em substrato à base de torta de caroço de algodão e que, não apenas sejam tolerantes,

mas que sejam capazes de degradar o gossipol, tornando o substrato de cultivo livre deste produto tóxico aos suínos.

No presente trabalho, diferentes espécies de fungos basidiomicetos foram avaliados quanto à sua capacidade de crescimento em meio de cultura à base de caroço ou torta de caroço de algodão. Os resultados mostraram que *Fistulina hepatica* possui grande potencial de utilização como agente biodestoxicador da torta de caroço de algodão. Em função disso, outros experimentos foram conduzidos com o objetivo de se caracterizar o isolado selecionado, bem como para otimizar o processo.

*Fistulina hepatica* é um cogumelo comestível, pertencente a ordem Agaricales e à família *Fistulinaceae*. O consumo deste cogumelo é observado em maior escala na França, seguido de alguns países europeus. São vendidos em mercados na maioria das vezes e podem ser consumidos crus em saladas ou cozidos ao molho com temperos. Possui coloração vermelha característica e se assemelha com um fígado (de onde deriva o nome da espécie) (SONG, 2015). Trata-se de um cogumelo rico em ácidos fenólicos, o que lhe confere propriedades antioxidantes superiores, quando comparado a outros alimentos, além de vitaminas do complexo B (VAZ et al., 2011; Palazzolo, 2012).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Origem e manutenção da coleção dos macrofungos

Todos os isolados testados neste trabalho estão depositados na coleção de Microrganismos Aplicados à Agroenergia e Biorrefinaria da Embrapa Agroenergia. Trinta e cinco isolados de macrofungos foram avaliados no presente trabalho e estão descritos na tabela 1. Os fungos foram mantidos por meio de repicagens contínuas em Batata-Dextrose-Agar (BDA). As placas colonizadas foram mantidas sob refrigeração a 8 °C, até nova repicagem.

Tabela 1 – Espécies de macrofungos e diferentes isolados, pertencentes à coleção de cogumelos comestíveis – Embrapa Agroenergia.

Nº total	Cód.	Nome científico	Viabilidade micelial em BDA
1	CC421	<i>Agaricus bitorquis</i>	Viável
2	CC414	<i>Agaricus subrufescens</i>	Viável
3	CC348	<i>Auricularia auricula-judae</i>	Viável
4	CC420	<i>Auricularia fuscosuccinea</i>	Viável
5	CC159	<i>Coprinus comatus</i>	Viável
6	CC425	<i>Coprinus comatus</i>	Viável
7	CC102	<i>Fistulina hepatica</i>	Viável
8	CC027	<i>Flammulina velutipes</i>	Viável
9	CC36	<i>Ganoderma lipsiense</i>	Viável
10	CC024	<i>Ganoderma lobatum</i>	Viável
11	CC351	<i>Ganoderma lucidum</i>	Viável
12	CC404	<i>Ganoderma lucidum</i>	Viável
13	CC029	<i>Hericium erinaceus</i>	Viável
14	CC418	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	Viável
15	CC390	<i>Lentinula edodes</i>	Viável
16	CC412	<i>Lentinus sajor-caju</i>	Viável
17	CC402	<i>Lepiota fusciceps</i>	Viável
18	CC037	<i>Oudemansiella canarii</i>	Viável
19	CC040	<i>Panus lecomtei</i>	Viável

20	CC088	<i>Pholiota aegerita</i>	Viável
21	CC089	<i>Pholiota nameko</i>	Viável
22	CC416	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Viável
23	CC380	<i>Pleurotus columbinus</i>	Viável
24	CC353	<i>Pleurotus eryngii</i>	Viável
25	CC111	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	Viável
26	CC335	<i>Pleurotus florida</i>	Viável
27	CC389	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Viável
28	CC403	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Viável
29	CC154	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Viável
30	CC400	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Viável
31	CC328	<i>Schizophyllum commune</i>	Viável
32	CC247	<i>Trametes spp.</i>	Viável
33	CC427	<i>Trametes spp.</i>	Viável
34	CC124	<i>Trametes versicolor</i>	Viável
35	CC094	<i>Volvariella volvacea</i>	Viável

Fonte: Embrapa Agroenergia

## 2.2 Obtenção e processamento de co-produtos do algodão: caroço de algodão íntegro e torta de caroço de algodão.

Como substratos para crescimento dos macrofungos foram utilizados dois diferentes co-produtos da indústria de produção de biodiesel que usam como matéria-prima o algodão, sendo o 1- caroço de algodão íntegro e 2- torta de caroço de algodão. Estes produtos foram fornecidos por instituições parceiras, cedidos durante o desenvolvimento do projeto intitulado FungiDetox (projeto este que subsidiou o presente trabalho). O caroço de algodão íntegro foi processado, utilizando triturador. Ambos os co-produtos foram armazenados em temperatura ambiente e em local destinado para o armazenamento de amostras nas dependências da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Agroenergia.

## 2.3 Meios de culturas: sólido à base de caroço de algodão 10% e semi-sólido à base de caroço de algodão 100%

Dois meios de cultivo foram utilizados para avaliação a capacidade de crescimento dos macrofungos testados. O primeiro foi o meio à base de torta de caroço de algodão a 10%. Para 1 L de meio foram utilizados 100g de torta de caroço de algodão e 15 g de ágar-ágar. O meio foi autoclavado a 121°C por 30 minutos. Esse meio de cultura foi denominado meio Ágar Torta de Caroço de Algodão (ATCA). Após o resfriamento, o meio foi vertido (20 mL) em placas de Petri (90 mm de diâmetro). O segundo meio foi, na verdade, um substrato à base exclusivamente da torta de caroço de algodão, com umidade ajustada para 60%, como num sistema de fermentação semi-sólida. Após o umedecimento da torta, o substrato foi acondicionado em potes de vidro de 250 mL, com abertura na tampa protegida com fita <sup>®</sup>Micropore de 25 mm). Os frascos foram autoclavados a 121°C por 30 minutos. Esse meio foi denominado meio Torta de Caroço de Algodão Triturado 100% (TCA 100%). Como controle, foi utilizado um terceiro meio, denominado CAT 100% (Caroço de Algodão Triturado-100%). Este meio foi preparado da mesma forma que o ATCA 100%. A única diferença entre ambos é que, para este, o substrato consistiu do caroço de algodão triturado, enquanto que, para o anterior, utilizou-se a torta.

#### **2.4 Inoculações dos macro-basidiomicetos nos meios ATCA e TCA**

Trinta e cinco macrofungos foram reativados em placas contendo meio BDA e incubados a 28°C durante sete dias. Discos miceliais dessas placas foram utilizados para inocular as placas de Petri contendo o meio ATCA 10%. A partir dos fungos crescidos nesse meio, treze ((Tabela 2) foram selecionados para a próxima etapa, que foi a colonização do substrato TCA 100% em frascos de vidro, inoculação nas mesmas condições os quais foram incubados a 28 °C durante 15 dias. A avaliação do crescimento micelial foi feita em mm/dia, por meio de medições com paquímetro, considerando-se 6 dias de crescimento para o meio CTA 10% e 15 dias para o substrato TCA 100%.

#### **2.5 Inoculações de macro-basidiomicetos para avaliação de degradação de gossipol**

Os ensaios para avaliação da degradação de gossipol livre (GL), foram conduzidos por meio do cultivo dos fungos nos mesmos substratos (TCA 100% e CAT 100%) no sistema de fermentação semi-sólida. A inoculação foi feita conforme descrito anteriormente, porém, utilizando-se apenas dez fungos (Tabela 2), variando-se o tempo de incubação de acordo com o substrato. Para o primeiro (TCA 100%), foram 15 dias, enquanto que, para o segundo (CAT 100%), foram 20 dias de incubação. Ao final do tempo de incubação todos os fungos

apresentavam 100% de colonização e, portanto, todos foram usados para as etapas de extração e detecção do GL, conforme descritos a seguir.

Tabela 2- Isolados de fungos utilizados durante as etapas dos experimentos

Macrofungos	ACTA <sup>1</sup>	Meio Pote TCA <sup>2</sup>	Meio Pote CAT <sup>3</sup>
1 - CC 139	X	X	X
2 - CC 440	X	X	X
3 - CC 351	X	X	X
4 - CC 353	X	X	X
5 - CC 403	X		
6 - CC 36	X	X	X
7 - CC 111	X	X	X
8 - CC 037	X	X	
9 - CC 412	X	X	X
10 - CC 159	X		
11 - CC 390	X		
12 - CC 335	X	X	
13 - CC 40	X	X	X
14 - CC 110	X	X	
15 - CC 102	X	X	X
16 - CC 028	X	X	X
17 - CC 416	X		
18 - CC 24	X		
19 - CC 27	X		
20 - CC 29	X		
21 - CC 116	X		
22 - CC 380	X		
23 - CC 414	X		
24 - CC89	X		
25 - CC124	X		
26 - CC154	X		
27 - CC247	X		
28 - CC328	X		
29 - CC348	X		
30 - CC418	X		
31 - CC420	X		
32 - CC421	X		
33 - CC425	X		
34 - CC 88	X		
35 - CC 94	X		

Legenda: Marcações refere-se aos macronfugos usados enquanto que em branco os que não foram usados/etapa. <sup>1</sup> Meio ATCA: meio de cultura sólido composto por Agar torta caroço de algodão; <sup>2</sup> Meio Pote CAT: meio de cultura composto por torta de caroço de algodão disposto em frascos de vidro. <sup>3</sup> Meio Pote TCA: meio de cultura composto por torta de caroço de algodão disposto em frascos de vidro. Fonte: Do autor.

## 2.6 Extração de gossipol livre e quantificação via RP-UHPLC-DAD

A extração foi realizada segundo a metodologia determinada pela AOCS (BA 8-78, 1997) para extração de gossipol livre com modificações realizadas por CONCEIÇÃO et al., (2018). Após os tempos de incubação, foram obtidas as biomassas tratadas, e essas foram desidratadas a 60 °C por 48 horas. Logo após, foram trituradas e homogeneizadas com o auxílio de moinho de bancada do tipo IKA. Amostras de 1 g foram transferidas para tubos do tipo Falcon de 15 mL. Após adicionar 10 mL de acetona 70%, as amostras foram sonificadas em banho de gelo por 5 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a 14000 rpm a 8°C por 5 minutos. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferida para microtubo e novamente centrifugada a 9000 rpm a 8 °C por 10 min. Cada uma das amostras assim processadas foram transferidas para *vials* e analisadas em UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography). A eluição foi feita em gradiente com solvente aquoso (TFA 0,1%) e orgânico (100 % metanol) em coluna C18 da marca Kinetex® (100 mm x 2.10 mm, 2.6 µm) a 35°C. O tempo de corrida foi de 14 minutos com fluxo de 0.4 mL/min. A amostra foi mantida a 8°C no equipamento, sendo injetada alíquota de 1µL. O detector usado foi o PDA (Photodiodearray) ajustado para aquisição em 254 nm. A concentração de gossipol foi determinada em µg/g. A porcentagem de degradação de gossipol foi obtida através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Gossipol inoculado} - \text{Gossipol remanescente}}{\text{Gossipol inoculado}} \times 100$$

## 2.7 Atividades enzimáticas

### 2.7.1 Obtenção do extrato bruto a partir do crescimento dos fungos em CAT e ATCA

Para obtenção do extrato bruto enzimático, pesou-se 10 g (úmido) dos substratos colonizados (torta ou caroço de algodão) e adicionou-se 50 mL de Polietilenoglicol 6000 0,01% (PEG 6000) em proporção de 1:5. A mistura foi homogeneizada em um homogeneizador do tipo ultraturax por 60 segundos e então centrifugada a 8000 rpm e 4 °C por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em funil de buchner com papel de filtro. O sobrenadante foi então denominado extrato bruto e foi utilizado nas determinações de atividades enzimáticas. Para evitar contaminação, ao extrato foi adicionado azida sódica 1%.

### 2.7.2 Açúcares Redutores – DNS

Para a determinação dos açúcares redutores liberados após reações enzimáticas, utilizou-se uma modificação do método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), originalmente proposto por Miller (1959). O método do DNS baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, concomitantemente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Após o aquecimento, a solução torna-se avermelhada, sendo lida em espectrofotômetro a 540 nm. O preparo da solução de DNS seguiu o método de Ghose (1987).

### 2.7.3 Atividades de holocelulases

A partir dos cultivos em estado semi-sólido nos substratos à base de caroço e torta de caroço de algodão, foram obtidos os extratos brutos. Os ensaios enzimáticos foram realizados em placas de PCR (96 poços) para endoglucanase, xilanase, pectinase e mananase, utilizando 20 µL extrato bruto e 20 µL de substrato (respectivamente: carboximetilcelulose, xilana, pectina cítrica, todos a 1%, e galactomana a 0,5%). A placa foi incubada em termociclador durante 30 minutos a 50°C. Transcorrido o tempo, foram adicionados 120 µL de DNS e as placas foram novamente incubadas no termociclador por 10 minutos a 50°C. Após o resfriamento, transferiu-se uma alíquota de 36 µL para placa de Elisa contendo 100 µL de água destilada para leitura do ensaio no espectrofotômetro a 540 nm. Para o ensaio de FPase (Filter Paper Hydrolases) foi utilizado como substrato o papel Whatman número 1 em forma de discos, 40 µL de tampão citrato de sódio e 20 µL da fonte enzimática, que foram incubadas por 1 h a 50°C. Os ensaios de FPase foram interrompidos e analisados como descrito anteriormente para outras holocelulases.

Para determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos foram construídas as curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as cadeias principais dos respectivos polissacarídeos. Para calibração foi utilizado uma solução estoque de 2 mg/mL para cada açúcar redutor (glicose, xilose, manose e ácido galacturônico). Variando a concentração do açúcar redutor com água destilada, totalizando sempre o volume de 150 µL, assim foram construídos 5 pontos para plotagem no gráfico de regressão linear. Do gráfico foi obtida a equação da reta que foi utilizada para quantificar o total de açúcar redutor após a adição de 300 µL de DNS, com fervura por 10 minutos e leitura a 540 nm.

### 2.7.4 Atividades $\beta$ Glicosidase

As enzimas  $\beta$ -glicosidases, também conhecidas por celobiasas, catalisam a hidrólise de celobiose ou oligossacarídeos com grau de polimerização até seis glicoses. O ensaio consistiu na exposição do substrato padrão, celobiose, ao extrato bruto, seguido de quantificação por método colorimétrico. Para isto, 100 $\mu$ L da solução de celobiose 15 mM foram misturados a 100 $\mu$ L do extrato bruto, sendo a reação incubada em termociclador a 50°C por 30 minutos. Após o resfriamento, foram transferidos 2,5  $\mu$ L para uma placa de Elisa com 250  $\mu$ L do reagente de glicose oxidase (Bioclin). A placa foi incubada por 10 minutos a 37°C e a absorvância determinada, então, em espectrofotômetro a 505 nm.

### 2.7.5 Atividades de proteases

A determinação das atividades de proteases foi realizada de acordo com o protocolo de Charney & Tomarelli (1946) com adaptações. Os ensaios para proteases presentes no extrato bruto ocorreram em tubos de centrífuga tipo Falcon de 15 mL. Exatos 500 $\mu$ L do extrato bruto foram adicionados 500  $\mu$ L de azocaseína 0,5%, e a reação foi, então, incubada em banho-maria a 37°C por 40 min. A reação foi interrompida com TCA 10% (ácido tricloroacético). No preparo do branco da amostra, para que não houvesse reação enzimática, o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Para o branco do aparelho, foi utilizada uma mistura de 500  $\mu$ L de azocaseína e 500  $\mu$ L de tampão acetato de sódio pH 5, sem a adição do extrato bruto. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm, por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos, então adicionou-se 1 mL de KOH 0,5 M.

A leitura em espectrofotômetro foi a 430 nm. Para o cálculo da atividade foi usada a fórmula conforme descrito a seguir:

$$X = \frac{Abs / 0,001}{T(min) \times V.enzima \times V.EC} \times \text{Volume total ensaio}$$

X = valor U/ml

Onde:

Abs = Absorvância ensaio - Absorvância branco

t = tempo em minutos no banho-maria;

V = volume

EC = ensaio colorimétrico

### 2.7.6 Lacases

A lacase é uma oxidase que catalisa reações de oxidação, na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando deste modo oxigênio (O<sub>2</sub>) como oxidante, o qual é reduzido a H<sub>2</sub>O. A atividade de lacase foi determinada utilizando 180 µL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5 e 180 µL de extrato bruto e 40µL do substrato 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). A oxidação do ABTS foi monitorada pela cinética em espectrofotômetro, leitura em 420 nm, durante 90 segundos a 25°C (Wolfenden & Wilson, 1982). O cálculo da atividade enzimática foi determinado de acordo com a fórmula:

$$\text{Concentração} = \frac{\Delta\text{Abs} \times T \times V \text{ total} \times 10^6}{\epsilon \times V \text{ amostra}} \text{ U.mL}^{-1}$$

Onde: ΔAbs = valor de absorbância

ε = Lacase: 36000 L.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>;

V= volume (mL) do sobrenadante

T = Tempo de reação (min).

### 2.7.5 Peroxidases totais

As peroxidases são heme-proteínas amplamente, distribuídas na natureza, que catalisam a oxidação do substrato na presença de peróxido de hidrogênio. A atividade de peroxidases totais foi determinada utilizando 140 µL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5, 180 µL do extrato bruto e 40 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2mM. Imediatamente antes da leitura em espectrofotômetro, adicionou-se 40 µL de solução ABTS 5 mM. A oxidação do ABTS foi monitorada pela cinética em espectrofotômetro, leitura em 420 nm, durante 90 segundos a 25°C. O cálculo da atividade enzimática foi determinado de acordo com a fórmula:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Absorbância} - \text{Abs lacase} \times t \times V \text{ total} \times 10^6}{\epsilon \times V \text{ amostra}} \text{ U.mL}^{-1}$$

Onde:

t = 90 segundos

10<sup>6</sup> = conversão de mol para µmol

$\epsilon$  ABTS = 36000 (coeficiente específico para a concentração de 1 mol.L<sup>-1</sup> em caminho óptico de 1 cm

### 2.7.6 Atividade de Lignina peroxidase (Lip)

A atividade de LiP foi determinada pela oxidação de álcool veratrílico na presença de peróxido de hidrogênio, segundo Tien & Kirk (1984). O meio reacional foi composto de 500 µL do extrato bruto centrifugado, 200 µL de álcool veratrílico (2 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M; pH 3,0) e 200 µL de peróxido de hidrogênio (2 mM). A formação de aldeído veratrílico foi acompanhada pela leitura da absorbância a 310 nm em espectrofotômetro V-Vis (Spectrum SP-2000 UV) por 5 minutos, com registros a cada 10 segundos.

$$\frac{UI}{L} = \frac{\Delta Abs}{\epsilon \times R \times t} \times 10^6$$

Onde:

$\Delta Abs$  = valor de absorbância

$\epsilon$  = LiP: 9300 L.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>;

R = volume (mL) do sobrenadante;

t = Tempo de reação (min).

### 2.7.7 Manganês peroxidases

A atividade de manganês peroxidases foi determinada pelo método proposto por Kuwahara et al., (1984). A mistura reacional consistiu de 0,1 mL de vermelho de fenol 1%; 0,05 mL de sulfato de manganês 2 mM; 0,02 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2mM; 0,1 mL de lactato de sódio 250 mM; 0,2 mL de albumina bovina; 0,5% de tampão succinato de sódio em pH 4,5 e 0,5 mL de extrato bruto. Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40 µL de NaOH 2M. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância (610 nm), de acordo com a fórmula:

$$\Delta Abs \times 10^6 = Enzima \frac{U}{L} \epsilon \times R \times T$$

Onde:

$\Delta\text{Abs}$  = valor de absorbância

$\epsilon$  = MnP: 460L.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>;

R = volume (mL) do sobrenadante;

T = Tempo de reação (min).

### 2.7.8 Atividade de lipase

A determinação da atividade dessa enzima foi realizada através do método titulométrico de acordo com protocolo de Diaz et al. (2006). O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis na reação de hidrólise. Para os ensaios enzimáticos foi feita uma emulsão com 2,5 mmol. L<sup>-1</sup> de tampão Tris-HCL pH 7,0; 150 mmol. L<sup>-1</sup> de NaCl; 2 mmol. L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, com adição de 3% de goma arábica. Para determinação de lipases usou-se como substrato óleo de oliva (66 mmol. L<sup>-1</sup>).

### 2.8 Cultivo de *F. hepatica* CC102

Para o preparo do inóculo, foram usados arroz em casca e farelo de trigo, na proporção de 10:1. O arroz em casca (6 kg) foi pré-cozido por aproximadamente 30 minutos e depois do resfriamento, foi misturado ao farelo de trigo. Frações da formulação (300 g) foram transferidas para sacos de polietileno com filtro e autoclavados por 30 minutos a 121°C. Após o resfriamento, o substrato foi inoculado em condições assépticas, usando o micélio advindo de meio BDA em placas de Petri de 5 cm de diâmetro. Para o cultivo do fungo, foi utilizado o substrato contendo 80 % da torta do caroço de algodão e 20% de bagaço de cana. O substrato foi acondicionado em frascos de vidro e autoclavados a 121°C por 90 minutos. Após o resfriamento, o substrato foi inoculado assepticamente, com o inóculo preparado conforme descrito anteriormente. Os frascos foram incubados a temperatura ambiente por, aproximadamente 20 dias, quando o substrato já estava completamente colonizado.

### 2.9 Análise bromatológica

O substrato colonizado por *F. hepatica* CC102, produzido conforme descrito anteriormente, foi retirado dos potes e desidratados a 105°C por 24-48 h em estufa de secagem para as análises bromatológicas, descritas a seguir.

### 2.9.1 Matéria seca

A determinação de matéria seca é feita por um método gravimétrico baseado na evaporação da água presente na amostra, sendo calculada pela diferença das pesagens entre o recipiente com a amostra úmida e o recipiente com a amostra seca a 105°C. Devido à grande variabilidade do teor de umidade nas diferentes biomassas, os resultados das análises composicionais são reportados com base na matéria seca, permitindo, com isso, a comparação entre diferentes amostras. O procedimento inicial, baseia-se em secar os cadinhos de porcelana em estufa a 105°C, durante 2 h; após o resfriamento em dessecador por 1 h (até temperatura ambiente), pesou-se em balança analítica (precisão de 0,0001 g) e registrou-se a massa inicial do cadinho (Cadinho inicial); em sequência, pesou-se 0,30000 g das amostras em balança analítica, novamente registrando a massa da amostra (Massa da amostra). Após, secou-se a amostra em estufa a 105°C até massa constante (“overnight”), retirou-se a amostra da estufa, deixando resfriar em dessecador por 1 h (até temperatura ambiente) e pesou-se em balança analítica registrando a massa do cadinho (cadinho MS) com o resíduo de matéria seca. O resultado foi obtido por meio da fórmula a seguir:

$$\% MS = \frac{\text{Cadinho MS} - \text{Cadinho MN}}{\text{Massa da amostra}} \times 100$$

Onde: MS = Matéria Seca

MN = Matéria Natural

### 2.9.2 Cinzas

As amostras foram calcinadas em forno tipo mufla para eliminar a matéria orgânica. O procedimento inicial baseia-se em secar os cadinhos de porcelana em estufa a 105°C, durante 2 h. Após o resfriamento em dessecador por 1 h (até temperatura ambiente) pesou-se em balança analítica (precisão de 0,0001 g) e registrou-se a massa inicial do cadinho. Em sequência, pesou-se 0,30000 g das amostras em balança analítica, novamente registrando a massa da amostra e queimou-se as amostras em mufla, elevando a temperatura de forma gradativa até chegar a 600°C por 240 minutos. Para finalizar, transferiu-se os cadinhos com o auxílio de um pinça tenaz, para o dessecador para resfriamento e pesou-se a massa do cadinho com o resíduo de cinzas (cadinho cinzas). O teor de cinzas (% c) foi calculado segundo a fórmula abaixo:

$$\% c = \frac{\text{cadinho cinzas} - \text{cadinho inicio}}{\text{Massa da amostra}} \times 100$$

### 2.9.3 Extrato Etéreo

A metodologia permite determinar o teor de gordura bruta por extração com solvente. Os compostos extraídos são predominantemente triglicerídeos, contudo, outros lipídeos juntamente com compostos menores com alguma solubilidade em éter de petróleo também são extraídos. A extração se dá pelo contato direto entre amostra e solvente sob pressão e em alta temperatura.

Para a análise, pesou-se 1g da amostra dentro de saquinhos (previamente pesados e identificados) próprios do equipamento (XT15, ANKOM Technology), selando-os e acomodando-os em estufa de secagem a 105°C por 3 horas. Após o resfriamento, pesou-se novamente todos os saquinhos para então depositá-los no extrator. A análise ocorreu por 60 minutos a 90°C. Ao final da extração, os saquinhos foram mantidos em estufa por 30 minutos para evaporação do solvente residual. Após isto, os sacos foram pesados novamente. O cálculo para determinação do teor de extrato etéreo segue abaixo:

$$\text{Teor de Extrato Etéreo}(\%) = \frac{(M_2 - M_3)}{M_1} \times 100$$

Onde:

M1 = Peso da amostra

M2 = Peso da amostra + saquinho após secagem.

M3 = Peso da amostra seca + saquinho após a extração.

### 2.9.4 Fibra em Detergente Neutro (FDN)

Por meio de uma digestão em detergente neutro, o conteúdo celular (compostos solúveis em detergente neutro) constituído, principalmente de proteínas, gorduras, carboidratos solúveis, pectina e outros constituintes solúveis em água, é separado da parede celular (compostos insolúveis em detergente neutro). Essa fração, insolúvel em detergente neutro (FDN), é constituída, basicamente, de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada. A análise baseou-se na pesagem das amostras (0,50g) em saquinhos próprios do equipamento, devidamente identificados. Após, cada saquinho foi submetido a 15 mL de solução de ureia 8

mol/L e 0,4 mL de enzima alfa-amilase termoestável e posteriormente armazenados no digestor de fibras, onde permaneceu por 75 minutos. Após, transferiu-se os saquinhos para béquer de vidro contendo acetona suficiente para cobrir os saquinhos. Depois de secos, levou-os à estufa a 105°C por 4 h. Após esse tempo, retirou-se da estufa e, após o resfriamento, as amostras foram pesadas, registrando-se a massa do saquinho com o resíduo de FDN. O teor de fibras em detergente neutro (% FDN) foi determinado segundo as fórmulas abaixo:

$$c_{Br} = \frac{Branco_{Final}}{Branco_{Inicial}}$$

$$\% FDN = \left( \frac{(Saquinho_{FDN} - (Saquinho_{inicial} \times c_{Br}))}{Massa_{amostra}} \right) \times 100$$

Os resultados foram expressos em base seca ( $x_{bs}$ ), tendo-se como base de correção a matéria seca a 105°C. Para isso, bastou multiplicar o resultado ( $x$ ) por 100 e dividir pela porcentagem de matéria seca (% MS), de acordo com a fórmula abaixo:

$$x_{bs} = \frac{x \times 100}{\% MS}$$

### 2.9.5 Determinação de Fibra em Detergente Ácido (FDA)

Método proposto por VAN SOEST (1965) propicia conhecer os constituintes menos solúveis da parede celular. Posteriormente, poderão ser determinados: celulose, lignina, nitrogênio insolúvel em detergente ácido (nitrogênio lignificado), cinzas insolúveis em ácido e sílica. O conteúdo celular, hemicelulose e a maior parte da proteína insolúvel são extraídos a quente, com solução de detergente ácido, restando, principalmente, a lignina insolúvel, a celulose, o nitrogênio lignificado e a sílica que constituem a fibra em detergente ácido (FDA) (NOGUEIRA, 2005). A análise baseia-se na pesagem das amostras (0,50g) em saquinhos próprios do equipamento, devidamente identificados. Posteriormente armazenou-se as amostras no digestor de fibras com 2 L de solução de detergente ácido, onde permaneceram por 60 minutos. Após, transferiu-se os saquinhos para béquer de vidro contendo acetona suficiente para cobrir os saquinhos. Depois de secos, levou-os à estufa a 105°C por 4 h. Após esse tempo, retirou-os da estufa, aguardou-se o esfriamento e pesou-se as amostras, registrando a massa do saquinho com o resíduo de FDA. O teor de fibras em detergente ácido (% FDA) foi determinado segundo as fórmulas abaixo:

$$c_{Br} = \frac{Branco_{Final}}{Branco_{Inicial}}$$

$$\% FDA = \left( \frac{(Saquinho_{FDA} - (Saquinho_{inicial} \times c_{Br}))}{Massa_{amostra}} \right) \times 100$$

Os resultados foram expressos em base seca ( $x_{bs}$ ), tendo-se como base de correção a matéria seca a 105°C. Para isso, bastou multiplicar o resultado ( $x$ ) por 100 e dividir pela porcentagem de matéria seca (% MS), de acordo com a fórmula genérica abaixo:

$$x_{bs} = \frac{x \times 100}{\% MS}$$

### 2.9.6 Proteína Bruta

A determinação do nitrogênio total proposta por Kjeldahl em 1883, fundamenta-se na decomposição da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico, em presença de sulfato de cobre como catalisador a, aproximadamente, 400°C. O nitrogênio, resultante da decomposição, se apresenta solubilizado, na solução ácida resultante, na forma de sulfato de amônio. Este, na presença de solução de hidróxido de sódio, libera gás amônia, que é destilado e condensado em solução de ácido bórico. O íon amônio é titulado com ácido sulfúrico de título conhecido, com isso, obtém-se o teor de nitrogênio total (AOAC, 1990). O teor de nitrogênio total (%N) foi determinado segundo a fórmula abaixo:

$$\% N = \left( \frac{(Volume_{amostra} - Volume_{branco}) \times M_{H_2SO_4} \times 0,028}{Massa_{amostra}} \right) \times 100$$

O teor de proteína bruta (%PB) é determinado segundo a fórmula abaixo:

$$\% PB = \% N \times 6,25$$

Os resultados foram expressos em base seca ( $x_{bs}$ ), tendo-se como base de correção a matéria seca a 105°C. Para isso, bastou multiplicar o resultado ( $x$ ) por 100 e dividir pela porcentagem de matéria seca (% MS), de acordo com a fórmula genérica abaixo:

$$x_{bs} = \frac{x \times 100}{\% MS}$$

### 2.10 Ensaio de *Artemia salina* para avaliação toxicológica dos substratos

Os TCA-CC102 e TCA-CC389 foram acrescidos em 5, 15 e 25% nas formulações da dieta para roedores machos e fêmeas. Foram analisados comportamentos físicos e psíquicos nos animais, além do perfil lipídico dos mesmos em relação a toxicidade ao gossipol. O microcústáceo *Artemia salina* foi utilizado no presente trabalho como bioindicador de

toxicidade. O ensaio foi realizado pela adaptação da metodologia de Meyer et al. (1982), utilizando-se uma solução com sal marinho na concentração de 30 g/L. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0 por meio da adição de solução 0,1 mol/L de NaOH. Para a eclosão, foram pesados 46 mg de ovos liofilizados de artemia e depositados em solução salina, por 48 horas, com aeração constante a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Após a eclosão dos ovos, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos de ensaio contendo solução salina e extratos oriundas da extração do gossipol livre a serem testadas, nas seguintes concentrações do extrato: 2000  $\mu\text{g/g}$ , 400  $\mu\text{g/g}$ , 200  $\mu\text{g/g}$ , 40  $\mu\text{g/g}$  e 4  $\mu\text{g/g}$ . O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 horas para determinar a DL50 (Dose letal mediana) que é a dose necessária do extrato capaz de matar 50% da população em teste.

## 2.11 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), e analisados estatisticamente pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA) e, sendo utilizado como pós-teste o método de Tukey, utilizando-se o software “GraphPadPrism® para sistema operacional Windows (64 bits)”, 2007, versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). As análises de quantificação dos analitos foram realizadas através do método de regressão linear (ZAR, 2010), utilizando-se o software “GraphPadPrism® para sistema operacional Windows (64 bits)”, 2007, versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ou “OriginPro® para sistema operacional Windows (64 bits)”, versão 9.1, 2013 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

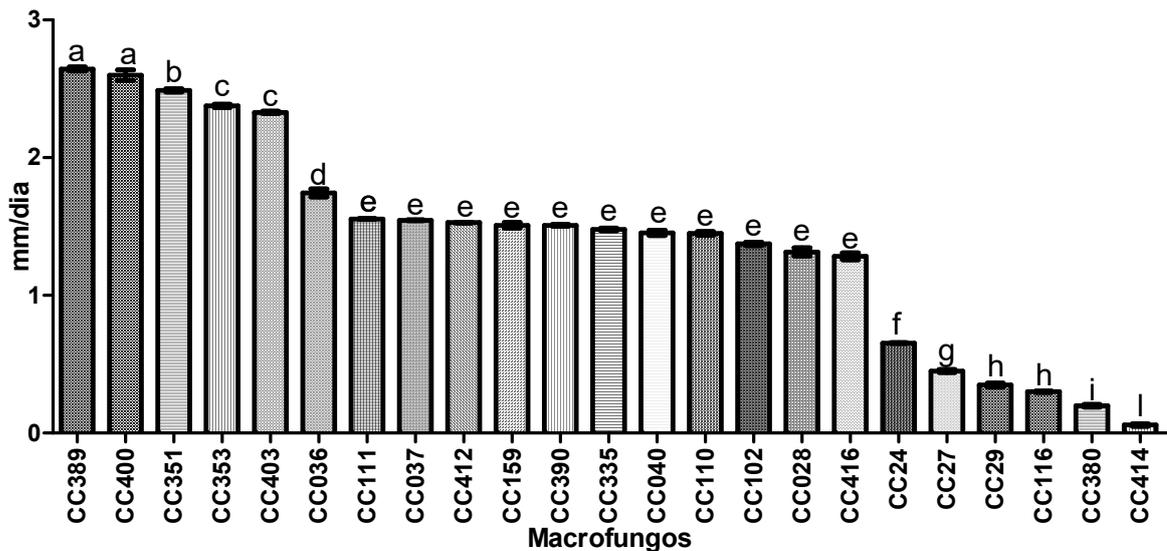


### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Seleção de basidiomicetos capazes de degradar o gossipol livre

Essa etapa foi subdividida em três fases distintas, porém dependentes. A primeira, baseia-se no processo de triagem (screening) de 35 macrofungos cultivados em meio ágar-torta-de-carço-de-algodão (ATCA). A formulação do meio de cultura baseou-se na hipótese de que os fungos são capazes de crescer em torta de caroço de algodão por possuir enzimas necessárias para degradação do componente tóxico presente nesse coproduto. Foi mensurado o crescimento do micélio em milímetro por dia (mm/dia), e estão expressos na figura abaixo.

Figura 1: Desenvolvimento micelial dos fungos em meio ágar-torta-de-carço-de-algodão

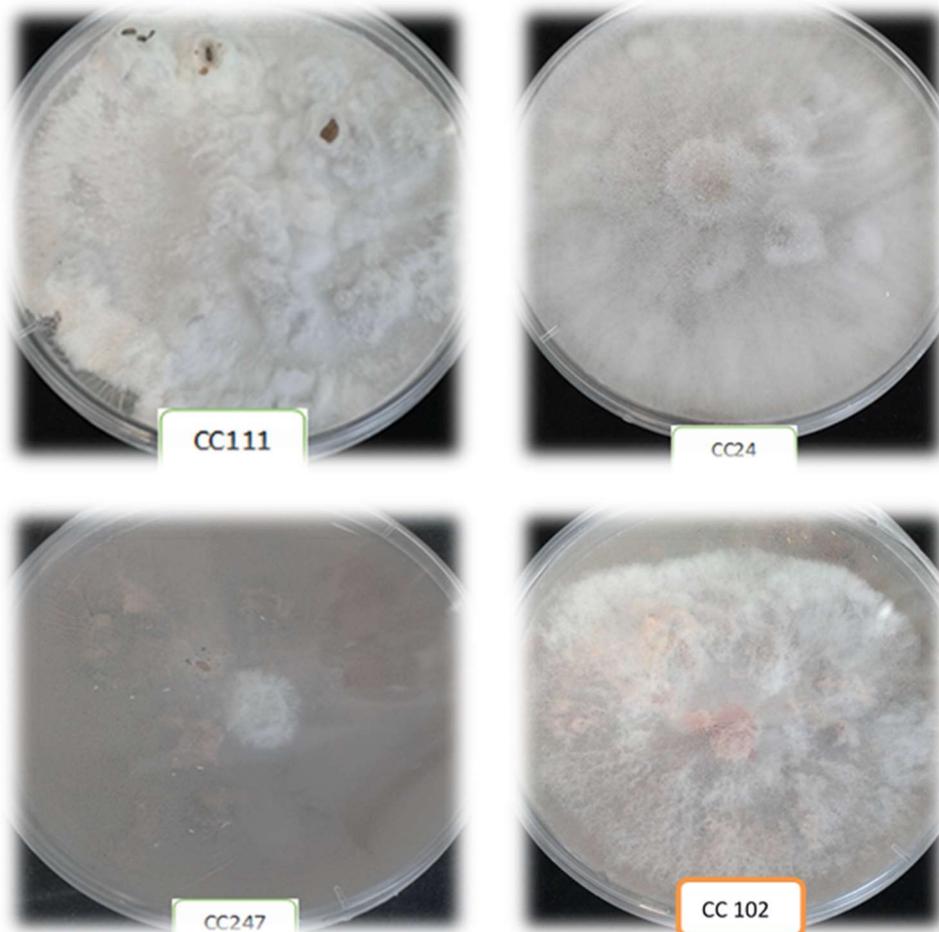


Fonte: Embrapa Agroenergia.

Os fungos se comportaram de diferentes maneiras quando submetidos ao meio ATCA na placa, alguns cresceram de forma vigorosa, com micélio cottonoso, denso e branco, outros permaneceram com colorações características das espécies e outros não se desenvolveram. Entre os 10 fungos com melhor crescimento em placa, 5 deles são do gênero *Pleurotus*, sendo o *P. ostreatus* o de maior crescimento. O segundo basidiomiceto com maior crescimento foi o *Picnoporus sanguineus*, seguido pelo *Ganoderma lucidum*. No entanto, 12 fungos não conseguiram se desenvolver no meio, provavelmente por não possuírem enzimas adequadas

para o metabolismo neste meio. Exemplos das diferenças entre o crescimento, assim como da disposição e cor do micélio pode ser observado na figura 2.

Figura 2 - Placa com meio de cultivo ATCA após 7 dias de inoculação dos fungos



Fonte: Embrapa Agroenergia.

A figura 2 evidencia as diferenças morfológicas das colônias, tendo sido elas expostas às mesmas condições de cultivo. Quanto mais lento o crescimento do microrganismo, maiores as chances de um organismo competidor se desenvolverem no substrato, podendo dominá-lo e suprimir o crescimento da cultura primária. Por essa razão é indispensável a determinação do tempo de crescimento do microrganismo de interesse junto aos meios de cultivo estabelecidos no bioprocessamento (GOMES, 2015).

Na segunda etapa, também como forma de triagem dos microrganismos capazes de se desenvolverem em condições adversas, os fungos com melhor colonização em meio ATCA, foram cultivados em substrato 100% torta de caroço de algodão, sem acréscimo de qualquer fonte nutricional. (Figura 3).

Figura 3: Cultivo em torta de caroço de algodão após 20 dias de inoculação dos fungos, evidenciando as diferenças no comportamental dos diferentes gêneros e espécies ao serem submetidos a um meio tóxico.

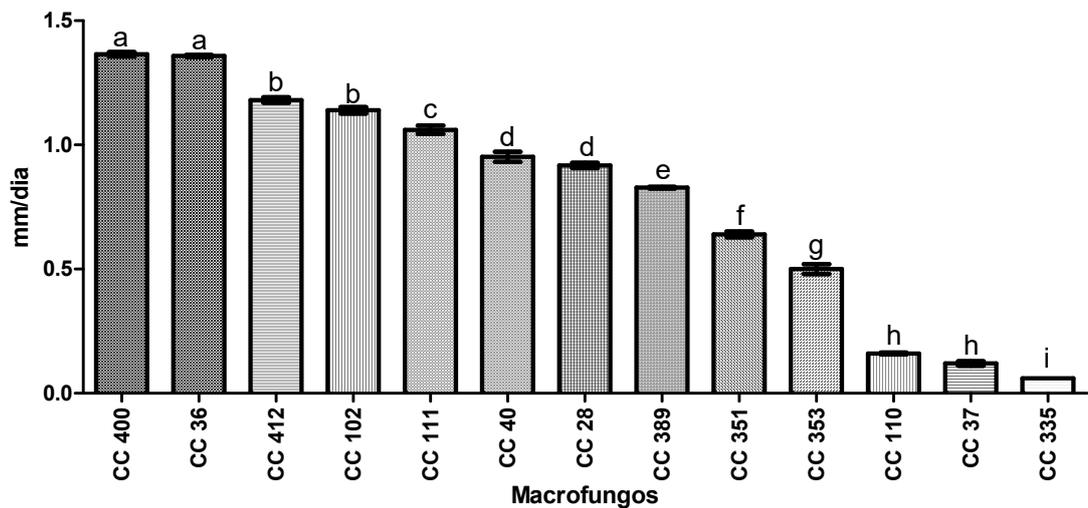


Fonte: Embrapa Agroenergia

Observou-se que, dos 35 fungos inicialmente testados, 23 cresceram nas placas com meio ATCA, enquanto que, destes, apenas 13 cresceram no substrato 100% torta de caroço de algodão. Provavelmente, os fungos que não cresceram neste substrato, não apresentam o arsenal enzimático necessário para a destoxificação da torta e/ou baixa capacidade de adaptação ao substrato, em função das características intrínsecas ao mesmo, como umidade, porosidade e alto teor de nitrogênio da torta (relação C/N). Cada espécie de fungo apresenta as suas particularidades em termos de exigências nutricionais e fatores físico-químicos, o que resulta em diferentes capacidades de utilização de materiais lignocelulolíticos para o seu metabolismo. Graças ao seu arsenal enzimático, várias espécies de fungos, em especial, basidiomicetos, são capazes de degradar substratos lignocelulósicos como palhas, bagaços e serragens, os quais

tornam-se fontes de nutrientes necessários para o seu crescimento (AGUIAR, 2016). Um dos fatores mais importantes para o crescimento desses fungos é a relação C/N, a qual varia de acordo com gênero a ser cultivado. Geralmente a relação C/N ideal para o aporte nutricional dos fungos está entre 20 a 50:1, abaixo ou acima desse valor observa-se o não crescimento micelial ou crescimento lento deste (FIGUEIRÓ 2009). Entretanto, várias espécies de basidiomicetos crescem bem em substratos com relação C/N mais ampla, como é o caso de algumas espécies do gênero *Pleurotus*. Para essas espécies, é comum também que as mesmas apresentem dificuldade de colonização em substratos com relação C/N muito estreita, ou seja, teor muito elevado de nitrogênio pode resultar em inibição do crescimento fúngico (MANTOVANI et al., 2012).

Figura 4 - Crescimento micelial em cultivo em pote com torta de caroço de algodão após 20 dias de inoculação dos fungos.



Fonte: Embrapa Agroenergia.

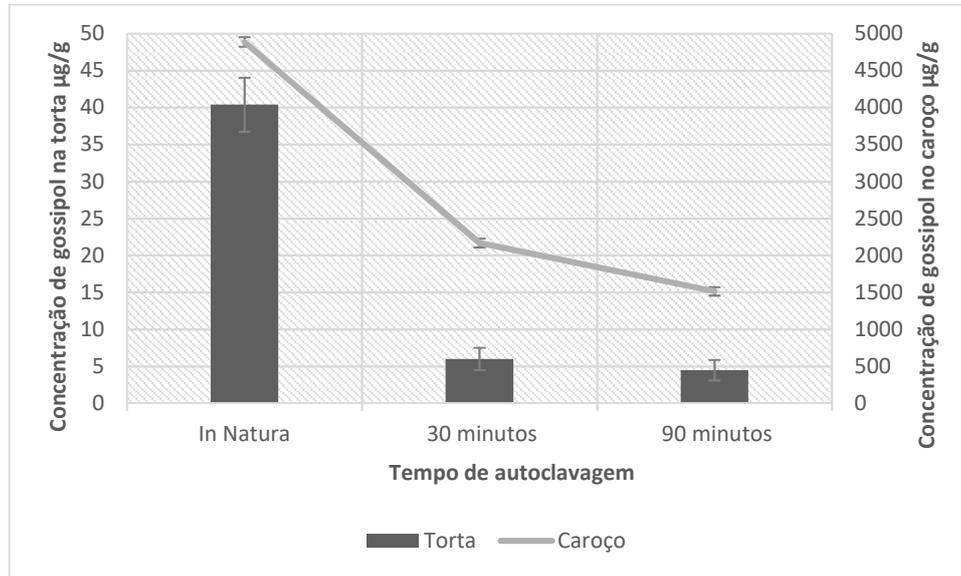
De acordo com os dados obtidos neste trabalho, das espécies do gênero *Pleurotus* destacaram-se na sua capacidade de crescimento na presença de alto nível de gossipol livre. Inicialmente foram testados 10 cepas do gênero em placas (*P. pulmonarius*-CC154, *P. ostreatus*-CC389 e CC403, *P. eringii*-CC353, *P. ferulae*-CC111, *P. sajor caju*-CC412, *P. florida*-CC335, *P. sapidus*-CC110, *P. citrinuspeliatus*-CC416 e *P. columbinus*\_CC380). Dentre eles, apenas *P. pulmonarius* não cresceu no teste em placas e, no experimento seguinte, apenas *P. citrinuspeliatus*, *P. ostreatus* CC403 e *P. columbinus*, não cresceram no substrato torta de caroço de algodão. É digno de nota a observação de que, dentro da mesma espécie (*P. ostreatus*), dois isolados (CC389 e CC400) tenham apresentado comportamentos distintos acerca da capacidade de crescimento na presença de maior concentração do gossipol.

O gênero *Pleurotus* dispõe de cerca de 70 espécies descritas, distribuídas nas mais variadas regiões, de acordo com a espécie, como, por exemplo *P. pulmonarius* (regiões tropicais e subtropicais), *P. eryngii* (Europa, África e grande parte da Ásia) e *P. ostreatus* (regiões temperadas). Portanto, origens distintas podem conferir diferenças também na capacidade de crescimento desses fungos, em função da espécie, uma vez que ambientes distintos podem ter proporcionado pressões seletivas diferentes. Entretanto, para isolados de uma mesma espécie, outros fatores devem estar envolvidos na expressão gênica diferenciada para as mesmas condições de cultivo. Por isso, será importante estudar com mais detalhes esses dois isolados quanto à sua capacidade de crescimento no substrato à base de torta de caroço de algodão e da sua capacidade de destoxificação desse substrato. Uma análise transcriptômica desses dois isolados poderia ser muito interessante para entender quais genes e respectivas enzimas estão envolvidos no processo.

Outros gêneros fúngicos também se destacaram tanto no crescimento em placa (ATCA) como no TCA. *Picnosporus sanguineus* (CC400) e *Fistulina hepatica* (CC102) apresentaram crescimento maior de 1.5 mm/dia em placas e menor em 1mm/dia em TCA, respectivamente. Fungos como *Coprinus comatus* (CC159), *Lentinula edodes* (CC390), *Ganoderma lobatum* (CC24), *Flammulina velutipes* (CC27), *Hericiium erinaceus* (CC29), *Gloeophyllum trabeum* (CC116) e *Agaricus subrufescens* (CC414) apresentaram crescimento em placa, contudo, não colonizaram o substrato. Consequentemente, apenas os tratamentos nos quais os fungos colonizaram completamente o substrato, foram utilizados para os ensaios de extração do gossipol livre.

### **3.2 Extração e determinação dos agentes destoxificadores do gossipol livre**

Figura 5- Concentração de gossipol livre na torta do caroço de algodão, ambos submetidos a tratamento com calor úmido.



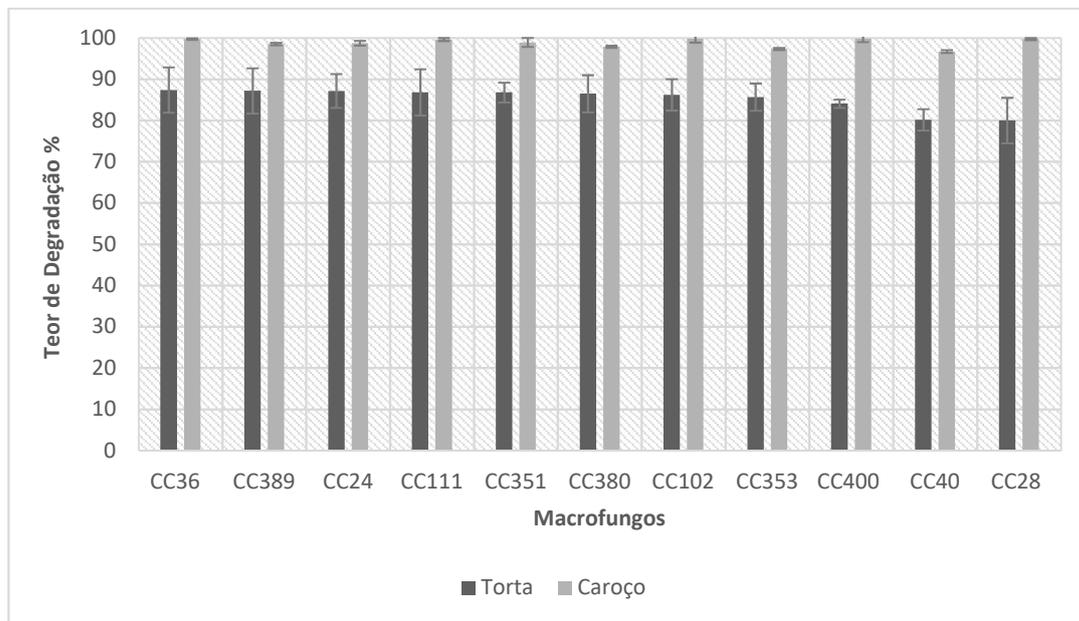
Fonte: Do autor.

O teor de gossipol livre na torta do caroço de algodão foi menor em comparação ao caroço de algodão após o tratamento térmico. Sabe-se que a temperatura é capaz de reduzir significativamente os índices de gossipol livre na torta e caroço de algodão. Em função disso, foram feitas as análises dos substratos 30 e 90 minutos de autoclavagem, comparados ao controle (substrato *in natura*), de forma a se permitir a real avaliação da ação destoxicadora dos fungos nos substratos colonizados. Para o tratamento de 30 minutos de autoclavagem, observou-se uma redução expressiva do teor de gossipol, passando de 40,395 para 6,005 µg/g na torta do caroço de algodão. Entretanto, o aumento do tempo de exposição ao calor não resultou mais em redução significativa do gossipol, uma vez que, após 90 minutos de autoclavagem, observou-se um teor de gossipol de 4,490 µg/g do substrato, ou seja, uma redução de apenas 1 µg, aproximadamente, em relação ao tratamento de 30 minutos.

Com respeito ao caroço de algodão, o teor de gossipol no material *in natura* foi de 54887,255 µg/g, valor muito mais alto do que aquele observado para a torta. Esse resultado já era esperado, uma vez que já se sabe que o processamento para extração do óleo resulta na diminuição do teor de gossipol no subproduto gerado, que é a torta de caroço de algodão. Por outro lado, observou-se também que a redução do teor de gossipol após a autoclavagem foi muito menor do que aquele observado na torta, nas mesmas condições de autoclavagem. Para o caroço de algodão, a redução foi de 4887,255 para 2168,420 µg/g de caroço, para 30 minutos de autoclavagem, e para, aproximadamente, 1514,960 µg de gossipol livre, para 90 minutos de autoclavagem. Outros estudos estimam que a concentração de gossipol em insumos da indústria

do algodão estão entre 0,47-7% do peso seco do caroço e entre 0,44 e 1,77% na torta (ROMERO, 2013). Portanto, ainda que o tratamento térmico apresente efeito redutor expressivo sobre o gossipol, para o caroço de algodão in natura, a redução não é tão significativa, somado ao fato de que o teor inicial é também muito mais elevado. Além disso, Chai e Sun (2016) relataram um fator negativo da utilização da temperatura como fator físico de eliminação. Segundo os autores, o tratamento térmico pode resultar também na formação de complexos entre proteínas e o gossipol livre, os quais seriam indigestíveis. Conseqüentemente, essa tecnologia torna-se inviável ou limitada este propósito, principalmente para animais não ruminantes, os quais são sensíveis a este fator antinutricional na dieta.

Figura 6 - Teor de degradação da torta e do caroço de algodão por ação de macrofungos.



Fonte: Embrapa Agroenergia

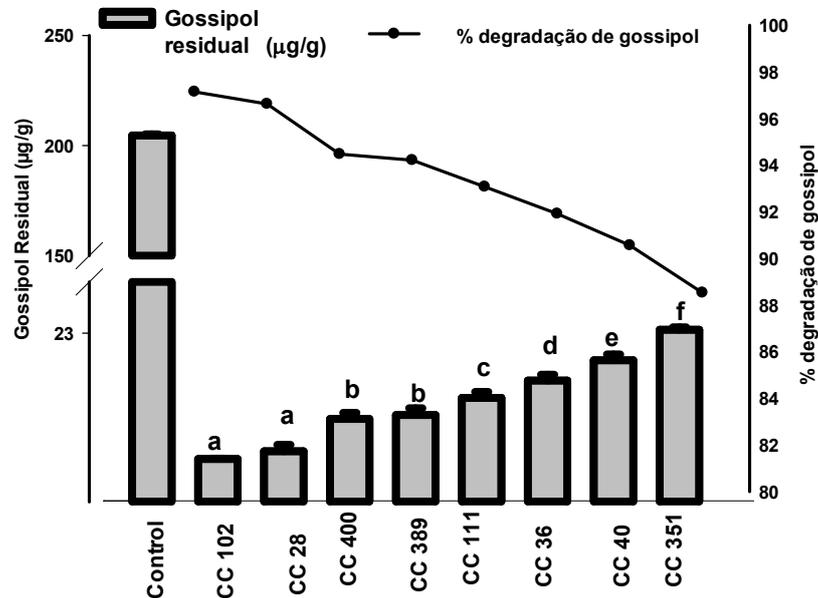
Os resultados mostraram altos níveis de degradação de 11 fungos dentre os 13 testados. Apenas o *P. sapidus*-CC110, *P. sajor caju* CC-412 e *O. canari*-CC37 não foram capazes de diminuir efetivamente o gossipol presente na torta e no caroço de algodão, com degradação menor que 70% (não representados no gráfico). Os demais fungos degradaram significativamente o gossipol livre (valores médios de 85,22% de degradação).

Os maiores índices de degradação foram observados no cultivo em caroço de algodão em comparação a aquele observado no cultivo em torta de caroço de algodão. Provavelmente, isso ocorreu em função da grande diferença de teor inicial de gossipol nos dois tipos de substratos, seguido pela baixa sensibilidade do método de detecção utilizado, o qual é conhecido por ser pouco eficiente na detecção de concentrações mínimas de gossipol. Contudo,

observou-se que algumas espécies de fungos destacaram-se na capacidade de degradação do gossipol, tais como os isolados CC36, CC111 e CC102, com uma degradação de 99,70%, 99,60% e 99,80% respectivamente no caroço de algodão e 87,37%, 86,80% e 86,18% respectivamente para a torta. Em razão da menor concentração de gossipol livre na torta, os ensaios que visavam a quantificação deste neste material, foram feitos com o caroço de algodão apenas triturado, para dessa forma garantir a eficiência do fungo em degradar a maior quantidade possível de gossipol. Um novo ensaio de quantificação do gossipol foi conduzido, utilizando os 8 isolados fúngicos de melhor resultado nos ensaios anteriores. Como substrato, foi utilizado caroço de algodão 100% (CAT), considerando que este substrato apenas elevado teor inicial de gossipol, ao passo que a torta apresenta um teor muito menor, em função do processamento da mesma. Esta escolha foi importante para avaliar a efetiva capacidade de destoxificação que esses fungos possuem, partindo de um substrato com elevado teor desse composto tóxico.

Os resultados descritos na figura 7 demonstram que *Fistulina hepatica* CC102 foi o melhor agente destoxicador do gossipol livre, com, aproximadamente, 97% de degradação e 17.052 µg como residual. Araújo (2018), concluiu que *Pleurotus ostreatus* apresentou eficiência de 99,96% sobre a degradação do gossipol livre em torta de caroço de algodão. Em estudo semelhante, Rajarathnam et al. (2001) relataram que *P. florida* foi também capaz de degradar 100% do gossipol também em torta do caroço de algodão, demonstrando a potencialidade de utilização deste gênero para este propósito.

Figura 7- Degradação de gossipol livre (GL) por estirpes de macrofungos ao final de quinze dias de cultivo por fermentação estado sólido contendo apenas caroço de algodão como fonte de substrato (CAT-100%)

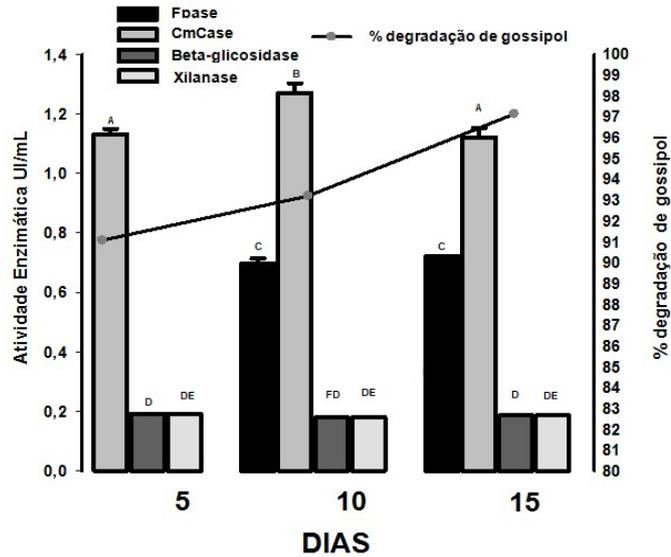


Legenda: CC102: *Fistulina hepatica*, CC28: *Schizophyllum commune*, CC400 *Pycnoporus sanguineus*, CC389: *Pleurotus ostearus*, CC111: *Pleurotus eryngii* var. *Ferulae*, CC36 *Ganoderma lipsiense*, CC40: *Panus lecomtei*, CC351: *Ganoderma lucidum*. Fonte: Embrapa Agroenergia.

### 3.3 Curva de degradação de gossipol livre versus enzimas do macrofungo *Fistulina hepatica* CC102.

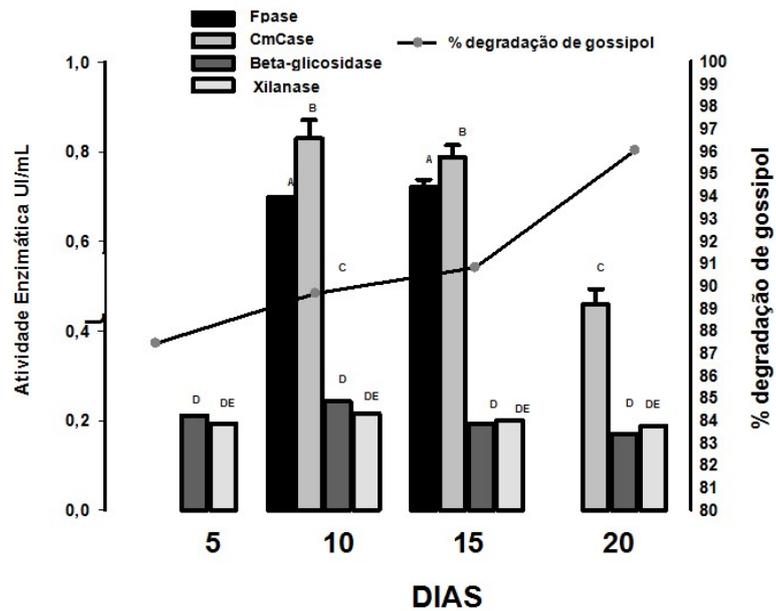
*F. hepatica* CC102 foi selecionado para os experimentos subsequentes após avaliação dos resultados descritos anteriormente (Figura 7). O fungo foi novamente cultivado em substrato CAT-100 durante 15 dias e em torta de caroço de algodão por 20 dias. A avaliação da degradação de gossipol livre e a determinação das atividades enzimáticas foram feitas ao longo de todo o período de cultivo, com amostragem a cada 5 dias (três réplicas biológicas por tempo de amostragem).

Figura 8- Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividade enzimáticas de celulases FPase, CMCase, Beta-glicosidase e Xilanases obtidos no cultivo de *CC 102* quando cultivado em caroço de algodão 100% durante 15 dias.



Fonte: Embrapa Agroenergia.

Figura 9- Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividades enzimáticas de celulases (FPase, CMCase, Beta-glicosidase) e Xilanases obtidos no cultivo de *CC 102* quando cultivado em torta de caroço de algodão 100% durante 20 dias.



Fonte: Embrapa Agroenergia.

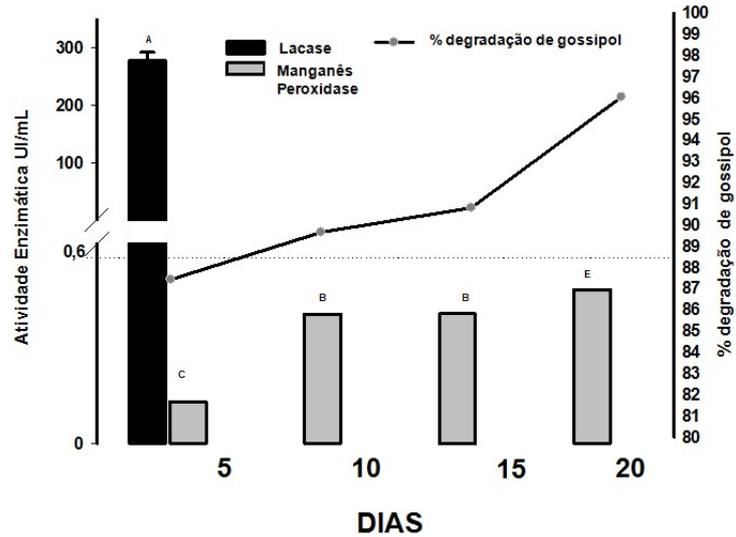
As atividades de xilanase e  $\beta$ -glicosidase mantiveram-se de forma quase invariável em torno de 0,2 U/ml durante todo o período de cultivo, caroço de algodão e com pequena variação em torta, mas também em torno de 0,2 U/ml (Figuras 8 e 9). Esses valores parecem indicar uma atividade basal para essas enzimas nessas condições de cultivo de *F. hepatica*. Os maiores valores de atividade enzimática foram observados para CMCase e Fpase nos dois substratos testados, assim como as maiores variações em função do tempo e do substrato. Para CMCase, a atividade foi bastante uniforme durante o cultivo em caroço de algodão, variando de 0,402 a 0,804 U/ml. Entretanto, no cultivo em torta, não se observou atividade de CMCase aos 5 dias de cultivo. Aos 10 dias de cultivo, observou-se atividade de CMCase de 0,804 U/ml, caindo para 0,79 e 0,43/ml, aos 15 e 20 dias, respectivamente. Para FPase, não se observou atividade aos 5 dias de cultivo em nenhum dos dois substratos testados. No substrato caroço de algodão, a atividade de FPase foi 0,75 U/ml e 0,77 U/ml aos 10 e 15 dias respectivamente.

Com respeito à degradação do gossipol por *Fistulina hepatica*, observou-se o aumento da degradação em até, aproximadamente, 97% para o cultivo em caroço de algodão aos 15 dias de cultivo e 96% para a torta aos 20 dias de cultivo (Figuras 8 e 9). Portanto, observa-se que, mesmo com um tempo de cultivo maior, a taxa de degradação do gossipol na torta foi ainda ligeiramente inferior àquela observada no caroço de algodão. A queda na atividade de CMCase, bem como o desaparecimento da atividade de FPase, não parecem ter afetado o processo de degradação do gossipol na torta (Figura 9).

As Cmcase (endoglucanases) são enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose, liberando os outros carboidratos constituintes da parede celular para que outras enzimas possam atuar. Dessa forma, as ligações glicosídicas são quebradas nas regiões amorfas da celulose, abrindo espaço para as FPases atuarem como potentes celulases do processo, clivando principalmente regiões cristalinas e amorfas da parede celular (DU et al, 2009).

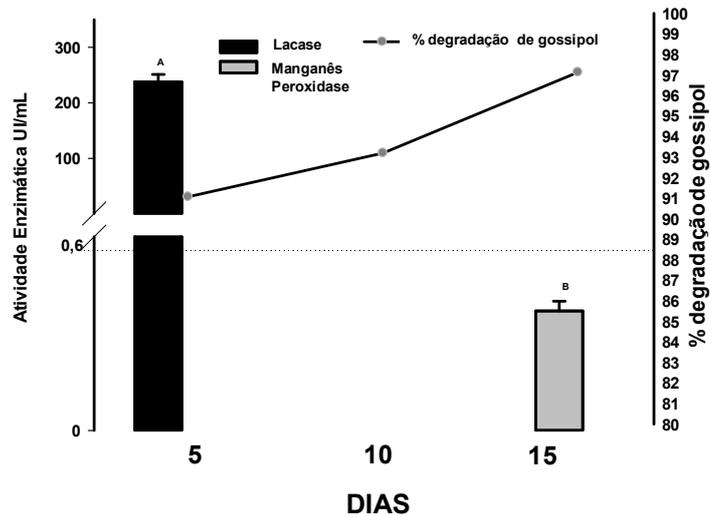
A beta-glicosidade atua principalmente nas celobioses que foram liberadas após este processo feito pelas celulases e endoglucanases (ZHANG & LYND, 2006). No entanto, a  $\beta$ -glicosidase não atua diretamente na celulose, mas é considerada como componente do sistema celulase mesmo que em menor quantidade, por causa do estímulo à hidrólise de celulose (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000). A xilanase também se comporta de maneira similar, atuando em produtos previamente hidrolisados da cadeia principal, a xilana presente na hemicelulose (MEYER et al., 2009). Estudos mostram que a presença de grande quantidade de glicose presente após os processos de deslignificação, pode inibir parte da atividade de algumas enzimas específicas, como as beta-glicosidades (SINGHANIA et al., 2013).

Figura 10- Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividades enzimáticas de ligninases (Lacase - LAC e Manganês peroxidase - MnP) obtidos no cultivo de *CC 102* quando cultivado Torta de caroço de algodão 100% durante 20 dias.



Fonte: Embrapa Agroenergia.

Figura 11- Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividades enzimáticas de ligninases (Lacase - LAC e Manganês peroxidase - MnP) obtidos no cultivo de *CC 102* quando cultivado C de caroço de algodão 100% durante 15 dias



Fonte: Embrapa Agroenergia.

A atividade de lacase destacou-se em relação à manganês peroxidase, com uma atividade superior de mais de 200 U/ml no cultivo em torta como no caroço de algodão (Figuras 10 e 11). Além disso, a lacase destacou-se também por apresentar um pico único aos 5 dias de

cultivo. Segundo SOUZA et al. (2006), *P. pulmonarius* pode apresentar atividades similares de lacase e manganês peroxidase, ao contrário do que foi observado neste trabalho para *F. hepatica*. Para manganês peroxidase, o comportamento foi bastante distinto entre os dois substratos. A atividade desta enzima foi observada desde os 5 dias de cultivo em torta de caroço de algodão, a qual cresceu nas etapas subsequentes, atingindo o pico máximo aos 20 dias de cultivo (Figura 10). Entretanto, no cultivo em caroço de algodão, não observou atividade desta enzima os 5 e 10 dias, mas somente após os 15 dias de cultivo (Figura 11). Portanto, para este substrato, observou-se atividade enzimática apenas de lacase no início do processo (5 dias) e apenas de manganês peroxidase no fim do processo (15 dias). Esses resultados demonstram uma grande diferença entre os substratos torta e caroço de algodão, indicando que outras enzimas, inclusive aquelas envolvidas no processo de degradação do gossipol podem também ser afetadas. A atividade de lacase foi observada por Ardon et al (1996) em apenas 4 dias de cultivo de *Pleurotus ostreatus* em resíduo do caroço de algodão. Alexandrino e colaboradores, testando casca de laranja para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* encontraram valores de 76,6 U/ml e 6,8 U/ml da atividade de lacase e manganês peroxidase respectivamente. No presente estudo a atividade do manganês peroxidase também se apresentou menor, comparada a lacase.

Comparando o tempo de cultivo de *Fistulina hepatica* nesses dois substratos, observou-se que, em 15 dias do processo, a degradação do gossipol livre foi 1% maior (97%) em comparação a 20 dias de cultivo (96%), em caroço e torta de caroço de algodão, respectivamente. A diferença de 1% parece, a princípio, pouco expressiva, entretanto, é importante enfatizar que o teor de gossipol no caroço é muito maior quando comparado ao teor presente na torta, conforme discutido anteriormente. Assim como observado para as celulasas, não se observou uma relação entre as atividades de lacase/manganês peroxidase e a taxa de degradação do gossipol. Em outras palavras, pode-se dizer que a taxa de degradação do gossipol não foi influenciada pela atividade dessas enzimas, seja positivamente ou negativamente. Isso fica evidente quando se observa que mesmo não havendo mais detecção de lacase nas etapas subsequentes aos 5 dias de cultivo, a degradação do gossipol continua acontecendo (Figuras 10 e 11). De forma semelhante, observa-se também que, mesmo não se observando a atividade de manganês peroxidase nas etapas iniciais (5 e 10 dias) do cultivo em caroço de algodão, a degradação do gossipol segue, sem sinais de perturbação (Figura 11).

Diversos trabalhos mostram a grande capacidade lignocelulolítica que essas enzimas possuem, degradando compostos como ésteres e fenóis. A degradação dos ésteres de forbol depende de enzimas como as esterases, que hidrolisam ésteres de cadeia curta (PHENGNUAM e SUNTORNSUK, 2013). Diterpeno e seus derivados são hidrolisados pelas proteases (JOSHI

et al., 2011) e as enzimas responsáveis pela despolimerização da lignina (ligninases), principalmente por lacases e manganês peroxidase (KASUYA et al., 2013). A diferença da degradação do gossipol aos 20 dias em comparação aos 15 dias de cultivo, pode ser deduzida pelo decréscimo das atividades enzimáticas que, em alguns trabalhos mostram que ao passar dos dias há uma diminuição da aeração do substrato pelo crescimento micelial e isto dificulta a máxima atividade enzimática (Rossi, 2001). Ainda não se sabe se a degradação do gossipol livre se dá pela eficiência das enzimas citadas, sendo necessário, portanto, um estudo mais aprofundado que identifique de fato a correlação destas ou de outros processos responsáveis pelo desaparecimento da quase totalidade do gossipol livre.

### 3.4 Ensaio toxicológicos

De modo geral, os resultados da avaliação da biomassa pré tratada por *Fistulina hepatica* quanto a toxicidade, em ensaios com *Artemia salina* e roedores, demonstram que não houve nenhuma anomalia ou efeito tóxico do gossipol livre. Os ensaios de toxicologia com os roedores, fazendo uso de TCA após o cultivo com *Fistulina hepatica* CC102 e *Pleurotus ostreatus* CC389 na dieta dos animais (machos e fêmeas), não apresentaram diferenças significativas quanto ao controle. De modo geral, observou-se que a utilização de níveis crescentes de TCA-CC102 e TCA-CC389 proporcionou mudanças no perfil lipídico dos animais. Estes resultados sugerem que a inserção da torta destoxificada pelos fungos promoveu um aumento na qualidade nutricional da ração na maior dose testada que foi de 25% da formulação da ração. Estes resultados já eram esperados uma vez que dados de literatura tem descrito as vantagens do uso de biomassas vegetais previamente “tratadas” por macrofungos, trazendo benefícios como enriquecimento com ácidos orgânicos e substâncias nutracêuticas, que podem refletir na melhoria da nutrição e sanidade animal. Deste modo, os fermentados de TCA-CC102 foram escalonados para realização dos ensaios de digestibilidade total e ileal de suínos na fase de terminação como continuação deste trabalho.

### 3.5 Análise bromatológica

Na tabela 3 estão representados os valores obtidos pela análise bromatológica da torta do caroço de algodão antes e depois do tratamento por *Fistulina hepatica* CC102. O valor de proteína bruta (16,81%) encontrado neste trabalho foi similar ao encontrado para outras espécies de basidiomicetos.

Tabela 3: Análise bromatológica do substrato à base de torta do caroço de algodão antes e após o pré-tratamento de *F. hepatica* CC102.

Análise	% no substrato antes do cultivo	% no substrato após o cultivo
Matéria Seca	91,51	94,77
Cinzas	4,04	5,43
FDN	66,02	60,12
FDA	50,25	47,70
Lignina	12,57	14,20
Proteína Bruta	16,53	16,81
Extrato Etéreo	3,70	1,28

Fonte: Do autor.

Os valores obtidos antes e após o pré-tratamento de *Fistulina hepatica* CC102 mostram a importância do macrofungo nas qualidades nutricionais na torta do caroço de algodão. Os valores de matéria seca antes e depois o cultivo aumentou de 91,5 % a 94,77% e cinzas de 4,04 a 5,43%. Já para FDN e FDA, esses valores diminuíram de 66,02% a 60,12% e 50,25% para 47,70% respectivamente. Já a lignina aumentou seu teor, de 12,57% para 14,20, ao contrário do extrato etéreo, que diminuiu de 3,70% para 1,28%. Já a proteína bruta teve pouco aumento no antes e após o tratamento fúngico (16,53% para 16,81%). Os valores que aumentaram após o cultivo de *Fistulina hepatica* CC102 pode ter sido proveniente do próprio micélio fúngico, bem como suas características enzimáticas de degradação. O baixo aumento da proteína bruta, pode ser explicado pelo fato da não frutificação do macrofungo *Fistulina hepatica* CC102 na torta do caroço de algodão, além da característica nutricional da espécie utilizada neste estudo. O teor de proteína bruta varia em função da espécie, da linhagem cultivada, do processamento após colheita, do estágio de desenvolvimento do basidioma, da parte do basidioma e do substrato (MINHONI et al., 2007)

Os fungos de podridão branca são os únicos organismos na natureza capazes de degradar compostos altamente lignificados. Isto explica o fato dos teores de FDN e FDA diminuírem após o processo de tratamento. Fungos de podridão branca são capazes de remover a lignina, disponibilizando-a e aumentando-a no meio, para ter acesso à celulose para sua nutrição e, assim obter uma degradação eficaz de conteúdo vegetal, diminuindo os teores totais das fibras presentes (KAFFENBERGER & SCHILLING, 2015).

Scariot et al. (2000) cultivaram *P. ostreatoroseus* e *P. ostreatus* em resíduos de algodão, encontrando teores de proteína bruta entre 15 a 20%. Araújo (2018), analisando a fração de proteína de *Pleurotus ostreatus* em torta do caroço de algodão e bagaço de cana, observou um teor de 16,75 %, que é, praticamente, o mesmo valor obtido neste trabalho.

Com respeito aos demais componentes, os valores de matéria seca, cinzas, FDN, FDA e de extrato etéreo foram também semelhantes aos encontrados por Araújo (2018), cujos valores foram de 97,75 % de matéria seca, 3,84% de cinzas, 64,83% de FDN, 45,30% de FDA e 1,58% de extrato etéreo. A composição destes componentes com os resultados encontrados por este mesmo autor, pode ser correspondente ao tipo de macrofungo de cultivo e as condições de produção, que interferem diretamente na degradação eficaz dos basidiomicetos. O teor de lignina deste trabalho, apresentou-se pouco menor do que os analisados por Fonseca et al. (2017), no qual encontraram para o mesmo processo, o teor de 15,58%. O conceito de FDN (Fibra em Detergente Neutro) está relacionado à fração em que se encontra a lignina, a hemicelulose e a celulose, já a FDA (Fibra em Detergente Ácido) é a fração que compõe a soma da lignina e a celulose. Portanto a análise que apresenta um maior FDA em relação ao FDN corresponde a amostras com um conteúdo lignocelulolítico maior e mais difícil de ser degradado (FONSECA et al., 2017).

Na avaliação de um resíduo ou subproduto que possa ser utilizado na alimentação de suínos, por exemplo, este deve conter principalmente teores de proteína e fibra bruta em quantidades suficientes, que não ultrapassem e nem faltem em relação à necessidade fisiológica dos animais. Em um estudo feito por Da Trindade (2009), níveis ideais de proteína na fase de crescimento e terminação de suínos está entre 14,90% e 17,80%. Portanto, o teor de proteína bruta encontrada na torta do caroço de algodão pré-tratada neste trabalho (16,81%), se encontra dentro da faixa de valores considerados ideais para ser utilizada como ingrediente da ração para suínos.

### **3.6 Obtenção do substrato pré-tratado por *Fistulina hepatica* CC102 para a alimentação animal**

No presente trabalho, não houve formação de corpos de frutificação (cogumelos) por *Fistulina hepatica* CC102. Em uma análise anterior observou-se que, devido às condições físicas restritas desse fungo, como temperatura mais baixa, os blocos inoculados para o cultivo não emitiram primórdios para formar corpos de frutificação. Toledo (2017) cultivando a variedade da *Fistulina hepatica*, denominada *Fistulina antarctica*, em ambiente fechado,

observou que a melhor temperatura de cultivo foi a de 20 a 25°C, o que corresponde às condições nativas deste fungo, por ser predominantemente silvestre de temperaturas amenas. Além disso, a formulação do substrato de cultivo pode afetar diretamente a produção de cogumelos. Silva et al. (2007) avaliaram substrato à base de capim coast-cross e bagaço de cana, enriquecidos com farelo de trigo e uréia, para o cultivo do cogumelo *P. sajor-caju*. Segundo os autores, teores de nitrogênio a partir de 1,75% apresentaram efeito negativo, inibindo a colonização do substrato pelo fungo. Neste trabalho, a colonização não foi afetada, apenas a produção de cogumelos. Entretanto, considerando que o teor de proteína bruta na torta é elevado, seria interessante avaliar novas formulações com maiores proporções de bagaço de cana em relação à torta, caso o objetivo seja a produção de cogumelos como estratégia de destoxificação deste subproduto. Para os objetivos deste trabalho, que é a destoxificação da torta e sua utilização na alimentação de suínos, foi preparado o substrato com 80% de torta do caroço de algodão e 20% bagaço de cana, o qual foi inoculado com *Fistulina hepatica* e incubado até a completa colonização. O material assim obtido foi denominado “Substrato pré-tratado por *Fistulina hepatica* CC102”. Ao final deste processo, o substrato assim obtido foi seco em estufa a 105°C e destinadas à alimentação de suínos na fase de terminação.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os 35 isolados fúngicos testados, 11 foram capazes de degradar o gossipol livre residual presente no substrato à base de torta do caroço de algodão. A eficiência de degradação variou de acordo com o fungo utilizado, mas pode ser melhorada por meio da otimização de parâmetros como o controle de fatores físicos do cultivo. O processo de autoclavagem da torta do caroço de algodão foi eficaz na redução do gossipol livre residual, mas este processo pode gerar complexos indigestíveis entre proteínas e o gossipol livre, impossibilitando seu uso como alimento alternativo. O macrofungo *Fistulina hepatica* CC102 obteve melhor eficiência na degradação do gossipol livre residual (96%), sendo utilizado como agente biodestoxificador, utilizado no projeto subsequente da digestibilidade ileal em suínos na fase de terminação.

Os resultados obtidos neste trabalho são satisfatórios ao que se refere a eficiência enzimática de *Fistulina hepatica* CC102, que pode ser um dos fatores de eliminação do gossipol livre. Além do mais, este estudo abre possibilidades da integração de cadeias produtivas de biodiesel (caroço de algodão), fungicultura (cogumelos comestíveis) e indústria de rações para suínos, visto que a torta do caroço de algodão tratada por este basidiomiceto, obteve valores nutricionais satisfatórios para a inclusão neste setor.

## 5. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AGUIAR, L. V. B. DE. **Cultivo e avaliação nutricional de *Pleurotus ostreatus* de ocorrência na Amazônia, em condições ambientais não controladas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2016.

Alexandrino, A. M., Garcia de FARIA, H., Giatti Marques de SOUZA, C., & Peralta, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, 2007.

ANDRADE, I. R. A. D., CÂNDIDO, M. J. D., POMPEU, R. C. F. F., GUIMARÃES, V. P., SILVA, L. V. D., & EVANGELISTA, M. E. S. Desempenho produtivo e econômico do confinamento de ovinos utilizando diferentes fontes proteicas na ração concentrada. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 3, p.717-730 2014.

ARAÚJO, A. P.F. **Tratamento da torta de semente de algodão por autoclavagem e macrofungos para degradação de gossipol**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2018.

ARDON, Orly; KEREM, Zohar; HADAR, Yitzhak. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. **Journal of Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 201-207, 1996.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS; ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (US). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Association of Official Analytical Chemists., 1997.

BONATTI, M., KARNOPP, P., SOARES, H. M., & FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food chemistry**, v. 88, n. 3, p. 425-428, 2004.

BRUGNARI, T., KATO, C. G., CORREA, V. G., DE FREITAS, E. N., NOLLI, M. M., & DE SOUZA, C. G. M. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DO COGUMELO COMESTÍVEL *Pleurotus ostreatus*. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, v. 25, n. 3, p. 46-50, 2018.

CAI, Y., ZHANG, H., ZENG, Y., MO, J., BAO, J., MIAO, C. & CHEN, F. CA. An optimized gossypol high-performance liquid chromatography assay and its application in evaluation of different gland genotypes of cotton. **Journal of biosciences**, v. 29, n. 1, p. 67-71, 2004.

CHAI, XIUHANG; BI, YANLAN; SUN, Shangde. Free fatty acids increase gossypol losses in soybean oil during heating. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 4, p. 584-591, 2016.

- COGORNI, P. F. B. O., SCHULZ, J. G., ALVES, E. P., GERN, R. M. M., FURLAN, S. A., & WISBECK, E. The production of *Pleurotus sajor-caju* in peach palm leaves (*Bactris gasipaes*) and evaluation of its use to enrich wheat flour. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 267-274, 2014.
- CONCEIÇÃO, A. A., NETO, C. B. S., DE AQUINO RIBEIRO, J. A., DE SIQUEIRA, F. G., MILLER, R. N. G., & MENDONÇA, S. Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. **PLoS one**, v. 13, n. 5, p. e0196164, 2018.
- DA TRINDADE NETO, M. A., BERTO, D. A., DE ALBUQUERQUE, R., SCHAMMASS, E. A., MIGUEL, W. C. Níveis de proteína em dietas de suínos em fase de crescimento e terminação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 474-483, 2009.
- DE CARVALHO, C. S. M., DE AGUIAR, L. V. B., SALES-CAMPOS, C., DE ALMEIDA MINHONI, M. T., & DE ANDRADE, M. C. N. Cultivo in vitro de *Pleurotus ostreatus* em resíduos de bananeira. **Ambiência**, v. 9.3. p.651-660, 2013.
- DIAZ, J. M., RODRÍGUEZ, J. A., ROUSSOS, S., CORDOVA, J., ABOUSALHAM, A., CARRIERE, F., & BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.
- DU, G., LIU, L., LI, J., FANG, J., & CHEN, J. FM-P27 Process modeling and optimization for enhanced hemicellulase production by *Aspergillus niger* using artificial neural network coupling quantum-behaved particle swarm optimization algorithm (Section VIII Fermentation and Microbial Technology). **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 108, n. 1, p. S127, 2009.
- FIGUEIRÓ, G. G., GRACIOLLI, L.A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35. p. 924-930, 2009.
- FONSECA, L. S., ARAÚJO, A., MACHADO, A., DE SIQUEIRA, F. G., LEMOS, M., MENDONÇA, S. Caracterização química do resíduo pós-cultivo de cogumelos destoxicantes em torta de algodão. In **Embrapa Agroenergia-Artigo em anais de congresso**. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 4., 2017.
- GADELHA, I. C. N., FONSECA, N. B. S., OLORIS, S. C. S., MELO, M. M., & SOTO-BLANCO, B. Gossypol toxicity from cottonseed products. **The Scientific World Journal**, v. 2014. p. 11- 23, 2014.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GOMES, T. G., MACHADO, A. E. V., ARAÚJO, A. P., LAVIOLA, B., RIBEIRO, J. D. A., CAMPANHA, R. & DE SIQUEIRA, F. G. Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis. In: **Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso** In: Encontro de

Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, 2., 2015, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2015.

GONÇALVES, C.C.M.; PAIVA, P.C.A.; DIAS, E.S.; SIQUEIRA, F.G.; HENRIQUE, F. Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Fries) Sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n.1, p. 220-225, 2010.

HELICK, Kenneth. **Official methods of analysis**. AOAC, 1990.

JOSHI, C.; MATHUR, P.; KHARE, S.K. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. **Bioresource technology**, v. 102, n. 7, p. 4815-4819, 2011.

KAFFENBERGER, Justin T.; SCHILLING, Jonathan S. Comparing lignocellulose physiochemistry after decomposition by brown rot fungi with distinct evolutionary origins. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 4885-4897, 2015.

KJELDAHL, C. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. **Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 22, p. 366-382, 1883.

KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MORGAN, M. A., & GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS letters**, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.

LOMASCOLO, A., UZAN-BOUKHRIS, E., HERPOËL-GIMBERT, I., SIGOILLOT, J.C., LESAGE-MEESSEN, L. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1129-1149, 2011.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

Mantovani, T. R. D. A., Meirelles, L. D. P., do Valle, J. S., Linde, G. A., & Colauto, N. B. Formulação de substratos na produção de biomassa micelial e de lacase de *Pleurotus ostreatus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1681-1691, 2012.

MEYER, A. S.; ROSGAARD, L.; SORENSEN, H. R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 337-44, 2009.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., & MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Plant Research Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N.; ZIED, D. C.; KOPYTOWSKI FILHO, J. Cultivo de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – (Shiitake). 3 ed. Botucatu: FEPAF, 2007.

PALAZZOLO, ERISTANNA; LETIZIA GARGANO, MARIA; VENTURELLA, GIUSEPPE. The nutritional composition of selected wild edible mushrooms from Sicily

(southern Italy). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 79-83, 2012.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKHA, M. N.; BANO, Zakia. Biodegradation of gossypol by the white oyster mushroom, *Pleurotus florida*, during culturing on rice straw growth substrate, supplemented with cottonseed powder. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 221-227, 2001.

ROGÉRIO, M.C.P., BORGES, I., SANTIAGO, G.S, TEIXEIRA, D.A.B. Uso do caroço de algodão na alimentação de ruminantes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 6, n. 1, p. 85-90, 2003.

SCARIOT, M. R., RAK, L., COSTA, S. M. G., & CLEMENTE, E. Composição química de cogumelos comestíveis cultivados em resíduo de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 317-320, 2000.

SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SUKUMARAN, R. K., LARROCHE, C., & PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource technology**, v. 127, p. 500-507, 2013.

SONG, JIE; HAN, MEI-LING; CUI, BAO-KAI. *Fistulina subhepatica* sp. nov. from China inferred from morphological and sequence analyses. **Mycotaxon**, v. 130, n. 1, p. 47-56, 2015.

TIEN, Ming; KIRK, T. Kent. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 238-249 1988.

TOLEDO, CAROLINA VERÓNICA; BARROETAVEÑA, CAROLINA. Crecimiento micelial de especies silvestres de hongos comestibles de los bosques andino-patagónicos: primeros pasos para su domesticación. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 52, n. 3, p. 435-446, 2017.

TOMARELLI, Rudolph M.; CHARNEY, Jesse; BERNHART, F. W. Utilization of intramuscularly injected carotene. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 63, n. 1, p. 108-110, 1946.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. 3. Study of effects of heating and drying on yield of fiber and lignin in forages. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 48, p. 785-790, 1965.

VAZ, J. A., BARROS, L., MARTINS, A., MORAIS, J. S., VASCONCELOS, M. H., FERREIRA, I. C. Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 343-346, 2011.

VIEIRA, SONIA. **ANÁLISE DE VARIÂNCIA: ANOVA**. EDITORA ATLAS SA, 2000.

WASSER, Solomon. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. **Biomedical journal**, v. 37, n. 6, p. 345-346, 2014.

ZAR, J. H. Biostatistical analysis, 5th. **Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall**, v. 1, p. 389-94, 2010.

## CAPÍTULO 3

### DIGESTIBILIDADE ILEAL DA TORTA DO CAROÇO DE ALGODÃO PRÉ-TRATADA PELO MACRO-BASIDIOMICETO *Fistulina hepatica* CC102 EM DIETAS PARA SUÍNOS

#### RESUMO

A produção de suínos é uma atividade econômica que vem crescendo aceleradamente ao longo dos anos. A criação dos animais exige alimentos ricos em energia e proteínas como, por exemplo, o farelo de soja e o milho. Diante da crescente competição no setor, é necessário que o produtor tenha opções para a formulação da ração, ou isso acaba comprometendo a sua situação financeira, devido ao custo destes produtos no mercado. Dessa forma, os produtores buscam novas alternativas de produção e novas estratégias para manter a produção e, assim, superar a competitividade na cadeia do agronegócio. A torta do caroço de algodão é um subproduto da produção do biodiesel com alto valor proteico, utilizada na alimentação de ruminantes. Entretanto, a torta deve ser evitada na alimentação de animais não ruminantes, devido a presença de gossipol livre, uma vez que este composto atua como fator antinutricional, portanto, tóxico para esta classe animal. Dessa forma, é necessário que haja um tratamento que degrade o gossipol livre sem que o subproduto contenha riscos aos animais. Já se sabe que tratamentos químicos e térmicos não foram satisfatórios quanto a segurança e qualidade da torta do caroço de algodão na alimentação de não ruminantes. Com base nisto, a torta do caroço de algodão foi previamente destoxificada pelo fungo *Fistulina hepatica* CC102, resultando na obtenção de um produto denominado “substrato pre-tratado com *Fistulina hepatica* CC102” ou SPC, com 97% de degradação do gossipol livre e testado previamente em *Artemia salina* e roedores com 100% de segurança nutricional. Ensaio de digestibilidade ileal da proteína foram realizados no presente trabalho para determinar o aproveitamento deste subproduto pelos animais. A caracterização bromatológica do produto foi feita para avaliar se os níveis nutricionais eram adequados para a alimentação de suínos. Cirurgias foram realizadas para implantação de uma cânula T na porção final do íleo em 4 suínos com peso de 80 kg cada. Os animais passaram pelo período pós-operatório e alimentados durante 6 dias com uma dieta isenta de proteína (DIP) e uma dieta DIP contendo 25% de SMS. No sexto dia de alimentação, foram retiradas digestas em sacos plásticos acoplados a cânula, durante 24 horas. As digestas foram armazenadas em freezer e liofilizadas para análise de HPLC (High performance liquid chromatography) para a quantificação dos aminoácidos. O SPC apresentou valores de proteína bruta e fibra consideráveis para a produção de suínos. Os coeficientes de digestibilidade da proteína aparente (CDPBap), verdadeira (CDPB), coeficiente de digestibilidade ileal aparente dos aminoácidos (CDAAap) e verdadeira (CDAAv) foram semelhantes a alguns relatados na literatura. Perdas endógenas demonstraram a importância de se considerar os aminoácidos perdidos durante a alimentação da DIP e descontados na digestibilidade verdadeira, dando um real valor de digestibilidade. No entanto, é necessário conhecer o comportamento da fibra e valores energéticos deste alimento na produção de suínos na fase de crescimento, para assim aproveitar ao máximo este resíduo.

**Palavras-chave:** SMS, Digestibilidade ileal, *Fistulina hepática*, cânula T, HPLC.

## ABSTRACT

Pig production is an economic activity that has been growing rapidly over the years. The breeding of animals requires foods rich in energy and protein, such as soybean meal and corn. Faced with growing competition in the industry, it is necessary that the producer has options for formulating the feed, or this ends up compromising his financial situation due to the cost of these products in the market. In this way, producers seek new production alternatives and new strategies to maintain production and, thus, to overcome competitiveness in the agribusiness chain. The cotton seed cake is a by-product of the production of biodiesel with high protein value, used in ruminant feed. However, the pie should be avoided in the feeding of non-ruminant animals, due to the presence of free gossypol, since this compound acts as an antinutritional factor, therefore, toxic to this animal class. Therefore, there is a need for a treatment that degrades free gossypol without the by-product containing risks to the animals. It is already known that chemical and thermal treatments were not satisfactory regarding the safety and quality of cotton seed cake in non-ruminant feed. Based on this, the cotton seed cake was previously detoxified by the fungus *Fistulin hepatic* CC102, resulting in a product called "substrate treated with *Fistulin hepatic* CC102" or SPS, with a 97% degradation of free gossypol and previously tested in *Artemia saline* and rodents with 100% nutritional security. Tests of ileal digestibility of the protein were performed in the present work to determine the utilization of this by-product by the animals. The bromatological characterization of the product was done to evaluate if the nutritional levels were adequate for the feeding of pigs. Surgeries were performed to implant a T-cannula in the final portion of the ileum in 4 pigs weighing 80 kg each. The animals went through the postoperative period and were fed for 6 days with a protein-free diet (DIP) and a DIP diet containing 25% of SPS. On the sixth day of feeding, digests were withdrawn in plastic bags attached to the cannula for 24 hours. The digests were stored in freezer and lyophilized for high performance liquid chromatography (HPLC) for the quantification of amino acids. The SMS presented considerable crude protein and fiber values for the production of pigs. The digestibility coefficients of the apparent protein (CDPBap), true (CDPB), apparent ileal digestibility coefficient of the amino acids (CDAAap) and true (CDAAv) were similar to some reported in the literature. Endogenous losses demonstrated the importance of considering the amino acids lost during PIP feeding and discounted at the true digestibility, giving a true digestibility value. However, it is necessary to know the behavior of the fiber and energy values of this food in the production of pigs in the growth phase, in order to make the most of this residue.

**Key words:** SMS, ileal digestibility, *Fistulin hepatic*, T-cannula, HPLC.

## 1. INTRODUÇÃO

A carne suína é um dos alimentos mais consumidos no mundo, devido a sua qualidade nutricional e aspectos culinários de boa aceitação pelo público. Até o ano de 2024, estima-se um aumento do consumo deste alimento por países principalmente em desenvolvimento, já que a maior parte da população mundial se encontra nestas localidades (ABCS, 2016). No entanto, a criação dos animais exige alimentos ricos em energia e proteínas como, por exemplo, o farelo de soja e o milho e isso acaba comprometendo a situação financeira do produtor devido ao alto preço que estes produtos alcançam no mercado. Dessa forma, a busca por alimentos alternativos é importante para atender as condições econômicas e aproveitar de forma nutricional os alimentos que atendem as necessidades fisiológicas do animal (CORASSA et al., 2014).

As tortas geradas pela cadeia de produção do biodiesel podem ser utilizadas como substrato para a produção de cogumelos, enquanto que o substrato pós-cultivo de cogumelos, (do inglês *Spent Mushroom Substrate* ou SMS) pode ser utilizado na alimentação animal. O uso da torta de caroço de algodão como um subproduto da produção de biodiesel é um alimento alternativo convencionalmente utilizado na produção de ruminantes, pelo seu alto teor de proteína e energia (ARAÚJO et al., 2016). Além do mais, a torta do caroço de algodão possui uma quantidade significativa de fibras, o que auxilia na digestão de outros alimentos e na modulação microbiana do trato gastrointestinal, fazendo com que haja uma competição de bactérias comensais sobre as patogênicas, estabelecendo uma saúde intestinal positiva. No entanto, na alimentação de animais não ruminantes, como é o caso dos suínos, a torta do caroço de algodão é limitada, devido à presença de altas concentrações de gossipol, um composto antinutricional que causa nos animais problemas tóxicos e reprodutivos (TILYABAEV et al., 2009). Poucos trabalhos têm abordado a eliminação do gossipol em tortas do caroço de algodão e sua utilização na alimentação de animais não ruminantes.

A utilização de cogumelos comestíveis tem se mostrado eficiente na biodestoxificação da torta do caroço de algodão (ARAÚJO et al., 2016). Após a produção do cogumelo usando a torta de caroço de algodão como substrato de cultivo, o SMS pode ser uma alternativa na qual apresenta potencial de utilização na alimentação de suínos, pois se sabe que esta possui características proteicas e fibrosas de interesse na alimentação animal (FONSECA, et al., 2017).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a digestibilidade ileal verdadeira e aparente da torta do caroço de algodão pré-tratada por *Fistulina hepatica* CC102, na alimentação de suínos na fase de terminação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do substrato pré-tratado por *Fistulina hepatica* CC102 (SPT *Fistulina hepatica* CC102)

Antes do preparo do substrato, o SPT *F. hepatica* CC102 foi testado em *Artemia salina* e roedores, garantindo 100% de segurança quanto a alimentação in vivo. O substrato foi preparado para uma composição final de 80% de torta do caroço de algodão 20% de bagaço de cana. A mistura foi preparada em betoneira, com adição de água para deixar o material com, aproximadamente, 70 % de umidade. Após este processo, o substrato foi acondicionado em potes de vidro com tampa vedada com fita micropore, autoclavados a 121°C e, após o resfriamento, inoculados com *F. hepatica* em capela de fluxo laminar. O crescimento fúngico foi observado até o 28º dia após a inoculação, quando se observou a completa colonização do substrato. Após o crescimento, o material foi tirado, seco em estufa a 105°C e triturado para a granulometria correta para a ração dos animais. Não houve a produção de cogumelos da espécie em questão neste trabalho, obtendo-se, portanto, somente o substrato pré-tratado por *F. hepatica* CC102, denominado de SPT *Fistulina hepatica* CC102.

### 2.2 Cirurgia para implantação da cânula T

A permissão do procedimento cirúrgico e experimentação animal foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Lavras (CEUA-UFLA) sob o protocolo de número 053/2017. Respeitando as normativas éticas e de direitos animais do comitê, o qual exige número mínimo e significativo de animais para o procedimento cirúrgico, 4 suínos híbridos comerciais de 40 kg foram submetidos à cirurgia de implantação de cânula “T” simples, utilizando-se o procedimento descrito por Donkoh et al. (1994). O procedimento cirúrgico foi realizado no Centro Cirúrgico de Grandes Animais do Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

Antes da cirurgia, os animais foram submetidos a 24 horas de jejum alimentar e a 12 horas de jejum hídrico. Após este período, receberam medicação pré-anestésica composta da administração da solução associada de 10mg/kg de cefamicina e 0,5 mg/kg de midazolam, na mesma seringa e administrados via intramuscular profunda. Após 15 minutos, a indução anestésica foi realizada com 5mg/kg de propofol pela via intravenosa. Após a indução,

procedeu-se a intubação orotraqueal com sonda orotraqueal nº 8,5 com *cuff*. A manutenção anestésica se deu com isoflurane e oxigênio, utilizando CAM aproximada de 1,0-1,5%. A ventilação permaneceu na modalidade espontânea durante todo o trans operatório. O aparelho de anestesia utilizado foi o da marca Takaoka® modelo Origami. A monitoração dos animais foi feita com monitor multiparamétrico da marca Emai, utilizando-se cabo e eletrodos de ECG (eletrocardiograma) e oxímetro de pulso (colocado na língua do animal). Ausculta pulmonar, controle de pulso e temperatura foram aferidos com estetoscopia e termômetro digital. As medidas de pressão arterial foram aferidas pelo método de pressão invasiva através de manômetro aneroide. Foram anotados todos os sinais vitais, além da frequência cardíaca e respiratória, temperatura e pressão arterial. Após preparação cirúrgica do sítio operatório (tricotomia e antissepsia) foi realizada celiotomia abdominal direita a, aproximadamente, 7cm caudal à última costela. Após incisão magistral de pele, subcutâneo e planos musculares, foi realizada abertura do peritônio e acesso à cavidade peritoneal. A junção íleo-cecal foi identificada, exteriorizada e incisada para permitir a implantação e fixação da cânula, por meio de sutura de Cushing com o fio de ácido poliglicólico 0,50 absorvível. Em seguida, foi realizada uma nova incisão de pele, cranial à primeira a, aproximadamente, 4cm de distância da última costela, por onde a extremidade da cânula foi exteriorizada. Durante o procedimento cirúrgico foi feita a irrigação periódica das alças intestinais expostas com solução fisiológica estéril para evitar o ressecamento da serosa. Após a fixação da cânula foi realizado o procedimento de celiorrafia com sutura do peritônio, em padrão simples contínuo, com o fio catagute 3-0, seguido de sutura da musculatura em padrão Reverdin com o fio de náilon (0,45mm), redução do espaço subcutâneo com fio catagute 2-0 e dermorrafia em padrão simples contínuo com fio de náilon (0,30mm). No pós-operatório, foi realizada a antibioticoterapia com Enrofloxacina (2,5mg/kg) a cada 24 horas por via intramuscular profunda, por 5 dias.

## **2.2 Manejo pós-operatório**

A analgesia pós-operatória foi feita com cloridrato de tramadol na dose de 4mg/kg e dipirona sódica na dose de 25 mg/kg a cada 12 horas, em um intervalo de 1h entre a aplicação de um fármaco e do outro (via intramuscular) durante 3 dias. Os cuidados de limpeza e curativo das feridas cirúrgicas e da cânula T, foram realizados duas vezes ao dia, durante 20 dias de pós-operatório e a remoção dos pontos de sutura de pele foi realizada no décimo dia. A limpeza das feridas cirúrgicas e da cânula foi feita com soro fisiológico e aplicação de repelente à base de cipermetrina, duas vezes ao dia. A recuperação dos animais foi feita de forma individual, onde

cada animal respondeu de uma forma aos procedimentos pós-operatórios. Dessa forma, os animais se recuperaram rapidamente e foram feitos manejos nutricionais regulados para se igualarem ao peso dos animais que tardaram na recuperação e fechamento da sutura.

## 2.2 Dietas experimentais

Os animais foram alojados em baias individuais com água a vontade, com jejum alimentar nas primeiras 24 horas de pós-operatório, seguidas de reintrodução gradativa de uma dieta prática de crescimento. Ao final da recuperação, os animais se encontravam no peso de 80 kg. Após o período de recuperação e uniformização do peso dos animais, estes foram submetidos a um período de adaptação às dietas experimentais de cinco dias e um período de coleta de digesta ileal por 24 horas. Adotou-se descanso dos animais por 2 dias entre as coletas, no qual foi fornecida uma ração à base de milho e farelo de soja para atender a exigência dos animais de acordo com Rostagno et al. (2011). O substrato pré-tratado por *F. hepatica* CC102 utilizado para este experimento foi previamente testado, quanto ao teor de toxicidade ao gossipol, utilizando cobaias.

Os suínos foram alimentados duas vezes ao dia (7:00 e 17:00 horas), com base em seu peso metabólico (kg x 0,75), sendo a ração misturada com água numa proporção de 1:1 a fim de evitar o desperdício e facilitar o consumo das rações. Os animais se alimentaram de 2,7 kg de ração ao dia, durante o período experimental. A composição química das rações utilizadas no experimento está apresentada na Tabela 1. As dietas experimentais foram: uma dieta isenta de proteínas (DIP) para determinação da excreção endógena de proteínas e aminoácidos, e a outra dieta contendo apenas o SPT *F. hepatica* CC102 como fonte de proteína, na qual o substrato pré-tratado por *F.hepatica* CC102 substituiu ao nível de 25% da DIP. O SPT *F. hepatica* CC102 utilizado possui garantia de segurança na destoxificação quanto ao teor de gossipol, de acordo com os ensaios descritos anteriormente. As duas dietas foram marcadas com 0,5% de óxido de cromo, como um fator de indigestibilidade, pelo princípio proposto por Carvalho (2013).

Tabela 1 - Composição centesimal das dietas experimentais

Ingredientes <sup>3</sup>	DIP <sup>1</sup>	Dieta experimental
SMS	-	25
Amido	81,86	56,86
Açúcar	8	8

Óleo	2	2
Sabugo de milho	4,32	4,32
Fosfato bicálcico	1,96	1,96
Calcário	0,76	0,76
Sal	0,4	0,4
Sup. Vitaminas e minerais <sup>4</sup>	0,2	0,2
Óxido de cromo	0,5	0,5
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Legenda: <sup>1</sup> Dieta Isenta de Proteína; <sup>2</sup> Dieta isenta de proteína com 25% de SPT de *Fistulina hepatica* CC102; <sup>3</sup> Formulação adaptada de (Carvalho (2013), <sup>2</sup> O suplemento de vitaminas e minerais fornecia: Sulfato de Mg, 1,18%; cloreto de K, 0,57%; carbonato de K, 0,90%; carbonato de Na, 0,56%; suplemento vitamínico, 0,265; suplemento mineral, 0,05%. Fonte: Do autor.

Como proposto, para a avaliação das perdas endógenas de aminoácidos e cálculos das digestibilidades, os níveis de aminoácidos da dieta DIP apresentou níveis de aminoácidos nulos para treonina, alanina, isoleucina, histidina, triptofano, fenilalanina e arginina. Os níveis baixos de tirosina, lisina, metionina, valina e leucina podem ser relacionados ao fato de a ração conter o sabugo de milho como fonte de fibra na ração, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Níveis e aminoácidos nas dietas experimentais

Aminoácidos essenciais	DIP <sup>1</sup> (%)	Dieta Experimental (%) <sup>2</sup>
Lisina	0,02	0,18
Metionina	0,04	0,05
Treonina	ND <sup>3</sup>	0,13
Alanina	ND	0,19
Valina	0,05	0,19
Isoleucina	ND	0,15
Leucina	0,02	0,25
Histidina	ND	0,1
Triptofano	ND	0,03
Fenilalanina	ND	0,18
Arginina	ND	0,28
Ácido aspártico	0,13	0,31
Ácido glutâmico	0,04	0,64
Cistina	0,03	0,04
Prolina	0,02	0,17
Serina	ND	0,14
Tirosina	0,05	0,1
Glicina	ND	0,18
Soma	0,4	3,31

Proteína Bruta	0,37	5,6
----------------	------	-----

Legenda: <sup>1</sup> Dieta Isenta de Proteína, <sup>2</sup> Dieta Isenta de Proteína com 25% de SPT *Fistulina hepatica* CC102 a base de torta de caroço de algodão e bagaço de cana, <sup>3</sup> ND = Não Detectado. Fonte: Do autor.

## 2.4 Coleta e análises

A coleta da digesta ileal foi realizada por meio de sacos plásticos aderidos diretamente à cânula, sendo retirados após o seu enchimento, substituídos por novos sacos plásticos e imediatamente armazenados no congelador para prevenir a degradação bacteriana dos aminoácidos na digesta. Ao final do ensaio experimental, as amostras foram descongeladas, homogeneizadas e liofilizadas. Análises bromatológicas do substrato pré-tratado por *Fistulina hepatica* CC102 e dietas foram realizadas de acordo com as normas da AOAC (1990). A composição de aminoácidos, proteína bruta e nível de cromo nas dietas e das amostras de digesta foram analisados pelo laboratório CBO em Paulínia-SP.

## 2.5 Fórmulas para determinação da Digestibilidade Ileal

A determinação da digestibilidade ileal dos aminoácidos foi calculada com base na matéria seca das dietas e digestas, nos níveis de cromo (Cr) por meio do fator de indigestibilidade (FI) e dos valores de proteína bruta e aminoácidos, através de fórmulas predefinidas na literatura por Sakomura e Rostagno (2016).

$$CDPBap (\%) = \frac{PB \text{ dieta} - (PBE1 \times F1)}{\%PB \text{ dieta}} \times 100$$

$$CDPBv (\%) = \frac{\%PB \text{ dieta} - (PBE1 \times F1) - (PBE2 \times F2)}{\%PB} \times 100$$

$$\text{Perdas Endógenas Mg/gr} = AAE2 \times MS \times F2$$

$$CDAAv (\%) = \frac{(MgAA/ \text{dieta}) - (MgAA/ E1 \times F1 - M /g E2 \times F2)}{MgAA/g \text{ dieta}} \times 100$$

$$CDAAap (\%) = \frac{(MgAA/ \text{dieta}) - (MgAA/g E1 \times F1)}{MgAA/g} \times 100$$

$$FI = \frac{\text{Cromo na dieta}}{\text{Cromo na digesta}}$$

Em que:

CDAAp= Coeficiente de digestibilidade aparente dos aminoácidos

CDAAv= Coeficiente de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos

CDPBap= Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta

CDPBv= Coeficiente de digestibilidade verdadeira da proteína bruta

MS=Matéria Seca

PB= Proteína Bruta

AA = Aminoácidos

E1= Digesta da dieta-teste      E2= Digesta da dieta isenta de proteína (DIP)

FI1= Fator de indigestibilidade da dieta-teste

FI2 = Fator de indigestibilidade da dieta isenta de proteína (DIP).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição química da torta do caroço de algodão tratada com *Fistulina hepatica* e dietas

Tabela 3 - Composição bromatológica do substrato tratado com *Fistulina hepática* a base de torta de caroço de algodão e bagaço de cana

Análise	% SPT <i>Fistulina hepatica</i>	% <i>Pleurotus</i> <i>Ostreatus</i>	% no Farelo de Soja
Matéria Seca	96,38	94,99	89,24
Cinzas	5,84	5,93	6,49
FDN	60,12	61,97	13,39
FDA	47,70	46,0	10,32
Lignina	14,20	14,80	3,55
Proteína Bruta	21,03	16,75	45,55

Legenda:<sup>1</sup> Valores médios em porcentagem da composição bromatológica no SPT de *Fistulina hepatica* CC102 a base de 80% de torta de caroço de algodão e 20% de bagaço de cana comparado com Substrato pós cultivo de *Pleurotus ostreatus* e farelo de soja. Fonte: Adaptação de Araújo (2018) e Carvalho (2009).

O valor de proteína bruta observado no substrato tratado com *F. hepatica* é maior do que aquele relatado por Araújo (2018) para o substrato tratado com *P. ostreatus* (tabela 3), sendo que os dois substratos apresentavam a mesma composição, à base de torta de caroço de algodão e bagaço de cana. Para as demais frações, foram observadas algumas variações, entretanto, os valores foram, de modo geral, bastante próximos. Possivelmente, o maior teor de proteína bruta encontrado no substrato de *F. hepatica* esteja associado à maior capacidade desta espécie na degradação desta espécie e, conseqüentemente, melhor aproveitamento e conversão do nitrogênio disponível em proteína. A capacidade de aproveitamento energético pelos suínos é muito variável em decorrência da capacidade de fermentação da fibra presente, a qual está diretamente relacionada com as fibras solúveis na dieta (SILVA et., 2012). Por isso, são necessárias análises para avaliar o tipo de fibra do substrato pré-tratado por *Fistulina hepatica* CC102 e o perfil digestivo da mesma *in vivo*, em ensaios de digestibilidade energética. Os valores de lignina se mostraram altos, de acordo com a definição de Cavalcanti (1984), o qual relatou que as enzimas digestivas do aparelho digestório dos suínos, praticamente, não atuam sobre a celulose e a lignina. O autor relata, ainda, que o percentual máximo desse tipo de fibra em dietas de suínos estaria entre 5% e 8%, podendo se estender até 12%.

Não há relatos acerca do uso de substrato pré-tratado por *Fistulina hepatica* CC102 da torta do caroço de algodão para suínos, no entanto, o nível de proteína deste resíduo (21,06%) o torna um potencial alimento alternativo para esta categoria animal. Trinta de Neto et al., (2009) testaram níveis de proteína na fase de terminação e concluíram que a dieta com 17,80% de proteína bruta seria indicada para assegurar a concentração de lisina digestível, aminoácido limitante na produção de suínos. Como fonte de proteína, os autores utilizaram farelo de soja como fonte de proteína, o qual é um produto relativamente caro e eleva bastante o custo da ração, vindo daí a necessidade de buscar alternativas à sua utilização.

Comparando com os dados presentes também na tabela 3, o valor de fibras do SPC de *F. CC102* (FDN: 60,12%, FDA: 47,70% e Lignina 12,20%) mostraram-se superiores àqueles encontrados no farelo de soja, relatado por Carvalho (2009) (13,39%, 10,32%, 3,55%, respectivamente). Portanto, infere-se que este subproduto possa ser utilizado para o adequado ajuste de fibras na alimentação de suínos em fase de crescimento. O teor de proteína do farelo de soja é bem maior (45,55%) comparada ao SPC de *F. hepatica* CC102 (16,75%). Carvalho et al. (2010) relataram o problema da qualidade dos subprodutos oriundos da extração do óleo de algodão, no qual a disponibilidade da proteína está relacionada com o tipo de fibra e o processamento que deu origem ao resíduo, o que pode ser explicado pelos dados do presente trabalho. De acordo com PAIANO (2014), o processamento dos subprodutos da cadeia do algodão interfere diretamente na qualidade nutricional destes na alimentação de suínos. Neste contexto, o tratamento da torta com *F. hepatica*, contribui para a melhoria desta qualidade.

Tabela 4 - Composição dos aminoácidos com base na MS do SMS

Aminoácidos essenciais	SPT <i>Fistulina hepatica</i> CC102 <sup>1</sup> (%)
Lisina	0,61
Metionina	0,15
Treonina	0,56
Alanina	0,69
Valina	0,68
Isoleucina	0,52
Leucina	0,95
Histidina	0,37
Triptofano	0,09
Fenilalanina	0,65
Arginina	1,1

Ácido aspártico	1,39
Ácido glutâmico	2,53
Cistina	0,16
Prolina	0,59
Serina	0,57
Tirosina	0,43
Glicina	0,74
Soma	12,78

Legenda: <sup>1</sup> Substrato Pré-tratado por *Fistulina hepatica* a base de torta de caroço de algodão e bagaço de cana. <sup>2</sup> MS: Matéria Seca. Fonte: Do autor.

De acordo com Bertechini (2012), para suínos nessa fase de crescimento, lisina e metionina constituem a 1ª e 2ª limitação prática, respectivamente, em rações à base de milho e farelo de soja. O 3º limitante é a treonina ou o triptofano, dependendo do perfil de ingredientes utilizados na base de cálculo para essa fase de criação. O nível de lisina total em rações de suínos em terminação, recomendado para otimizar o desempenho corresponde de 0,70 a 0,90 % nas dietas (Portela, 2014). Na tabela 4 estão dispostos os aminoácidos em porcentagem no SPT *F. hepatica* CC102, através da técnica de HPLC. A lisina do SPT *F.hepatica* CC102 apresentou nível percentual de 0,61%, e mostra um valor próximo a exigência de 0,691% das tabelas brasileiras de aves e suínos, porposta por Rostagno et al., (2011). Huang et al. (2012), testou farelo de trigo na alimentação de suínos em terminação com os valores de lisina de 0,49% e obteve valores de desempenho consideráveis. A metionina do substrato pré-tratado por *Fistulina hepatica* CC102 neste trabalho, apresentou valor de 0,15%, pouco abaixo do recomendável que está em torno de 0,20%. Huang (2012) encontrou em farelo de trigo nas concentrações de metionina médias de 0,27%. A treonina do substrato pré-tratado por *F.hepatica* CC102 apresentou 0,56%, no qual o recomendável para a fase de terminação se encontra na faixa de 0,46%, tornando assim um aminoácido com suprimento adequado neste resíduo. As exigências de triptofano se encontra na faixa de 0,13% a 0,15%. No substrato pré-tratado por *F.hepatica* CC102, o valor obtido para este aminoácido foi um pouco abaixo do ideal, em 0,09%. Portanto, é necessária a inclusão de poucas quantidades de aminoácidos sintéticos limitantes na ração dos suínos quando um alimento não atende as exigências nutricionais (MELLO et al.,2012). No entanto, os valores de aminoácidos essenciais e limitantes para suínos no substrato pré-tratado por *F.hepatica* CC102 mostraram-se promissores quanto a inclusão deste na cadeia de produção, visto que os valores estão próximos dos ideais. Rostagno et al. (2011), descreveu nas Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos (2011), os níveis ideais para a fase de terminação para suínos dos aminoácidos como sendo: arginina

0,255; valina, 0,595%; isoleucina, 0,468%; leucina, 0,825%; histidina, 0,272% e fenilalanina, 0,417%. Observa-se que os níveis encontrados no SPT *F.hepatica* CC102 estão de acordo com os níveis propostos para estes aminoácidos, exceto para arginina (Tabela 4). É importante ressaltar que os aminoácidos contidos neste pré-tratado podem ser originados do micélio fúngico presente neste material, além do que já se encontra na torta do caroço de algodão.

### 3.2 Perdas endógenas dos aminoácidos

Tabela 5– Perdas endógenas da proteína e aminoácidos pela DIP

Nutriente	Perda endógena ( mg/g de MS ingerida)
Proteína Bruta	120,29
Aminoácidos essenciais	
Lisina	65,02
Metionina	130,05
Treonina	0
Alanina	0
Valina	162,56
Isoleucina	0
Leucina	65,25
Histidina	0
Triptofano	0
Fenilalanina	0
Aminoácidos não essenciais	
Arginina	0
Ácido aspártico	422,66
Ácido glutâmico	130,05
Cistina	97,53
Prolina	65,02
Serina	0
Tirosina	162,56
Glicina	0

Legenda: Os valores estão expressos em mg/kg com base na matéria seca ingerida por dia de Dieta Isenta de Proteína (DIP).

A perda endógena de proteína bruta observada neste trabalho foi de 120,29 mg/g de matéria seca consumida. Costa et al. (2008) encontrou 106,6 mg/g na DIP. O valor da proteína bruta endógena corresponde a valores de proteínas que fazem parte da desconjugação de sais biliares e mucoglicoproteínas, uma vez que esses componentes geralmente são resistentes à ação das enzimas proteolíticas e não poderão ser absorvidos pelo animal, sendo assim um fator que não traz segurança para os dados reais (HE et al., 2016).

Os valores médios de aminoácidos que compõem as perdas endógenas foram avaliados pelos valores obtidos com a dieta isenta de proteína (DIP). A avaliação das perdas endógenas possibilita estimar a quantidade de aminoácidos endógenos não reabsorvidos e que não são digeríveis no trato gastrointestinal do animal (ADEOLA 2016). Quando se fornece uma dieta sem nenhuma fonte de proteína para o animal, o organismo entra em um processo fisiológico de compensação proteica, síntese enzimática e descamação de parte da mucosa intestinal (HE et al., 2016). Por este fato, é necessário avaliar a perda endógena, já que essa pode subestimar a digestibilidade das dietas.

Os valores da perda endógena de prolina (65,02 mg/g), tirosina (162,56 mg/g), ácido aspártico (422,66 mg/g), valina (162,56 mg/g) na matéria seca ingerida, podem ser considerados elevados. Isso se deve ao fato de que estes aminoácidos são produzidos pelo organismo do animal em altas quantidades para compor os sais biliares e as mucoglicoproteínas presentes no muco intestinal (COSTA et al., 2008). Jasman et al., (2002) afirmaram que quando índices de prolina estão acima de 25,9 mg/g, o animal ao ingerir DIP obteve um estresse fisiológico característico.

Os valores de ácido glutâmico e leucina (130,05 e 65,25 mg/g) foram encontrados acima dos valores de arginina (0 g/mg), lisina (65,02 mg/g), alanina (0 mg/kg), histidina (0 mg/g), triptofano (0 mg/g) e fenilalanina (0 mg/kg) (Tabela 5). O ácido glutâmico e leucina são encontrados em maior quantidade nos sucos pancreáticos dos suínos porque reveste a parede intestinal, compondo a camada de mucina presente neste local (HE et al., 2016). Valores de metionina e cistina (130,05 mg/g e 97,53 mg/g) são devido aos aminoácidos sulfurados que compõem as secreções digestivas e na camada de mucina, nos quais não possuem boa digestibilidade (POZZA et al., 2003).

### **3.3 Digestibilidade ileal aparente e verdadeira**

Os coeficientes de digestibilidade ileal verdadeira e aparente da proteína bruta e aminoácidos são apresentados na tabela 6, mostrando a diferença entre a porcentagem encontrada nos dois tipos de digestibilidade. Há uma grande necessidade na pesquisa de digestibilidade verdadeira, revelando assim os valores das perdas endógenas e a absorção verdadeira do aminoácido. Estudos feitos por He e colaboradores (2016) relataram que dietas com baixa proteína afetam a digestibilidade do aminoácido ileal e a expressão gênica das enzimas digestivas em suínos em crescimento e terminação.

Muitos trabalhos são feitos estimando somente a digestibilidade aparente dos aminoácidos. O valor real dos aminoácidos que compõem o processo fisiológico do animal e os aminoácidos que são provenientes da digesta, os quais não foram absorvidos, não são identificados nesta análise, tendo assim resultados superestimados desses nutrientes.

A definição da digestibilidade aparente é como sendo a diferença da quantidade de aminoácidos na dieta e a quantidade destes nas fezes ou na digesta ileal. Neste caso, a palavra aparente, segundo Stein et al. (2007), é utilizada para enfatizar o conteúdo não digestível de aminoácidos e a não correção para as contribuições de origem endógena nesse valor de digestibilidade. Já a digestibilidade verdadeira é determinada pela diferença entre a quantidade de aminoácidos na dieta e na digesta ileal, sendo consideradas as perdas endógenas dos aminoácidos, que são subtraídas da quantidade total de aminoácidos presentes na digesta ileal (SAKOMURA; ROSTAGNO, 2007). Os valores da digestibilidade ileal verdadeira deste trabalho condiz com o esperado, já que as perdas endógenas dos aminoácidos foram subtraídas nas fórmulas propostas por Sakomura, e Rostagno (2016).

Tabela 6 – Digestibilidade ileal aparente e verdadeira da PB e aminoácidos

Coeficiente de Digestibilidade em % na MS das dietas e digestas		
	Aparente	Verdadeira
Proteína Bruta	78,87	86,42
Aminoácidos Essenciais		
Lisina	85,47	86,14
Metionina	85,29	89,81
Treonina	79,98	78,98
Alanina	85,41	85,41
Valina	85,41	86,90
Isoleucina	86,04	86,04
Leucina	83,25	83,71
Histidina	86,42	86,42
Triptofano	71,72	71,72
Fenilalanina	85,86	85,86
Aminoácidos não essenciais		
Arginina	90,50	90,50
Ácido aspártico	83,58	85,95
Ácido glutâmico	88,51	88,86

Cistina	80,20	84,44
Prolina	82,70	83,36
Serina	80,60	80,60
Tirosina	81,33	84,16
Glicina	83,97	83,97

Legenda: <sup>1</sup> PB= Proteína Bruta<sup>2</sup> MS = Matéria Seca

Os coeficientes de digestibilidade verdadeira da proteína bruta (CDvPB) foram maiores do que as apresentadas por Rostagno et al. (2011), avaliando a digestibilidade de biscoito e macarrão na alimentação de suínos. Salvant, Perez e Tran (2004), relatou valores de CDvPB menores do que os valores encontrados neste trabalho. Bosi et al. (2011), utilizando plasma sanguíneo em leitões na fase de crescimento, obtiveram 72,40% de coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDPBap). Os valores altos de CDPBap deste trabalho, nos mostra a quantidade ideal de proteína bruta encontrada no alimento e a sua eficácia quanto à digestibilidade.

Os valores de digestibilidade ileal verdadeira dos aminoácidos (CDAAv) e aparente (CDAAap) foram em média e 86,42% e 78,87% de e respectivamente. Isso pode explicar porque dietas contendo baixas a medianas proporções de aminoácidos usualmente tem CDAAap menores, devido a perdas endógenas, contribuindo relativamente mais para a produção ileal de aminoácidos (YU, 2016).

Houve variação na digestibilidade dos aminoácidos lisina, metionina, valina, leucina, ácido aspártico, ácido glutâmico, cistina, prolina e tirosina (Tabela 6) pelo CDAAap comparado ao CDAAv. A produção destes nos líquidos digestivos e parede intestinal aumentam a concentração dos mesmos e conseqüente indigestibilidade no animal (ADEOLA, OLAYIWOLA; RAGLAND, 2016). A digestibilidade aparente da arginina (90,50%) foi a mais alta, seguida pelo ácido glutâmico (88,51%). Os valores de metionina (85,29%) foram menores do que aquele relatado por Huang et al., (2012), em suínos alimentados com farelo de trigo como dieta experimental. Os mesmos autores encontraram a digestibilidade da lisina entre 76,31 a 86,28%. O triptofano (71,72%) está abaixo do valor encontrado por estes autores (77,42%). A digestibilidade ileal aparente da lisina encontrada neste trabalho (85,47%) se encontra entre a faixa citada também por Huang et al., (2012). Alanina, valina, isoleucina, histidina e fenilalanina tiveram valores variando de 85,41% a 86,42%. Quanto maior for a concentração de aminoácidos no suco pancreático, nos sais biliares e nas mucoglicoproteínas, maior será a digestibilidade ileal aparente em comparação a verdadeira. Perdas específicas de

treonina, e prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico e cistina representam a maior preocupação devido à sua abundância em proteína na forma endógena (YU et al., 2016).

Os valores do CDAAv dos aminoácidos variaram em pequenas proporções (Tabela 8), exceto para tirosina (84,16%) e cistina (84,44%), ácido aspártico (85,95%) e metionina (85,29%) onde a digestibilidade foi alta em relação aos demais. Adeola (2016) por outro lado, utilizando milho fermentado, obteve valores acima de 100% para glicina e prolina. O menor valor neste trabalho foram dos aminoácidos treonina (78,98%) e triptofano (71,72%). Yu et al., (2016) encontrou para a metionina 92,88% de CDAAv em farelo de trigo. Adeola e colaboradores (2016) encontrou valores altos da digestibilidade ileal verdadeira na maioria dos aminoácidos (acima de 90%). Os valores baixos para os aminoácidos pelo CDAAv podem ser devido ao alto teor de fibra, estimulando perdas endógenas por hidrólise enzimática e descamação da mucosa no momento da digestão (STEIN et al., 2007). Além dos demais estudos mostram que alimentos com alto teor de fibra pode interferir na digestibilidade dos nutrientes, principalmente de proteínas (FERREIRA et al., 2007). É necessário, portanto, conhecer o comportamento fisiológico do animal, em ensaios de digestibilidade energética quanto ao teor e tipo de fibra presente no SPT de *F. hepatica* CC102.

Tsai et al.(2017) citaram que a baixa digestibilidade ileal da lisina e de outros aminoácidos provavelmente está relacionada com a alta concentração de fibras do grão de trigo, dificultando assim a digestibilidade deste aminoácido. Para melhorar a digestibilidade dos aminoácidos, principalmente os essenciais, alguns pesquisadores incluem proteases para disponibilizarem os aminoácidos à absorção. A suplementação dietética com protease revestida aumentou os coeficientes de digestibilidade aparente e proteína em leitões desmamados (YU, 2016). Apolônio (2003) obteve coeficiente médio de digestibilidade verdadeira de 90,6%, o qual está acima dos resultados observados neste trabalho, concluindo que a digestibilidade dos alimentos se deve principalmente ao teor de fibra presente no mesmo. O mesmo autor relatou que a lisina foi o aminoácido menos digestível no sorgo, no milho e na levedura de cerveja, apresentando valores de digestibilidade intermediários, entre 85 a 90%. No presente trabalho, a lisina, que é o aminoácido mais limitante na produção de suínos, obteve valor dentro da faixa daqueles relatados por estes autores. Portanto, esses resultados corroboram com a possibilidade de se utilizar o SPC de *F. hepatica* CC102 como uma alternativa viável de inclusão na ração de suínos.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os coeficientes de digestibilidade ileal verdadeira da proteína e aminoácidos foram menores, quando comparados ao coeficiente aparente da proteína e aminoácidos, concluindo que há perdas endógenas destes no trato gastrointestinal dos animais, porém estes mesmos parâmetros foram semelhantes comparados a outros alimentos, tornando a inclusão do substrato pré-tratado por *F. hepatica* CC102 na suinocultura como um alimento promissor.

Os coeficientes de digestibilidade determinados neste trabalho devem ser utilizados como referência da composição protéica e aminoacídica para a formulação de dietas para suínos. A inclusão do mesmo na alimentação destes animais contribuiria para o elo entre a fungicultura e cadeia do biodiesel, proporcionando ao produtor rural um subproduto de baixo custo, porém de alta qualidade nutricional.

## 5. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABCS. **Associação Brasileira dos Criadores de Suínos**. Disponível em: [http://www.abcs.org.br/images/-0apeamento\\_completo\\_bloq.pdf](http://www.abcs.org.br/images/-0apeamento_completo_bloq.pdf). Acesso em 21/04/2018.

ADEOLA, OLAYIWOLA; RAGLAND, DARRYL. Comparative ileal amino acid digestibility of distillers' grains for growing pigs. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 262-266, 2016.

APOLÔNIO, L. R., DONZELE, J. L., OLIVEIRA, R. D., SOUZA, A. D., SILVA, F. D. O., BÜNZEN, S. Digestibilidade ileal de aminoácidos de alguns alimentos, determinada pela técnica da cânula T simples com suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 605-614, 2003.

ARAÚJO, A.P.F.; GOMES, T.G.; MACHADO, A.E.V.; CONCEIÇÃO, A.A.; RIBEIRO, J.A.A.; CAMPANHA, B.R.; URBEN, F. A.; MENDONÇA, S.; SIQUEIRA, F.A. Fungos como agentes destoxicadores de torta de caroço de algodão (Gossipol). **Embrapa Agroenergia**, Brasília – DF, 2016.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS; ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (US). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Association of Official Analytical Chemists., 2011.

BETERCHINI, A. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: UFLA. 225 p. 2012.

BIODIESEL BR. Disponível em: <https://www.biodieselbr.com>. Acesso em 21/04/2018.

BOSI, P.; CASINI, L.; FINAMORE, A.; CREMOKOLINI, C.; MERIALDI, G.; TREVISI, P.; NOBILI, F.; MENGHERI, E. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaning pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 6, p. 1764-1772, 2004.

CAVALCANTI, S.S. **Produção de suínos**. Campinas, SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 453p. 1984

CARVALHO, G. G. P. D. C., PIRES, A. J. V., GARCIA, R., VELOSO, C. M., SILVA, R. R., MENDES, F. B. L. DE SOUZA, D. R. Degradabilidade in situ da matéria seca, da proteína bruta e da fração fibrosa de concentrados e subprodutos agroindustriais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 689-697, 2009.

CORASSA, A., PREZOTTO, R. T., KOMIYAMA, C. M., MOREIRA, P. S. A., DE ARAÚJO, C. V. Farelo de biscoito na alimentação de porcas em lactação. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, V.44, p.42-44, 2014.

COSTA, L. F., LOPES, D. C., DE FREITAS, L. S., HANNAS, M. I., PUPA, J. M. R., CORASSA, A. Determinação das perdas endógenas e da digestibilidade ileal da proteína e dos aminoácidos em suínos utilizando-se duas técnicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 7, p. 1243-1250, 2008.

CARVALHO, C. B. D., DUTRA JUNIOR, W. M., REBELLO, C. B. V., LIMA, S. B. P. D., TAKATA, F. N., NASCIMENTO, G. R. D. Avaliação nutricional do farelo de algodão de alta energia no desempenho produtivo e características de carcaças de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1166-1172, 2010.

CARVALHO, T. A. **Energia metabolizável e aminoácidos digestíveis de alimentos para suínos**. 36 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

FONSECA, L. S., ARAÚJO, A., MACHADO, A., DE SIQUEIRA, F. G., LEMOS, M., MENDONÇA, S. Caracterização química do resíduo pós-cultivo de cogumelos destoxicantes em torta de algodão. In: **Embrapa Agroenergia - Artigo em anais de congresso**. In: 4º ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, EMBRAPA, Brasília, DF, 2017.

HE, L., WU, L., XU, Z., LI, T., YAO, K., CUI, Z., WU, G. Low-protein diets affect ileal amino acid digestibility and gene expression of digestive enzymes in growing and finishing pigs. **Amino Acids**, v. 48, n. 1, p. 21-30, 2016.

HUANG, Q., X.S. PIAO, P.REN, D.F.LI. Prediction of the digestible and metabolizable energy content of wheat milling by-products for growing pigs from chemical composition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 107-116, 2014.

JANSMAN, A. J. M., SMINK, W., VAN LEEUWEN, P., RADEMACHER, M. JANSMAN, A. J. M. Evaluation through literature data of the amount and amino acid composition of basal endogenous crude protein at the terminal ileum of pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 98, n. 1-2, p. 49-60, 2002.

MELLO, G., LAURENTIZ, A. C., FILARDI, R. S., BERGAMASCHINE, A. F., OKUDA, H. T., LIMA, M. M., JUNQUEIRA, O. M. Farelo de algodão em rações para suínos nas fases de crescimento e terminação. **Archivos de zootecnia**, v. 61, n. 233, p. 55-62, 2012.

PAIANO, D., MOREIRA, I., CARVALHO, P. L. D. O., FURLAN, A. C., SILVA, M. A. A., KUTSCHENKO, M. VOORSLUYS, T. Farelo de algodão na alimentação de suínos (30-90 kg). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 3, p. ??? 2014.

PEDERSEN, C., ALMEIDA, J. S., STEIN, H. H., PEDERSEN, C., ALMEIDA, J. S., STEIN, H. H. Data for standardized ileal digestibility of protein and amino acids in soy proteins fed to pigs. **Journal of Animal Science**, 94 (Suppl. 3), p. 340-343, 2016.

PORTELA, L., SIQUEIRA, J., BOMFIM, M., NASCIMENTO, D. C. N., RIBEIRO, F., OLIVEIRA, F. SANTOS. Níveis de lisina em rações de suínos em terminação: uma metanálise para otimizar o desempenho. **Archivos de zootecnia**, v. 63, n. 243, p. 419-428, 2014.

POZZA, P. C., GOMES, P. C., ROSTAGNO, H. S., LOPES, J., DONZELE, M. S. D. S., FERREIRA, R. A. Avaliação da perda endógena de aminoácidos, em função de diferentes níveis de fibra para suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1354-1361, 2003.

ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., DONZELE, J. L., GOMES, P. C., OLIVEIRA, R. F., LOPES, D. C., EUCLIDES, R. F. Composição de alimentos e exigências nutricionais. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. Viçosa, MG: Editora UFV, v. 2, p. 252 2011.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: Funep, 283p, 2007.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal, SP: Editora Funep, 676p, 2016.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal, SP: Editora Funep, 676p, 2014.

SAUVANT, D., J.M. PEREZ, G. TRAN. Tables of composition and nutritional value of feed materials: pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses, fish. **Wageningen Academic Publishers**, Wageningen and INRA Editions, Versailles, 2004.

SILVA, C. S.; VAN DEN BORNE, J. J.; GERRITS, W. J.; KEMP, B.; BOLHUIS, J. E. Effects of dietary fibers with different physicochemical properties on feeding motivation in adult female pigs. **Physiology & Behaviour**, v.107, p.218-230, 2012.

SILVA, E. G. B., MARINHO, A. L., MOREIRA, J. A., NOVAES, L. P., DA SILVA, A. D. L., & MOTA, L. C. Bran palm giant with exogenous enzymes addition in pig nutrition on growth. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 4, p. 314-321, 2016.

STEIN, H. H.; FULLER, M.F.; MOUGHAN, P. J. et al. 2007. Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. **Livestock Science**, v. 109, p. 282-285, 2007.

TRINDADE NETO, M. A., BERTO, D. A., DE ALBUQUERQUE, R., SCHAMMASS, E. A., MIGUEL, W. C. Níveis de proteína em dietas de suínos em fase de crescimento e terminação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 474-483, 2009.

TILYABAEV, K.Z.; TALIPOV, S.A.; IBRAGIMOV, B.T. et al. Crystal structures of the solvates of di-ethylaminogossypol with ethyl acetate and pyridine. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 39, p. 677-682, 2009.

TSAI, T. C., KIM, H., WANG, X., CHEWNING, J. J., APPLE, J. A., THOMSON, J. E., & MAXWELL, C. V. Effect of increasing standardized ileal digestible tryptophan: lysine ratio on growth performance of grower–finisher pigs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. suppl\_2, p. 136-138, 2017.

USLU, B., LINGEMAN, H., OZKAN, S. A., PALIT, M., DOGAN-TOPAL, B. Analytical Method Development and Validation of Pharmaceutical Analysis Using Chromatographic Techniques. **Chromatography Research International**, 2012.

YU, G., CHEN, D., YU, B., HE, J., ZHENG, P., MAO, X., YU, J. Coated protease increases ileal digestibility of protein and amino acids in weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 214, p. 142-147, 2016.

