



Universidade Federal do Tocantins

**Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

ANA PAULA FERNANDES ARAÚJO

**TRATAMENTO DA TORTA DE SEMENTE DE ALGODÃO POR
AUTOCLAVAGEM E MACROFUNGOS PARA DEGRADAÇÃO DE
GOSSIPOL**

GURUPI - TO

2018



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

ANA PAULA FERNANDES ARAÚJO

**TRATAMENTO DA TORTA DE SEMENTE DE ALGODÃO POR
AUTOCLAVAGEM E MACROFUNGOS PARA DEGRADAÇÃO DE
GOSSIPOL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Tocantins, como parte das exigências do curso pós-graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Félix Gonçalves de Siqueira

Co-orientadora: Dra. Simone Mendonça

GURUPI - TO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

A663t Araújo, Ana Paula Fernandes.

Tratamento da torta de semente de algodão por autoclavagem e
macrofungos para degradação de gossipol.. / Ana Paula Fernandes
Araújo. – Gurupi, TO, 2018.

89 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do
Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-
Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2018.

Orientador: Félix Gonçalves de Siqueira

Coorientadora : Simone Mendonça

1. Gossipol. 2. Cogumelos. 3. Pleurotus ostreatus. 4. Algodão. I.
Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que
citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime
estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-1649 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br



ANA PAULA FERNANDES ARAUJO


Tratamento da torta de semente de algodão por autoclavagem e macrofungos para degradação de gossipol.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 23/02/2018 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da aprovação: 23/02/2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira – Orientador – Embrapa


Prof.^a. Dr.^a. Simone Mendonça – Coorientadora - Embrapa


Prof.^a. Dr.^a. Perola de Oliveira Magalhães Dias Batista – Examinadora - UnB


Prof. Dr. Bruno Leite Sampaio – Examinador - Embrapa

Brasília (DF).
2018.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades, pela proteção e por ser a luz que ilumina minha caminhada.

Aos meus pais Nozinho Rodrigues de Araújo e Dora Costa Fernandes pela confiança, amor, carinho e incentivo de sempre, com vocês aprendi que com esforço, trabalho e fé serei capaz de conquistar e alçar grandes vôos.

Ao meu amado irmão, Paulo Rodrigo, pelo incentivo, amor e carinho e por entender meus momentos de fraqueza e fragilidade que na maioria das vezes eram descarregadas sobre ele.

A todos os amigos que sonharam comigo a execução deste trabalho, que me incentivaram, sorriram e choraram ao meu lado e por entenderem todas às vezes que me ausentei de momentos importantes em prol dos trabalhos.

Ao professor Félix Gonçalves de Siqueira pelos ensinamentos, paciência, oportunidade e confiança concedida. O senhor é um grande exemplo de profissional e carregarei seus ensinamentos, tanto acadêmicos quanto de crescimento pessoal por todos os caminhos a serem percorridos.

À Doutora Simone Mendonça pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo amparo em todas as etapas da pesquisa.

Ao coordenador do programa de pós-graduação em biotecnologia Doutor Gessiel Scheidt.

A todos do grupo de pesquisa Antony, Taisa, Alexandra, Joice, Carla, Aparecido, Marivane, Clemente e Ruben pela colaboração, amizade e sorrisos, vocês fazem parte dessa vitória; também a Paula Carmona pela ajuda nos testes estatísticos, e, Dejair pelo auxílio na confecção dos gráficos.

A Embrapa Agroenergia e a todos os profissionais, tanto funcionários como colaboradores. Sinto-me honrada pela oportunidade de trabalhar em um centro de pesquisa que reuni excelência em infraestrutura e pessoal.

Aos analistas, em especial a Raquel Bombarda, José Antônio R. de Aquino, Thais Demarchi, Thályta Pacheco, Agenor Marquez pela colaboração e orientação, vocês foram fundamentais para a execução deste trabalho.

À Doutora Arailde Urben pela confiança e parceria no desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPq Embrapa– Projeto FungiDetox pela bolsa concedida.

RESUMO

A torta de caroço de algodão (TCA) é um coproduto gerado após a extração de óleo desta oleaginosa, que tem sido utilizada como uma das matérias-primas para a produção de biodiesel. O uso de TCA na nutrição animal é restrito, sendo mais utilizado em ruminantes, em função da elevada concentração do fator antinutricional e tóxico, gossipol. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de alguns macrofungos em degradar o gossipol na forma livre, utilizando TCA como substrato após serem esterilizadas por autoclavagem. Trinta e cinco macrofungos foram avaliados quanto a sua capacidade de crescimento em meio à base de TCA e redução dos teores de gossipol livre (GL). Treze macrofungos apresentaram capacidade de crescimento micelial em meios de cultura contendo TCA+Agar (placas) ou apenas TCA (frascos de vidro) como fonte nutritiva. Os seis macrofungos com melhor desempenho de crescimento foram avaliados quanto à capacidade de degradação do GL em sistema de cultivo por fermentação estado sólido (FES). O processo de esterilização por calor úmido (autoclavagem) do TCA apresentou degradação significativa do gossipol, entretanto há níveis consideráveis de GL residual na biomassa. Os seis macrofungos apresentaram capacidade de reduzir até 90% do valor residual de GL após a autoclavagem das TCAs. O *Pleurotus ostreatus* CC389 foi escolhido dentre os seis macrofungos para realização das atividades para determinação de eficiência biológica e produtividade de cogumelos comestíveis. Também foram feitas análises das atividades enzimáticas e degradação do GL, nas biomassas pós-colheita dos cogumelos (SMS, *spent mushroom substrate*). O *P. ostreatus* CC389 quando cultivado em TCA como substrato por 20 dias secretou enzimas lignolíticas como lacase (até 166,67 UI/mL) e manganês peroxidase (até 12,81 UI/mL). Também degradou o GL residual em até 94% ao final dos vinte dias de cultivo. A atividade de manganês peroxidase apresentou correlação com a degradação de GL. A produtividade de cogumelos de *P. ostreatus* CC389 foi de aproximadamente 20% em quatro formulações de substratos preparados a base de TCA (70%) e 30% de outras fontes de biomassas vegetais (lignocelulósicos). A eficiência biológica foi maior na combinação de TCA com serragem de eucalipto (acima de 67%). Os SMSs e os cogumelos obtidos ao final do sistema de cultivo de *P. ostreatus* CC389 nas diferentes formulações apresentaram redução de GL acima de 99%. Os resultados obtidos nos ensaios com *P. ostreatus* CC 389 para degradação de GL presentes em TCA e quando enriquecidas com outras fontes lignocelulosicas poderão servir de elo para integração de cadeias produtivas de biocombustíveis (biodiesel), fungicultura (cogumelos comestíveis) e nutrição animal (insumos – enzimas, bioativos, fontes nutricionais – proteína bruta).

Palavras-chave: Gossipol; Cogumelos; *Pleurotus ostreatus*; Algodão.

ABSTRACT

Cotton seed cake (TCA, in Portuguese) is a coproduct obtained after the extraction of cottonseed oil, which has been used as one of the raw materials for biodiesel production. TCA is restricted for animal nutrition, being more used for ruminants, due to the high concentration of the antinutritional and toxic factor, gossypol. The objective of the present study was to evaluate the ability of some macrofungi species to degrade free gossypol using TCA as substrates after being sterilized by autoclaving process. Thirty-five macrofungi were evaluated for their growth capacity in medium containing TCA and reduction of free gossypol (GL, in Portuguese). Thirteen macrofungus presented mycelial growth capacity in culture media containing TCA+Agar (Petri plates) or only in TCA (glass bottles) as nutritional source. Six macrofungus with best growth performance were selected and evaluated for GL degradation capacity during solid state fermentation (FES, in Portuguese) system. The humid heat sterilization (autoclaving) of the TCA showed significant degradation of free gossypol, however, there were still considerable levels of residual GL in the biomass. The six macrofungus presented capacity to reduce up to 90% of the residual value of GL in autoclaved TCA. *Pleurotus ostreatus* CC389 was chosen from among the six macrofungus to determination of biological efficiency and productivity of edible mushrooms. It was also analyzed the enzymatic activities and degradation of GL in post-harvested mushroom biomass (SMS, Spent Mushroom Substrate). *P. ostreatus* CC389, when cultured in TCA as a substrate for 20 days, secreted lignolytic enzymes such as laccase (up to 166.67 IU/mL) and manganese peroxidase (up to 12.81 IU/mL). It also degraded the residual GL by up to 94% at the end of the cultivation period. The activity of manganese peroxidase showed correlation with the degradation of GL. Mushroom productivity of *P. ostreatus* CC389 was approximately 20% in four different substrate formulations based on TCA (70%) mixed with 30% of different lignocellulosic biomass sources. The biological efficiency was higher when *P. ostreatus* CC389 was cultured in substrate containing TCA and eucalyptus sawdust (up to 67%). The SMS and the mushrooms obtained at the end of the *P. ostreatus* CC389 cultivation in the different formulations presented reduction of GL up to 99%. The results obtained with *P. ostreatus* CC 389 assays for degradation of GL in TCA and when enriched with other lignocellulosic biomass sources could represent an interesting link for the integration of biofuels (biodiesel), fungiculture (edible mushrooms) and animal nutrition (inputs - enzymes, bioactive molecules, nutritional sources - crude protein) production chains.

Keywords: Gossypol; Mushrooms; *Pleurotus ostreatus*; Cotton.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS USANDO ÁLCOOL.....	18
FIGURA 2. LOCALIZAÇÃO DAS UNIDADES PRODUTORAS DE BIODIESEL, DISTRIBUIÇÃO DO SELO COMBUSTÍVEL SOCIAL E CAPACIDADE DE PRODUÇÃO INSTALADA DE ACORDO COM AS REGIÕES BRASILEIRAS.....	19
FIGURA 3. EVOLUÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS USADAS NA PRODUÇÃO DO BIODIESEL, DURANTES OS ANOS DE 2008 ATÉ NOVEMBRO DE 2016.....	20
FIGURA 4. SISTEMA AGROINDUSTRIAL (SAG) COMO DEMOSTRATIVO DE PRODUTOS DA CADEIA DO PRODUTIVA DO ALGODÃO COM RESPECTIVOS ELOS/ATORES.....	24
FIGURA 5. MAIORES PRODUTORES MUNDIAIS DE ALGODÃO. SAFRA 2016/2017.....	25
FIGURA 6. PRODUÇÃO MUNDIAL DE ALGODÃO (ENTRE OS CINCO MAIORES PRODUTORES) EM T x1.000.000.	25
FIGURA 7. MAPA DO BRASIL INDICANDO AS PRINCIPAIS REGIÕES QUANTO A PRODUÇÃO DE ALGODÃO..	26
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO GOSSIPOL.....	28
FIGURA 9. FILOGENIA E CLASSIFICAÇÃO DOS FUNGOS. BASAL FUNGI E DIKARIA. A DISTÂNCIA ENTRE APRESENTADAS NO ESQUEMA NÃO SÃO PROPORCIONAIS A DISTÂNCIA GENÉTICA.....	33
FIGURA 10. UM MODELO PIRAMIDAL DE USOS DE COGUMELOS (FUNGICULTURA INDUSTRIAL).	36
FIGURA 11. RESUMO DAS ATIVIDADES EXPERIMENTAIS REALIZADA JUNTO AOS MACROFUNGOS COM POTENCIAL DEGRADADOR DE GOSSIPOL LIVRE EM TORTA DE SEMENTE DE ALGODÃO.	42
FIGURA 12. DIFERENTES CRESCIMENTOS DOS MACROFUNGOS EM MEIO DE CULTIVO ATCA APÓS 7 DIAS..	60
FIGURA 13. CRESCIMENTO MICELIAL DOS MACROFUNGOS (MM/DIA) EM PLACA DE PETRI (90 MM) CONTENDO MEIO DE CULTIVO ÁGAR ENRIQUECIDO COM TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO (10%) – ATCA-10).	60
FIGURA 14. ILUSTRAÇÕES DO CULTIVO DOS MACROFUNGOS EM FERMENTAÇÃO ESTADO SÓLIDO CONTENDO 100% TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO (TCA-100) DURANTE 20 DIAS A 28°C.....	61
FIGURA 15. CRESCIMENTO MICELIAL DOS MACROFUNGOS (MM/DIA) EM FRASCOS DE VIDRO (250 mL) CONTENDO COMO MEIO CULTIVO SOMENTE TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO (100%) – TCA-100).....	622

FIGURA 16. DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL LIVRE (GL) POR ESTIRPES DE MACROFUNGOS DURANTE 20 DIAS DE CULTIVO POR FERMENTAÇÃO ESTADO SÓLIDO CONTENDO APENAS TORTA CAROÇO DE ALGODÃO COMO FONTE DE SUBSTRATO (TCA-100).	63
FIGURA 17. PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL LIVRE (GL) VERSUS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LIGNINASES (LACASE - LAC E MANGANÊS PEROXIDASE - MNP) OBTIDOS NO CULTIVO DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> CC389 QUANDO CULTIVADO FES EM TCA-100%....	65
FIGURA 18. PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL LIVRE (GL) VERSUS ATIVIDADE ENZIMÁTICAS DE XILANASE (HEMICELULASE) OBTIDOS NO CULTIVO DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> CC389 QUANDO CULTIVADO FES EM TCA-100%.	67
FIGURA 19. PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL LIVRE (GL) VERSUS ATIVIDADE ENZIMÁTICAS DE CELULASES (FPASE, CMCASE E BETA-GLICOSIDASE) OBTIDOS NO CULTIVO DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> CC389 QUANDO CULTIVADO FES EM TCA-100%.....	67
FIGURA 20. EFICIÊNCIA BIOLÓGICA (EB) E PRODUTIVIDADE (P) OBTIDA DURANTE O CULTIVO AXÊNICO DE COGUMELOS DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> CC389 EM SUBSTRATOS CONTENDO TCA (70%) E OUTRAS FONTES LIGNOCELULÓSICAS (30%).....	70
FIGURA 21. DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL LIVRE POR <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> CC389 NAS DIFERENTES FASES DE CULTIVO: <i>GRÁFICO SUPERIOR</i> - SUBSTRATOS (AUTOCLAVADOS), SMSS; E, <i>GRAFICO INFERIOR</i> - COGUMELOS COLHIDOS.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: VALORES MÉDIOS DE GOSSIPOL EM SUBPRODUTOS DE SEMENTE/CAROÇO DE ALGODÃO.	29
TABELA 2: PRODUÇÃO ANUAL DE COGUMELOS COMESTÍVEIS NO BRASIL	38
TABELA 3: MACROFUNGOS FORMADORES DE COGUMELOS COMESTÍVEIS UTILIZADOS NOS CULTIVOS POR FERMENTAÇÃO ESTADO SÓLIDO (FES) UTILIZANDO TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO COMO SUBSTRATOS.....	42
TABELA 4. MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE AS VARIÁVEIS PRODUÇÕES DE ENZIMAS OXIDATIVAS: LACASE (LAC), MANGANÊS PEROXIDASE (MNP) E DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL LIVRE POR AÇÃO DO MACROFUNGO <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> CC389, QUANDO CULTIVADO FES EM TCA-100%.	65
TABELA 5. MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE AS VARIÁVEIS PRODUÇÕES DE ENZIMAS HOLOCELULASES (FPASE, CMCASE, BETA-GLICOSIDASE E XILANASE) E DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL LIVRE POR AÇÃO DO MACROFUNGO <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> CC389, QUANDO CULTIVADO FES EM TCA-100%.	68
TABELA 6: ANÁLISE BROMATOLÓGICA DOS SUBSTRATOS (PÓS-ESTERILIZAÇÃO EM AUTOCLAVE) E SMS (BIOMASSA PÓS-COLHEITA DOS COGUMELOS) NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES PREPARADAS PARA CULTIVO DO <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> CC389 EM TCA (70%) ENRIQUECIDA COM OUTRAS FONTES LIGNOCELULÓSICAS (30%).....	70
TABELA 7: ANÁLISE BROMATOLÓGICA DOS COGUMELOS COLHIDOS DE <i>P. OSTREATUS</i> CC 389 QUANDO CULTIVADOS NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SUBSTRATOS COM TCA (70%) ENRIQUECIDA COM OUTRAS FONTES LIGNOCELULÓSICAS (30%).	70

LISTA DE ABREVIATURAS

aw – Atividade de água
ATCA – Agar Torta de Algodão
BDA – Batata dextrose ágar
CA – Caroço ou semente de algodão
C/N – Relação carbono nitrogênio
CMC – carboximetilcelulose
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
DNS – Ácido 3,5 dinitrosalicílico
EB – Eficiência biológica
FES – Fermentação em estado sólido
FS – Fermentação submersa
GL – Gossipol livre
IEA – Índice enzimático de atividade
Lac – Lacase
LiP – Lignina peroxidase
mg – Miligramas
mL – Mililitros
mm – Milímetros
mM – Milimolar
MnP – Manganês peroxidase
nm – Nanômetro
rpm – Rotação por minuto
SAG – Sistema Agroindustrial
SDs – Suplementos dietéticos
TCA – Torta de caroço de algodão
UI – Unidade internacional
WRF – inglês “*White rot fungi*”, tradução livre: fungo de podridão branca
 μ L – Microlitros

SUMÁRIO

ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
SUMÁRIO	XII
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL – ASPECTOS GERAIS	18
3.2 PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE OLEAGINOSAS E GERAÇÃO DE COPRODUTOS.	20
3.3 ALGODÃO: CADEIA DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS.....	21
3.4 COTONICULTURA E COPRODUTOS: CAROÇO, FARELO/TORTA DE ALGODÃO.....	26
3.5 CARACTERÍSTICAS DO GOSSIPOL.....	27
3.6 TRATAMENTOS PARA DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL.....	30
3.7 MACROFUNGOS.....	32
3.8 PRODUÇÃO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS.....	35
3.9 BIOMASSA RESIDUAL PÓS-COLHEITA DE COGUMELOS OU <i>SPENT MUSHROOM</i> <i>SUBSTRATE</i> (SMS).	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DA COLEÇÃO DOS MACROFUNGOS (BASIDIOMICETOS).....	42
4.2 PRODUTOS QUÍMICOS	51
4.3 SUBSTRATOS PARA CULTIVO DOS MACROFUNGOS.....	51
4.4 TRIAGEM: CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DOS MACROFUNGOS EM MEIOS COM TCA	52
4.5 MACROFUNGOS CAPAZES DE DEGRADAR GOSSIPOL EM TCA.....	52
4.6 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS TEORES GOSSIPOL LIVRE – TCA	53
4.7 CURVA DE DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL LIVRE X ENZIMAS DO <i>P. OSTREATUS</i> CC389	53
4.8 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	54
4.8.1 <i>Lacase e Manganês Peroxidase</i>	54
4.8.2 <i>Xilanase, Carboximetilcelulase (CmCase), FPase e β-glicosidase</i>	55

4.9 PRODUÇÃO DO COGUMELO <i>P.OSTREATUS</i> CC389 EM SUBSTRATO CONTENDO TCA E OUTROS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	55
4.9.1 Preparo do inóculo ou semente (<i>Spawn</i>)	55
4.9.2 Preparo dos substratos para o cultivo cogumelos de <i>P. ostreatus</i> CC389.....	56
4.9.3 Eficiência Biológica (<i>EB</i>) e Produtividade (<i>P</i>) – Cultivo de <i>P. ostreatus</i> CC389.....	56
4.10 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS.....	57
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
5. RESULTADOS	59
5.1 CRESCIMENTO MICELIAL: SELEÇÃO DE MACROFUNGOS EM CULTIVO COM ÁGAR ENRIQUECIDO COM TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO.....	59
5.2 CRESCIMENTO MICELIAL: SELEÇÃO DE MACROFUNGOS EM CULTIVO COM TCA-100. ..	61
5.3 MACROFUNGOS DEGRADADORES DE GOSSIPOL LIVRE EM TCA	62
5.4 <i>PLEUROTUSOSTREATUS</i> CC389: CINÉTICA DE DEGRAÇÃO DO GL E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM CULTIVO COM TCA-100.	64
5.5 CULTIVO DE COGUMELOS DE <i>P. OSTREATUS</i> CC389 EM SUBSTRATOS DE TCA ENRIQUECIDOS COM OUTRAS FONTES LIGNOCELULÓSICAS	69
5.5.1 Eficiência biológica (<i>EB</i>) e Produtividade (<i>P</i>).....	69
5.5.2 Análises bromatológicas dos cogumelos e <i>SMS</i>	70
5.6 ANÁLISE GOSSIPOL LIVRE (GL): FORMULAÇÕES DE SUBSTRATOS, COGUMELOS E <i>SMSs</i> – <i>PLEUTORUS OSTREATUS</i> CC389	74
6. DISCUSSÃO	76
7. CONCLUSÃO.....	80
8. REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

Um dos temas prementes na agenda mundial é o aquecimento global (“efeito estufa”), o qual está diretamente relacionado com o excesso de emissões de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera (MATTEI, 2010). Grande parte do excesso de CO₂ à nível mundial tem sua origem no aumento da população urbana, que eleva as necessidades por suprimentos energéticos (MATTEI, 2010; FERREIRA; OLIVEIRA, 2016). Entre os setores que mais emitem gases poluentes por fontes de carbono está o dos transportes, que gera bilhões de toneladas de emissões de CO₂ todos os anos (FERREIRA; OLIVEIRA, 2016). No Brasil, de acordo com a ANFAVEA (Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores), em abril de 2017 foram licenciadas 156,6 mil novas unidades de autoveículos.

As tendências mundiais mostram que nas próximas décadas o consumo de energia irá aumentar e como consequência há a necessidade de ampliação das capacidades de produção (CAR, 2016). Para que a dependência por recursos naturais não-renováveis não agrave ainda mais a situação climática, é primordial uma reorientação tecnológica com relação as matrizes energéticas e suas matérias-primas em prol de recursos renováveis e autossustentáveis (MATTEI, 2010; ODERICH, 2013).

Acompanhando essas questões energéticas e de meio ambiente, governos, empresas públicas e privadas em parceria com a classe científica mundial vêm tentando identificar possíveis alternativas que sejam econômica e ambientalmente viáveis (ODERICH, 2013). Deste modo, o setor de biocombustíveis é vislumbrado como alternativa viável e autossustentável para a substituição parcial do petróleo e consequente redução das emissões dos gases de efeito estufa (LEITE; LEAL, 2007).

Neste contexto de aumento de demanda por energia, as alternativas energéticas renováveis como as matrizes de biomassa vegetal estão entre as melhores possibilidades e a disposição. As biomassas vegetais podem ser transformadas em insumos para obtenção de biocombustíveis como bioetanol (carboidratos) e o biodiesel (lipídeos).

As sementes oleaginosas da soja e algodão são fontes importantes para obtenção de óleos e por conseguinte fonte para produção de biodiesel no Brasil.

Entretanto, os processos de obtenção de tais óleos geram subprodutos, como tortas/farelos (porção sólida) que podem ser destinados ao mercado de nutrição animal como fonte de proteína, lipídeos e carboidratos. A comercialização destes farelos/tortas para a nutrição animal é essencial para o equilíbrio econômico da cadeia produtiva das indústrias de extração de óleos vegetais. Além disso, há outros resíduos/subprodutos gerados durante o processamento de óleos vegetais e animais na produção de biodiesel, tais como borras e glicerina. Essas biomassas residuais podem servir como matérias-primas para a criação de novos produtos biotecnológicos (SALLET; ALVIM, 2011).

No Brasil, tanto o governo como o empresariado apresentam otimismo quanto a projetos relacionados com a produção de biocombustíveis a partir de tais fontes vegetais. As observações de oportunidades estão voltadas principalmente na possibilidade de diversificação da matriz vegetal para produção óleo/biodiesel em função das particularidades de solo/clima de cada região do país; como também com a proximidade do mercado de nutrição animal, por exemplo, que é um ávido consumidor de tortas/farelos de sementes oleaginosas.

Neste cenário de integração de cadeias produtivas, a fungicultura (cogumelos comestíveis) tem potencial para ser mais um elo entre a produção de biodiesel e a indústria de insumos para ração animal. Os macrofungos formadores de cogumelos comestíveis podem agregar valor aos coprodutos/resíduos da cadeia de produção de algodão tais como tortas/farelos, cascas de sementes, resíduos da fiação e etc. Estes coprodutos/resíduos seriam usados como substrato na fungicultura, gerando os corpos de frutificação (cogumelos comestíveis) e a biomassa pós-colheita de cogumelos (SMS, inglês *Spent Mushroom Substrate*).

O SMS é uma mistura de biomassa microbiana/fungo e biomassa lignocelulósica, porém parcialmente desconstruída, que por sua vez pode ser destinado ao setor de nutrição animal, por exemplo. SMSs oriundos de fungicultura que fazem uso de coprodutos/resíduos da cotonicultura poderão apresentar características de interesse para nutrição animal tais como: maior digestibilidade (deslignificação-lignina e despolimerização-celulose), destoxificação, maior concentração de proteína (fungica e vegetal) e composição satisfatória de aminoácidos; além de substâncias bioativas (metabólitos fúngicos) que podem trazer benefícios a sanidade animal.

Desta forma, as informações contidas nesse manuscrito foram estruturadas em dois capítulos que vislumbram as possibilidades a integrar a cadeia da fungicultura aos segmentos industriais da conotonicultura. O primeiro capítulo consiste na descrição da revisão de literatura sobre a importância da cultura de algodão no cenário agroindustrial brasileiro e a fungicultura para produção de cogumelos comestíveis. O segundo capítulo descreve os resultados obtidos das experimentações utilizando macrofungos como agentes degradadores de gossipol livre e a produção de cogumelos comestíveis utilizando TCA em conjunto com outras biomassas lignocelulósicas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de macrofungos-basidiomicetos em degradar gossipol livre quando cultivados por fermentação estado sólido em substratos formulados com torta do caroço de algodão previamente estelizados por autoclavagem.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- OE1: Selecionar estirpes de macrofungos formadores de cogumelos comestíveis capazes de degradar gossipol livre (GL), quando cultivados em fermentação estado sólido em meios de cultura contendo torta de caroço de algodão (TCA);
- OE2: Avaliar a eficiência biológica e produtividade de *Pleurotus ostreatus* CC389 quando cultivado em diferentes condições de preparo de substratos contendo torta de algodão (TCA).
- OE3: Avaliar as atividades de enzimas ligno-celulolíticas durante o cultivo de *Pleurotus ostreatus* CC389 quando cultivado em substratos a base de torta de caroço de algodão (TCA).
- OE4: Determinar os teores de gossipol nos substratos pós-colheita de cogumelos e cogumelos do *Pleurotus ostreatus* CC389.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL – ASPECTOS GERAIS

O biodiesel é um combustível produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias-primas como óleos ou gorduras de origem vegetal e animal, respectivamente. Este combustível deve ser composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, conforme à especificação contida no Regulamento Técnico nº 3/2014, parte integrante da Resolução ANP nº 45, de 25 de agosto de 2014 (ANP, 2017).

A transesterificação de óleos de origem vegetal (soja, dendê, mamona, amendoim, palma, etc.) ou animal (sebos e gorduras) ocorre quando triglicerídeos contidos nestas fontes reagem com um álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador ácido ou básico. Esta reação produzirá uma mistura de ésteres monoalquílicos (biodiesel) e glicerol (Figura 1). O glicerol/glicerina é um dos subprodutos do beneficiamento de óleos em biodiesel.

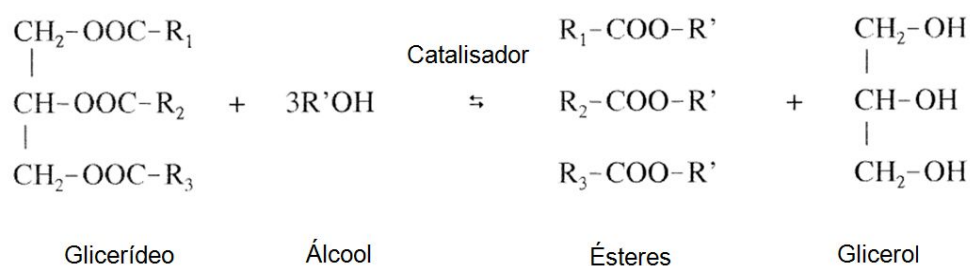


Figura 1. Reação de transesterificação de triglicerídeos usando álcool (MA e HANNA, 1999)

O Brasil atua na vanguarda, juntamente com outros países, no processo de diversificação da matriz energética. Os esforços têm sido feitos para a inclusão gradativa de biodiesel ao diesel ao longo dos últimos anos. Um exemplo deste esforço foi o lançamento, em dezembro de 2004, do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB). O PNPB tem como eixo a implantação e produção de biodiesel,

de forma a gerar impactos positivos e sustentáveis economicamente por meio do desenvolvimento regional (BRASIL, 2004).

De acordo com a ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2017), no ano de 2016, havia 48 unidades de usinas aptas a operar comercialmente o biodiesel no País; sendo que 37 unidades (92%) eram detentoras do Selo Combustível Social (Figura 2).

Biodiesel: Localização das Unidades Produtoras

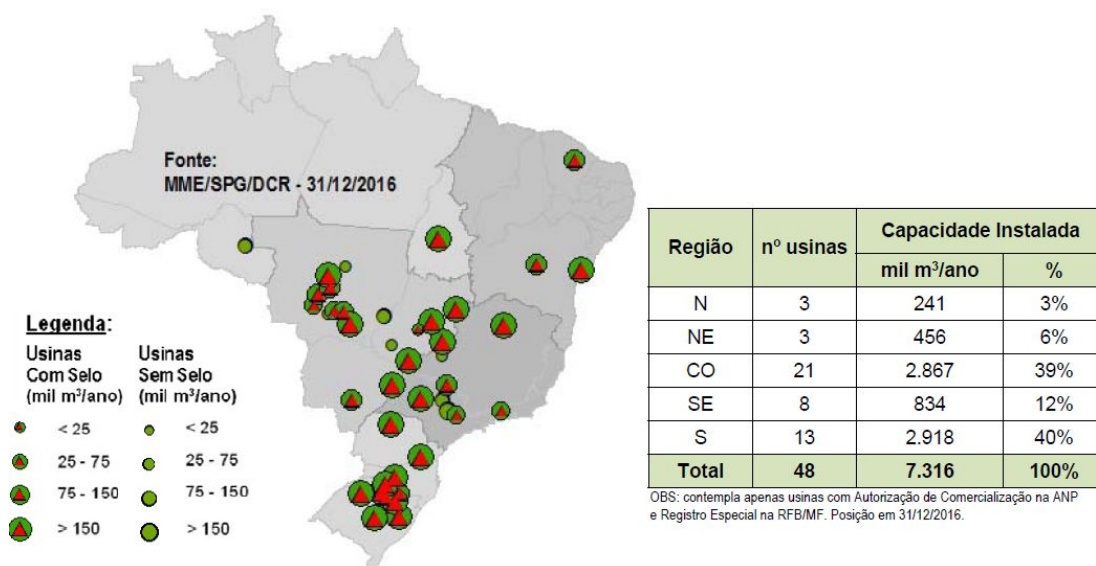


Figura 2. Localização das unidades produtoras de biodiesel, distribuição do Selo Combustível Social e capacidade de produção instalada de acordo com as regiões brasileiras. Fonte: ANP n. 107/2017.

Em janeiro de 2005 foi fixada a Lei 11.097/2005 que dispôs sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Foram criadas metas obrigatórias para adição de biodiesel ao diesel, de forma proporcional e sucessiva ao longo dos anos. Também foram criados incentivos à inclusão da agricultura familiar na cadeia produtiva do biodiesel (CONCEIÇÃO *et al.*, 2015).

A produção e distribuição de biodiesel estão concentradas nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste, alcançando mais de 92% (Figura 2). Em relação à localização pelo território brasileiro das unidades aptas a operarem comercialmente, 91% se concentram nessas mesmas regiões, que juntas detiveram quase a totalidade de capacidade instalada de produção no ano de 2016. Quanto aos Estados, o Rio

Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso e São Paulo são hoje os maiores produtores (MME, 2016; ANP, 2017).

As principais oleaginosas utilizadas no Brasil como matérias-primas para produção de biodiesel são: soja, girassol, palma-dendê, mamona, amendoim, algodão, óleo e gorduras residuais como o sebo animal. O PNPB é basicamente dependente de matéria-prima vegetal, tendo a soja como sua principal fonte para produção do biodiesel (CÉSAR; BATALHA, 2013; EPE, 2014; MME, 2015).

No ano de 2016, a participação das três principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel foi de 77,1 % de soja, 15,5 % de gordura bovina e 1,0% de algodão (Figura 3). Em relação à distribuição regional da produção, a região Sul apresentou 40%, seguido de perto pelo Centro-oeste com 39%. As demais regiões representam 6%, Nordeste; 12% Sudeste e 3 % Norte de produção de biodiesel (ANP, 2017).

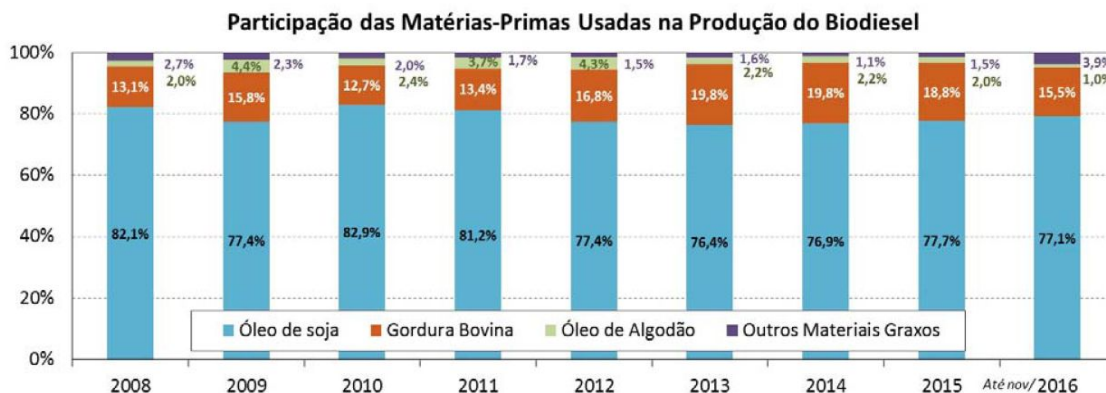


Figura 3. Evolução da participação das matérias-primas usadas na produção do biodiesel, durante os anos de 2008 até novembro de 2016. Fonte: ANP n. 107/2017.

3.2 PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE OLEAGINOSAS E GERAÇÃO DE COPRODUTOS.

Desde 2005, a produção de biodiesel no Brasil tem aumentado, sendo que o nível de adição do biodiesel de 10% ao diesel foi antecipado para março de 2018 (ANP, 2017). À medida que essa produção de biodiesel se intensifica, também aumenta a quantidade de coprodutos e resíduos gerados, fomentando assim a busca por aplicabilidades de tais biomassas residuais (VIANNA *et al.*, 2016).

Os coprodutos/resíduos da cadeia de biodiesel são fontes potenciais para geração de produtos biotecnológicos, agregando valores econômicos na cadeia produtiva. O beneficiamento da soja para biodiesel gera ou um farelo ou uma torta (dependendo do método de extração). Este coproduto já possui valor agregado em função da concentração de proteína total, de aproximadamente 45%. O farelo de soja apresenta demanda crescente para atender a indústria de nutrição animal, tanto para monogástrico como poligástrico (ruminantes) (TIBURCIO, 2011; RODRIGUES; RONDINA, 2013).

O caroço ou semente de algodão (CA) é a segunda oleaginosa mais usada para produção do biodiesel no Brasil. Da mesma forma que a soja, após extração/prensagem do CA gera-se a torta/farelo de caroço de algodão (TCA). De acordo com Carneiro et al. (2007), este coproduto é aproveitado principalmente para a alimentação de animais ruminantes. Além da soja e algodão, outras oleaginosas (em menor proporção) são utilizadas ou estudadas como potenciais fontes para fomentar e diversificar a matriz geradora de biodiesel. Neste contexto, tem-se uma lista de culturas com tais potenciais, como: amendoim, babaçu, canola, dendê, gergelim, girassol, mamona, nabo forrageiro, macaúba e o pinhão-manso (ABDALLA et al., 2008; FAVARO; MIRANDA, 2013).

Todas essas culturas vegetais geram coprodutos quando do processo de extração de óleos para biodiesel, que na maioria das vezes podem ser utilizados na nutrição animal. A torta/farelo de caroço de algodão tem grande potencial de utilização na alimentação animal, uma vez que o Brasil é dos principais produtores de algodão e também grande produtor de animais como fonte de nutrição humana. No entanto, se faz necessário conhecer as suas composições e níveis de inserção nos formulados para nutrição animal, uma vez que a TCA apresenta substâncias tóxicas ou fatores antinutricionais, como é caso do gossipol, principalmente para animais monogástricos (BONFIM et al., 2007). A ampliação do mercado de TCA poderá ocorrer, desde que seja estabelecido processos de destoxificação e melhoria da digestibilidade para animais, tais como suínos, aves e peixes.

3.3 ALGODÃO: CADEIA DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS

De acordo com a AMPA - Associação Matrogrossense de Produção de Algodão (2017), a palavra algodão deriva de *al-quTum* da língua árabe, que gerou os

vocábulos *cotton* (inglês); *coton* (francês); *cotone* (italiano); *algodón* (espanhol) e algodão (português).

A cultura do algodão é uma das atividades agrícolas mais antigas na história da humanidade. Em relação a sua origem há divergência na literatura: alguns a situam no continente americano, outros na África Central, outros afirmam ter origem no Paquistão ou Índia (LUNARDON, 2007). A AMPA (2017) descreve que a domesticação do algodoeiro ocorreu há mais de 4.000 a.C no sul da Arábia. Mas, há também registros de suas utilizações em 4.500 a.C pelos Incas no Peru. As primeiras confecções de tecidos de algodão na China datam de 2.200 a.C. Independente das origens de domesticação, o fato é que o algodão sempre esteve entre as principais matérias-primas para confecção de têxteis.

No Brasil, dados históricos mostram que os indígenas já manipulavam fibras de algodão antes da chegada dos portugueses em 1500. A exploração comercial das plumas de algodão teve início no século XVIII, inicialmente na região Nordeste. Em 1760, as fibras têxteis de algodão já faziam parte dos produtos que eram exportados para a Europa (AMPA, 2017). Deste modo, o Brasil tem sido um dos celeiros mundiais na produção de algodão; e conseqüentemente fonte de muitos estudos desde a cultura agrícola (variedades resistentes a pragas e doenças) até o beneficiamento dos fios e sementes (óleo e torta).

Algodoeiro é o nome popular dado às plantas pertencentes ao gênero *Gossypium* da família Malvaceae. Esse gênero apresenta 50 espécies distribuídas nos continentes: Ásia, África, Oceania e América. No entanto, o algodoeiro possui quatro espécies cultivadas; as demais são espécies silvestres que até então não apresentam valor econômico. As espécies cultivadas em vários países para fins econômicos são: *Gossypium arboreum* L., *Gossypium herbaceum* L., *Gossypium barbadense* L., e *Gossypium hirsutum* L., (CARVALHO, 2013). A espécie *G. hirsutum* L. é considerada uma das principais espécies domesticadas pelo homem entre as mais de 230 mil espécies de plantas superiores (QUEIROZ, 2017).

Gossypium hirsutum L. é a principal espécie produzida no Brasil e no mundo (90% da produção mundial) (FREIRE *et al.*, 2002). No Brasil, a espécie cultivada comercialmente é o *G. hirsutum*, em que a variedade *latifolium Hutch* é a produzida em maior escala (FREIRE, 2000). De acordo com a ABRAPA - Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, esta planta está entre as mais importantes culturas de

fibras do mundo. Anualmente são cultivados em média, 35 milhões de hectares. Segundo Lunardon (2007), apesar ser cultivado em mais de 60 países nos cinco continentes, sua produção está concentrada em poucos países; dos quais seis são responsáveis por mais de 75% da produção global.

Henrique e Laca-Buendia (2010) *apud* Queiroz (2017) relataram que o algodoeiro é a única espécie domesticada que apresenta termos econômicos como trina, ou seja, produção de fibra-fio (principal produto), óleo (semente) e produção de energia alimentar (torta). A integração de diferentes segmentos industriais ocorre pela sua utilização na fiação e tecelagem (indústria têxtil), nutrição animal (farelo/tortas), nutrição humana (óleos), cosméticos, farmacêutica, celulose e biocombustíveis (biodiesel). Assim, a cotonicultura apresenta um variado número de produtos primários e secundários, compondo uma cadeia produtiva bastante complexa (BARBOSA, 2016).

O dinamismo e complexidade da cadeia de algodão brasileiro pode ser observado no fluxograma (Figura 4), produzido pela ABRAPA (2011) com intuito de detalhar as contribuições do setor e demais elos e atores, que juntos formam o Sistema Agroindustrial (SAG). De acordo com este documento, o SAG do algodão destaca diferentes atores em variadas formas de relacionamento; desde compras no mercado *spot* até a integração de atividades fins. Dessa maneira, as formas de remunerações resultantes acabam por interferir de o preço dos insumos até os tributos recolhidos. Para melhor exposição, o SAG do Algodão é detalhado nas suas três divisões básicas: (1) antes da fazenda, (2) na fazenda e (3) depois da fazenda. Deste modo, pode-se observar a versatilidade de transformações da matéria-prima nos mais diferentes produtos desta cadeia, tais como: pluma, fibrilha, caroço, farelo-torta, óleo vegetal e línter.

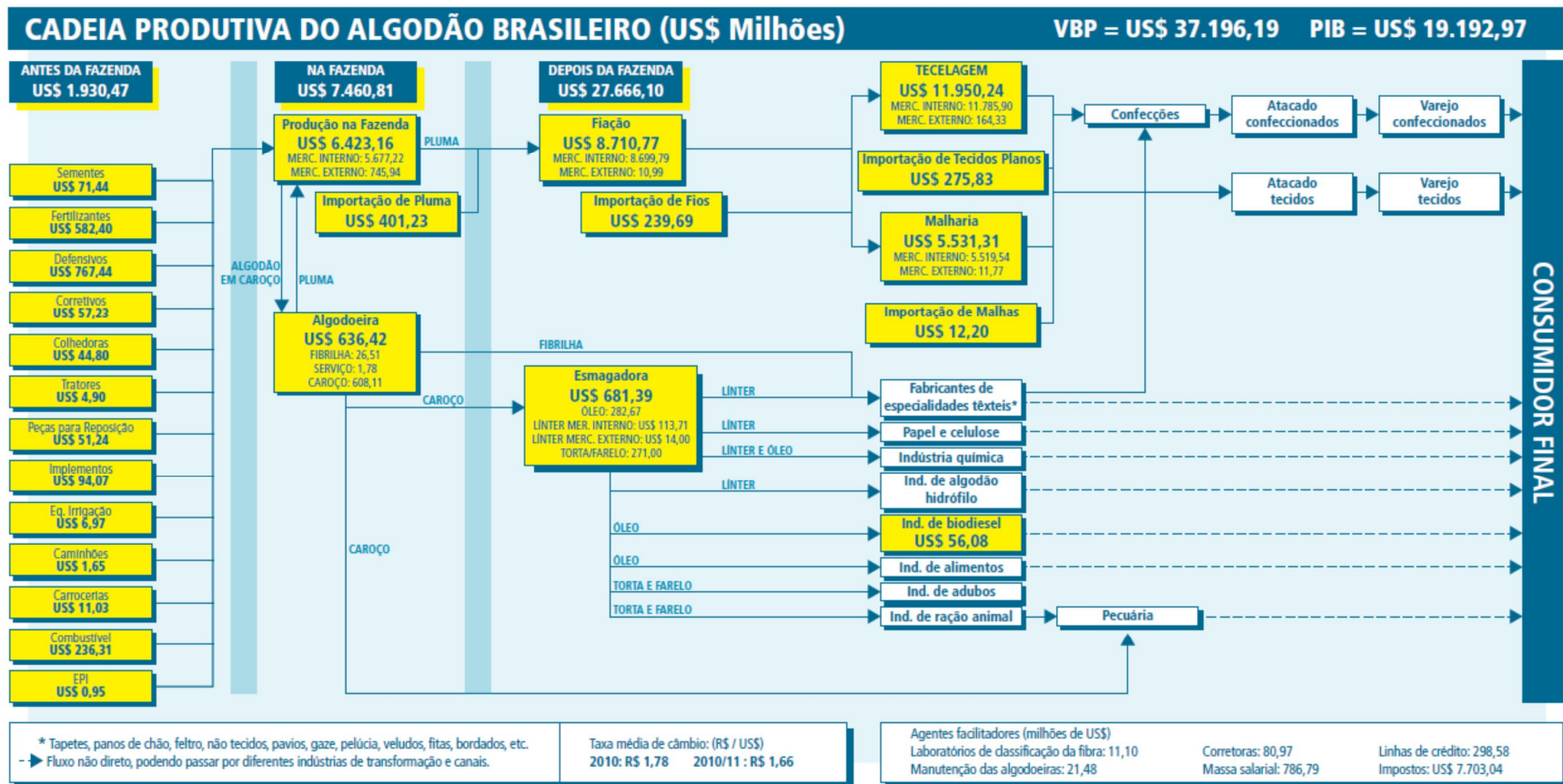


Figura 4. Sistema Agroindustrial (SAG) como demonstrativo de produtos da cadeia do produtiva do algodão com respectivos elos/atores (ABRAPA, 2011).

Segundo Meyer (2017) citando o USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e a CONAB (2017), os cinco maiores produtores de algodão são: Índia, China, Estados Unidos, Paquistão e Brasil(Figura 5).

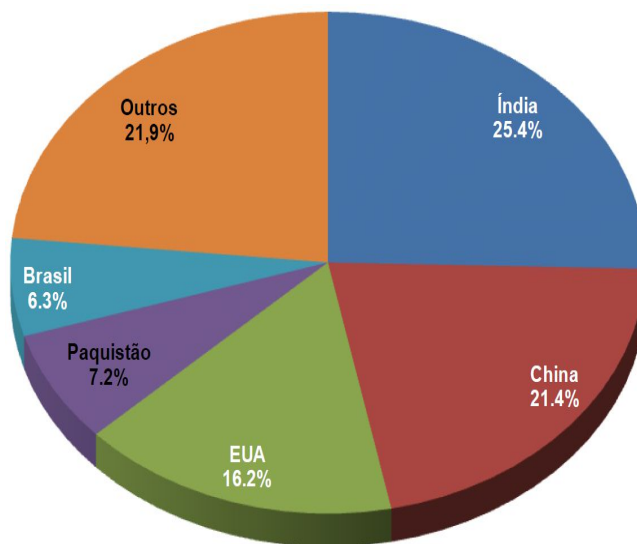


Figura 5. Maiores produtores mundiais de algodão. Safra 2016/2017 (Fonte: CONAB, 2017;MEYER, 2017).

Na figura 6 são apresentados os números da produção de algodão (ton x1.000.000) dos cinco primeiros países, na Safra de 2016. A Índia apresentou uma produção total de 5.746; seguido pela China (4.753), Estados Unidos (2.806), Paquistão (1.910), e o Brasil (1.447).

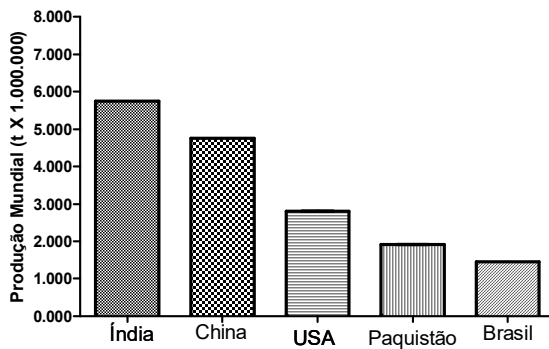


Figura 6. Produção mundial de algodão (entre os cinco maiores produtores) em t x1.000.000 (Fonte: CONAB, BRADESCO, 2017).

Segundo a CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2017), as regiões Centro-oeste e Nordeste do Brasil são as maiores produtoras de algodão. Os Estados de Mato Grosso e Bahia são os maiores representantes, seguidos por outros Estados como Mato Grosso do Sul, Goiás e Maranhão (Figura 7).

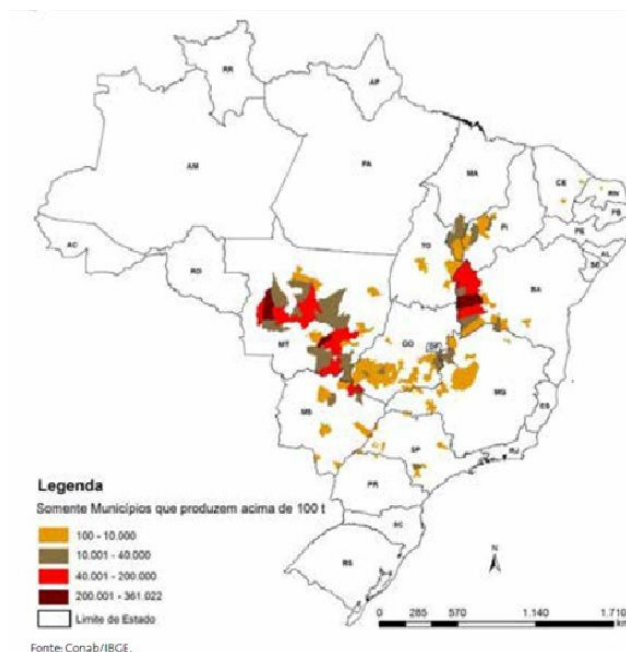


Figura 7. Mapa do Brasil indicando as principais regiões quanto a produção de algodão. (Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento- CONAB, 2017).

Cabe ressaltar que os pequenos produtores, inseridos no contexto da agricultura familiar, representam um segmento muito importante na produção do algodão no cenário nacional (DUPRAT; SOUZA, 2003). No Nordeste, por exemplo, a maioria das lavouras de algodão não ultrapassam os 5 hectares, inclusive fazendo uso de variedades de algodão colorido e orgânico, fomentando a busca por um desenvolvimento sustentável no setor agrícola da região (CALIXTO *et al.*, 2014).

3.4 COTONICULTURA E COPRODUTOS: CAROÇO, FARELO/TORTA DE ALGODÃO.

De acordo com o DESER - Departamento de Estudos Sócio-Econômicos Rurais (2007), durante o processo produtivo e de beneficiamentos do algodão são obtidos diversos subprodutos que apresentam grande importância econômica. O

línter, por exemplo, que é cerca de 10% da semente do algodão, tem aplicações no mercado de papel/celulose, indústria química, entre outras. Outros subprodutos desta cadeia também possuem nichos de mercado estabelecido que são: semente/caroço de algodão, cotendo 15,5% de óleo bruto, com ligação direta com a indústria de biodiesel e alimentação; e torta/farelo destinados a nutrição de ruminantes ou fertilizantes. A cotonicultura apresenta um viés dinâmico, onde se comunica direta ou indiretamente com vários setores, que empregam e/ou fornecem ocupação, desde o campo até a indústria de confecção, conforme fora visto no SAG (Figura 4).

A torta/farelo de caroço de algodão é diferenciada devido ao tipo de extração do óleo da semente. A torta é o subproduto originado da extração do óleo por ação física, normalmente por esmagamento mecânico, que apresentará em média 5% de óleo residual (4,6% Extrato Etéreo-EE), tornando-se mais energético, com menor teor de proteína. O farelo, por sua vez, é obtido por meio de extração química com solvente, gerando assim menos de 2% de óleo residual (2,2% EE), e portanto maior teor de proteína.

A torta ou farelo de algodão têm como mercado principal o setor de nutrição animal, ancorado principalmente nos animais ruminantes (BELTRÃO *et al.*, 2000; NCPA, 2003), em função da capacidade de tolerância a determinados níveis de gossipol (exceto para animais reprodutores). O reaproveitamento dos coprodutos, como torta/farelo, oriundos da extração de óleo vegetal na produção do biodiesel, para alimentação animal fortalece o cunho de cadeia produtiva sustentável, bioeconômica circular. Entretanto, o uso desses subprodutos é limitado à nutrição de animais ruminantes, em função de componentes tóxicos e/ou antinutricionais, como é o caso do gossipol (ARAÚJO *et al.*, 2003; ROMERO, 2013; BARBOSA, 2016).

3.5 CARACTERÍSTICAS DO GOSSIPOL

O gossipol é uma substância química fenólica de cor amarelada produzido em glândulas especializadas localizadas em vários tecidos e partes das plantas do gênero *Gossypium* (cotilédones, folhas, estípulas, caules ramos, frutos, na amêndoa dassementes e raízes). O gossipol é constituído por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio ($C_{30}H_{30}O_8$), com massa molecular de 518,6 daltons e fórmula química estrutural 8,8'-dicarboxaldeído-1,1',6,6',7,7'-hexahidroxi-5,5'-diisopropil-3,3'-dimetil-

2,2'-binaftaleno (Figura 8). Esta substância química faz parte dos mecanismos de defesa natural deste tipo de planta, protegendo-a principalmente contra o ataque de predadores, como os insetos (LIU *et al.*, 2008; GADELHA 2014).

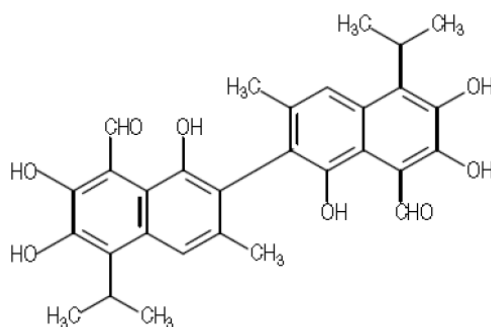


Figura 8. Representação da estrutura química do gossipol (LIU *et al.*, 2008).

O gossipol foi descoberto e isolado na segunda metade do século XIX (LONGMORE, 1886). Desde então, muitos estudos foram desenvolvidos para entender a estrutura, ou, na busca de potenciais aplicações biotecnológicas. XI-WANG *et al.* (2009) fizeram uma revisão sobre as potenciais aplicações do gossipol, tais como: anticâncer, antiviral e antiparasitária. Estes autores também relataram aplicações no controle de fertilidade humana masculina, além de inúmeros exemplos de atividades antimicrobianas, entre outras.

Nas plantas, o gossipol pode ser encontrado na forma livre ou ligada ao grupo amino das proteínas (BENEDICT *et al.*, 2004; ABDURAKHIMOV *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2010). Durante a prensagem das sementes de algodão para a extração do óleo, ocorre o rompimento das glândulas de armazenamento e conseqüentemente a liberação do gossipol, que pode permanecer na sua forma livre ou ligado às proteínas, tanto no óleo como na torta. A maior parte do gossipol se concentra na fase líquida (óleo), que pode variar de acordo com o método de extração. A forma livre de gossipol na torta ou farelo (até 10% do total contido na semente) pode causar efeitos tóxicos agudos em animais monogástricos como suínos e aves, por exemplo (MORGAN, 1989).

Na nutrição animal, o gossipol é descrito como um metabólito secundário da planta do algodoeiro que causa efeitos antinutricionais ou tóxicos, dependendo da concentração ingerida por diferentes tipos de animais ou idade (LIU *et al.*, 2008). De

acordo com Naves e colaboradores (2010) efeitos antinutricionais consistem na capacidade da substância em interferir na digestibilidade e absorção dos nutrientes, enquanto que toxicidade é a capacidade de provocar a morte.

As concentrações de gossipol apresentam variação nas diferentes partes do algodoeiro. Apesar de existirem alguns estudos na literatura internacional descrevendo os efeitos de moléculas bioativas presentes em novas matérias-primas vegetais para produção de biodiesel, no Brasil em particular, praticamente inexistem estudos abrangentes que reportem uma faixa de teor estimado de gossipol, tanto em caroço de algodão quanto em seus coprodutos (ROMERO, 2013).

Segundo Romero (2013), as concentrações de gossipol nas tortas de caroço de algodão apresentam variações de até 66% para amostras obtidas de diferentes locais do Brasil. Porém, os valores estão dentro da faixa de 0,04 a 1,77% citada pela OECD em 2009, que descreveu as variações encontradas em diferentes regiões do globo para a torta de caroço de algodão. Algumas características podem interferir na concentração de gossipol nas plantas e nos subprodutos (torta/oleo), tais como: variedade, condições ambientais de cultivo e armazenamento das sementes (PAIM *et al.*, 2010).

A concentração de gossipol nas sementes de algodão pode chegar a 2% da massa total (EMBRAPA, 2004). Diferentes valores médios de gossipol em subprodutos de algodão podem ser evidenciados na tabela 1. A presença de gossipol em derivados do algodão, principalmente na farinha de sementes, restringe o seu uso para alimentação humana. Entretanto, os produtos derivados da semente de algodão poderão ser utilizados para estes fins desde que sejam tratados, de forma que fique comprovada a destoxificação quanto aos teores de gossipol.

Tabela 1: Valores médios de gossipol em subprodutos de semente/caroço de algodão.

Substância (%)	Farelo de algodão		Caroço de algodão	Casca de algodão
	prensado	solvente		
Gossipol total	1,09	1,16	0,66	0,107
Gossipol livre	0,06	0,14	0,68	0,049

Fonte: Embrapa, 2004

O uso de torta/farelo de algodão em nutrição de ruminantes é uma prática já estabelecida no mercado brasileiro, porém a sua administração ocorre de forma moderada em função de efeitos antinutricionais quando inseridos em maiores quantidades. Para a nutrição de monogástricos a limitação é ainda maior, já que qualquer concentração de torta/farelo resulta em consequências graves à saúde dos animais (KONG *et al.*, 2010), podendo afetar o crescimento; provocar anormalidades nos órgãos reprodutores, infertilidade; e em casos mais severos levar o animal à óbito (EMBRAPA, 2004; ZHANG *et al.* 2007).

De acordo com os regulamentos da FDA (*Food and Drug Administration*), a concentração de gossipol livre em produtos alimentares não deve exceder a 0,045%, ou seja, 450 ppm. De modo similar, outras agências regulamentadoras, tais como *Protein Advisory Group of the United Nations Food and Agriculture* e a *Organization and World Health Organization* (FAO/WHO) estabeleceram limites de gossipol livre de 0,060% (600 ppm), e 1,2% (12.000 ppm) de gossipol total (GT) em produtos destinados ao consumo humano (LIADAKIS *et al.*, 1993). No Brasil, a única referência sobre a regulamentação data de 1988, entanto, a mesma foi revogada (EMBRAPA, 2004), inexistindo regulamentações vigentes no país até o momento.

Tratamentos físicos, químicos e biológicos vêm sendo descritos na literatura com o intuito de destoxificação de TCA para alimentação de monogástricos, no entanto, não há registro de um método eficaz em escala industrial. Faz-se necessário a comprovação de que após o tratamento da TCA, os níveis de gossipol sejam seguros, exigindo, além das análises químicas (métodos analíticos), testes toxicológicos com modelos animais, tais como *Artemia salina* e roedores. Os níveis seguros de inserção de TCA destoxificado são determinados pela ausência de alterações no organismo das cobaias, em testes toxicológicos, tais como: comprometimento das funções hepáticas, a taxa de respiração e a capacidade de transporte de oxigênio pelos eritrócitos (EMBRAPA, 2004).

3.6 TRATAMENTOS PARA DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL

Os métodos para degradação de gossipol livre são diversificados, desde ações biológicas, físicas, químicas ou combinadas.

Tratamentos químicos para TCA podem ser feitos pela adição de sulfato de ferro, óxido ou hidróxido de cálcio em conjunto com ingredientes da dietantricial dos animais; neutralizando os efeitos do gossipol por alcalinizações. No entanto, o uso de sulfato ferroso nas rações é pouco comum, pois onera o custo da produção (NAGALAKSHMI *et al.*, 2002, 2003; EMBRAPA, 2004).

A peletização é outro processamento que contribui para diminuir o potencial de toxicidade do gossipol livre. Este processo físico provoca modificação nas propriedades químicas do gossipol por meio do calor úmido. Porém, este procedimento altera significativamente as características proteicas do TCA, principalmente a disponibilidade do aminoácido lisina. Além disso, a peletização apenas reduz o potencial de toxicidade e não soluciona o problema por completo para o uso em monogástricos (BARBOSA, 2010; MARSIGLIO, 2010; HENRY *et al.*, 2001).

Uma outra ferramenta para a obtenção de TCA atóxico é o melhoramento genético, que fornece variedades de algodoeiro com menores concentrações de gossipol livre, como os “cultivares *glandless*”. Um cultivar sem gossipol livre ou reduzido ampliaria o uso da torta e do farelo na alimentação animal (monogástricos e poligástricos) como também na alimentação humana (ARAÚJO *et al.*, 2003, EMBRAPA, 2004). No entanto, os cultivares não alcançaram o mercado, pois com as alterações feitas ficaram mais susceptíveis a infestação de insetos e outras pragas (STIPANOVIC *et al.*, 1986; LUSAS, JIVIDEN, 1987; EMBRAPA, 2004). Além disso, a sub-expressão ou silenciamento de genes do gossipol envolve o emprego de tecnologias modernas de alto custo, e podem, ainda, resultar em perda de algum fator biológico importante presente nos coprodutos ou na planta (EMBRAPA, 2004).

Os tratamentos biológicos de TCA usando microrganismos vêm ganhando força por meio dos resultados científicos divulgados nos últimos anos. Microrganismos como *Aspergillus oryzae* (LIM; LEE, 2011), *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* (ZHANG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2011) apresentaram resultados positivos na degradação de gossipol livre. Os macrofungos também ganharam destaque nestas ações, incluindo basidiomicetos degradadores de gossipol em meio líquido (RAJARATHNAM *et al.*, 2001).

3.7 MACROFUNGOS

Os fungos são organismos eucariotos que podem ser uni (leveduras) ou multicelulares. São chamados de macrofungos aqueles multicelulares capazes de formar corpos de frutificação ou cogumelos, resultantes de sua reprodução sexuada, e apresentam parede celular composta por quitina, como os demais “fungos verdadeiros”.

Os fungos filamentosos são capazes de formar massas visíveis chamadas micélios, compostas por longos filamentos (hifas) que se ramificam e se entrelaçam. Possuem reprodução sexuada e assexuada e se desenvolvem a partir de esporos ou de fragmentos de hifas. Esses seres são heterotróficos e suas células normalmente obtêm os nutrientes por meio de um processo de absorção de matéria orgânica do ambiente, podendo ser do solo, da água, de um animal ou uma planta. São organismos fundamentais no equilíbrio ecológico de vários ecossistemas (RAVEN, 2001; SILVA; COELHO, 2006; TORTORA; CASE; FUNKE, 2012).

Hibbert *et al.* (2007) propuseram uma classificação filogenética abrangente do reino Fungi, com referência a recentes análises filogenéticas moleculares e com a contribuição de diversos membros da comunidade taxonômica de fungos. De acordo com este grupo de estudo, os organismos do reino Fungi estão classificados em 195 taxons até o nível de ordem, dos quais validaram e descreveram 16: Dikarya subreino nov.; Chytridiomycota, Neocallimastigomycota phyla nov.; Monofefraridomicetos, Neocallimastigomicetos classe. nov.; Eurotiomycetidae, Lecanoromycetidae, Mycocaliciomycetidae subclasse. nov.; Acarosporales, Corticiales, Baeomycetales, Candelariales, Gloeophyllales, Melanosporales, Trechisporales, Umbilicariales ords. nov. O clado que contém Ascomycota e Basidiomycota foi classificado como subclasse Dikarya (Figura 9), refletindo a sinapomorfia putativa das hifas dicarióticas.

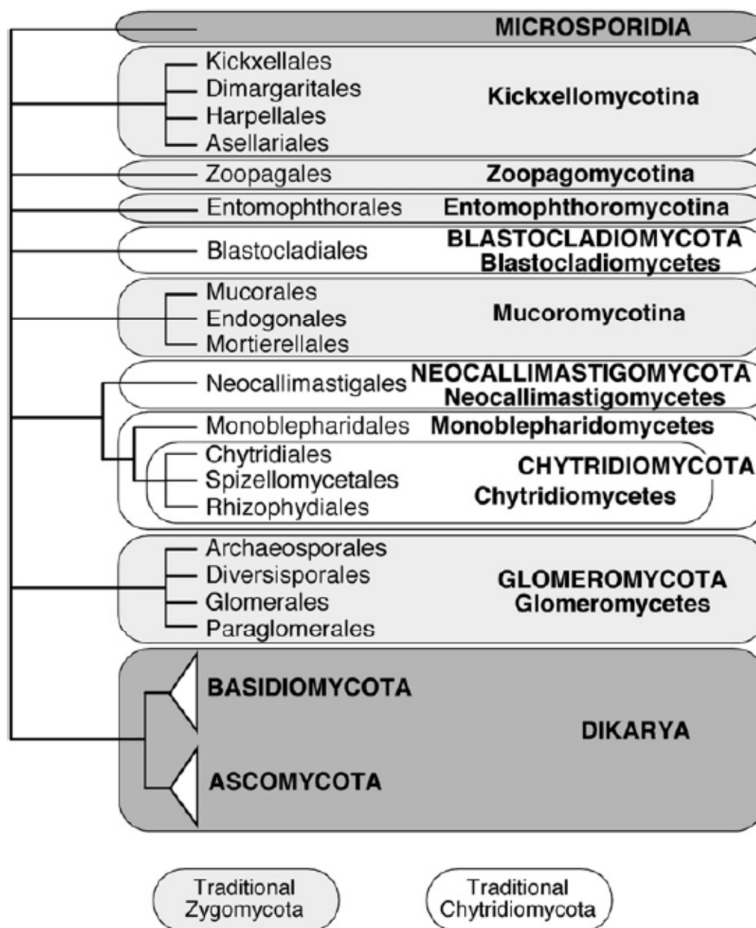


Figura 9. Filogenia e classificação dos fungos. Basal fungi e Dikaria. A distância entre apresentadas no esquema não são proporcionais a distância genética. Fonte: Hibbett et al. (2007).

Hibbett *et al.*, (2007) relataram que as mudanças mais dramáticas na classificação relativa aos trabalhos anteriores diziam respeito aos grupos que tradicionalmente estavam inclusos em Chytridiomycota e Zygomycota. O Chytridiomycota é retido em sentido restrito, com Blastocladiomycota e Neocallimastigomycota buscando segregar phyla de fungos flagelados. Os táxons que tradicionalmente foram colocados em Zygomycota estão distribuídos entre Glomeromycota e vários subfilos “*incertae sedis*”, incluindo Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina e Zoopagomycotina. Microsporidia foi incluída nos Fungos, mas nenhuma subdivisão adicional do grupo foi proposta. Vários gêneros “basais” ou fungos de posição incerta não foram colocados em taxons superiores, incluindo Basidiobolus, Caulochytrium, Olpidium e Rozella.

Os fungos do clado Basidiomycota incluem as espécies conhecidas como cogumelos e orelhas de pau, porém há fungos formadores de corpo de frutificação (cogumelos) no clado Ascomycota. Os macrofungos-basidiomicetos apresentam algumas características tais como a formação de hifas septadas e de basidiósporos, formados externamente em um pedestal conhecido como basídio (TORTORA; CASE; FUNKE, 2012). Esse grupo de fungos é bastante difundido por todo o planeta e talvez seja o mais visualizado na natureza devido a formação dos corpos de frutificação macroscópicos (SILVA; COELHO, 2006).

Dentre os macrofungos-basidiomicetos, várias espécies são degradadoras de madeira e podem crescer e frutificar (formação de cogumelos) em substratos lignocelulósicos em função de sua capacidade de produzir enzimas extracelulares hidrolíticas (AGUIAR; FERRAZ, 2011). Os fungos degradadores de madeira ainda podem ser divididos em dois grupos: os fungos causadores de podridão-branca (inglês, *white rot fungi* – WRF) e os causadores de podridão-parda (inglês, *brown rot fungi* – BRF) (SILVA; COELHO, 2006).

Os macrofungos do grupo WRFs são dotados de um complexo enzimático que os tornam capazes de desconstruir a celulose, hemicelulose e lignina em água, CO₂ e energia após o metabolismo dos monômeros constituintes destes polímeros e complexos. A madeira, depois de sofrer a ação desses fungos, fica com aspecto esponjoso, fibroso ou laminado e com cor esbranquiçada, o que caracteriza o nome do grupo. Os macrofungos BRFs são responsáveis pela degradação da celulose e hemicelulose e deixam a madeira com aspecto amorfa e ao final do processo de degradação, ficando apenas a lignina modificada, que tem coloração parda (KIRK; FARRELL, 1987; BLANCHETTE, 1995; SILVA; COELHO, 2006, CANAM *et al*, 2013);

Assim os macrofungos WRFs e BRFs são organismos interessantes na busca de processos biotecnológicos de conversão enzimática dos componentes estruturais da parede celular vegetal, principalmente quando se trata de resíduos ou subprodutos vegetais gerados nos processos agroindustriais.

De acordo com Gimenes (2010), do ponto de vista econômico, um dos processos mais importantes que faz uso de fungos filamentosos é o da transformação de resíduos lignocelulósicos por meio da produção de cogumelos comestíveis. Assim, gera-se um alimento humano re-utilizando biomassas vegetais residuais. São várias

as espécies fungicas formadoras de cogumelo utilizadas na fungicultura comercial, tais como os *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* e vários do gênero *Pleurotus*.

Nos biomas brasileiros há uma grande biodiversidade de macrofungos com potencial de produzir cogumelos comestíveis e a nível comercial, porém as espécies mais utilizadas na fungicultura brasileira são as mesmas exploradas em outros países. O Brasil segue a tendência destes outros locais quanto ao aumento na produção e consumo de diferentes cogumelos comestíveis (GIMENES, 2010).

3.8 PRODUÇÃO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS

Os países com maior produção de cogumelos comestíveis estão na Ásia: China, Japão e Coreia do Sul. Os países do continente europeu vêm em seguida, como Holanda, Espanha, França e Polônia. Os Estados Unidos e o Canadá são os principais representantes das Américas (DIAS, 2010; EMBRAPA, 2013; ROYSE, 2014; CHANG & WASSER, 2017).

O consumo de cogumelos comestíveis vem aumentando desde o fim da Segunda Guerra Mundial (CHANG; WASSER, 2017). As explicações para esse aumento podem estar relacionados com fatores como: maior divulgação dos produtos, preços mais acessíveis, apelo comercial em relação as suas qualidades nutricionais, além do uso de novas tecnologias de cultivo.

O uso de novas tecnologias está permitindo utilizar resíduos variados da agroindústria como substratos, e assim, diminuir custos de produção e impactos ambientais no final da cadeia produtiva da fungicultura (BERNAS, 2006; CARVALHO *et al.*, 2013; CHANG; WASSER, 2017). Outro fator que tem intensificado o consumo deste tipo de alimento é o apelo nutracêutico ou alimento funcional, já que o mesmo apresenta capacidade de melhorar a saúde do consumidor ou até mesmo tratar doenças, como tem sido apresentado pela Medicina Chinesa, por exemplo, que os utilizam há mais de 2.000 anos (XUE; O'BRIEN, 2003).

O modelo piramidal de uso de cogumelos (Figura 10) está em conformidade com um ditado chinês "a medicina e a alimentação têm uma origem comum." Esta afirmação é particularmente aplicável aos cogumelos, por suas qualidades nutricionais (CHANG; BUSWELL, 1996), como suplementos dietéticos (SDs) e atributos

medicinais há muito tempo reconhecido (WASSER, 2010). A condição de saúde humana pode ser dividida em três estados: saúde, subnutrição e doença. Os cogumelos podem ser usados principalmente como alimento para um estado saudável, como um remédio para doenças, e como SDs para um estado sub-saudável, bem como para ambos (CHANG; WASSER, 2010).

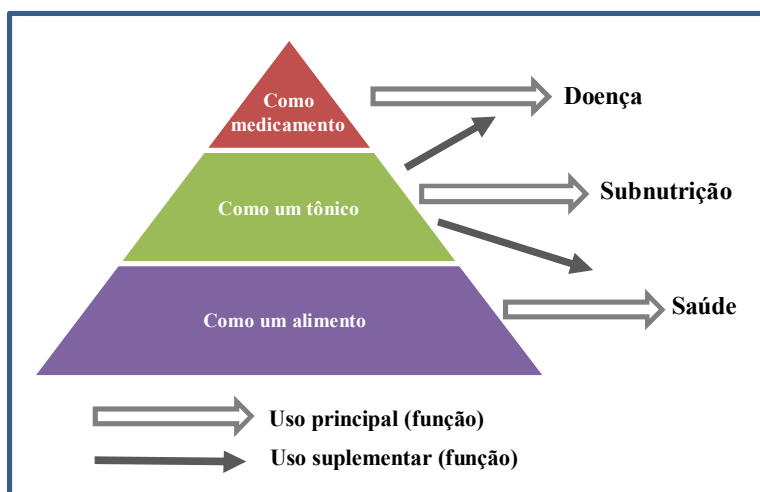


Figura 10. Um modelo piramidal de usos de cogumelos (fungicultura industrial) - (adaptado de CHANG & WASSER, 2010).

Globalmente, a produção de cogumelos aumentou de forma significativa. Isto tem ocorrido principalmente pelas contribuições de países com economias em desenvolvimento como China, Índia, Polônia e Hungria. Em contraste, a produção de cogumelos nos países da Europa Ocidental, nos Estados Unidos e no Japão permanece inalterada ou até caiu em certos períodos. A China, especialmente, testemunhou um enorme aumento no cultivo de cogumelos comestíveis, sendo hoje o maior produtor mundial (mais de 85% do total). Além disso, novas espécies de cogumelos foram recentemente cultivadas e comercializadas na China. A Índia é outro exemplo da expansão da fungicultura, passando de 5.000 toneladas em 2001 para 10.000 toneladas em 2004, e com perspectiva de crescimento de cerca de 25% ao ano. Na América Latina, a produção anual de cogumelos também aumentou de forma constante desde 1995. Durante o período 1995-2001, o nível estimado de produção de cogumelos comerciais nesta região aumentou 32% (49.975 para 65.951 toneladas), representando um aumento anual de 5% (CHANG & WASSER, 2010).

O cultivo de cogumelos pode ser uma atividade agroindustrial intensiva em mão-de-obra, o que tem grande impacto econômico e social, gerando renda e emprego para mulheres e jovens, particularmente em áreas rurais nos países em desenvolvimento (CHANG; WASSER, 2010).

O Brasil ocupa uma posição significativa entre os principais países do setor do agronegócio. Isto está relacionado principalmente em função da sua posição geográfica. O setor pujante do agronegócio gera diferentes tipos de agroindústrias que processam os produtos agrícolas ou pecuários. Tais agroindústrias geram resíduos ou subprodutos que podem servir de matéria-prima para diversos outros setores como a fungicultura (cogumelos comestíveis).

As agroindústrias da fungicultura brasileira estão localizadas principalmente no estado de São Paulo (82,6 %). Estas, por sua vez, preparam os respectivos substratos para cultivo dos fungos à base dos resíduos lignocelulósicos regionais, tais como: serragem de eucalipto, bagaço de cana, entre outros. Há diferentes tipos de resíduos agroindustriais espalhados pelo país, que podem fomentar a fungicultura comercial. Bett e Perondi (2011) relatam que os principais subprodutos agroindustriais utilizados para a produção de cogumelos no Brasil são: bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz, serragem de eucalipto, sabugo de milho e farelo de trigo.

O consumo de cogumelos no Brasil ainda é incipiente quando comparados aos principais países produtores e consumidores, porém crescente (EMBRAPA, 2013). Os municípios que se destacam na produção de cogumelos no Brasil são Itaquaquetuba, Mogi das Cruzes, Itupeva e Jundiá. Além de São Paulo, outros estados brasileiros têm recebido atenção para instalação de grandes, médias e pequenas empresas produtoras, entre os quais se destacam a Bahia (Vitória da Conquista), Minas Gerais (Belo Horizonte e regiões), Paraná (Castro, São José dos Pinhais), Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal e outros (DUPRAT; SOUZA, 2003, VARGAS 2011).

As principais espécies de macrofungos formadores de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil seguem o mesmo padrão de produção internacional, tais como Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), o “Shiimeji” ou cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) e o “Shiitake” (*Lentinula edodes*) (Tabela 2) (PHAN; SABARATNAM, 2012). As espécies *Agaricus subrufescens*, sinônima *blazei* ou *brasiliensis* estão entre as principais espécies cultivadas no Brasil, pois este fungo foi isolado na Mata Atlântica

(Município de Piedade/SP) e desde então tem sido explorado comercialmente em função de suas características nutracêuticas, como apontam diversos estudos no Brasil, Japão, e outros países.

Tabela 2: Produção anual de cogumelos comestíveis no Brasil

Espécies	Produção estimada (toneladas/ ano)
<i>Agaricus bisporus</i> (cogumelos de paris)	8.000
<i>Pleurotus ssp.</i> (shimeji)	2.000
<i>Lentinula edodes</i> (shiitake)	1.500
<i>Agaricus blazei</i> murril	500
Outros	50

Fonte: ANPC, 2013

3.9 BIOMASSA RESIDUAL PÓS-COLHEITA DE COGUMELOS OU *SPENT MUSHROOM SUBSTRATE* (SMS).

A produção de cogumelos comestíveis em países onde o setor da fungicultura já está consolidado como China e alguns países europeus fazem uso de tecnologias para agregar valor a biomassa residual após a colheita dos cogumelos (inglês, *Spent Mushroom Substrate* – SMS). A quantidade gerada de SMS na fungicultura pode variar de acordo com a espécie de cogumelo, como também segundo o método de produção e tempo de colheita (fluxos).

A fungicultura comercial de cogumelos comestíveis mensura sua produtividade por meio da razão entre substratos frescos (umidade 60%) pela quantidade de cogumelos frescos colhidos. A produtividade pode variar de acordo com a espécie, substratos, sistema de preparo de substrato, sistema de cultivo e tempo de colheitas. Uma produtividade de 20% a 30% para cultivo de espécies do gênero *Pleurotus* são as planejadas e esperadas pelos fungicultores. Assim, para cada quilo de substrato fresco espera-se pelo menos 200 gramas de cogumelo fresco.

Neste modelo, pode-se obter a partir de cada 1 kg de cogumelo fresco uma produção aproximada de 5 kg de biomassa residual pós-colheita de cogumelos (SMS) (PHAN; SABARATNAM, 2012). A China, por exemplo, que tem uma longa história de cultivo de cogumelos e é atualmente o maior produtor, consumidor e exportador deste produto, produziu mais de 30 milhões de toneladas de cogumelos frescos em 2013, acumulando assim mais de 150 milhões de toneladas de SMS.

A gestão ambiental e comercial do SMS passa a ser uma questão de fundamental importância para fungicultura industrial, uma vez que o seu descarte inadequado pode resultar em contaminação de solos, cursos d'água e nascentes (ZHU *et al.*, 2012; LOPES, 2014). Algumas estratégias de disposição do SMS têm sido adotadas em países como a China, entre as quais se destacam: queima, aterros e compostagem em conjunto com estrume animal para obtenção de adubos (SINGH *et al.*, 2003 apud PHAN; SABARATNAM, 2012). Recentemente, alguns estudos utilizaram SMS como matéria-prima para obtenção de produtos de maior valor agregado, tais como biogás, enzimas extracelulares a granel, fertilizante orgânico ou como suplementos alimentares para animais (LIM; LEE, 2011).

Visando minimizar os impactos ambientais com SMS, estudos científicos têm sido conduzidos, em especial no setor da biotecnologia, visando, por exemplo, a obtenção de enzimas (PHAN, SABARATNAM, 2012). Outros estudos apontam para o uso em biorremediação de solo contaminado por petróleo (RUSSO, 2012). O SMS pode ter teores de proteína bruta e vitaminas interessantes para o seu aproveitamento em nutrição animal. Em parte, a produção dessas substâncias pode ser explicada pelo metabolismo fúngico durante as biotransformações dos substratos vegetais e incorporação na massa micelial (ZHU *et al.*, 2012). Fazaeli e Masoodi (2006) relataram que o SMS apresenta grande valor nutricional na alimentação de animais, e a sua utilização pode ser eficiente, de modo similar ao uso da palha de trigo e farelo de soja, que são habitualmente empregados para esse tipo de alimentação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal, Brasil. O fluxograma (Figura 11) a seguir apresenta uma síntese das principais etapas e abordagens utilizadas nesse trabalho.

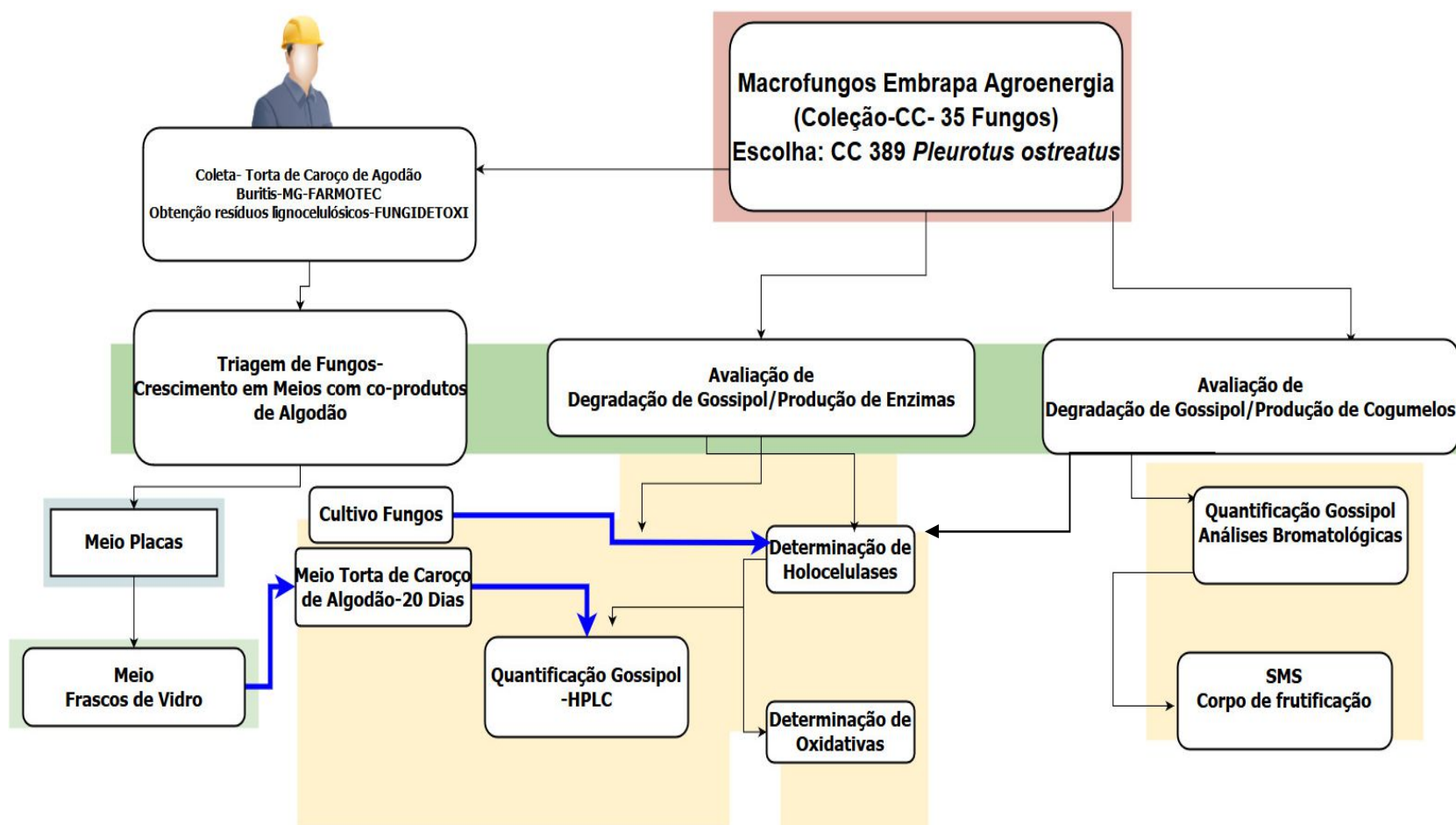




Figura 11. Resumo das atividades experimentais realizadas junto aos macrofungos com potencial de degradação de gossipol livre em torta de semente de algodão.

4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DA COLEÇÃO DOS MACROFUNGOS-BASIDIOMICETOS

Foram utilizados trinta e cinco isolados de macrofungos-basidiomicetos formadores de cogumelos comestíveis provenientes de transferência da coleção mantida pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e depositados na coleção de Microrganismos e Microalgas aplicados à agroenergia e biorrefinarias da Embrapa Agroenergia. Os macrofungos foram mantidos por meio de repique contínuo em Batata-Dextrose-Agar (BDA) e em refrigeração a 8 °C. Os macrofungos utilizados neste trabalho estão detalhados na Tabela 3.

Tabela 3: Macrofungos formadores de cogumelos comestíveis utilizados nos cultivos por fermentação estado sólido (FES) utilizando torta de caroço de algodão como substratos.

Espécie de Macrofungos-Basidiomicetos	Código Coleção Embrapa1	Corpo de frutificação (cogumelos)
<i>Agaricus bitorquis</i>	CC421	 http://www.champyves.fr
<i>Agaricus blazei</i> ou <i>Agaricus brasiliensis</i> ou <i>Agaricus subrufecens</i>	CC414	 http://www.champyves.fr

Auricularia auricula

CC348



<http://www.mycelia.be/en>

Auricularia fuscosuccinea

CC420



<http://www.naturezabrasileira.com.br/>

Coprinus comatus

CC159



<http://www.wikiwand.com/>

Coprinus comatus

CC425



<http://www.wikiwand.com/>

Fistulina hepatica

CC102



<http://www.mycelia.be/en>

Flamulina velutipes

CC27



<http://www.mycelia.be/en>

Ganoderma lipsiense

CC36



<http://members.home.nl>

Ganoderma lobatum

CC24



<http://arborist.forest.usf.edu/>

Ganoderma lucidum

CC351



<http://www.rogersmushrooms.com/>

Gloeophyllum trabeum

CC116



<http://www.nahuby.sk>

Grifola frondosa

CC28



<http://www.medicalmushrooms.net/>

Hericium erinaceus

CC29



<http://www.mycelia.be/en>

Hypsizigus sp.

CC418



<http://www.alohaculturebank.com/>

Lentinula edodes

CC390



<http://www.mycelia.be/en>

Oudemansiella canarii

CC37



<http://mushroaming.com>

P. sajor-saju sinonimia *L. sajor-caju*

CC412



www.dreamstime.com/

Panus lecomtei

CC40



<https://ppbio.inpa.gov.br>

Pholiota aegerita

CC88



<http://www.amb.agrate.brianzaest.it/>

Pholiota nameko

CC89



<http://www.mycelia.be>

Pleurotus citrinuspeliatus

CC416



<http://joehinkle.com>

Pleurotus columbinus

CC380



<http://www.fungi.com/>

Pleurotus eringii

CC353



<http://www.mycelia.be/en>

Pleurotus ferulae

CC111



<http://www.mycelia.be/en>

Pleurotus florida

CC335



<http://www.mycelia.be/en>

Pleurotus ostreatus

CC389



<http://www.mycelia.be/en>

Pleurotus ostreatus

CC403



<http://www.mycelia.be/en>

Pleurotus pulmonarius

CC154



<http://www.mycelia.be/en>

Pleurotus sapidus

CC110



<https://www.flickr.com>

Pycnoporus sanguineus

CC400



<http://www.loegiesen.nl/>

Schizophyllum commune

CC328



<http://www.champyves.fr>

Trametes sp.

CC247



<http://www.mykoweb.com>

Trametes versicolor

CC124



<http://www.mykoweb.com>

Volvariella volvacea

CC94



<http://joehinkle.com>

4.2 PRODUTOS QUÍMICOS

Todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau HPLC. A acetona e o metanol foram adquiridos da TEDIA® e o ácido trifluoroacético (TFA) foi adquirido da SIGMA®. O (±). O Gossypol padrão (≥95% de pureza) foi adquirida da SIGMA® (código G8761).

4.3 SUBSTRATOS PARA CULTIVO DOS MACROFUNGOS

A torta de caroço de algodão (TCA), assim como os demais resíduos, capim-elefante, serragem de eucalipto, fibra de prensagem do dendê e bagaço de cana de açúcar, foram obtidos a partir de empresas como Farmotec, Denpasa, Usina Jales Machado e agroindústrias locais (Brasília, DF).

4.4 TRIAGEM: CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DOS MACROFUNGOS EM MEIOS COM TCA

Para selecionar os macrofungos capazes de crescer em meio contendo a torta de caroço de algodão como única fonte de nutrientes, foi preparado um meio de cultura em placa de *petri* tendo como base a torta de caroço de algodão 10% e ágar-ágar (ATCA-10). Pesou-se 100 g/L de TCA, 15 g/L de ágar-ágar e adicionou-se um litro de água. O meio nutritivo foi autoclavado a 121°C por 30 minutos. O volume de 20 mL de ATCA-10 foi disposto em placas de *Petri* (90 cm de diâmetro). Após resfriamento do meio, um disco micelial (8 mm) de cada macrofungo foi inoculado (em condições assépticas) e incubado em estufa a 28 °C durante 9 dias (triplicata). A velocidade de crescimento micelial dos macrofungos foram aferidas a cada três dias com uso de paquímetro. Após o cálculo das médias, os resultados foram expressos em mm/dia.

Os treze macrofungos selecionados com base nos melhores crescimentos em ATCA-10 foram submetidos a outro tipo de meio de cultivo contendo TCA. O segundo meio de cultivo foi feito apenas com TCA com umidade ajustada a 60%, denominado como TCA-100 (%). TCA-100 foi confeccionado com 100 g (massa seca) de TCA acrescido de água (60%) em frascos de vidro (250 mL) e esterilizado por 30 minutos a 121°C. Após o resfriamento, os frascos contendo TCA-100 foram inoculados com 3 discos miceliais (8 mm) de cada um dos 13 macrofungos (triplicata) e incubado a 28°C durante 15 dias. O crescimento micelial foi aferido usando paquímetro e os resultados expressos em mm/dia.

4.5 MACROFUNGOS CAPAZES DE DEGRADAR GOSSIPOL EM TCA

Seis macrofungos foram escolhidos com base no crescimento micelial obtido no item 4.4. – TCA-100. Os seis macrofungos foram novamente inoculados em meio TCA-100, conforme descrito no item 4.4. – TCA-100. Os macrofungos foram incubados a 28°C por vinte dias (triplicata) para a determinação dos teores de gossipol livre (GL).

4.6 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS TEORES GOSSIPOL LIVRE EM TCA

A extração e quantificação do gossipol livre (GL) foi baseada na metodologia Ba 7–58 recomendada pela AOCS (1985) com modificações feitas por Conceição et al. (2018). As amostras de biomassas TCA e TCA+massa micelial (cultivo dos macrofungos) foram secas em estufa a 60°C durante 48 horas; sendo então trituradas e homogeneizadas usando moinho de bancada. Pesou-se 1 g de amostra e adicionou-se 10 mL de acetona aquosa a 70%, sonificando-as por 5 minutos. Após centrifugação (14.000 rpm/8°C/5min), o sobrenadante foi transferido novamente centrifugado para a quantificação em cromatógrafo líquido de alta performance(UHPLC). A eluição em UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) 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. O detector usado foi o PDA (*Photodiodearray*) ajustado para aquisição em 254 nm, utilizando como padrão a fórmula a seguir para construção da curva de calibração nas concentração de x a y. O gossipol livre residual foi plotado em µg/g. O porcentagem de degradação de gossipol livre por meio do cultivo utilizando os macrofungos foi calculado por meio da fórmula:

$$\frac{(G1 - G2) \times 100}{(G1)}$$

Onde:

G1: Gossipol inicial da amostra antes da inoculação dos macrofungos - TCA;

G2: Gossipol remanescente no TCA após 20 dias de cultivo dos macrofungos.

4.7 CURVA DE DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL LIVRE VERSUS ENZIMAS DO *Pleutortus ostreatus*CC389

O macrofungo *P. ostreatus* CC389 foi selecionado para os experimentos subsequentes após avaliação dos resultados obtidos no item 4.6 (degradação do gossipol livre em TCA-100%). O CC389 foi novamente crescido em TCA-100 (item 4.5) durante 20 dias. A avaliação da degradação de GL e a determinação de algumas atividades enzimáticas foram feitas ao longo de 20 dias com amostragem a cada 5

dias (três replicas biológicas – por tempo/amostragem). O gossipol livre foi calculado conforme item 4.6. As atividades enzimáticas serão descritas no item 4.8.

4.8 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A biomassa (TCA + massa micelial) das triplicatas biológicas e nos diferentes tempos de amostragem (5, 10, 15 e 20 dias) foi homogeneizada e dividida em quatro partes para obtenção de 10 g (massa úmida). A esta biomassa foi acrescentado 50 mL de polietilenoglicol 6000 0,01% v/v (PEG 6000) na proporção de 1:5. A mistura foi homogeneizada em ultraturrax por 60 segundos e centrifugado por 10 minutos a 8000 rpm e 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em funil de *buchner* com papel de filtro número 0,2 mm, e os extratos brutos foram armazenados a 2°C para determinação das atividades enzimáticas, conforme a descritos nos item 4.8.1 e 4.8.2.

As atividades enzimáticas foram expressas em (U) definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 μmol de substrato ou produzir 1 μmol de produto por minuto de reação ($\mu\text{mol min}^{-1}$). Os ensaios foram realizados após cada amostragem. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8.1 Lacase e Manganês Peroxidase

A atividade de lacase (Lac, EC 1.10.3.2) foi determinada por meio da oxidação de ABTS (2,2'- azino-bis 3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato), onde foram adicionados 180 μL de enzima (extrato bruto) em 180 μL tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5, 25 °C). A oxidação do ABTS foi monitorada a 420 nm (ϵ_{420} :36000 L.mol⁻¹cm⁻¹) por 90 segundos a 25°C (WOLFENDEN e WILLSON, 1982).

A atividade de Manganês-peroxidase (MnP EC1.11.1.1) foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol a 610 nm (ϵ_{610} = 460L.mol⁻¹cm⁻¹) (KUWAHARA et al., 1984) com modificações, reagindo em 0,5 mL de enzima (extrato bruto) em mistura (0,1 mL de vermelho de fenol 1%, 0,05 mL MnSO₄ 2mM, 0,02 mL H₂O₂ 2mM, 0,1mL de lactato de sódio 250 mM, 0,2 mL de albumina bovina 0,5% e tampão succinato de sódio pH 4,5 a 25 °C) e incubadas durante 5 min a 30°C, sendo interrompida pela adição de 40 μL NaOH 2M.

4.8.2 Xilanase, Carboximetilcelulase (CmCase), FPase e β -glicosidase.

A quantidade de açúcar redutor liberada por ação das enzimas presentes nos extratos brutos foi determinada usando a metodologia DNS (MILLER, 1959). As curvas para glicose e xilose foram construídas usando concentrações entre 0e 2.0 mg/mL. A absorvância foi determinada em 540 nm usando espectrofotômetro.

Foram realizados ensaios enzimáticos em placas (96 poços) de CMCase (endoglicanase) e xilanase, utilizando 20 μ L da extrato bruto e 20 μ L de substrato (respectivamente: Carboximetilcelulase e xilana). Estas foram incubadas em termociclador durante 30 minutos a 50°C. Adicionou-se então 120 μ L de DNS e deixado para reagir por 10 minutos. Posteriormente transferiu-se uma alíquota de 36 μ L para placa tipo Elisa contendo 100 μ L de água destilada para leitura do ensaio no espectrômetro a 540 nm.

Para o ensaio de FPase (celulase total) foi utilizado como substrato o papel Whatman número 1 em forma de discos, 40 μ L de tampão citrato de sódio e 20 μ L de extrato bruto, que foram incubadas por 1 h a 50°C. Os ensaios de FPase foram interrompidos e analisados como descrito anteriormente para outras enzimas.

Para a β -glicosidase foi adicionado 100 μ L da solução de celobiose 15 mM e 100 μ L do extrato bruto, que foram incubadas em termociclador a 50°C por 30 minutos. Após o resfriamento, foram transferidos 2,5 μ L para uma placa de Elisa com 250 μ L do reagente de glicose oxidase (Bioclin). Em espectrofotômetro, a placa foi incubada por 10 minutos a 37°C e a absorvância determinada em 505 nm.

4.9 PRODUÇÃO DO COGUMELO *P. ostreatus* CC389 EM SUBSTRATO CONTENDO TCA E OUTROS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

4.9.1 Preparo do inóculo ou semente (Spawn)

O cultivo do inóculo do *P. ostreatus* CC389 foi feito em arroz em casca enriquecido com farelo de trigo (fonte de proteína total). O arroz em casca foi previamente cozido por 30 minutos. O excesso de água foi escorrido para o acréscimo de farelo de trigo (10%), mantendo assim uma proporção 10:1. Frações dessa formulação (800 g) foram transferidas para sacos de polietileno com filtro e autoclavados por uma hora a 121°C. Uma placa de petri (90 mm) com massa micelial

foi utilizado por repetição (sacolas). A colonização foi feita em estufa ventilada a 28°C durante 30 dias.

4.9.2 Preparo dos substratos para o cultivo cogumelos de *P. ostreatus* CC389

Foram preparadas quatro diferentes formulações de substratos para o cultivo do *P. ostreatus* CC389. As formulações continham 70% de torta de caroço de algodão (TCA) e suplementadas com outras biomassas lignocelulósicas (30%), mantendo a razão 70:30 de massa seca. Os substratos lignocelulósicos que foram utilizados na suplementação foram: serragem de eucalipto (SE); bagaço de cana-de-açúcar (BC); fibra de prensagem do fruto de dendê (FD); e, capim-elefante (CE).

Cada formulação representou um tratamento experimental, além da TCA 100% (sem nenhum tipo de suplementação). Os substratos foram homogeneizados e umedecidos (60 a 65%) em misturador mecânico tipo betoneira. Assim, para cada rodada de preparo de substrato foram utilizados 14 Kg de TCA e 6 Kg para cada biomassa suplementar, com adição de 20 L de água (razão 1:1 m:v). Ao final de cada preparo os substratos foram distribuídos 2,00 ± 0,02 Kg em sacolas de polietileno (PEAD), com filtro de troca de ar estérile esterilizados a 1 atm, a 121°C por 90 minutos em autoclave. Cada tratamento teve 20 replicas biológicas.

Após o resfriamento (câmara fria – 4 horas) foi feita a inoculação dos substratos com 2% de massa micelial (inóculo – arroz em casca) por sacola/replica. A inoculação ocorreu em capela de fluxo laminar (previamente limpa e esterilizada). Após as sacolas terem sido inoculadas e vedadas, foi feita a transferência para casa de vegetação mantida a temperatura ambiente.

4.9.3 Eficiência Biológica (EB) e Produtividade (P) – Cultivo de *P. ostreatus* CC389

A avaliação de Eficiência Biológica (EB) do cultivo do *P. ostreatus* CC389 nas diferentes formulações dos substratos a base de TCA foi calculada por meio da porcentagem de produção do cogumelo fresco colhido em relação a massa seca do substrato utilizado. Isto é: $EB = ([\text{peso fresco de cogumelos (g)}/\text{peso seco do substrato inicial (g)}] \times 100)$. A porcentagem de produtividade foi estimada por meio do peso fresco dos cogumelos $[(\text{g})/\text{peso substrato inicial úmido (g)} \times 100]$ (OLIVEIRA et al., 2007).

4.10 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

Foram realizadas as análises bromatológicas dos substratos, SMS e cogumelos derivados do cultivo do *P. ostreatus* CC389 nos diferentes substratos a base de TCA. Foram realizadas as seguintes análises: matéria seca (MS); matéria mineral (MM); Fibra em Detergente Neutro (FDN); Fibra em Detergente Ácido (FDA); Extrato Etéreo (EE); Proteína Bruta (PB).

Todas as biomassas avaliadas (substratos, SMS e cogumelos) foram secas por 48 horas em estufa com ventilação forçada a temperatura ambiente (65°C) e trituradas em moinho tipo Willey com peneira de 60 mesh.

O teor de matéria seca foi determinado em estufa a 105°C por 12 h e a matéria mineral (cinzas) em forno tipo mufla a 600°C por 3h.

As análises seguiram as metodologias de Van Soest (1994) para as determinações dos componentes da parede celular. Nesses materiais foram determinados: Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Fibra em Detergente Ácido (FDA).

A determinação do teor de extrato etéreo foi realizada obedecendo o método Am 5-04 da (AOCS 2005) em equipamento tipo Ankon.

Para a determinação de proteína bruta (PB) usou-se o método de Kjeldahl (AOCS, 2005). Para os cogumelos utilizou-se o fator de conversão nitrogênio proteína de 4,38; já que os cogumelos possuem uma significativa quantidade de compostos nitrogenados não protéicos (que não são digeridos) na forma de quitina em suas paredes celulares (BREENE, 1990). Para os demais materiais, o fator de conversão foi de 6,25.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de variância foi realizada com comparações múltiplas (ANOVA) e posteriormente foi feito o Teste de Tukey. As diferenças em $p < 0,05$ foram consideradas significativas. Também foram utilizadas análises de variância e as suas médias foram agrupadas por meio do teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade. As análises de correlação linear de Pearson, entre todas as variáveis, se basearam de

acordo com a significância de seus coeficientes em $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* R Core Team (2013).

5. RESULTADOS

5.1 CRESCIMENTO MICELIAL: SELEÇÃO DE MACROFUNGOS EM CULTIVO COM ÁGAR ENRIQUECIDO COM TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO.

O meio de cultivo ATCA-10 foi utilizado como ferramenta para triagem de 35 macrofungos quanto à capacidade e velocidade de crescimento em ambiente enriquecido com torta de caroço de algodão (Figura 12). Vinte e três estirpes de macrofungos apresentaram crescimento micelial no meio ATCA-10 (Figura 13). Entretanto, a velocidade de crescimento e os aspectos visuais, tais como: densidade micelial – muito cotonoso, cotonoso e pouco cotonoso ou ralo; foram distintos entre os 23 macrofungos que apresentaram capacidade de crescimento em ATCA-10. Os macrofungos *P. ostreatus* CC389 e *P. sanguineus* CC400 apresentaram diferenças significativas quanto ao crescimento micelial em ATCA-10 em relação aos demais, com 2,83 e 2,82 mm/dia respectivamente. O *Ganoderma lucidum* CC351 também apresentou resultado relevante, assim como duas outras estirpes do gênero *Pleurotus*, *P. eryngii* CC353 e *P. ostreatus* CC403. O crescimento micelial destas três espécies variaram entre 2,4 e 2,7 mm/dia. Um grupo intermediário de doze macrofungos (entre CC36 e CC416) apresentaram valores de crescimento micelial próximo de 1,7 mm/dia. Seis macrofungos (CC24, CC27, CC29, CC116, CC380 e CC414) apresentaram crescimento micelial abaixo de 1 mm/dia, mostrando pouca aptidão para crescimento em meios enriquecidos com TCA.A. *subrufences* (Sinonimia *A. blazei* e *A. brasiliensis*) e *P. colombinus* apresentaram os menores resultados quanto a aptidão de crescimento em ATCA-10.

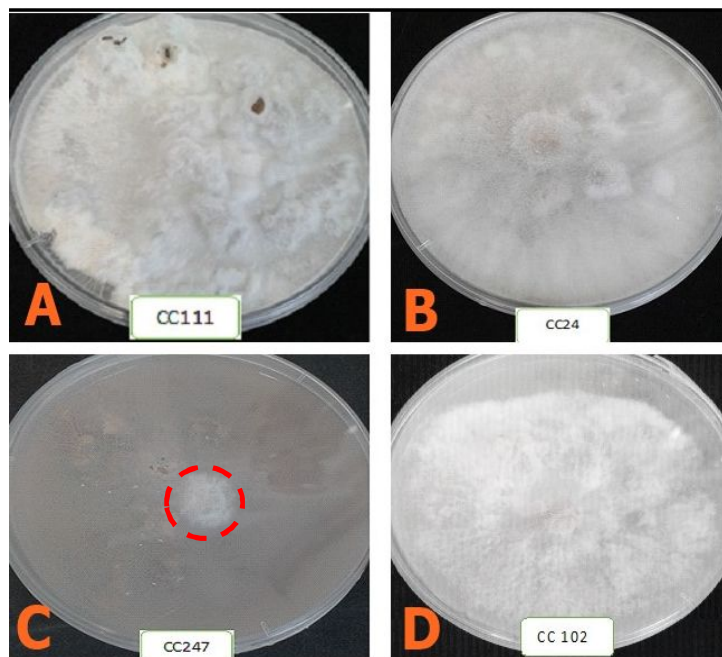


Figura 12. Diferentes crescimentos dos macrofungos em meio de cultivo ATCA após 7 dias. (Ae B= micélio denso e cotonoso; C= ausência de crescimento D= micélio ralo e crescimento lento).

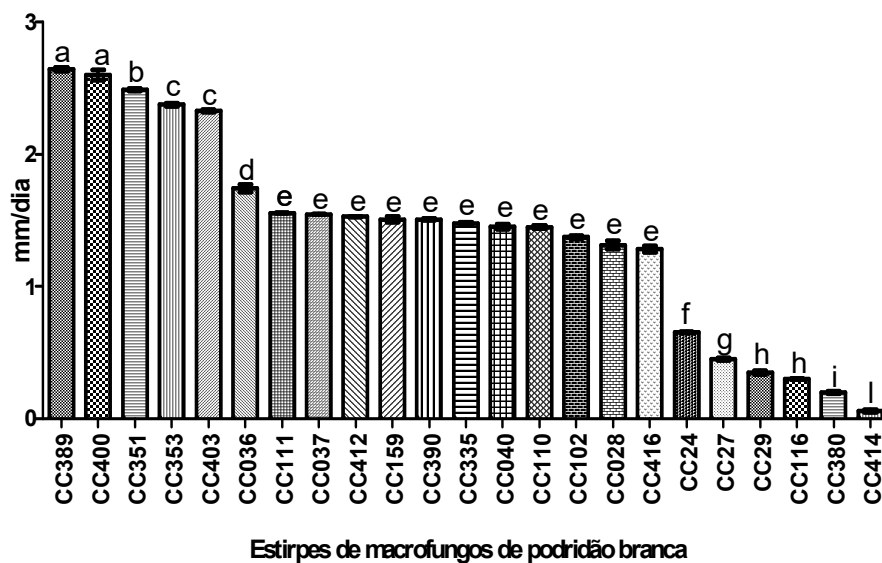


Figura 13. Crescimento micelial dos macrofungos (mm/dia) em placa de Petri (90 mm) contendo meio de cultivo Ágar enriquecido com Torta de Caroço de Algodão (10%) – ATCA-10). Todos os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão de três repetições ($n = 3$). Valores com diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

5.2 CRESCIMENTO MICELIAL: SELEÇÃO DE MACROFUNGOS EM CULTIVO COM TCA-100.

Um segundo segundo experimento foi realizado para avaliar a capacidade de crescimento dos macrofungos em meios de cultivo contendo apenas torta de algodão (TCA-100) e testar a destoxificação dos gossipol. Treze macrofungos foram selecionados para este experimento, baseados nos resultados observados no primeiro experimento de cultivo em ATCA-10 (Figura 14). Os treze macrofungos foram desafiados a crescer em 100% de TCA com umidade ajustada a 65% (aproximadamente) e sem correção de pH durante 20 dias.

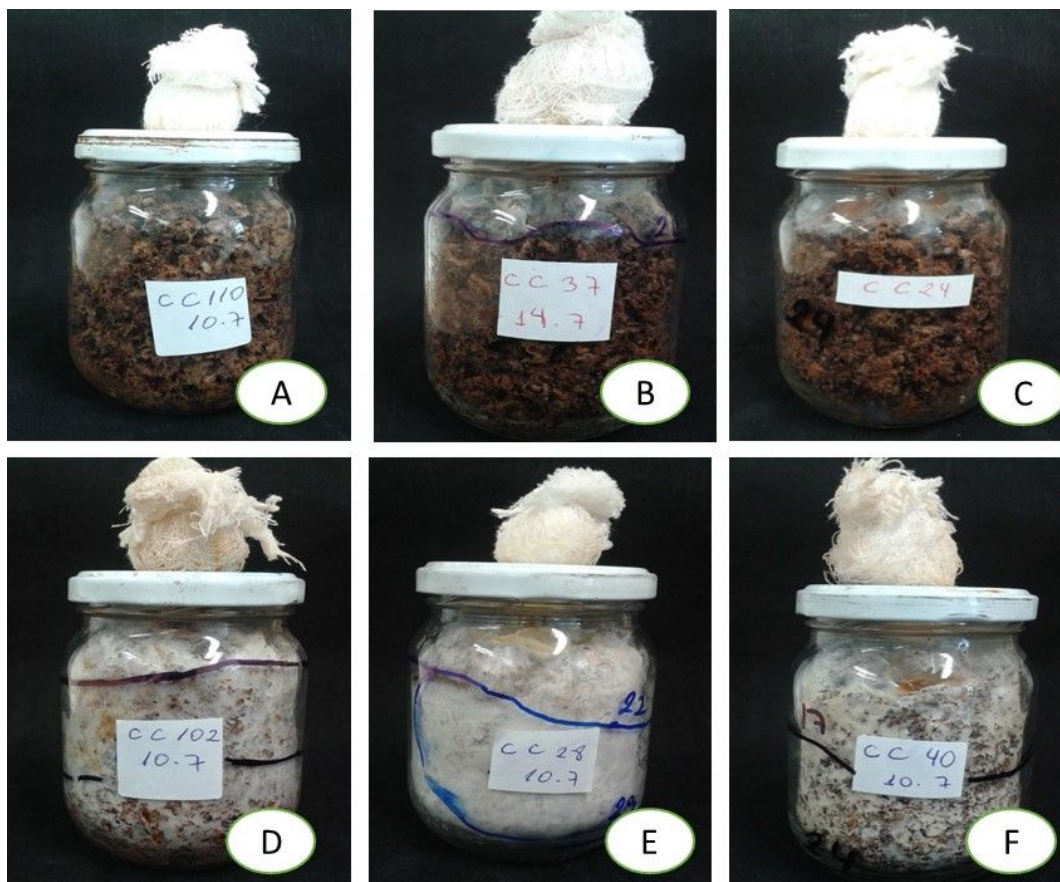


Figura 14. Ilustrações do cultivo dos macrofungos em fermentação estado sólido contendo 100% torta de caroço de algodão (TCA-100) durante 20 dias a 28°C. Legenda: *A-B-C: não capacidade de crescimento em meio TCA100; A) *Pleurotus sapidus* CC110; B) *Oudemansiella canarii* CC37; C) *Hericium herinaceus*. *D-E-F: capacidade de crescimento em meio TCA100; CC24 D) *Fistulina hepatica* CC102; E) *Grifola frondosa* CC28; F) *Panus lecomtei* CC40.

Os macrofungos *P. sanguineus* CC400 e *G. lipiense* CC36 apresentaram os melhores resultados de crescimento micelial e não diferiram estatisticamente com 1,3 mm/dia (Figura 15). O *P. sajor-caju* (sinonímia *L. sajor-caju*) CC412 e o *F. hepatica* CC102 foram o segundo grupo com melhor desempenho no crescimento micelial, seguido por *P. ferulae* CC111, *P. lecomtei* CC40 e *P. ostreatus* CC389. Os piores resultados de crescimento micelial em TCA-100 foram observados no cultivo de *P. sapidus* CC110, *O. canarii* e *P. florida*.

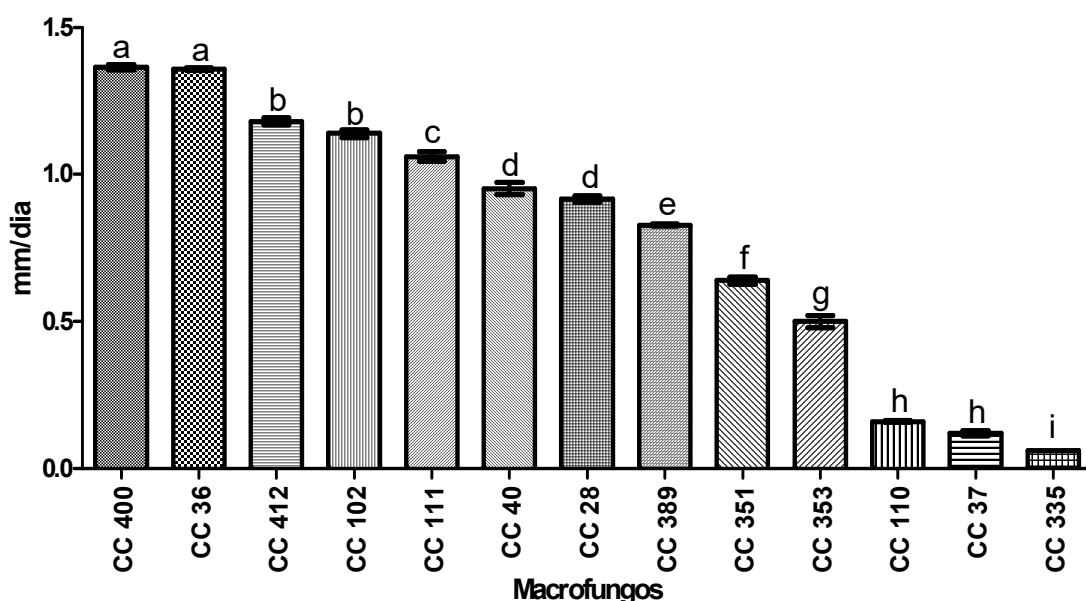


Figura 15. Crescimento micelial dos macrofungos (mm/dia) em frascos de vidro (250 mL) contendo como meio cultivo somente Torta de Carço de Algodão (100%) – TCA-100). Todos os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão de três repetições (n = 3). Valores com diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

5.3 MACROFUNGOS DEGRADADORES DE GOSSIPOL LIVRE EM TCA

Em função da quantidade de análises/tempo/custo fora feita a seleção de seis macrofungos dentre os dez com maior capacidade de crescimento em TCA-100 (Figura 16), para avaliação da degradação de gossipol livre (GL) nos respectivos cultivos. O critério de escolha foi observado de modo que pelo menos um macrofungo

seria utilizado de acordo com desempenho estatístico apresentado no crescimento micelial em TCA-100. Deste modo, foram selecionados os seguintes macrofungos: *G. lipiense* CC36 (pelos dados estatísticos); *F. hepatica* CC102 (pelo potencial biotecnológico); *P. lecomtei* CC40 (desenvolvimento micelial mediano); *G. frondosa* CC28 (desenvolvimento micelial mediano); *P. ostreatus* CC389 (mercado consumidor bem delimitado); e, *P. eryngii* CC353 (mercado consumidor em expansão). O *Pleurotus ferulae* CC111, apesar de ter apresentado resultado estaticamente diferente entre *P. lecomtei* CC40 e *G. frondosa* CC28, não foi escolhido para as análises da degradação de GL. Este critério foi utilizado de modo a favorecer a maior diversidade possível de gêneros, uma vez que já haviam sido escolhidos duas espécies do gênero *Pleurotus* (CC389 e CC353).

O teor de GL na torta *in natura* foi de 40 µg/g. O teor de GL na TCA após a autoclavagem de 90 minutos (Procedimeto anterior a inoculação) foi de 13µg/g. a figura 16 apresenta o teor de GL na TCA após cultivo de 20 dias com os macrofungos.

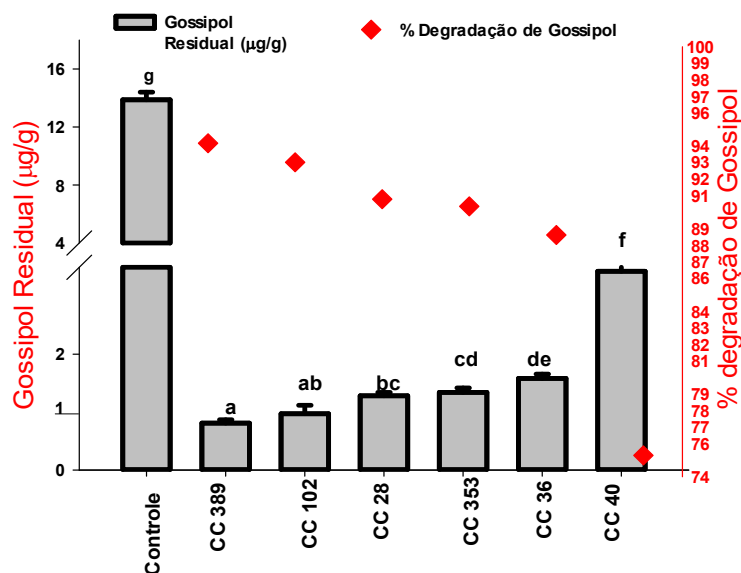


Figura 16. Degradação de gossipol livre (GL) por estirpes de macrofungos durante 20 dias de cultivo por fermentação estado sólido contendo apenas torta caroço de algodão como fonte de substrato (TCA-100). Controle: TCA (65% de umidade) esterilizada por autoclavagem durante 90 minutos.

Todos os macrofungos foram capazes de reduzir a quantidade de GL remanescente em TCA após a autoclavagem, com percentuais entre 74 e 94% (em

relação ao valor residual após a autoclavagem) (Figura16). Os macrofungos que apresentaram os melhores resultados na degradação de GL em TCA foram *P. ostreatus* CC389 (94%) e *F. hepatica* CC102 (93%), onde os teores residuais ficaram abaixo de 1 µg/g. Os macrofungos *G. frondosa* CC28, *P. eryngii* CC353 e *G. lipiense* CC36 não apresentaram diferenças estatísticas significativas, degradando cerca de 90% de GL. Neste critério, o *P. lecomtei* CC40 apresentou o menor degradação do GL residual com 75%.

5.4 *Pleurotus ostreatus* CC389: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO GL E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM CULTIVO COM TCA-100%.

O *P. ostreatus* CC389 apresentou um dos melhores resultados quanto à degradação de GL. Esta espécie é amplamente utilizada na fungicultura mundial, inclusive no Brasil. Estes dois atributos fizeram com que o macrofungo *P. ostreatus* CC389 fosse selecionado para as etapas seguintes deste trabalho, tais como: testes toxicológicos em roedores (dados não apresentados); cultivo em escala para obtenção dos cogumelos comestíveis, fazendo uso de diferentes combinações de substratos a base de TCA; fonte de extratos brutos para determinação de atividades enzimáticas, nas diferentes etapas de cultivo (colonização/miceliação e pós-colheita de cogumelos).

O primeiro experimento de uma série feita com *P. ostreatus* CC389 foi a avaliação de algumas atividades enzimáticas versus a degradação de GL, durante o período de 20 dias de colonização/miceliação. O objetivo deste experimento foi avaliar e correlacionar às variações de atividades de algumas enzimas extracelulares (ligninases, celululases e hemicelulases) com a degradação de GL ao longo do período. A amostragem foi feita a cada cinco dias de cultivo.

A atividade enzimática de manganês peroxidase apresentou-se crescente ao longo do período de cultivo (variando entre 3 e 13 UI/mL);acompanhando o contorno crescente da degração de gossipol livre (Figura 17). A atividade de lacase apresentou comportamento inverso, ou seja, reduzindo a atividade enzimática (166 a 20 UI/mL) em relação ao aumento degradação do GL. A degradação de GL residual após 10 dias de cultivo já atingia percentuais próximos de 90%, alcançando 94% com 20 dias.

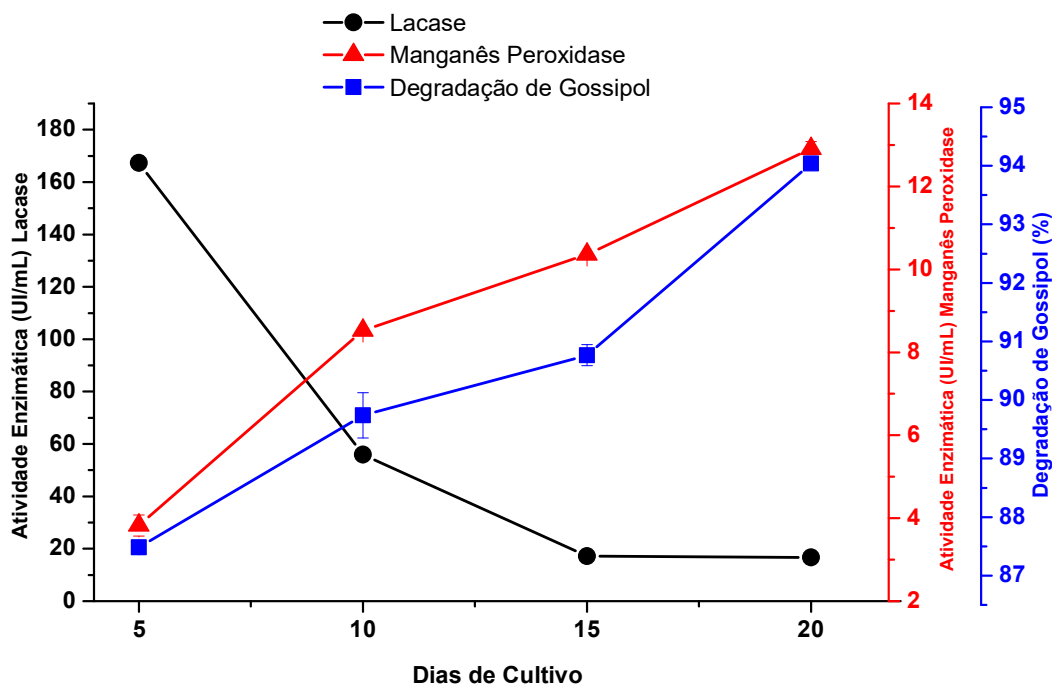


Figura 17. Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividades enzimáticas de ligninases (Lacase - LAC e Manganês peroxidase - MnP) obtidos no cultivo de *Pleurotus ostreatus* CC389 quando cultivado FES em TCA-100%.

A matriz de correlação de Pearson (Tabela 4) mostrou-se negativa (-0,83) entre as variáveis: produção de lacase e degradação de gossipol. Esses resultados mostraram que a diminuição da produção dessa enzima ocorre simultaneamente ao aumento na degradação de GL. A correlação negativa (-0,95) também foi observada quando comparada a produção de MnP e LAC, com redução da produção de LAC à medida que se aumenta a produção de MnP. Enquanto que a correlação positiva (0,96) ficou entre a produção de MnP e degradação de gossipol, de forma que o aumento da atividade desta enzima pelo *P. ostreatus* CC389 resultou no aumento de degradação de GL.

Tabela 4. Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis produções de enzimas oxidativas: Lacase (LAC), Manganês Peroxidase (MnP) e degradação de gossipol livre

por ação do macrofungo *Pleurotus ostreatus* CC389, quando cultivado FES em TCA-100%.

	LAC	MnP	Degradação de Gossipol Livre
LAC	1	-0,95**	-0,83**
MnP		1	0,96
Degradação de Gossipol Livre			1

** : Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. LAC e MgP: valores de atividades de enzimas oxidativas: Lacase e Manganês Peroxidase, respectivamente em UI/mL; Degradação de Gossipol Livre: valores de degradação de gossipol livre em %.

FPase, CMCCase, β -glicosidase e xilanase são enzimas microbianas extracelulares (principalmente de fungos filamentosos) de interesse biotecnológico e industrial, devido à sua capacidade de degradação da parede celular vegetal. As holocelulases (celulases e hemicelulases) estão envolvidas diretamente na capacidade de crescimento dos fungos, principalmente quando cultivados em resíduos agroindustriais. Assim, essas enzimas foram avaliadas durante o cultivo do *P. ostreatus* CC389 em TCA-100%, bem como a correlação entre as atividades enzimáticas e a degradação de GL.

A atividade de xilanase (hemicelulase) do *P. ostreatus* CC389 foi basal (Figura 18), não apresentando muitas variações na degradação das cadeias laterais de hemicelulose como a xilana, por exemplo. Aumentos e reduções de atividades de xilanases são comumente encontrados em cultivos de fungos filamentosos. As atividades para CMCCase (endoglicanase) e β -glicosidase também seguiram a tendência observada para xilanase, com um pico de atividade nos primeiros dias e atividades basais ao longo do cultivo, de modo a fornecer quantidades suficientes de glicose e outras hexoses para o metabolismo fungico. A atividade de FPase total (exoglicosidase, endoglicosidase e beta-glicosidase) mostrou-se crescente ao longo do período de cultivo (Figura 19), alinhando-se com a degradação do gossipol e atividades para MnP.

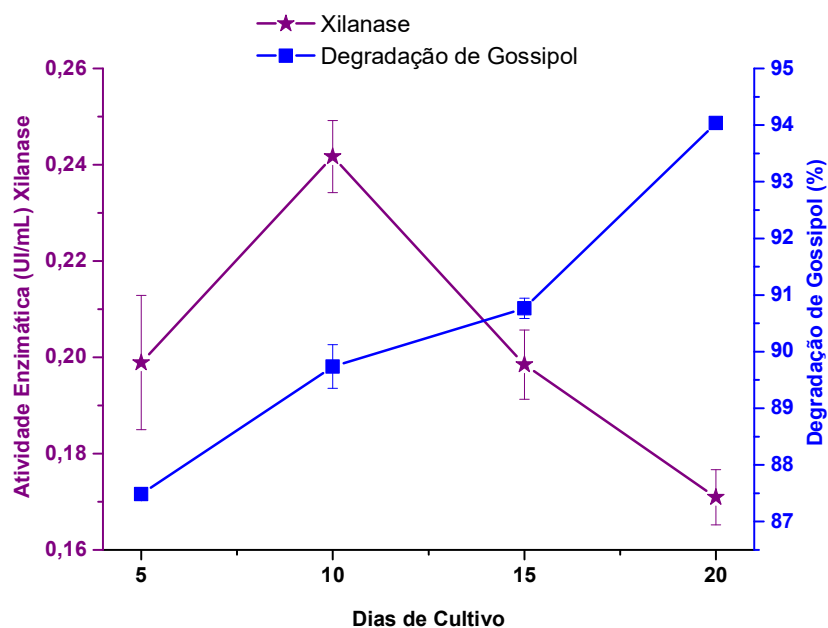


Figura 18. Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividade enzimáticas de xilanase (hemicelulase) obtidos no cultivo de *Pleurotus ostreatus* CC389 quando cultivado FES em TCA-100%.

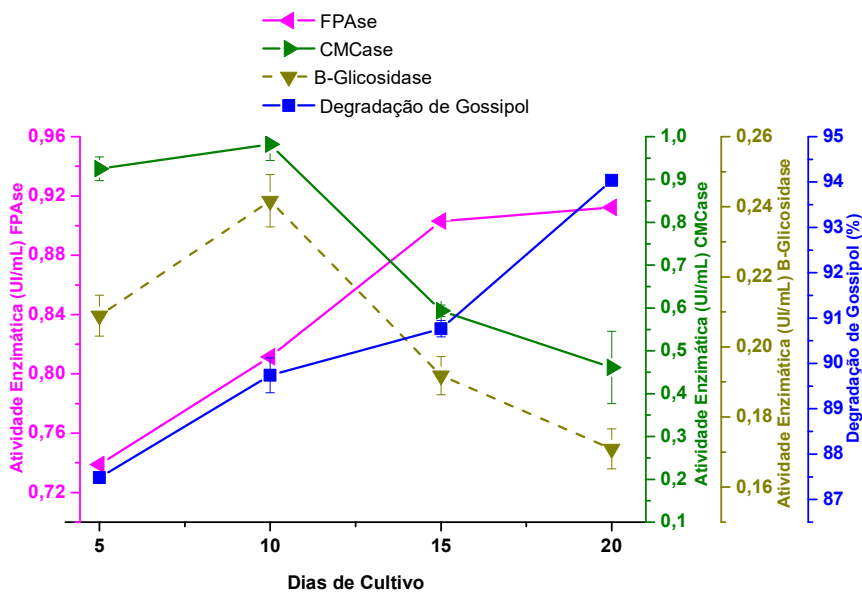


Figura 19. Percentual de degradação de gossipol livre (GL) versus atividade enzimáticas de celulases (FPase, CMCCase e Beta-glicosidase) obtidos no cultivo de *Pleurotus ostreatus* CC389 quando cultivado FES em TCA-100%.

A correlação entre as atividades das holocelulases (xilanase, FPase, CMCase e Beta-glicosidase) e a degradação de GL foram plotadas em matriz de Pearson (Tabela 5). A atividade enzimática de CMCase (endoglicanase) apresentou correlação positiva (0,86) com β -glicosidase; e negativa (-0,83) para degradação de GL. A produção de β -glicosidase apresenta correlação positiva com Xilanase (0,93). Com base nessas análises, quando CMCase aumenta, há aumento das atividades de β -glicosidase; fato já esperado em função do sinergismo descrito entre as celulasas (exoglicanase, endoglicanase e beta-glicosidase). O aumento da atividade de beta-glicosidase causou um aumento das atividades xilanases. Quando atividades de CMCase diminuem, ocorre um aumento na degradação GL. Deste modo, pode-se inferir que não houve correlação estatisticamente significativa entre atividades de xilanase (0,47), CMCase (-0,84) e beta-glicosidase (-0,61) com degradação de gossipol livre. A correlação entre atividades de FPase e a degradação de gossipol foi positiva (0,65), porém com valores inferiores ao observado com atividade MnP (0,96).

Tabela 5. Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis produções de enzimas holocelulases (FPase, CMCase, Beta-glicosidase e Xilanase) e degradação de gossipol livre por ação do macrofungo *Pleurotus ostreatus* CC389, quando cultivado FES em TCA-100%.

	Fpase	CmCase	Beta glicosidase	Xilanase	Degradação de Gossipol Livre
FPase	1	-0,65*	-0,43 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	0,65*
CMCase		1	0,86**	0,73**	-0,84**
Beta glicosidase			1	0,93**	-0,61*
Xilanase				1	0,47 ^{ns}
Degradação de Gossipol Livre					1

**e *: Significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste t, ns: não significativo, FPase, CMCase e Beta-glicosidase e xilanase: valores de atividades enzimáticas em UI/mL; Degradação de Gossipol Livre: valores de degradação de gossipol livre em %.

5.5 CULTIVO DO COGUMELO *P. ostreatus* CC389 EM SUBSTRATOS DE TCA E COM OUTRAS FONTES LIGNOCELULÓSICAS

5.5.1 Eficiência biológica (EB) e Produtividade (P)

O cultivo do *P. ostreatus* CC389 para obtenção de cogumelos foi feito utilizando a técnica axênica (estelização total) dos substratos por autoclavagem por 90 minutos a 121°C. Os substratos foram preparados em quatro diferentes formulações contendo TCA (70% - massa seca), variando os substratos lignocelulósicos (30% - fonte de carbono). Formulação 1: [TCA 70% + 30% de serragem de eucalipto (SE)]; Formulação 2: [TCA 70% + 30% Bagaço de cana-de-açúcar (BC)]; Formulação 3: [TCA 70% + 30% fibra de prensagem do fruto de dendê (FD)]; Formulação 4: [TCA 70% + 30% Capim elefante (CE)].

A colonização ou miceliação total ocorreu aproximadamente 30 dias após a inoculação para todos os substratos. A indução para formação dos primórdios ocorreu por meio da transferência das sacolas para sala de frutificação (umidade 90%) e aberturas de orifícios na parte superior e laterais das sacolas.

A colheita dos cogumelos foi feita em três fluxos, que apresentaram intervalos de aproximadamente 10 dias, perfazendo um total de 30 dias de colheita ou 60 dias de cultivo (colonização e frutificação).

A eficiência biológica (EB) e produtividade (P) foram os parâmetros utilizados para mensurar quais das formulações apresentava melhor resultado quanto a quantidade de cogumelos frescos colhidos (massa úmida) e a possibilidade de uso do SMS (biomassa pós-colheita) para nutrição animal (monogástricos); podendo assim gerar um potencial ativo financeiro para os fungicultores que optarem pela integração das duas cadeias produtivas (fungicultura e nutrição animal).

A produtividade (P) não apresentou diferenças significativas entre as quatro formulações avaliadas, com resultados próximos a 20% (Figura 20), ou seja, 200 gramas de cogumelos fresco para cada um quilo de substrato úmido (inicial). A eficiência biológica (EB) é a razão entre a quantidade de cogumelos frescos e a quantidade de substrato inicial – massa seca. A EB apresentou diferenças estatísticas entre os substratos. A formulação enriquecida com serragem de eucalipto (SE) foi a mais relevante (67%), seguido pelas formulações enriquecidas com bagaço de cana-

de-açúcar (BC) e fibra de prensagem do fruto de dendê (FP), com valores próximos a 50%.

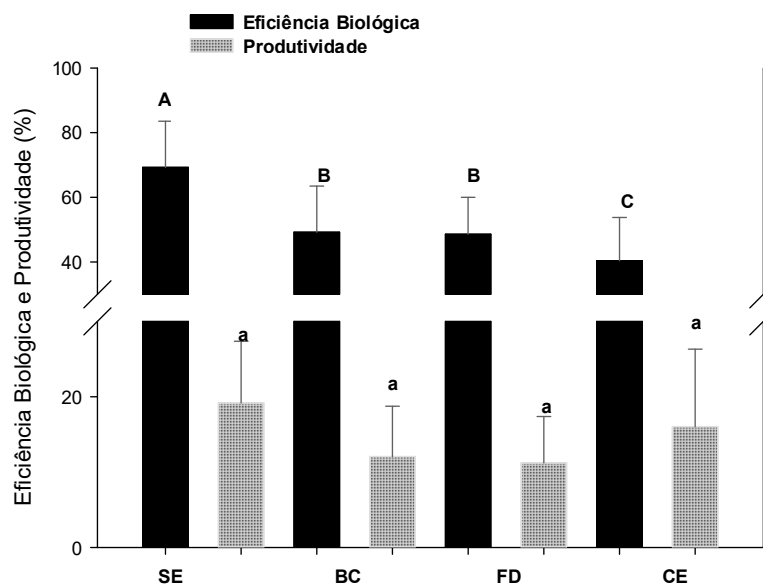


Figura 20. Eficiência Biológica (EB) e produtividade (P) obtida durante o cultivo axênico de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* CC389 em substratos contendo TCA (70%) e outras fontes lignocelulósicas (30%). **SE**: serragem de eucalipto; **BC**: Bagaço de cana-de-açúcar; **FD**: Fibra de prensagem do fruto de dendê; **CE**: Capim elefante).

5.5.2 Análises bromatológicas dos cogumelos e SMSs

A destoxificação de TCA por meio de cultivo de macrofungos formadores de cogumelos comestíveis, tais como o gênero *Pleutorus*, abre uma oportunidade de interação/integração das cadeias produtivas da fungicultura com nutrição animal e biodiesel. Deste modo, além da comprovação da destoxificação das TCA por métodos analíticos e toxicológicos, faz-se necessário avaliar as características bromatológicas dos cogumelos (mercado – alimentação humana) e o SMS (mercado – insumo para nutrição animal, por exemplo).

Os resultados das análises bromatológicas do cultivo do *P. ostreatus* CC389 em diferentes formulações substratos (70% de TCA + 30% de outros lignocelulósicos) e da biomassa pós-colheita dos cogumelos (SMS) foram descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Análise bromatológica dos substratos (pós-esterilização em autoclave) e SMS (biomassa pós-colheita dos cogumelos) nas diferentes formulações preparadas

para cultivo do *Pleurotus ostreatus* CC389 em TCA (70%) enriquecida com outras fontes lignocelulósicas (30%).

CÓDIGOS	SUBSTRATOS	SMS
MATÉRIA SECA (%)		
BC	97.06 ± 3.60 Aa	97.75 ± 0.65 Aa
CE	97.99 ± 0.24 Aa	96.38 ± 2.38 Aa
FD	98.40 ± 0.60 Aa	96.47 ± 1.93 Aa
SE	98.75 ± 0.07 Aa	98.53 ± 0.47 Aa
MATÉRIA MINERAL (%)		
BC	3.84 ± 0.05 Cb	5.93 ± 0.07 Ba
CE	6.23 ± 0.18 Ab	7.56 ± 0.04 Aa
FD	4.70 ± 0.33 Ba	5.17 ± 0.55 Ca
SE	4.12 ± 0.11 Ca	4.99 ± 0.64 Ca
PROTEÍNA BRUTA (%)		
BC	16.76 ± 1.26 Ab	20.75 ± 0.44 Aa
CE	17.75 ± 1.99 Aa	18.79 ± 0.43 Ba
FD	16.09 ± 0.66 Ab	18.70 ± 0.29 Ba
SE	18.67 ± 0.12 Aa	18.66 ± 1.18 Ba
FIBRA DE DETERGENTE NEUTRO (%)		
BC	64.83 ± 0.96 Aa	61.97 ± 2.00 Ba
CE	59.49 ± 1.95 Bb	64.68 ± 0.65 Ba
FD	60.38 ± 1.99 Bb	72.92 ± 0.72 Aa
SE	60.36 ± 0.95 Ba	62.29 ± 2.11 Ba
FIBRA DE DETERGENTE ÁCIDO (%)		
BC	45.30 ± 0.84 Aa	46.80 ± 1.61 Ca
CE	45.78 ± 1.49 Ab	50.10 ± 1.17 Ba
FD	43.25 ± 1.46 Ab	57.72 ± 0.89 Aa
SE	43.81 ± 0.16 Ab	49.71 ± 2.22 Ba
EXTRATO ETÉREO (%)		
BC	1.58 ± 0.05 Ca	0.98 ± 0.29 Ab
CE	2.52 ± 0.40 Ba	0.51 ± 0.02 Bb
FD	3.69 ± 0.15 Aa	1.17 ± 0.30 Ab
SE	3.29 ± 0.07 Aa	0.76 ± 0.02 Bb

SE: formulação contendo 70% de torta de caroço de algodão e 30% serragem de eucalipto; **BC:** formulação contendo 70% de torta de caroço de algodão e 30% Bagaço de cana de açúcar; **FD:** formulação contendo 70% de torta de caroço de algodão e 30% fibra de prensagem do fruto de dendê; **CE:** formulação contendo 70% de torta de caroço de algodão e 30% Capim elefante). Todos os dados são apresentados como médias ± desvio padrão de três repetições (n = 3). Valores com **letras minúsculas** diferentes (comparação entre na mesma formulação, antes e depois do cultivo) indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste t de Student (p < 0,05). Valores com diferentes **letras maiúsculas** (comparação entre diferentes misturas no mesmo momento do cultivo) indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de Scott-Knott (p < 0,05).

Os teores de matéria seca não apresentaram diferenças estatísticas entre as formulações *in natura* (antes da inoculação do fungo) ou entre os SMS's (após 60 dias de cultivo), nem nos diferentes momentos do cultivo.

A composição mineral apresentou resultados diferentes entre as misturas dos substratos, tanto no início (autoclavagem) e no SMS. A formulação enriquecida com capim elefante (CE) apresentou os maiores teores em ambos os momentos avaliados (6,23 e 7,56% respectivamente).

O teor de proteína bruta (PB) é um ponto crucial para tomada de decisão sobre a adoção ou não de um ingrediente em formulações de rações para animais. Os teores de proteína bruta nas quatro formulações de substratos foram mantidos no SMS ou aumentados, como foi o caso da formulação com BC, que aumentou de 16,76 para 20%. Isto significa dizer que apesar do metabolismo de crescimento do *P. ostreatus* CC389 junto aos substratos, os teores de PB permaneceram inalterados ou enriquecidos. Provavelmente o que ocorreu foi à conversão de parte da proteína vegetal (TCA), por exemplo, em proteína microbiana (massa micelial).

Os teores de FDN e FDA estão relacionados aos mecanismos de digestibilidade dos carboidratos da fração holocelulósica (celulose e hemicelulose). Porém, cabe ressaltar que junto ao SMSs há outro tipo de carboidratos, que é a quitina (não determinada), que compõe a parede celular dos fungos (massa micelial). Os resultados de FDN de modo geral aumentaram no SMS quando comparado com o substrato inicial (Tabela 6). Os resultados de FDA também foram estatisticamente diferentes entre os substratos e SMSs, onde todos os valores aumentaram substancialmente, como foi o caso da formulação com FD que passou de 43,25 a 57,72%. De modo geral, pode-se inferir que o SMS, ou seja, biomassa pós-colheita dos cogumelos, apresentou maior digestibilidade que os substratos iniciais.

Os lipídios totais são determinados por meio da análise de extrato etéreo (EE), que é outro ponto importante quando se trata de formulação de rações animais. Os valores de EE em todos os SMSs foram menores que os substratos iniciais, mostrando que o *P. ostreatus* CC389 metabolizou parte ou todo o lipídio (caso tenha sido bioconvertido em massa micelial). O substrato enriquecido com SE, por exemplo, apresentou redução de EE de 3,29 a 0,76%; enquanto que na formulação FD a diminuição foi de 3,69 para 1,17% (Tabela 6).

Os cogumelos colhidos foram avaliados quanto aos teores de matéria seca, mineral, proteína bruta e extrato etéreo (Tabela 7). A matéria seca variou entre 90% e

95% nos diferentes tipos de substratos, enquanto que os teores de matéria mineral variaram entre 6,75 e 8,52%. A proteína bruta dos cogumelos colhidos no tratamento com substrato de FD apresentou os maiores valores (32,56%), enquanto que os demais variaram entre 28,79% e 30,94%. Os teores de extrato etéreo ficaram próximo de 1%, sendo que os cogumelos oriundos do tratamento BC diferiram de forma significativa (0,77%)

Tabela 7. Análise bromatológica dos cogumelos colhidos de *P. ostreatus* CC389 quando cultivados nas diferentes formulações de substratos com TCA (70%) enriquecida com outras fontes lignocelulósicas (30%).

MATÉRIA SECA (%)	
BC	95.05 ± 1.70 A
CE	90.16 ± 2.02 B
FD	93.44 ± 2.19 A
SE	90.83 ± 0.70 B
MATÉRIA MINERAL (%)	
BC	8.52 ± 0.49 A
CE	7.73 ± 0.35 A
FD	7.86 ± 0.60 A
SE	6.75 ± 0.28 B
PROTEÍNA BRUTA (%)	
BC	30.94 ± 0.50 B
CE	28.79 ± 0.34 C
FD	32.56 ± 0.62 A
SE	28.83 ± 0.88 C
EXTRATO ETÉREO (%)	
BC	0.77 ± 0.12 B
CE	1.04 ± 0.02 A
FD	1.13 ± 0.12 A
SE	1.00 ± 0.08 A

Legenda: SE: formulação contendo 70% de torta de caroço de algodão e 30% serragem de eucalipto; BC: formulação contendo 70% de torta de caroço de algodão e 30% Bagaço de cana de açúcar; FD: formulação contendo 70% de torta de caroço de algodão e 30% fibra de prensagem do fruto de dendê; CE: formulação contendo 70% de torta de caroço de algodão e 30% Capim elefante). Todos os dados são apresentados como médias ± desvio padrão de três repetições (n = 3). Os resultados com letras diferentes em uma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott (p <0,05).

5.6 ANÁLISE GOSSIPOL LIVRE (GL): FORMULAÇÕES DE SUBSTRATOS, COGUMELOS E SMSs – *Pleurotus ostreatus* CC389

A análise química dos teores de GL foi feita nas diferentes etapas do cultivo do *P. ostreatus* CC389, como os substratos (TCA + lignocelulosicos), biomassa pós-colheita dos cogumelos (SMS) e os cogumelos. Esta análise é de suma importância para validação da degradação do GL e provável destoxificação para permitir a alimentação animal (SMSs) e humana (cogumelos). Os testes toxicológicos com *A. salina* e roedores foram realizados e comprovaram a destoxificação total do GL, tanto no SMS como nos cogumelos (dados não apresentados).

O gossipol livre nos substratos preparados foram diferentes do controle (TCA autoclavado), ou seja, a adição de 30% de substratos lignocelulósicos junto ao TCA promoveu a diluição. Porém, os teores de GL nas formulações apresentaram diferenças estatísticas significativas. A serragem de eucalipto (SE) foi o substrato que mais preservou os teores de GL, enquanto que o capim elefante (CE) foi o que provocou maior degradação (Figura 21). Observa-se que as taxas de degradação de GL variaram entre 80 e 50% somente em virtude misturas dos substratos lignocelulósicos. O mesmo comportamento foi observado para os respectivos SMSs, porém com percentuais acima de 99%. Não há relatos científicos que explique o porque das diferenças, uma vez que o TCA foi igual para todos e o percentual de 30% de matéria-seca foi utilizado para os demais substratos. A hipótese levanta pelo presente trabalho refere-se a composição dos metabólitos gerados pelas diferentes misturas.

Nos SMSs foi observado que quanto maior a quantidade de GL remanescente presente anteriormente nas formulações dos substratos, maiores foram os percentuais de degradação. Os SMSs do *P. ostreatus* CC389 apresentaram resultados acima de 99,1% de degradação de GL, ou seja, deixando resíduos ínfimos (0,1 µg) (Figura 21).

Os teores de GL nos cogumelos colhidos nas diferentes formulações apresentaram resultados ainda menores do que os vistos nos SMSs (Figura 21). Deste modo, o *P. ostreatus* CC389 não acumulou GL nos cogumelos, ou seja, apresentando apenas 0,0004% ou 0,06 µg de gossipol residual. Esses valores não apresentaram diferenças significativas daqueles encontrados nos SMSs.

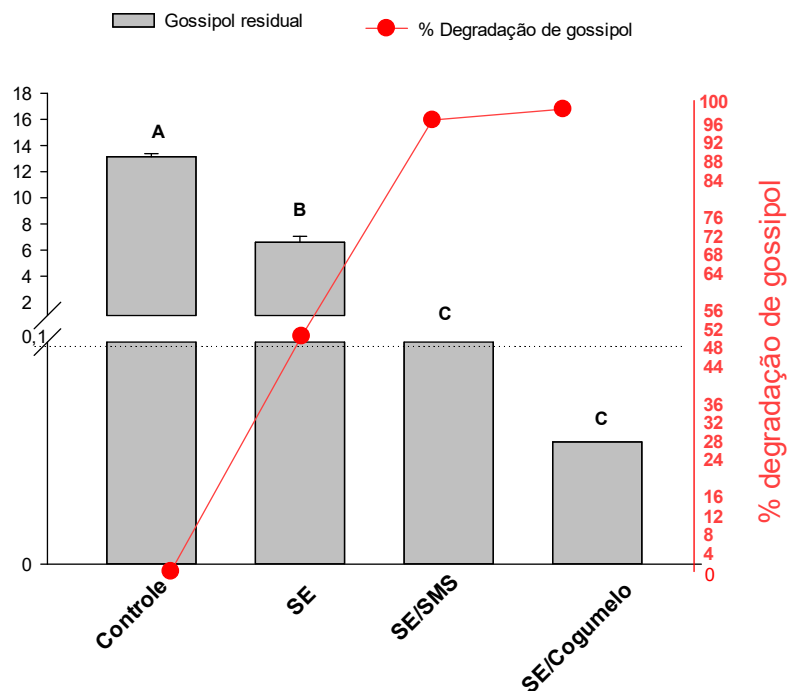
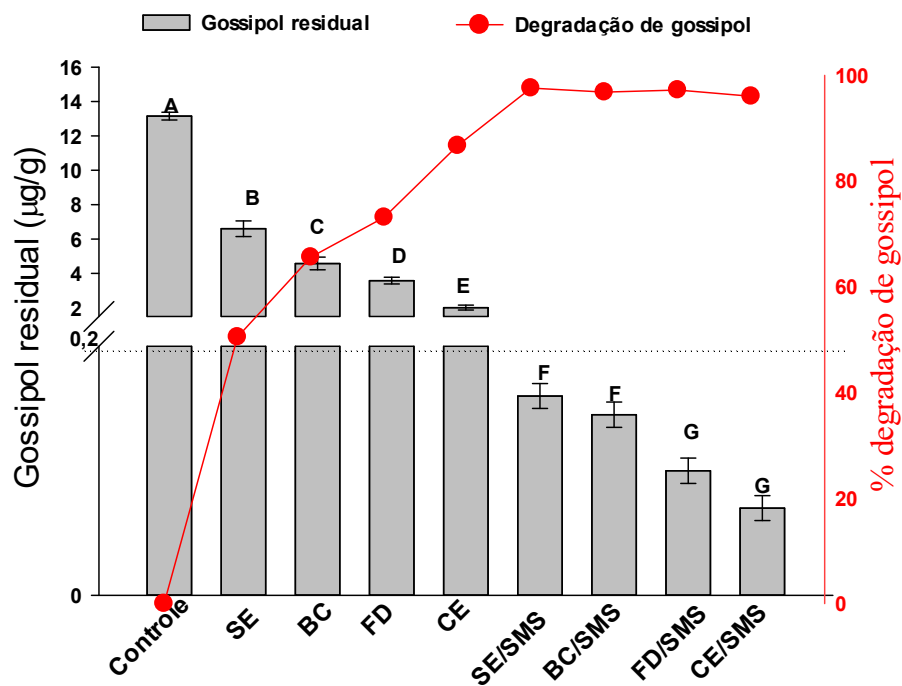


Figura 21. Degradação de gossipol livre por *Pleurotus ostreatus*CC389 nas diferentes fases de cultivo: *Gráfico superior* - substratos (autoclavados), SMSs; e, *Gráfico inferior* - cogumelos colhidos. *Legenda:* [(TCA 70% + 30% de SE: serragem de eucalipto); BC: [...Bagaço de cana de açúcar]; FD: [...Fibra de prensagem do fruto de dendê]; CE: [...Capim elefante)]. SMS: Spent Mushroom Substrate. Controle: TCA 100% autoclavada por 90 minutos. CE/Cogumelo: Corpo de frutificação obtido a partir do cultivo de TCA 70% + serragem de eucalipto (30%).

6. DISCUSSÃO

Diversos macrofungos, incluindo espécies como o *P. ostreatus*, são capazes de crescer e frutificar em diferentes substratos formulados com resíduos agroindustriais lignocelulósicos (SIQUEIRA et al., 2011; GONÇALVES et al., 2010). Os pacotes enzimáticos destes macrofungos credenciam tal capacidade de crescimento, servindo como exemplo as enzimas extracelulares como peroxidases e/ou ligninases (manganês peroxidase e lacases), celulases, pectinases, xilanases e diferentes oxidases (NYANHONGO et al., 2007). Essas enzimas são utilizadas pelos fungos para desconstruir os componentes da parede celular vegetal, fornecendo monômeros de açúcares e outros compostos fenólicos para a manutenção do metabolismo (KULSHRESHTHA et al., 2014; SIQUEIRA & FERREIRA-FILHO, 2010). A parede celular vegetal é constituída basicamente por três frações poliméricas: celulose (34-50%), hemicelulose (19-34%) e ligninas (11-30%), unidas por ligações covalentes formando uma rede resistente a ataques químicos e enzimáticos. A celulose está protegida pela lignina, que lhe confere rigidez, resistência e proteção enquanto que a hemicelulose atua ligando a lignina e a celulose (TONELOTTO, 2012).

Nesse trabalho evidenciamos a produção dessas enzimas durante a degradação de gossipol livre, quando do cultivo do *P. ostreatus* CC389 em diferentes combinações de substratos a base de TCA com outras fontes vegetais. A capacidade de degradação de gossipol por fungos já foram observadas em outros estudos. Mageshwaran et al. (2014), ao analisarem fungos provenientes de solos e cultivados em TCA, verificaram taxas de degradação de GL de até 65,2%. Mageshwaran et al., (2017) continuaram os estudos isolando e identificando fungos filamentosos de solos de plantações de algodão com a mesma aplicação e encontraram *Aspergillus terreus*, *Lichithemia ramosa*, *Alternaria alternata*, e quatro isolados de *Fusarium sp*, com degradação de até 65,2%, pelo *Fusarium thapsinum*.

Yang e colaboradores (2012), ao cultivar fungos filamentosos com meios de cultura acrescidos de gossipol, como fonte metabólica, propuseram que tais fungos degradam GL por ação das proteases. Os resultados das análises de proteoma sinalizaram que algumas proteases estão intimamente ligados à degradação desse fator (YANG et al. 2012). Outros autores apontam que as reações para degradação de gossipol por fungos filamentosos podem envolver interações com diferentes sistemas bioquímicos como as enzimas lignolíticas, quando associado com o sistema

do citocromo P450 monooxigenase, glicosiltransferases, além de radicais hidroxílicos (KULSHRESHTHA *et al.*, 2014). No nosso trabalho a principal enzima que apresentou correlação de aumento de atividade versus degradação do GL foi a MnP, uma oxidoreductase secretada pelos fungos de podridão branca para auxiliar na degradação da lignina, no entanto não foram feitas atividades com MnP purificadas versus o GL para fins de comprovação desta ação.

As atividades enzimáticas de *P. ostreatus* CC389 e a degradação de GL já foram relatadas na literatura. Ardonet *et al.* (1996), por exemplo, observaram excelentes atividades de lacases em quatro dias de cultivo submerso deste fungo em resíduos do processamento das sementes de algodão. Assim como em nosso estudo, Carvalho (2011) observou que o cultivo de fungos filamentosos por fermentação em estado sólido utilizando TCA como substrato foram capazes de produzir atividades significativas de manganês peroxidase.

As holocelulases (xilanase, FPase, CMCase e beta-glicosidase) foram observadas no cultivo *Pleurotus* sp em bagaço de cana de açúcar (MENEZES, 2009). Entretanto os resultados do trabalho deste autor assim como em nosso estudo, similares. Em nosso caso, as atividades de xilanase basais, como 0,11 U/mL em um período de 10 a 20 dias de cultivo, assim como CMCase, com 0,06 U/mL. Em contrapartida, quando os autores utilizaram um meio de cultivo otimizado com sabugo de milho combinado com aveia como fonte de carbono em meio submerso para o mesmo fungo, a atividade de xilanase foi de 24,98 U/mL (MENEZES, 2009).

A demanda por enzimas extracelulares com potencial biotecnológico é crescente, principalmente as de origem fúngicas. As aplicações são as mais diversas desde processos de biorremediação, biodestoxificação, nutrição animal, entre outras (MENEZES, 2009; SIQUEIRA & FERREIRA-FILHO, 2010; ZHU *et al.*, 2016).

Os resultados de atividades enzimáticas dos macrofungos e degradação de gossipol livre durante o cultivo microbiano abrem uma oportunidade para avaliar o potencial dos extratos brutos enzimáticos no processo de destoxificação de fatores antinutricionais de tortas oleaginosas. Ações essas que estão em andamento pelo grupo de trabalho da Embrapa Agroenergia e colaboradores (Universidades), tanto em tortas de sementes oleaginosas de algodão, pinhão-manso, mamona, entre outras de importância para setor de nutrição animal. Outra ação a ser feita diante dos resultados obtidos no processo de degradação de GL em TCA pelo *P. ostreatus* CC389 e demais é a análise proteômica dos extratos brutos. A purificação parcial e/ou concentração

de algumas das enzimas contidas no arsenal produzidos por estes fungos quando cultivados em tais condições poderá servir de base tecnológica para bio-desconstrução de biomassa vegetais, tanto oleaginosas como lignocelulósicas.

Os resultados quanto a EB e produtividade observados, mostraram que ao suplementar a torta de caroço de algodão com as demais biomassas lignocelulósicas, todas elas foram capazes de equilibrar a relação carbono/nitrogênio e assim, aumentar a bioconversão do substrato em corpos de frutificação. Baseados nos resultados da eficiência biológica foi selecionada para o escalonamento de produção e testes toxicológicos com roedores e suínos (dados não apresentados) a formulação com serragem de eucalipto (SE). Essa formulação apresentou 0,05 µg de gossipol livre ao final do cultivo, ou seja, 99,96% do gossipol originalmente presente na formulação acabou sendo degradado.

O gênero *Pleurotus* dispõe aproximadamente de 70 espécies descritas e o *P. ostreatus* aparece como a espécie mais comercializada do gênero, distribuída em várias regiões ao redor do mundo. Este grupo de cogumelos possui valor nutricional com diversas propriedades terapêuticas e inúmeras aplicações biotecnológicas, assim como alto valor gastronômico. Sua colonização é caracterizada como eficiente, contendo ciclos produtivos mais curtos quando comparado com outros cogumelos comestíveis, por exemplo, o gênero *Agaricus* (CARVALHO, 2013). Esses cogumelos, na sua maioria, apresentam elevado teor protéico, rico em aminoácidos essenciais, elevada proporção de ácidos graxos insaturados e baixos teores de gorduras e calorias. São igualmente considerados como importantes fontes de carboidratos, fibras, minerais e vitaminas (COGORNÍ et al., 2014). O teor proteico está relacionado com a composição do substrato, o tamanho do píleo, ao tempo de cultivo e da espécie fúngica, variando entre 19 e 39 % (BERNARDI et al., 2006).

No presente trabalho, o teor de proteína encontrado no cogumelo variou entre 28,8 e 32,6% (base seca), estando dentro do intervalo citado na literatura. Os cogumelos em geral apresentam baixo percentual de gordura que pode variar conforme a espécie e o substrato de 2 a 8 % da matéria seca (DUPRAT, 2015). O teor de gordura (extrato etéreo) verificado no presente trabalho (0,8 a 1,1%, em base seca) foi inferior às margens já relatadas. Bonatti (2004) cultivou *P. ostreatus* em folha de bananeira a fim de observar sua composição centesimal e obteve 5,97% de gordura bruta, 47,0% de carboidratos totais, 16,9% de proteína total, 9,41% de fibras, 3,85% de nitrogênio total e 5,58% de matéria mineral. Segundo Sciot et al. (2000), o *P.*

ostreatus cultivado em resíduos de algodão mostrou teores de proteína bruta entre 15 a 20%. Comparando os dados referidos aos encontrados, nossos estudos mostraram índices superiores, principalmente um alto teor de proteínas brutas e um baixo teor de gordura bruta.

7. CONCLUSÃO

Seis macrofungos foram capazes de degradar o gossipol livre residual presente em torta de caroço de algodão autoclavados quando utilizados como meio de crescimento.

O *Pleurotus ostreatus* CC389 reduziu os índices de gossipol livre em mais de 90% em meio contendo somente torta de caroço de algodão.

A eficiência biológica/produzibilidade de cogumelo de *Pleurotus ostreatus* CC389 ficou próximo de 20% e acima de 50%, respectivamente, quando o fungo foi cultivado em substrato contendo 70% de torta de caroço de algodão e 30% de outras fontes lignocelulósicas.

A torta de caroço de algodão demonstrou potencial para ser usada como substrato para produção de cogumelos, tendo em vista que os corpos de frutificação produzidos nesse cultivo estão praticamente isentos de gossipol livre.

As biomassas pós-colheita dos cogumelos de *Pleurotus ostreatus* CC389 apresentaram reduções superiores a 99% de gossipol livre.

As atividades de manganês peroxidase de *Pleurotus ostreatus* CC389 sugerem correlação com a degradação do gossipol livre

Os resultados obtidos neste trabalho são satisfatórios quanto a eficiência do *Pleurotus ostreatus* CC389 na degradação de gossipol livre presentes em torta de caroço de algodão; abrindo assim possibilidades da integração de cadeias produtivas de biodiesel (caroço de algodão), fungicultura (cogumelos comestíveis) e indústria de nutrição animal (insumos).

8. REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 260-268, 2008.

ABDURAKHIMOV, R. S., VESHKUROVA, O. N., UZBEKOV, V. V., ARZANOVA, I. A., SULTANOVA, E. M. AND SALIKHOV, S. I. (2009) 'Effect of cotton-seed biocidal peptides and gossypol on resistance to biotic factors', *Chemistry of Natural Compounds*, 45(2), pp. 213-216.

ABDURAKHIMOV, R.S. et al. Effect of cotton-seed biocidal peptides and gossypol on resistance to biotic factors. **Chem. Nat. Comp.** v. 45, p.213-216, 2009.

ABRAPA - Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. **A Cadeia do Algodão Brasileiro: Desafios e Estratégias**. Biênio 2011/2012.

AGUIAR, A; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

AMPA - Associação Matrogrossense de Produção de Algodão. **Algodão Social - 2017**. Disponível em: <<http://www.ampa.com.br/arquivos/AlgodaoSocial2017.pdf>>. Acesso em: 15 agosto 2017

ANFAVEA - Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. Portal na internet. Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br>>. Acesso em: 15 agosto 2017.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETROLEO (BRASIL). **Boletim Mensal de Biodiesel**. Brasília, DF, Dezembro, 2014. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>> Acesso em: 10 janeiro 2015.

ANPC, Associação dos Produtores de Cogumelos. **O setor de cogumelos**. Disponível em <www.anpccogumelos.org> Acesso em: 18 junho. 2017.

AOAC. Official methods of analysis. 16th Ed. **Association of Official Analytical Chemists**: Washington DC; 1999.

AOCS. (1985) Determination of free gossypol. Official method Ba. 7 – 58. Official and Tentative Methods of Analysis. 3rd ed. **American Oil Chemists Society**, Chicago.

ARAÚJO, A.E., Silva, C.A.D., Freire, E.C. et al. Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar. **EMBRAPA Algodão**. 2003.

ARDON, O.; KEREM, Z; HADAR, Y. 'Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract', **Journal of Biotechnology**, 51(3), pp. 201-207. (1996)

BARBOSA, R.N.E. 108 f. Torta de algodão com suplementação enzimática para frangos de corte. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia), **Universidade Federal Rural de Pernambuco**. Recife, 2016.

BELTRÃO, N.E.M. et al. Potencialidade de alguns subprodutos do algodoeiro. I. Fitomassa e seu subproduto principal, a celulose. Campina Grande: **Embrapa Algodão**, (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 114), 2000.

BENEDICT, C. R. et al. Terpenoid aldehyde formation and lysigenous gland storage sites in cotton: Variant with mature glands but suppressed levels of terpenoid aldehydes. **Phytochemistry**, v. 65, n. 10, p. 1351–1359, 2004.

BERNAS, E.; JAWORSKA, G.; LISIEWSKA, Z. Edible Mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. **Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.** 5.1 (2006)

BETT, C. F.; PERONDI M. A. Análise Do Mercado De Cogumelos Comestíveis E Medicinais: Uma Prospecção De Alternativa De Renda Para Agricultura Familiar Na Região Sudoeste Do Paraná. **Synergismus scyentifica UTFPR, Pato Branco**, v. 06, n.1. 2011.

BLANCHETTE, R.A. Degradation of lignocellulose complex in wood. **Can. J. Bot.** 73. s.999 - 1010, 1995.

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, London**, v.88, p.425-428, 2004.

BONFIM et al. Potencialidades da utilização de subprodutos da indústria de Biodiesel na alimentação de caprinos e ovinos. **Anais do III Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte**, 2007.

BRASIL. **Decreto Presidencial nº 5.297 de 6 de dezembro de 2004**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-006/2004/decreto/D5297.htm>. Acesso em: 15 fevereiro.2017.

BREENE, W.M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection** (53): 883-894, 1990.

BRESSANI, R.; ELIAS, L. G.; JARQUIN, R.; BRHAM, J. E. (1964). All-vegetable protein mixture for human feeding: Effect of cooking mixtures containing cottonseed flour on free gossypol content. **Food Tech.** 18, 1599–1603.

CALIXTO, Fabiana Herculano; LIRA, Waleska Silveira; CÂNDIDO, Gesinaldo Ataíde; VASCONCELOS, Ana Cecília F. de. **A Tecnologia do Algodão Colorido como Alternativa para o Desenvolvimento Sustentável no Setor Agrícola**. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/boaspraticas/download/Tecnologia_Algodao_Colorido_Alternativa_Desenvolvimento.pdf>. Acesso em: 15 dezembro 2017.

CANAM, T.; DUMONCEAUX, T.J.; RECORD E.; LI, YEBO. "White Rot Fungi: The key to sustainable biofuel production; **Biofuels**.Vol. 4, no. 3. (February 2013): 247-250.

CAR - CENTER AUTOMOTIVE RESEARCH. **The Potential Effects of the 2017-2025 EPA/NHTSA GHG/Fuel Economy Mandates on the U.S. Economy**. 2016.

CARNEIRO et al. A redução dos custos no uso de arranjos produtivos locais na gestão competitiva da logística de suprimentos. Estudo de caso no APL Leite & Sol da cadeia produtiva do leite no Estado do Ceará. **Anais - XIV Congresso Brasileiro de Custos**, 2007.

CARVALHO, C. S. M. et al. In vitro cultivation of *Pleurotus ostreatus* in banana tree residues. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, V. 9, N. 3, p 651-660 Set./Dez. 2013.

CÉSAR. A. S.; BATALHA, M. O. Brazilian biodiesel: The case of the palm's social projects. **Energy Policy**, v. 56, p.165-174, 2013.

CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A. 'Mushroom nutraceuticals', **World J Microbiol Biotechnol**, 12(5), pp. 473-6. (1996)

CHANG, S.; WASSER, S. **The Cultivation and Environmental Impact of Mushrooms**. **Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science**. (2017-03-29) Disponível em: <<http://environmentalscience.oxfordre.com/view/10.1093/acrefore/9780199389414.001.0001/acrefore-9780199389414-e-231>>. Acesso em: 15 dezembro 2017.

COGORNI, P.F.B.O.; SCHULTZ, 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 Sci. Technol. Int.**, 34 (2014), pp. 267-274

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v.4 **Safra 2016/2017**.n7. 8º levantamento, maio de 2017.

CONCEIÇÃO, Aparecido Almeida et al. 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.

DESER - Departamento de Estudos Sócio-Econômicos Rurais. Portal na Internet. Disponível em: <<http://www.deser.org.br>>. Acesso em: 15 dezembro 2017.

DUPRAT, L. A. et al. Potencial nutritivo de cogumelos *Pleurotus ostreatus* cultivados em folhas de pupunheira. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 33, n. 1, p. 18-29 jan/jun. 2015.

DUPRAT, L. A.; SOUZA J. V. Análise da comercialização e do consumo de cogumelos comestíveis no mercado do Distrito Federal e entorno. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, **Embrapa**. Brasília. v. 48, p. 1676 – 1340, 2003.

ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 2., 2015, Brasília, DF. Anais ... Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2015. p. 13-14

EPE - EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balço Energético Nacional 2014**: Ano base 2013. Brasília: EPE, 2014.

FAVARO, S. P.; MIRANDA, C.H.B.. **Aproveitamento de espécies nativas e seus coprodutos no contexto de biorrefinaria**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.

FAZAELI, H.; MASOODI, A. R. T. Spent Wheat Straw Compost of *Agaricus bisporus* Mushroom as Ruminant Feed. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** V. 19, N. 6, p. 845-851, 2006.

FERREIRA, C. C. M., & OLIVEIRA, D. E. (2016). Estimativa da poluição veicular e qualidade do ar nas principais vias do sistema viário da região central da cidade de juiz de fora–mg. **Revista do Departamento de Geografia**, (spe), 98-114.

FREIRE, C.E. Distribuição, coleta uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil. Campina Grande, **Embrapa**, 2000.

FREIRE, E. C. et al. Fluxo gênico: análise do caso do algodão no Brasil. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 104-113, 2002.

GADELHA, I. C. N. et al. Gossypol Toxicity from Cottonseed Products. **The Scientific World Journal**, Article ID 231635, p. 1-11, 2014.

GIMENES, J.L. Fungos Basidiomicetos- Técnicas de coleta, isolamento e subsídios para processos biotecnológicos. **Instituto de Botânica – Ibt**, 2010- São Paulo/SP.

GONÇALVES CCDM, PAIVA PCDA, DIAS ES, SIQUEIRA FGD & HENRIQUE F (2010) 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. **Ciencia E Agrotecnologia** 34: 220-225, 2010.

HENRY et al. The performance or broiler chicks fed diets containing extruded corronseed meal supplemented with lysine. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, 2001.

HIBBETT DS, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol Res.** 2007 May;111(Pt 5):509-47. Epub 2007 Mar 13.

KIRK, T.K. & FARREL, R.L. Enzymatic ,combustion ': The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**. v.41, p.465-505, 1987.

KONG G.; DAUD M.K.; ZHU S. Effects of pigment glands and gossypol on growth, development and insecticide-resistance of cotton bollworm (*Heliothis armigera* (Hübner)). **Crop Protec**, v. 29, p.813-819, 2010.

KULSHRESHTHA, S.; MATHUR, N.; BHATNAGAR, P. 'Mushroom as a product and their role in mycoremediation', **AMB Express**, 4(1), (2014) pp. 29.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. **O biocombustível no Brasil**. Novos Estudos - CEBRAP, (78), 15-21. (2007). Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S0101-33002007000200003>>. Acesso em: 15 fevereiro 2017.

LIADAKIS, G.N.; ANASTASIOS, F.; CONSTANTINA, Tzia; VASSO, Oreopoulou. Protein isolates with reduced gossypol content from screw-pressed cottonseed meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 41(6), June 1993

LIM S.J; LEE K.J. A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **J World Aquac Soc.** 2011;42: 494–503.

LIU, J.; STIPANOVIC, R. D.; BELL, A. A.; PUCKHABER, L. S.; MAGILL, C. W. Stereoselective coupling of hemigossypol to form (b)-gossypol in moco cotton is mediated by a dirigent protein. **Phytochemistry** 69, (2008) 3038–3042.

LONGMORE, J. Cotton-seed oil: Its colouring matter and mucilage, and description of a new method of recovering the loss occurring in the refining process. **J. Soc. Chem. Ind. (Lond.)** 5, (1886) 200–206.

LOPES, R. P. X. Produção de mudas e frutos de tomateiro a partir de compostos pós-cultivo do cogumelo *Agaricus subrufescens*. Dissertação - Lavras. **Universidade Federal de Lavras**, 2014.

LUNARDON, T.M. **Análise da conjuntura agropecuária** Safra 2007/08 ALGODÃO. 2007. Disponível em: <www.seab.pr.gov.br>. Acesso em: 15 fevereiro 2017.

LUSAS, E. W.; JIVIDEN, G. M. (1987). Glandless cottonseed: A review of the first 25 years of processing and utilization research. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 64, 839–854.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review1. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 10// 1999.

MAGESHWARAN, V.; MAJEE, S.B. 'Isolation and identification of potential Gossypol degrading fungal strains from cotton growing soil. Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase', **Microbiology Research Journal International**. 21(1), (2017) Part pp. 1-6

MARSIGLIO, B.N. Utilização do caroço de algodão na nutrição animal X gossipol. **IEPEC**, 2010.

MATTEI, L. Programa Nacional para Produção e Uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): Trajetória, Situação Atual e Desafios. **Documentos Técnico-Científicos**, V. 41 N° 04, 2010.

MEGALE, Antônio. **Desempenho Da Indústria Automobilística Brasileira**, 2017.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos** - Vol. 5, nº 1:68-78, São Paulo, 2009.

MEYER, L. United States Departmente of Agriculture-USDA- **Cotton and Wool Outlook**, May, 2017.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Anal. Chem**, 1959, 31 (3), pp 426–428 DOI: 10.1021/ac60147a030

MME - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Boletim mensal dos combustíveis Renováveis**, Brasília, SPG, n. 88, maio, 2016.

MORGAN, S. E. Gossypol as a toxicant in livestock. *Veterinary Clinics of North America*, **Food Animal Practice**, v. 5, n. 2, p. 251–262, 1989.

NAGALAKSHMI, D.; SASTRY, V. R. B.; AGRAWAL, D. K. Detoxification of undecorticated cottonseed meal by various physical and chemical methods. **Anim. Nutr. Feed Technol.**2, 117–126. 2002.

NAGALAKSHMI, D.; SASTRY, V. R. B.; PAWDE, A. Rumen fermentation patterns and nutrient digestion in lambs fed cottonseed meal supplemental diets. **Anim. Feed Sci. Technol.** 103, 1–4. 2003.

NAVES, LUCIANA DE PAULA et al. Componentes antinutricionais e digestibilidade proteica em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) submetidas a diferentes processamentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 30, supl. 1, p. 180-184, May, 2010.

NCPA - National Cottonseed Products Association. **Cottonseed feed products guide**. 2003.

NYANHONGO, G. S., GÜBITZ, G., SUKYAI, P., LEITNER, C., HALTRICH, D.; LUDWIG, R. 'Oxidoreductases from *Trametes* spp. in Biotechnology: A Wealth of Catalytic Activity', **Food Technology & Biotechnology**, 45(3). (2007)
Nyanhongo, G. S., Gübitz, G., Sukyai, P., Leitner, C., Haltrich, D. and Ludwig, R. (2007) 'Oxidoreductases from *Trametes* spp. in Biotechnology: A Wealth of Catalytic Activity', *Food Technology & Biotechnology*, 45(3).

ODERICH, E. H. Desempenho e potencial agrônômico da produção de etanol em microdestilarias em pequenas propriedades da região noroeste do Rio Grande Do Sul. 2013. 117 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Desenvolvimento Rural) – **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Rio Grande do Sul.

OLIVEIRA, M., DONEGA, M. A., PERALTA, R. M. AND SOUZA, C. (2007) 'Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet-CCB19 a partir de resíduos da agroindústria', *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1), pp. 84-87.

PAIM et al. Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes. **Ciênc. vet. tróp.**, Recife-PE, v. 13, no 1/2/3, p. 24 - 37 - janeiro/dezembro, 2010.

PHAN, C.; SABARATNAM, V.. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 96, p. 863–873, 2012.

QUEIROZ, D. R. Análise genética para caracteres agronômicos e tecnológicos de fibra em genótipos de algodoeiro herbáceo (*Gossypium hirsutum* L. var. *Latifolium* Hutch.). 2017. 62f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - PPGCA) - **Universidade Estadual da Paraíba**, Campina Grande, 2017.

RAJARATHNAM S, SHASHIREKHA MN. e BANO Z. Biodegradation of gossypol by the white oyster mushroom, *Pleurotus florida*, during culturing on rice straw growth substrate, supplemented with cottonseed powder. **World J Microbiol Biotechnol.** 2001.

RAVEN, P. **Biologia Vegetal.** 6.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001.

RODRIGUES, F. V., RONDINA D. Alternativas de uso de subprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de ruminantes: glicerina bruta. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.91-99, 2013.

ROMERO, A.C. Resíduos da produção de biodiesel: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal. Tese- **Universidade De São Paulo Centro De Energia Nuclear Na Agricultura**, Piracicaba, 2013.

ROYSE, D. J. A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*. **Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8)**, New Delhi, India, 19-22 November 2014. Volume I & II 2014

RUSSO, L. Ozone oxidation and aerobic biodegradation with spent mushroom compost for detoxification and benzo(a)pyrene removal from contaminated soil. **Chemosphere**, v. 87, p. 595–601, 2012.

SALLET, Cíntia Letícia; ALVIM, Augusto Mussi. Biocombustíveis: uma análise da evolução do biodiesel no Brasil. **Economia & Tecnologia** - Ano 07, Vol. 25 - Abril/Junho de 2011

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. Fungos – Principais grupos e aplicações biotecnológicas. **Instituto de Botânica – Ibt**, out. 2006 - São Paulo/SP.

SIQUEIRA FG & FILHO EXF. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 7: 54-60, 2010.

SIQUEIRA FG, MARTOS ET, DA SILVA R & DIAS ES. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on banana stalk and Bahia grass based substrates. **Horticultura Brasileira** 29: 199-204, 2011.

STIPANOVIC, R. D.; ALTMAN, D. W.; BEGIN, D. L.; GREENBLATT, G. A.; BENEDICT, J. H. Effects of cotton terpenoid aldehydes on resistance to *Heliothis*.

International Union of Pure and Applied Chemistry, Sixth Int. **Congr. Pest. Chem.** Ottawa, Canada, 2D/E-05. 1986.

SUN FF, HONG J, HU J, SADDLER JN, FANG X, ZHANG Z & SHEN S. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. **Enzyme Microb Technol** 79-80: 42-48, 2015.

TIBURCIO, B. A. Atores sociais, agricultura familiar e desenvolvimento territorial: Uma análise do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. Tese de Doutorado. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2011.

TONELOTTO, M. Produção de celulasas, purificação e caracterização bioquímica-cinética da β -galactosidase produzida por fungo isolado da região amazônica. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia). **Universidade Federal do São Carlos**. São Carlos. 2012.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8ª Ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

VAN SOEST, Peter. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Cornell University Press, 1994

VARGAS, A. M. Análise Diagnostica da Cadeia produtiva de cogumelos do Distrito Federal. Dissertação- Brasília. **Universidade de Brasília**, programa de Pesquisa e pós graduação em Agronegócio, 2011.

VIANNA et al. Avaliação de fungos filamentosos isolados a partir de solo contendo glicerina para produção de compostos químicos por bioconversão. In: **Anais do II Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia**, 2016.

WOLFENDEN, B. S.; WILLSON, R. L. 'Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2[prime or minute]-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)', **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions 2, (7), pp. 805-812. (1982)

XI-WANG et al. Gossypol-A Polyphenolic Compound from Cotton Plant. **Chapter 6**. 2009.

XUE, C. C.; O'BRIEN, K. A. Modalities of Chinese medicine. In P. C. Leung, C. C. Xue, & Y. C. Cheng (Eds.), **Comprehensive guide to Chinese medicine** (pp. 21–46). Singapore: World Scientific (2003).

YANG X.; GUO J.; SUN J. Biodegradation of free-gossypol by a new fungus isolated from cotton planted soil. **African J Microbiol Res**. 2011.

YANG, X., GUO, J. AND SUN, J. (2011) 'Biodegradation of free-gossypol by a new fungus isolated from cotton planted soil', **African Journal of Microbiology Research**, 5(19), pp. 3066-3072.

YANG, X., SUN, J. Y., GUO, J. L. AND WENG, X. Y. (2012) 'Identification and proteomic analysis of a novel gossypol-degrading fungal strain', ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, 92(4), pp. 943-951.

YANG, X.; SUN, J. Y.; GUO, J. L.; WENG, X. Y. 'Identification and proteomic analysis of a novel gossypol-degrading fungal strain', ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, 92(4), pp. 943-951. (2012)

ZHANG W.; XU Z, SUN J.; YANG X. Effect of selected fungi on the reduction of gossypol levels and nutritional value during solid substrate fermentation of cottonseed meal. ***J Zhejiang Univ Sci B***. 2006.

ZHANG W.J.; XU Z.R.; PAN X.L.; YAN X.H.; WANG Y.B. Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. ***Livest Sci*** 111:19. 2007.

ZHANG, W. J., XU, Z. R., ZHAO, S. H., JIANG, J. F., WANG, Y. B. AND YAN, X. H. (2006) 'Optimization of process parameters for reduction of gossypol levels in cottonseed meal by *Candida tropicalis* ZD-3 during solid substrate fermentation', ***Toxicon***, 48(2), pp. 221-6.

ZHU N, LIU J, YANG J, ET AL. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. ***Biotechnology for Biofuels*** 9: 1-22, 2016

ZHU, H. et al. Combined alkali and acid pretreatment of spent mushroom substrate for reducing sugar and biofertilizer production. ***Bioresource Technology***, v. 136, p. 257–266, 2012.