



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

CLEMENTE BATISTA SOARES NETO

**DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL POR MACROFUNGOS E ANÁLISE DO  
SECRETOMA DE *PANUS LECOMTEI* DURANTE CRESCIMENTO EM CAROÇO  
DE ALGODÃO**

BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL  
2019

CLEMENTE BATISTA SOARES NETO

**DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL POR MACROFUNGOS E ANÁLISE DO  
SECRETOMA DE *PANUS LECOMTEI* DURANTE CRESCIMENTO EM CAROÇO  
DE ALGODÃO**

Tese apresentada à Universidade de Brasília  
como requisito para a obtenção do título de  
Doutor em Biologia Molecular pelo Programa  
de Pós-Graduação em Biologia Molecular.  
Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller  
Co-orientador: Félix Gonçalves de Siqueira

BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL  
2019

**DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL POR MACROFUNGOS E ANÁLISE DO  
SECRETOMA DE PANUS LECOMTEI DURANTE CRESCIMENTO EM CAROÇO  
DE ALGODÃO**

**CLEMENTE BATISTA SOARES NETO**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart - Membro Interno (UnB)**

**Dr<sup>a</sup>. Simone Mendonça - Membro Externo (Embrapa Agroenergia)**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amanda Araújo Souza - Membro Externo (IESB)**

**Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale - Membro Suplente (UnB)**

**Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller - Presidente (UnB)**

**BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL  
2019**

*À minha eterna amiga e amada filha Maria Cecília, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me possibilitado trilhar todo esse caminho guiando-me sempre.

Aos meus pais, Alberto Soares e minha mãe Mariza Soares, a vocês minha eterna gratidão, acredito que prova maior de amor não há do que mesmo sem compreender muito bem, abdicar e acreditar durante todos esses anos no que se tornara nossos sonhos!

A minha filha Maria Cecília S. Soares, obrigado por ser minha fonte de inspiração e luz nessa caminhada. Como você dizia: “Ôba! Papai vai ser doutor!”.

A toda minha família, em especial ao meu irmão William Soares, sei o quanto as minhas angústias também foram as suas.

A Alexandra por se fazer presente em tantos momentos.

A Félix Siqueira por acreditar que tudo isso seria possível desde a graduação até aqui, pela paciência e por todos os conselhos. Obrigado pela oportunidade ímpar em não somente me orientar, mas por permitir ir além: criarmos em equipe!

Ao meu Orientador Prof. Dr. Robert Miller, pelos inúmeros momentos, pela valiosa contribuição sem os quais nada disso seria possível. Agradeço por me mostrar o quanto exemplo e dedicação são grandes aliados no desenvolvimento pessoal e profissional. *Thank you very much.*

Agradeço aos colegas do laboratório de interação planta-praga da UnB. Tati e Érica, em especial a Dr. Gabriel por ser voz ativa em muitas das reuniões, Dr. Djair pelo auxílio nos gráficos, Dr. Fernando pela disponibilidade, Taisa por todas as contribuições nesses 4 anos, minha gratidão!

Agradeço aos colegas e equipe do laboratório LPB da Embrapa Agroenergia, Aparecido, Ana Paula, Jaya, Joice, Anthony, Elias, Rubén, Sámed e Caio pelas dicas. Agradecimento especial a Dra. Amanda por auxiliar nos experimentos finais dessa tese. A Dra. Simone Mendonça pelas importantes contribuições e confiança depositada desde o início. Aos analistas: Agenor Marques, Thályta Fraga, Thaís Demarchi, e em especial José de Aquino e Raquel Bombarda.

Agradeço à equipe do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da UnB nas figuras dos profs. Dr. Carlos André, Dr. Wagner Fontes e Dra. Mariana Castro pelas contribuições no desenvolvimento das análises de secretoma, importantíssimas na discussão desta tese.

Agradeço ao prof. Dr. Danilo Pinho pelo auxílio inicial nos trabalhos de identificação dos fungos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular (PPGBiomol) e à Universidade de Brasília, pela estrutura e pelos recursos financeiros. Pela oportunidade de fazer parte de um programa de excelência em ensino e pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro do projeto.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

Aos amigos pela torcida e incentivos; Geysa, em especial, pelas revisões cruciais nessa última etapa da tese. A todos obrigado pelas orações e energia positiva dedicadas durante todos esses anos!

*Nobody said it was easy  
It's such a shame for us to part  
Nobody said it was easy  
No one ever said  
It would be this hard  
Oh take me back to the start  
(Coldplay)*

## RESUMO

A torta de caroço de algodão (TCA) é um abundante subproduto obtido de agroindústrias, rico em proteínas. Entretanto, sua aplicação na nutrição de animais monogástricos é limitada pela presença de gossipol livre (GL), uma substância tóxica. Alguns fungos basidiomicetos são capazes de degradar TCA quando cultivados em fermentação em estado sólido (FES), secretando enzimas hidrolíticas e lignolíticas. Neste estudo, o potencial de macrofungos na degradação de GL foi avaliado e proteínas potencialmente envolvidas na biodestoxificação desse fator antinutricional foram identificadas. Para detectar de forma precisa o GL em níveis de traços, foi desenvolvido um método em cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) para quantificar GL em diferentes amostras. Os limites de detecção e quantificação foram observados em 0,2 e 0,5 µg/mL, respectivamente, com boa reprodutibilidade, precisão (RSD-Relative Standard Deviation) <10% e recuperação superior a 94%. Empregando-se esse método foi possível selecionar diferentes macrofungos capazes de degradar GL quando cultivados em FES. Os macrofungos promissores foram *Pleurotus ostreatus* (CC389), *Pleurotus sapidus* (CC28), *Panus lecomtei* (CC40), *Ganoderma lucidum* (CC351) e *Pycnoporus sanguineus* (CC400). Em outro momento, foram comparados diferentes métodos de pré-tratamento para redução de GL em caroço de algodão. Um tratamento químico com Ca(OH)<sub>2</sub> eliminou 99,9% do GL; a pré-compostagem biológica reduziu o GL em 99% após seis dias, e um método físico (autoclavagem) em 96,3% após exposição de 60 minutos. Um pré-tratamento utilizando um método combinado de autoclavagem seguida de FES por macrofungos, forneceu maiores níveis de reduções do que os mencionados acima, como também ofereceram melhorias nutricionais nas características do substrato final obtido, elevando os teores de proteína total e reduzindo lipídios totais. O substrato colonizado com os macrofungos *P. ostreatus* e *P. lecomtei* foi analisado quanto à presença de enzimas lacases e manganês peroxidase secretadas por fungos em um período de incubação de 15 dias. Na segunda etapa, *P. lecomtei* foi selecionado e novamente inoculado nas biomassas: caroço de algodão (CAT) tratado por autoclavagem e caroço de algodão tratado com Ca(OH)<sub>2</sub> (CAT-TR). Extratos brutos (EBs) foram obtidos a partir de cada cultivo e foram testados quanto à capacidade em degradar gossipol sintético (gossipol acetato) e inibidores derivados da lignina. Foi observada degradação total do gossipol sintético em apenas 60 minutos de incubação com degradação de inibidores enzimáticos, com destaque para o EB derivado de CAT-TR, com degradação de até 95% de ácido sinápico ao final de 240 minutos de incubação. Foram utilizadas abordagens proteômicas com o intuito de caracterizar o perfil do secretoma desses EBs (obtidos após seis e 12 dias de cultivo), por LC-MS/MS. Diferentes perfis proteicos foram identificados de acordo com o tipo de pré-tratamento empregado na biomassa bem como em função dos tempos de cultivo. Sendo assim, é provável que diferentes proteínas estejam envolvidas na sobrevivência do fungo e também na degradação de compostos tóxicos como o gossipol. As proteínas/enzimas com potencial biotecnológico obtidas dos EBs incluíram as lacases, peroxidases, oxidoredutases, *heat shock proteins*, metaloproteases, glucanases e citocromo b5, que atuam em vias envolvidas na oxidação de substratos, destoxificação de fatores tóxicos, estresse oxidativo, na quelatação de metais, degradação de lignina e respiração celular. A produção dessas enzimas pode ocorrer devido à presença do gossipol, com participação destas na biodestoxificação de GL, potencializando o uso de CAT na nutrição de animais monogástricos. Em resumo, os resultados deste estudo demonstraram eficiente degradação de GL por ação de diferentes abordagens econômicas e não poluentes. Os mecanismos enzimáticos envolvidos na degradação de GL foram investigados, com *P. lecomtei* apresentando considerável capacidade de produzir enzimas para a degradação GL, assim como da parede celular vegetal, com significativo potencial biotecnológico.

**Palavras-chave:** macrofungos, secretoma, gossipol livre, caroço de algodão, proteoma, enzimas, lacase, manganês peroxidase.



## ABSTRACT

Cottonseed cake (CSC), an abundant byproduct obtained from agribusinesses, is rich in proteins. Application in monogastric animal nutrition, however, is limited, due to the presence of free gossypol (FG), a toxic substance. Certain basidiomycete fungi are able to process CSC when cultured in solid state fermentation (SSF), secreting hydrolytic and lignolytic enzymes. In this study, the potential of different macrofungi in transforming FG was evaluated, with proteins potentially involved in biodegradation of this antinutritional factor identified. In order to accurately detect trace levels of FG, a method based on ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) was developed to quantify FG in different samples. Limits of detection and quantification were observed at 0.2 and 0.5 µg/mL respectively, with good reproducibility, precision (RSD - Relative Standard Deviation) <10%, and recovery above 94%. Employing this detection method, it was possible to select different macrofungi capable of degrading FG when cultivated in SSF. Promising macrofungi comprised *Pleurotus ostreatus* (CC389), *Pleurotus sapidus* (CC28), *Panus lecomtei* (CC40), *Ganoderma lucidum* (CC351), and *Pycnoporus sanguineus* (CC400). Later, different pretreatment methodologies for FG reduction in cottonseed were compared. A chemical treatment with Ca(OH)<sub>2</sub> eliminated 99.9% of FG; biological pre-composting reduced free gossypol by 99% after 6 days, and a physical method (autoclaving) by 96,3% after 60 minutes. Pre-treatment employing a combined method of autoclaving followed by SSF by macrofungi resulted in greater levels of reduction than the above treatments, as well as improving nutritional characteristics of the final substrate, raising total protein levels and reducing total lipids. Substrate colonized with the macrofungi *P. ostreatus* and *P. lecomtei* was analysed for the presence of fungal-secreted laccases and manganese peroxidase enzymes over a 15 day incubation period. In a second step, *P. lecomtei* was selected and again inoculated onto the biomasses: cottonseed (CS) treated by autoclaving and cottonseed treated with Ca (OH)<sub>2</sub> (CS-TR). Crude extracts (CEs) were obtained from each culture and tested for the ability to degrade synthetic gossypol (gossypol acetate) and inhibitors derived from lignin. Total degradation of synthetic gossypol was observed after only 60 minutes incubation, with inactivation of enzymatic inhibitors also detected, highlighting the CEs originating from CS-TR, with degradation of up to 95% of gossypol after 240 minutes incubation. Proteomic approaches were applied to characterize the secretome profile of these CEs (obtained following 6 and 12 days of culture) by LC-MS/MS. Different protein profiles were identified according to the type of biomass pretreatment applied as well as the time of cultivation. Different proteins are likely involved in fungal survival and also in degradation of toxins such as gossypol. Proteins/enzymes of biotechnological potential obtained from the CEs included laccases, peroxidases, oxidoreductases, shock proteins, metalloproteases, glucanases and cytochrome b5, which act in pathways involved in oxidation of substrates, detoxification of toxic factors, oxidative stress, in metal chelation, lignin degradation and cellular respiration. The production of such enzymes may be due to the presence of gossypol, with their participation in FG detoxification potentializing CSC use for monogastric animal nutrition. In summary, the findings of this study demonstrated efficient FG degradation using different economical, non-polluting approaches. Investigation of enzymatic mechanisms involved in FG degradation were investigated, with *P. lecomtei* exhibiting considerable capacity in producing enzymes for both FG and plant cell wall degradation, with relevant biotechnological potential.

**Keywords:** macrofungi, secretome, free gossypol, cottonseed, proteome, enzymes, laccase, manganese peroxidase.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

Figura 1 - Estrutura geral do gossipol.....	27
Figura 2 - Conjugação do gossipol com grupo amino de proteínas, transformando a forma livre em ligada.....	28
Figura 3 - Corte transversal de uma microfibrila de madeira com os três principais componentes das paredes celulares.....	31
Figura 4 - Estrutura química da celulose.....	33
Figura 5 - Características de relevância utilizadas na identificação morfológica de macrofungos.....	38
Figura 6 - Fluxograma para identificação de fungos usando análise filogenética molecular.....	39
Figura 7 - Organização geral do DNA ribossômico de fungos, evidenciando as subunidades do RNA ribossômico (18S [subunidade menor (SSU)], RNAr 5.8S e 28S [subunidade maior (LSU)] e de regiões intergênicas ITS1 e ITS2 .....	40
Figura 8 - Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Pleurotus spp</i> .....	44
Figura 9 - Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	45
Figura 10 - Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Panus lecomtei</i> .....	46
Figura 11 - Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	47
Figura 12 - Esquema de alguns processos realizados em microescala durante a fermentação em estado sólido (FES).....	54
Figura 13 - Substratos lignocelulósicos para cultivo artificial de plantas comestíveis e cogumelos medicinais. ....	57
Quadro 1 - Quadro de classificação dos fungos baseada em análises filogenéticas...42	
Quadro 2 - Aspectos gerais de macrofungos usados em FES por meio de resíduos agroindustriais e suas aplicações biotecnológicas.....	56

### CAPÍTULO II

Figure 1 - UHPLC chromatograms of free gossypol (FG) extracted from cottonseed cake (CSC) using different acetone concentrations .....	72
Figure 2 - Spectrum extracted from peaks observed in Fig 1B.....	73
Figure 3 - UHPLC chromatograms of standard gossypol generated following comparison of different elution organic phases.....	74
Figure 4 - UHPLC chromatogram of cottonseed sample spiked with standard gossypol (50 µg/mL).....	74
Figure 5 - UHPLC chromatograms and respective spectra at 254 nm of gossypol from standard solution and cottonseed sample extracts .....	75
Figure 6 - UHPLC chromatogram for standard gossypol and free gossypol (FG) extracts from CSC and FCSC.....	76

### CAPÍTULO III

Figure 1 - Free gossypol content in crushed whole cottonseed following physical and chemical treatments .....	108
Figure 2 - Free gossypol content in crushed whole cottonseed following pre-composting and following combined pre-composting and physical treatment (COMBO - Compost-Phys) .....	108
Figure 3 - Free gossypol content in crushed whole cottonseed following combined physical and biological solid state fermentation (COMBO-Phys-SSF) treatment with macro-basidiomycete fungi .....	109
Graphic 1 - TOC graphic .....	110

### CAPÍTULO IV

Figura 1 - Esquema geral utilizado para análise de secretoma global do macrofungo <i>Panus lecomtei</i> CC40 incubado em fermentação em estado sólido (FES), nos substratos caroço de algodão comum (CAT) e caroço de algodão tratado quimicamente .....	125
Figura 2 - Degradação de gossipol livre por ação do macrofungo <i>Panus lecomtei</i> CC40 durante 15 dias de cultivo em fermentação em estado sólido de caroço de algodão (CAT) comum - .....	129
Figura 3 - Curva de indução de atividades enzimáticas de manganês peroxidase e lacase (UI/mL), do macrofungo CC40 <i>Panus lecomtei</i> , crescidas em caroço de algodão comum (CAT) durante 15 dias.....	132
Figura 4 - Curva de indução de atividades enzimáticas de manganês peroxidase e lacase (UI/mL), do macrofungo CC40 <i>Panus lecomtei</i> , crescidas em caroço de algodão tratado quimicamente (CAT-TR) comum durante 15 dias.....	132
Figura 5 - Curva de indução de atividades enzimáticas de proteases (UI/mL), do macrofungo CC40 <i>Panus lecomtei</i> , crescidas em caroço de algodão comum (CAT) durante 15 dias.....	134
Figura 6 - Curva de indução de atividades enzimáticas de proteases (UI/mL), do macrofungo CC40 <i>Panus lecomtei</i> , crescidas em caroço de algodão tratado quimicamente (CAT-TR) durante 15 dias.....	135
Figura 7 - Degradação de gossipol livre após 18 horas de incubação do extrato bruto (obtido por fermentação em estado sólido) de <i>Panus lecomtei</i> CC40 com Caroço de algodão comum.....	137
Figura 8 - Degradação de gossipol livre após 18 horas de incubação do extrato bruto (obtido por fermentação em estado sólido) de <i>Panus lecomtei</i> CC40 com Caroço de algodão geneticamente modificado.....	137
Figura 9 - Avaliação de solubilidade de gossipol sintético (gossipol acetato) em diferentes solventes, tendo como controle gossipol sintético dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido).....	139
Figura 10 - Gossipol sintético remanescente após incubação com diferentes extratos	

obtidos da FES de <i>Panus lecomtei</i> CC40 em caroço de algodão comum (CAT) e tratado quimicamente (CAT-TR) com Ca(OH) <sub>2</sub> e após ultrafiltrados com diferentes <i>cutoffs</i> -membrana.....	141
Figura 11 - Perfil comatográfico do extrato do fungo <i>Panus lecomtei</i> CC 40 após cultivo em caroço de algodão comum (CAT) evidenciando as frações degradadoras de gossipol livre.....	143
Figura 12 - Degradação de gossipol sintético através de extrato bruto parcialmente purificado obtido da FES de <i>Panus lecomtei</i> CC40, crescido em CAT comum após cromatografia de exclusão molecular.....	143
Figura 13 - Perfil comatográfico do extrato do fungo <i>Panus lecomtei</i> CC 40 após cultivo em caroço de algodão comum tratado com Ca(OH) <sub>2</sub> (CAT-TR) evidenciando as frações degradadoras de gossipol livre.....	144
Figura 14 - Degradação de gossipol sintético usando extrato bruto enzimático obtido da FES de <i>Panus lecomtei</i> CC 40, crescido em CAT tratado com Ca(OH) <sub>2</sub> após cromatografia de exclusão molecular.....	144
Figura 15 - Provável mecanismo enzimático (lacase) de macrofungos como o <i>P. lecomtei</i> proposto para degradação de gossipol livre presente em caroço de algodão.....	146
Figura 16 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas presentes nas frações cromatográficas eluídas provenientes do extrato bruto e ultrafiltrados (50 kDa) do cultivo de <i>Panus lecomtei</i> CC40 em caroço de algodão comum (CAT).....	148
Figura 17 - Perfil eletroforético das proteínas (SDS-PAGE) presentes nas frações cromatográficas eluídas provenientes do do extrato bruto e ultrafiltrados (50 kDa) cultivo de <i>Panus lecomtei</i> CC40 em caroço de algodão comum tratado quimicamente (CAT-TR).....	148
Figura 18 - Degradação de compostos fenólicos usando extrato bruto enzimático obtido da FES de <i>Panus lecomtei</i> CC 40, crescido em CAT comum (A) e CAT tratado (B) com Ca(OH) <sub>2</sub> .....	149
Figura 19 - Análises de PCA em cinza indicando cada proteína identificada durante o tempo 6 dias.....	159
Figura 20 - Análises de PCA em cinza indicando cada proteína identificada durante o tempo 12 dias.....	160
Figura 21 - Dendrograma mostrando o agrupamento de proteínas de acordo com seus perfis de abundância, durante o tempo 6 dias.....	161
Figura 22 - Dendrograma mostrando o agrupamento de proteínas de acordo com seus perfis de abundância, durante o tempo 12 dias.....	162
Figura 23 - Perfis de abundância relativa de proteínas agrupados, durante tempo de incubação de 6 dias.....	163
Figura 24 - Perfis de abundância relativa de proteínas agrupados, durante tempo de incubação de 12 dias.....	164
Figura 25 - VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições- CAT e CAT-TR no tempo 6 dias.....	165
Figura 26 - VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições- CAT e CAT-TR no tempo 12 dias.....	166

Figura 27 - A e B: sPLS-DA 3D mostrando agrupamento de replicatas e diferenciação entre condições.....	167
Figura 28 - Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições. Em A: 6 DIAS conjunto das 50 proteínas e em B: 12 DIAS conjunto das 20 proteínas.....	168
Figura 29 - Agrupamento das proteínas em vias (Glicólise e Gliconeogênese).....	172
Figura 30 - Análises de termos GO agrupados segundo diferentes funções para o cultivo de 6 dias.....	173
Figura 31 - Agrupamento semântico de proteínas reguladas em cultivo de 6 dias.....	174
Figura 32 - Análises de termos GO agrupados segundo diferentes funções para o cultivo de 12 dias.....	176
Figura 33 - Agrupamento semântico de proteínas reguladas em cultivo de 12 dias.....	177

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Table 1 - Gradient elution applied for free gossypol (FG) detection by UHPLC.....	70
Table 2 - Free gossypol concentrations detected in different samples.....	76
Table 5 - Comparison of different liquid chromatographic methods for analysis of free gossypol.....	77

### CAPÍTULO III

Table 1 - Comparison of physical, chemical, biological and combined (COMBO) treatments on the degradation of free gossypol in crushed whole cottonseed.....	106
Table 2 - Bromatological analyses of CWCS samples following biological, chemical and combined (COMBO) physical and biological treatment.....	106
Table 3 - Free gossypol content in crushed whole cottonseed over a 15 day time course of solid state fermentation (COMBO-Phys-SSF) treatment with <i>Pleurotus ostreatus</i> CC389 and <i>Panus lecomtei</i> CC40, together with fungal laccase and manganese peroxidase enzyme activities.....	107

### CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Análise de purificação da enzima lacase por meio de cromatografia de exclusão molecular de frações obtidos a partir do cultivo de <i>Panus lecomtei</i> CC 40 por 12 dias em Caroço de Algodão comum (CAT) e Caroço de Algodão tratado com Ca(OH) <sub>2</sub> (CAT-TR).....	142
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GL	Gossipol livre
FG	<i>Free gossypol</i>
CAT	Caroço de algodão
CAT-TR	Caroço de algodão tratado quimicamente
FSS	<i>Solid state fermentation.</i>
FSS	<i>Submerged state fermentation</i>
CAT-OGM	Caroço de algodão geneticamente modificado
TCA	Torta de caroço de algodão
WRF	<i>White-rot fungi</i>
SMS	<i>Spent Mushroom Substrate</i>
C/N	Relação Carbono Nitrogênio
MnP	Manganês peroxidase
DEG	Differentially expressed gene/ Gene diferencialmente expresso
GO	Gene Ontology
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
SSF	Fermentação em fase sólida
FEL	Fermentação em fase submerso/líquida
SS	Substrato sólido
Aw	Atividade de água
pO <sub>2</sub>	Concentração do substrato
T	Temperatura
PSs	Polissacarídeos
homo-PSs	Homopolissacarídeos
hetero-PSs	heteropolissacarídeos
JGI	Joint Genome Institute
2-DE	Eletroforese bidimensional
LC	Cromatografia líquida
ANFS	<i>Anti-nutritional factors</i>
CPFA	Ácidos graxos ciclopropenoides

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	19
OBJETIVO GERAL .....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
ESTRUTURA DA TESE .....	23
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA .....	24
CULTURA DO ALGODOEIRO .....	24
Produtos e subprodutos do beneficiamento do algodão em caroço .....	25
Metabólitos secundários presentes em algodoeiros .....	25
CARACTERÍSTICAS DO GOSSIPOL.....	27
Métodos para degradação de gossipol.....	29
Biomassa lignocelulósica .....	30
Propriedades físicas e estruturais da celulose.....	32
Propriedades físicas e estruturais da hemicelulose .....	33
Xiloglicanas .....	34
Xilanas.....	34
Mananas, glucomananas e galactoglucomanana.....	34
Lignina .....	35
Pectinas .....	35
Biomarcadores usados em identificação de macrofungos .....	36
BASIDIOMICETOS .....	41
Principais enzimas produzidas por macrofungos ( <i>White-Rot Fungi</i> ).....	48
Lacases .....	48
Lignina peroxidase .....	49
Manganês peroxidase.....	49
Enzimas celulolíticas .....	50
Enzimas hemicelulolíticas.....	50
Macrofungos: Fermentação em estado sólido (FES) usando resíduos agroindustriais na obtenção de produtos biotecnológicos.....	51
Macrofungos:Produção de cogumelos e substâncias bioativas .....	58
Aspectos gerais de macrofungos e estudos proteômicos .....	61
CAPÍTULO II: <i>Development of an RP-UHPLC-PDA Method for Quantification of Free Gossypol in Cottonseed Cake and Fungal- treated cottonseed Cake.....</i>	65
Artigo Publicado Em Plos One (2018) .....	65
CAPÍTULO III: <i>A comparison of Physical, Chemical, Biological and Combined Treatments for Degradation of Free Gossypol in Crushed Whole Cottonseed ..</i>	86



Manuscrito submetido para Animal feed Science and Technology, 2019 .....	86
<b>CAPÍTULO IV: Caracterização e Análise do Secretoma do Extrato Bruto do Macrofungo <i>Panus Lecomtei</i> em Carócio de Algodão .....</b>	<b>111</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>118</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>118</b>
Reagentes .....	118
Biomassa vegetal, origem e cultivo do fungo.....	119
Pré-tratamento das biomassas.....	119
Obtenção e caracterização de extrato bruto .....	119
Testes de solubilidade do gossipol sintético.....	121
Degradação do gossipol sintético a partir da utilização de extrato bruto fungico .....	121
Purificação parcial do extrato bruto e separação das proteínas .....	122
SDS-PAGE: Eletroforese desnaturante.....	122
Análises do extrato bruto na degradação de inibidores enzimáticos .....	123
Determinação da degradação dos inibidores enzimáticos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	124
Análise do secretoma global do macrofungo <i>Panus lecomtei</i> CC40.....	125
Preparo e processamento das amostras.....	125
Análise por LC-MS/MS.....	126
Cromatografia.....	126
Espectrometria.....	126
Análise de dados.....	127
Análise Qualitativa .....	127
Análise Quantitativa.....	128
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>128</b>
Degradação de gossipol livre pelo macrofungo <i>Panus lecomtei</i> CC40 durante 15 dias de cultivo em estado sólido.....	128
Curva de produção de enzimas x degradação de gossipol livre por ação do macrofungo durante 15 dias de fermentação em estado sólido.....	131
Degradação de gossipol livre por extratos brutos enzimáticos de <i>P. lecomtei</i> CC40.....	136
Testes de solubilidade de gossipol sintético em diferentes solventes.....	138
Extratos brutos de <i>P. lecomtei</i> na degradação do gossipol livre: ultrafiltração e purificação parcial. ....	140

<b>Purificação Parcial: cromatografia de exclusão molecular e avaliação da efetividade de degradação de gossipol livre.....</b>	<b>141</b>
<b>SDS-PAGE .....</b>	<b>147</b>
<b>Análises do extrato bruto na degradação de inibidores enzimáticos .....</b>	<b>149</b>
<b>Secretoma global e análise proteômica de extrato bruto de <i>Panus lecomtei</i> CC40 cultivado em caroço de algodão. ....</b>	<b>153</b>
<b>Secretoma global durante 6 dias .....</b>	<b>153</b>
<b>Secretoma global durante 12 dias.....</b>	<b>154</b>
<b><i>Gene Ontology e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>.....</b>	<b>169</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>179</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE .....</b>	<b>181</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>206</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do algodão é uma das mais antigas da história humana e uma das mais cultivadas, com aproveitamento principal de suas sementes e fibra (LUNARDON, 2007; ALVES; BARROS, 2008). O algodoeiro é o nome popular dado às plantas pertencentes ao gênero *Gossypium*, da família Malvaceae. Esse gênero apresenta 50 espécies, no entanto, apenas quatro são utilizadas para produzir algodão, a saber: *Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L e *G. herbaceum* L. (FREIRE *et al.*, 2002).

O algodão, *Gossypium hirsutum* L., é uma das cultivares de grande importância comercial no mundo, produzindo, além de fibras para a indústria têxtil, também a semente que contém óleos e proteínas de alta qualidade (LUSAS; JIVIDEN, 1987; KONG; DAUD; ZHU, 2010). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), os cinco maiores produtores mundiais de algodão são a Índia, a China, os EUA, o Paquistão e o Brasil (MEYER, 2017).

O comércio mundial de algodão movimentava, anualmente, cerca de US\$ 12 bilhões e envolve mais de 350 milhões de pessoas em sua produção, desde as fazendas até a logística adotada, incluindo o descaroçamento, o processamento e a embalagem. Atualmente, o algodão é produzido por mais de 60 países nos cinco continentes, sendo que, durante as etapas de produção e processamento são obtidos diversos coprodutos, como a torta e o farelo de algodão (ABRAPA, 2019).

Nos últimos anos, a busca por proteínas advindas de fontes alternativas tem elevado o emprego de coprodutos na nutrição de animais (pecuária) (ŚWIĄTKIEWICZ; ARCZEWSKA-WŁOSEK; JOZEFIAK, 2016). Em países como a Índia, a China, os EUA, o Paquistão e o Brasil, o farelo de sementes oleaginosas, tais como algodão, tem sido utilizado como fonte de proteína para a composição de formulação para ração animal em substituição parcial do farelo de soja, devido aos altos teores protéicos (ŚWIĄTKIEWICZ; ARCZEWSKA-WŁOSEK; JOZEFIAK, 2016; PALHARES, 2014; GADELHA *et al.*, 2014; PAIM *et al.*, 2010).

As agroindústrias de beneficiamento do algodão em caroço – também denominado semente de algodão, apresentam perfil para implementações como plataformas para modelos de biorrefinarias. Nesse modelo, seria possível buscar a exploração de novos bioprodutos de valor agregado nos coprodutos como as tortas e os farelos, por exemplo, possibilitando a inserção em outras cadeias produtivas. Em

relação à exploração, cita-se as extrações de bioativos visando à composição de produtos, tais como: biopesticidas e compostos alimentícios funcionais.

Embora os coprodutos tortas e farelos de algodão já sejam utilizados na prática, a presença de substâncias antinutricionais e/ou tóxicas podem restringir o seu uso. Um relevante exemplo de tais substâncias, devido à toxicidade e à concentração, é o gossipol (MORGAN, 1989, KONG; DAUD; ZHU, 2010, NAVES *et al.*, 2010; TANKSLEY JUNIOR, 1992; ELKIN, 2017), limitador do uso para animais poligástricos. Outros exemplos, referentes às baixas concentrações e toxicidades, incluem os taninos condensados (YU, 1993; YU; MOUGHAN; BARRY, 1996) e ácidos graxos cicloprenóides (ELKIN, 2017).

O gossipol é uma substância que pode interferir na digestibilidade e/ou absorção dos nutrientes, podendo ser considerado tóxico, a depender da quantidade consumida pelos animais (TANKSLEY JUNIOR, 1992; ELKIN, 2017; GADELHA *et al.*, 2014).

A ingestão de produtos contendo gossipol, principalmente, por animais monogástricos, pode acarretar em graves efeitos, como: a redução do crescimento e do ganho de peso; o desenvolvimento de anomalias nos órgãos reprodutores, levando à infertilidade; o comprometimento de funções hepáticas e da taxa de respiração; a inibição de transporte de oxigênio pelos eritrócitos; além de danos como ataque cardíaco e, por fim, óbito do animal (BELTRÃO; DE ARAÚJO, 2004; ZHANG *et al.*, 2007).

Os coprodutos que possuem substâncias tóxicas e/ou antinutricionais para nutrição animal devem ser, preferencialmente, pré-tratados antes de ofertá-los aos animais, como também padronizados os limites seguros.

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), Agência Americana de controle e fiscalização de alimentos e medicamentos, o gossipol livre em produtos alimentares não deve exceder 0,045%, ou seja, 450 ppm. Entretanto, para a *European Food Safety Authority* (EFSA), Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, o nível máximo aceitável de gossipol na alimentação de ruminantes é de 500 mg/Kg ou 500 ppm (ALEXANDER *et al.*, 2008).

Diferentes pesquisas foram descritas na literatura ao longo dos últimos anos, baseadas na ação de métodos químicos, físicos, biológicos ou combinados, visando a eliminar o gossipol livre (GL) de tortas e farelos de algodão para aplicação na nutrição animal. Os processos químicos ou físicos descritos

envolvem a necessidade do uso de tecnologias de alto custo e métodos complexos, ou trazem perdas de algum fator biológico importante, por exemplo, a disponibilidade de aminoácidos essenciais (GERASIMIDIS *et al.*, 2007; NAGALAKSHMI; SASTRY; PAWDE, 2003; YU; MOUGHAN; BARRY, 1996). Em contrapartida, estudos baseados em métodos biológicos, apesar de poucos, têm se mostrado promissores. Alguns autores apontam, por exemplo, o emprego de microrganismos, seja por fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação em estado submerso (FSS), ou até mesmo o uso de enzimas provenientes de tais cultivos (ZHANG *et al.*, 2006a; YANG *et al.*, 2011; LIM; LEE, 2011).

A utilização de métodos biológicos, como a fermentação em estado sólido a partir de macrofungos ou macrobasidiomicetos em coprodutos derivados do algodão, apresenta um viés interessante, como a melhorias de suas qualidades nutricionais e conseqüente agregação de valor. Por outro lado, há a necessidade de entendimento dos mecanismos empregados por esses micro-organismos na degradação de fatores tóxicos como o GL.

Portanto, trabalhos que mostrem produções de biomoléculas envolvidas na desconstrução da lignocelulose e na degradação de compostos tóxicos e/ou antinutricionais, são essenciais. Conhecer os secretomas desses macrofungos abre espaço para o entendimento desses mecanismos de ação. Para isso, se faz necessário o uso de diferentes ferramentas moleculares, com destaque para proteômicas. Essas ferramentas podem auxiliar no entendimento de quais e como as moléculas protéicas, como as enzimas, podem estar envolvidas na degradação de GL.

Nesse sentido, pesquisadores da Embrapa Agroenergia, Brasília, em colaboração com outros pesquisadores de instituições como a Universidade de Brasília, têm trabalhado com a potencial integração entre o processamento de sementes oleaginosas e a fungicultura – produção de cogumelos comestíveis. Esses trabalhos visam proporcionar destoxificações de tortas oleaginosas, visto que, após a colheita dos cogumelos, a biomassa residual pós-colheita *Spent Mushroom Substrate* (SMS) – pode servir como insumo para rações animais (GOMES, 2015).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi contribuir para o entendimento dos mecanismos realizados por macrofungos, quando cultivados em estado sólido à base de coprodutos de algodão, descrevendo a biodegradação de gossipol livre

presente, avaliando o perfil do secretoma desses micro-organismos durante esse processo.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a degradação de gossipol livre por ação de macrofungos e descrever potenciais proteínas envolvidas no processo de biodestoxificação de caroço de algodão usando abordagens proteômicas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver método analítico com baixo limite de detecção baseado em UHPLC para identificação de gossipol livre (GL) em coprodutos de algodão (caroço e torta) submetidos ou não à diferentes tratamentos;
- Avaliar métodos físicos, químicos, biológicos ou combinação destes quanto à degradação de gossipol livre (GL) em coprodutos de algodão;
- Identificar, por meio de técnicas moleculares, espécies de macrofungos capazes de degradar GL;
- Avaliar a cinética de produção de enzimas desconstrutoras da parede celular vegetal e a degradação de GL durante o cultivo em fermentação em estado sólido de *P. lecomtei* CC 40, em caroço de algodão.
- Avaliar a capacidade dos extratos brutos, obtidos do cultivo de *P. lecomtei* em caroço de algodão, em degradar: GL e inibidores enzimáticos derivados da lignina;
- Analisar o proteoma de *P. lecomtei* em resposta a cultivos contrastantes quanto à presença ou ausência de gossipol livre em caroço de algodão, identificando potenciais proteínas envolvidas no processo de biodegradação desse fator antinutricional.

## **ESTRUTURA DA TESE**

A presente tese intitulada “Degradação de gossipol por macrofungos e análise do secretoma de *Panus lecomtei* durante crescimento em caroço de algodão”, está organizada em quatro capítulos.

**Capítulo I** - Apresenta uma revisão de literatura, trazendo o estado da arte sobre a importância biotecnológica dos macrofungos como agentes desconstrutores de biomassa vegetal, tais como os coprodutos do processamento de algodão.

**Capítulo II** - Refere-se ao artigo publicado no ano de 2018 na revista científica *PLOS ONE*, intitulado: “*Development of an RP-UHPLC-PDA Method for Quantification of Free Gossypol in Cottonseed Cake and Fungal-treated cottonseed Cake.*”

**Capítulo III** - Apresenta os resultados na forma de manuscrito científico submetido à publicação, denominado “*A comparison of Physical, Chemical, Biological and Combined Treatments for Degradation of Free Gossypol in Crushed Whole Cottonseed*”.

**Capítulo IV** - No último capítulo estão apresentados os resultados referentes aos experimentos de degradação de gossipol livre (GL) por ação do macrofungo *P. lecomtei* CC40, por análises do secretoma desse fungo cultivado em fermentação em estado sólido em substratos contrastantes na presença e ausência de gossipol livre.

## CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

### CULTURA DO ALGODOEIRO

A cultura do algodão é uma das mais antigas da história. Não há um consenso na literatura quanto à sua origem, se ocorreu no continente americano, na África Central ou na Índia (LUNARDON, 2007). De acordo com a Associação Matrogrossense de Produção de Algodão (AMPA, 2019), a domesticação do algodoeiro ocorreu há mais de 4.000 anos a.C., no sul da Arábia. Há registros de sua utilização datando de 4.500 a.C. pelos Incas, no Peru, e as primeiras confecções de tecidos com essa matéria-prima podem ter sido originadas na China, por volta dos anos de 2200 a.C.

O algodoeiro é o nome popular dado às plantas pertencentes ao gênero *Gossypium*, da família Malvaceae. Esse gênero apresenta 50 espécies, no entanto, apenas quatro são cultivadas para produzir algodão – a *Gossypium hirsutum* L., a *G. barbadense* L., a *G. arboreum* L e a *G. herbaceum* L. A primeira citada, *G. Hirsutum*, é a principal espécie cultivada que dá origem à fibra de algodão no Brasil e no mundo, alcançando 90% da produção mundial (FREIRE *et al.*, 2002).

A produção mundial de algodão está concentrada em seis principais países – a Índia, a China, os EUA, o Paquistão, o Brasil e a Austrália (BRADESCO, 2017; ABRAPA, 2019). Em termos globais, no biênio 2018/2019 a produção desse vegetal é estimada em 118,9 milhões de fardos, com área de colheita em 33,1 milhões de hectares e rendimento global de 782 kg/hectare (MEYER, 2019). O comércio mundial desse produto envolve mais de 350 milhões de pessoas, considerando as suas cadeias produtivas e de logística. Anualmente, movimenta cerca de US\$ 12 bilhões (ABRAPA, 2019; BRADESCO, 2017).

A maioria dos grandes produtores mundiais de algodão preveem safras menores em 2018/2019, com exceção do Brasil e da China. A safra brasileira é projetada como a que terá o maior aumento, enquanto a China se tornará a principal produtora mundial. No Brasil ocorrerá um aumento de 32% da áreas colhidas – a maior desde 1991/1992 – junto com o maior rendimento já registrado (1.640 kg/hectare); a safra está prevista em 11,75 milhões de fardos, 27% acima da safra obtida em 2017/2018 (MEYER, 2019).

Segundo dados históricos, a cultura do algodão no Brasil já era realizada pelos



indígenas, anteriormente à colonização dos portugueses ao país por volta dos anos 1.500 d.C. Entretanto, seu uso comercial teve início no século XVIII, no Nordeste (AMPA, 2019).

No País, atualmente, os cinco principais estados produtores são Mato Grosso, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, com destaque para os estados da região Centro-oeste, devido à presença de boas condições de cultivo como o clima, ao tamanho do empreendimento, ao nível tecnológico empregado, além de variedades adaptadas para a região (ABRAPA, 2019).

### **Produtos e subprodutos do beneficiamento do algodão em caroço**

Basicamente, a utilização do algodão concentra-se na indústria de fiação e tecelagem e nas indústrias de alimentação animal (farelo/torta), na indústria alimentícia (óleo refinado), cosmética, farmacêutica, de celulose e biocombustíveis (óleo bruto-biodiesel), sendo vista, portanto, como uma planta com múltiplas aplicações industriais (ALVES; BARROS, 2008).

O beneficiamento do algodão se inicia imediatamente após a colheita; o produto colhido é denominado algodão em caroço. A anatomia do algodão é constituída pelo caroço ou semente (internamente) e pela pluma ou fibra (externo: línter de algodão). O processamento para produção do principal produto, a pluma, gera inúmeros produtos e subprodutos (BARBOSA, 2016; ALVES; BARROS, 2008).

Entre os subprodutos do algodão, o farelo da semente ou caroço de algodão, resulta da extração de óleo bruto, que pode ser usado em diferentes indústrias. A depender do tipo de extração, a porção sólida remanescente desse material pode ser chamada de farelo ou torta. Em áreas com alta produção, esses coprodutos têm sido aplicados como fonte de proteína para composição da formulação de ração para animais poligástricos, devido aos teores significativos de proteínas, de lipídios e de carboidratos (BARBOSA, 2016).

### **Metabólitos secundários presentes em algodoeiros**

Produtos naturais são compostos químicos formados por sistemas vivos. Esses produtos podem ser divididos em categorias, a saber: (i) metabólitos primários, (ii) metabólitos de alto peso molecular e (iii) metabólitos secundários. Os metabólitos

primários são compostos químicos que ocorrem e desempenham papel essencial no metabolismo e reprodução das células (ácidos nucléicos, aminoácidos e açúcares); por sua vez, os de alto peso molecular, são basicamente materiais poliméricos como celulose, lignina e proteínas estruturais; enquanto os metabólitos secundários são inúmeros e possuem diferentes características, variando de acordo com a espécie de organismo (HANSON, 2003).

A maioria dos metabólitos secundários são subclassificados em categorias com base na sua rota de biossíntese. Nas plantas, por exemplo, essas biomoléculas não desempenham nenhum papel na fotossíntese, no crescimento ou na reprodução. Milhares dessas substâncias já foram identificadas em muitas famílias, gêneros e espécies de plantas, por vezes envolvidos em respostas a adversidades (presença de predadores) ou abióticos (estresse hídrico e nutricional) (HANSON, 2003; BRAHMKSHATRIYA; BRAHMKSHATRIYA, 2013).

Acredita-se que a principal função dos metabólitos secundários seja aumentar a chance de sobrevivência do organismo. Estima-se a existência em mais de 300.000 metabólitos secundários e, quando inexistente, não costuma ser uma complicação grave para o desenvolvimento e manutenção das plantas (KEELING; BOHLMANN, 2006).

Os metabólitos secundários de plantas são divididos em cinco classes principais: (i) terpenoides e esteroides, (ii) substâncias derivadas de ácidos graxos e policetídeos, (iii) polipeptídeos não ribossômicos, (iv) alcaloides e (v) cofatores enzimáticos. A exploração comercial dessas substâncias visa atender, principalmente, às formulações de produtos farmacêuticos, como o uso de alcaloides e da nicotina (BRAHMKSHATRIYA; BRAHMKSHATRIYA, 2013).

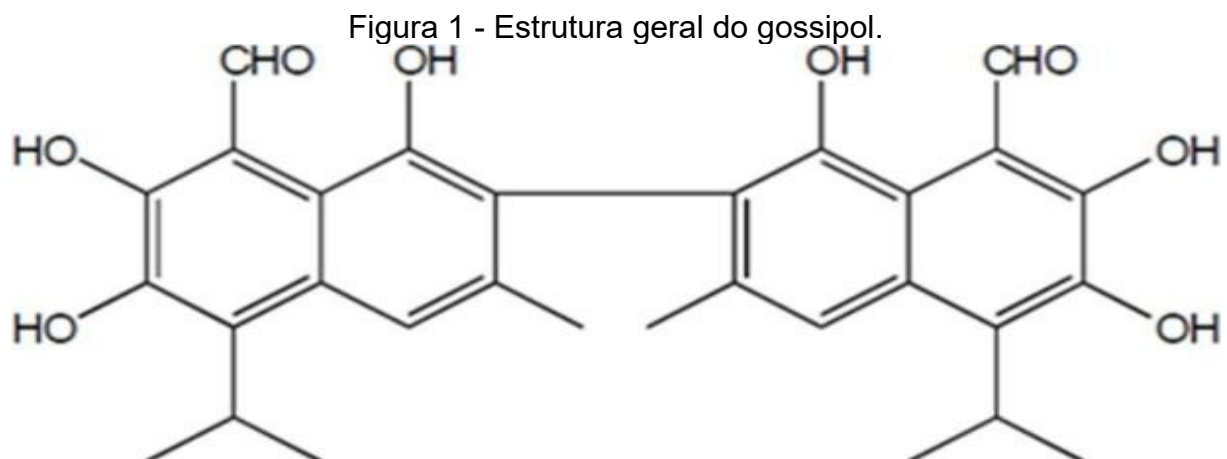
Diferentes metabólitos secundários são produzidos ao longo do crescimento vegetal sendo, alguns destes, considerados substâncias antinutricionais ou tóxicas – *Anti-nutritional factors* (ANFS). Os ANFS são definidos como moléculas produzidas naturalmente por diferentes espécies e que atuam por distintos mecanismos como, por exemplo, pela inativação de alguns nutrientes durante o processo digestivo. Ademais, exercem efeitos contrários à nutrição ideal do organismo (KUMAR, 1992; GEMEDE; RATTA, 2014). Tais compostos são frequentemente, mas, não exclusivamente, associados às fontes de alimentos de origem vegetal, normalmente utilizadas na alimentação humana ou animal (GEMEDE; RATTA, 2014).

Em algodoeiros, os principais ANFS encontrados são: o GL, em maior

quantidade (MORGAN, 1989; KONG; DAUD; ZHU, 2010, NAVES *et al.*, 2010; TANKSLEY JUNIOR, 1992; ELKIN, 2017), seguidos, em menores concentrações, pelos taninos condensados (YU, 1993; YU; MOUGHAN; BARRY, 1996), além de ácidos graxos cicloprenóides (ELKIN, 2017).

## CARACTERÍSTICAS DO GOSSIPOL

O gossipol ( $C_{30}H_{30}O_8$ ) é uma substância química derivada do algodoeiro (gênero *Gossypium*), que apresenta coloração amarela, sendo caracterizado como aldeído fenólico (FIGURA 1). Esse composto é formado pelo metabolismo do acetato na via isoprenoide, que permeia as células e atua como inibidor de várias enzimas desidrogenases.

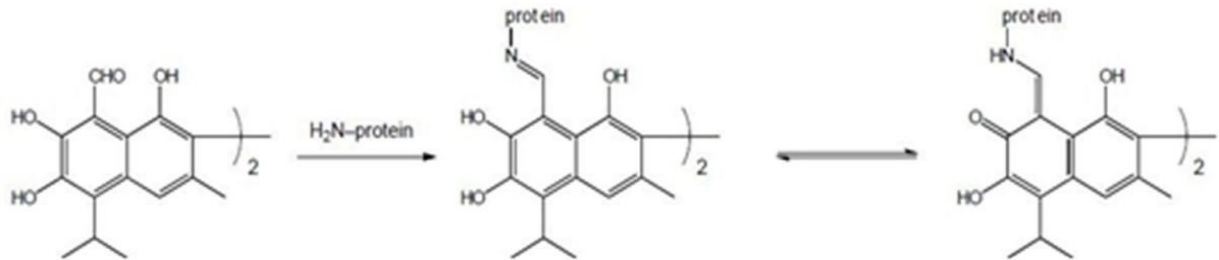


Fonte: ALEXANDER *et al.*, 2008.

O gossipol foi descoberto na segunda metade do século XIX (LONGMORE, 1886). De acordo XI-WANG *et al.* (2009), essa molécula vem sendo relatada em diversos estudos científicos. Tais terpenopolifenóis de cor amarelada são produzidos em glândulas especializadas, encontradas em vários tecidos de plantas do gênero *Gossypium* da família Malvaceae. Apresenta peso molecular de 518,6 Da e fórmula química estrutural 8,8' -dicarboxaldeído- 1,1',6,6',7,7' -hexahidroxi-5, 5' -diisopropil-3,3, -dimetil-2,2' - binaftaleno. O gossipol atua na planta como mecanismo de defesa natural (LIU *et al.*, 2008; GADELHA *et al.*, 2014) e apresenta diversas características bioativas descritas como atividade antimicrobiana, antitumoral, antiviral, antiparasitária e no controle da fertilidade humana masculina (XI-WANG *et al.*, 2009; MAJOLO *et al.*, 2019).

A molécula do gossipol pode ser encontrada no algodoeiro tanto na forma livre como na forma ligada, conforme a Figura 2 (BENEDICT *et al.*, 2004; ABDURAKHIMOV *et al.*, 2009; KONG; DAUD; ZHU, 2010). Na forma livre, é responsável por causar efeitos tóxicos e mais pronunciados em animais não-ruminantes (MORGAN, 1989).

Figura 2 - Conjugação do gossipol com grupo amino de proteínas, transformando a forma livre em ligada



Fonte: ALEXANDER *et al.*, 2008.

Dentre os metabólitos secundários produzidos pelos algodoeiros, o gossipol é geralmente descrito como “fator antinutricional” (LIU *et al.*, 2008), quando se administra farelos e/ou tortas de algodão na dieta de ruminantes.

De Paula Naves *et al.* (2010) ressaltaram que substâncias antinutrientes podem interferir na digestibilidade e/ou absorção dos nutrientes, sendo considerados tóxicos dependendo da quantidade consumida pelos animais.

Para o gossipol, as variações nas concentrações podem chegar a até 66% no caroço de algodão ou outros subprodutos, dependendo da região de procedência da variedade vegetal (ROMERO, 2013). Essas diferenças estão em consonância com a faixa de dados apresentados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (2009) que são, em parte, explicadas pelas diferenças nas culturas (variedades), pelas condições ambientais de cultivo e pela forma de armazenamento dos co-produtos (PAIM *et al.*, 2010).

Diferentes derivados do algodão são comumente empregados na alimentação de animais ruminantes devido aos processos fisiológicos diferenciados destes animais, como a presença de microbiota ruminal especializada na degradação dessa substância tóxica. Por outro lado, para os animais monogástricos, caso ingiram essas tortas/farelos dependendo da concentração consumida, podem sofrer intoxicação ou até mesmo ir a óbito (KONG; DAUD; ZHU, 2010).

## Métodos para degradação de gossipol

A toxicidade causada pela presença do gossipol em produtos derivados de sementes de algodão, vem limitando o seu emprego em produtos para a alimentação, especialmente, a animal. Há diversos estudos científicos desenvolvidos com objetivo de degradar o gossipol e, assim, detoxificar as tortas/farelos de algodão agregando valor a esta matéria-prima. Há relatos de estratégias fazendo uso de tratamentos físicos, químicos, biológicos ou combinados.

Dentre as alternativas de tratamento químico, tem-se a utilização de soluções de sulfato de ferro, óxido ou hidróxido de cálcio, que podem ser adicionados à dieta dos animais em conjunto com as tortas/farelos de algodão (BRESSANI *et al.*, 1964; BELTRÃO; DE ARAÚJO, 2004; NAGALAKSHMI; SASTRY; PAWDE, 2003; NAGALAKSHMI; SASTRY; AGRAWAL, 2002).

Métodos físicos para o tratamento de biomassa contendo gossipol também são comumente usados, sendo o calor úmido por meio autoclavagem, o mais utilizado (LUSAS; JIVIDEN, 1987; STIPANOVIC *et al.*, 1986).

Os tratamentos físicos e químicos, de modo geral, podem apresentar-se eficientes na degradação do gossipol, porém, oferecem algumas desvantagens que podem comprometer a viabilidade do processo. O tratamento com calor úmido (autoclave), por exemplo, proporciona resultados significativos na degradação do gossipol livre, entretanto, tem como desvantagem o alto custo e/ou formação de outros compostos químicos capazes de ocasionar diminuições da eficiência e/ou comprometimento da digestibilidade natural em animais. Os tratamentos químicos têm como desvantagem o uso de grande quantidade de água no preparo da solução química e a geração de efluentes (LUSAS; JIVIDEN, 1987; TANKSLEY JUNIOR, 1992; ATIA; RAHIM, 2009; BELTRÃO; DE ARAÚJO, 2004).

Quando as substâncias químicas são administradas em conjunto com as tortas, há a necessidade de avaliação da interação dos compostos químicos utilizados, além das respostas fisiológicas do animal quanto aos fatores como palatabilidade ou digestibilidade, elementos importantes já que estão associados à possível aceitação ou não dessas tortas pelo animal (TANKSLEY JUNIOR, 1992; ATIA; RAHIM, 2009).

Também foram realizadas tentativas de tratamentos com apelo comercial e possibilidades de emprego no mercado como a peletização e extrusão das tortas/farelos de sementes de algodão. Esses métodos buscavam a redução do

gossipol, minimizando perdas de palatabilidade ou demais modificações da biomassa, como a redução de teores proteicos (BARBOSA, 2016; HENRY *et al.*, 2001).

Em síntese, os processos químicos ou físicos descritos de forma isolada, não apresentaram maiores vantagens quanto à destoxificação e melhorias nas tortas e nos farelos de semente de algodão. Assim, ainda há espaços para novos métodos que possibilitem maior agregação de valor à tais biomassas, como o emprego de técnicas de biotecnologia e/ou combinações de tratamentos (físico-químico-biológico).

Ações biotecnológicas foram realizadas quanto à obtenção de variedades geneticamente modificadas visando à produção de uma cultivar que tivesse a característica ausência de glândulas produtoras de gossipol (*glandless*). A variedade alcançada não apresentou o gossipol, porém, a implementação comercial não fora viável em função da maior susceptibilidade à infestação de insetos e outras pragas (LUSAS; JIVIDEN, 1987; STIPANOVIC *et al.*, 1986; BELTRÃO; DE ARAÚJO, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2003).

Os tratamentos biológicos, por outro lado, também têm sido empregados e tem se conseguido sucesso na destoxificação das tortas/farelos de semente de algodão. O uso de microrganismos tem ganhado espaço junto aos tratamentos biológicos, sobretudo, com fungos como *Aspergillus oryzae* (LIM; LEE, 2011), *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* (ZHANG *et al.*, 2006b; YANG *et al.*, 2011) e *Pleurotus florida* (RAJARATHNAM *et al.*, 2001).

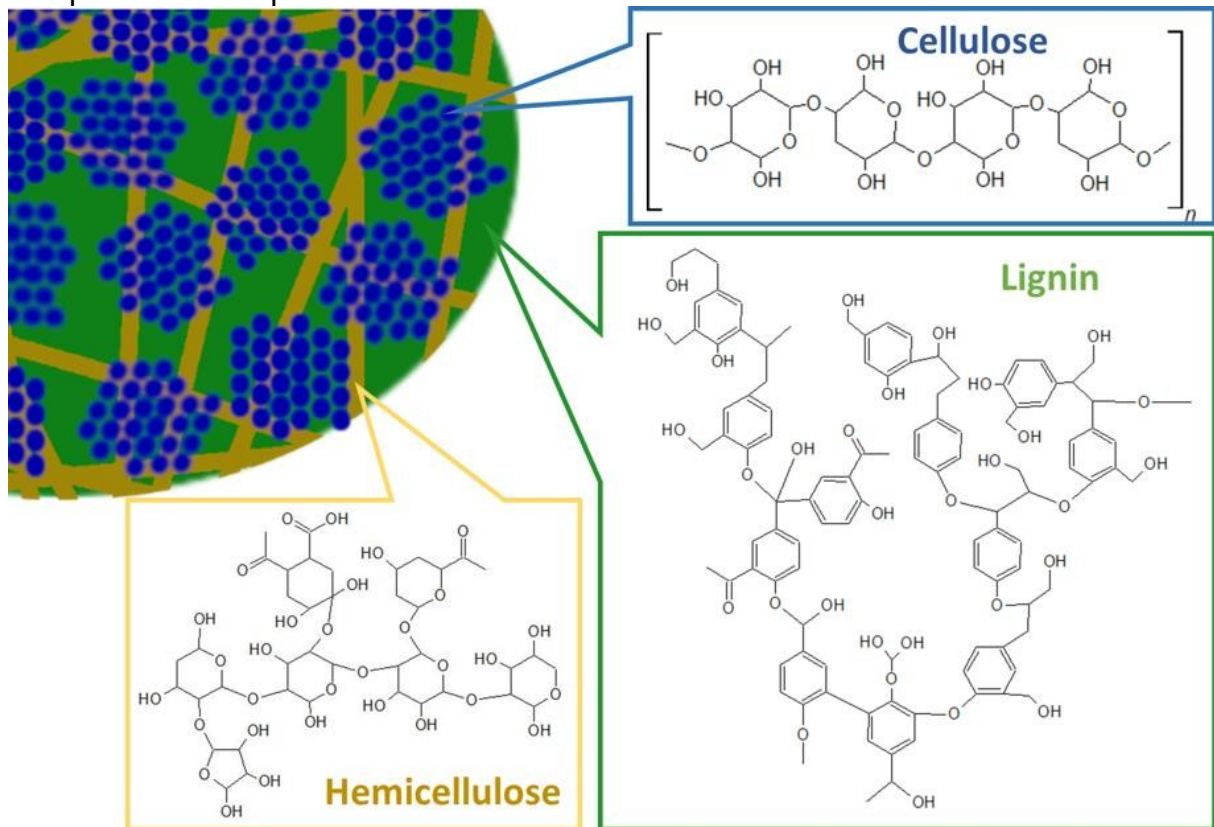
## **Biomassa lignocelulósica**

Biomassas são matérias primas estruturalmente complexas de origem vegetal, sendo formadas por carboidratos, proteínas, lipídeos e minerais, utilizadas para obtenção de uma variedade de bioprodutos. De acordo com Castro (2010), o Brasil apresenta vantagens para o aproveitamento destas matérias-primas, dada a sua magnitude de produção.

Os resíduos agroindustriais ou agroflorestais abrangem biomassas vegetais que não são normalmente utilizadas após colheita ou beneficiamento. Entre essas biomassas, as lignocelulósicas formam um grupo bastante significativo, incluindo as palhas das plantas (grãos e cereais), as cascas (após o processamento dos grãos), bagaços de frutas e resíduos madeireiros e florestais (gerados durante o desbaste) (VIRMOND *et al.*, 2013).

Os principais componentes dessas biomassas são carboidratos, açúcares solúveis, lipídios e proteínas. A quantidade em que cada um destes componentes está presente em cada biomassa vegetal varia bastante. Assim, é possível classificar os tipos de biomassas de acordo com a ocorrência, em termos quantitativos, de cada grupo estrutural. A título de exemplificação, são chamadas biomassa lignocelulósica aquelas com predominância de fibras vegetais, isto é, celulose, hemiceluloses e lignina (FIGURA 3), como a palha, a madeira e as gramíneas energéticas (FAO, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

Figura 3 - Corte transversal de uma macrofibrila de madeira com os três principais componentes das paredes celulares.



Fonte: DAHMEN, 2019.

Nota: Três principais componentes das paredes celulares. Celulose (40-55% em peso, cadeias lineares de glicose C6, grau de polimerização de fibrilas 5.000–15.000); hemicelulose (15-35% em peso, cadeias de açúcar C5 e C6 ramificadas, grau de polimerização 100-1.000); e lignina (20-40% em peso, formada por rede tridimensional de monômeros de ácidos aromáticos o guaiacil, coniferílico e siringil aromático).

Os materiais lignocelulósicos formam o complexo lignocelulósico, considerados as matérias-primas mais abundantes (até 50% da biomassa da natureza) e promissoras, como recursos naturais e renováveis essenciais para o funcionamento de sociedades industriais modernas (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; SANCHEZ; CARDONA, 2008).

A parede celular desses vegetais constitui uma rede fibrilar que fornece a estrutura estável e resistência à célula vegetal (COSGROVE, 2001). É constituída por celulose, hemicelulose e lignina em maiores proporções. No entanto, quantidades reduzidas de outros componentes como cinzas, proteínas e pectina podem ser encontradas em diferentes percentuais, dependendo da origem vegetal (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; DASHTBAN *et al.*, 2009).

Durante o desenvolvimento das células vegetais, os meristemas passam por divisão celular, aumentam e se expandem até 100 vezes o seu tamanho original. A parede celular desses seres pode ser morfológicamente dividida em parede celular primária, lamela média (região de intersecção entre as células) e parede secundária (KEEGSTRA, 2010).

### **Propriedades físicas e estruturais da celulose**

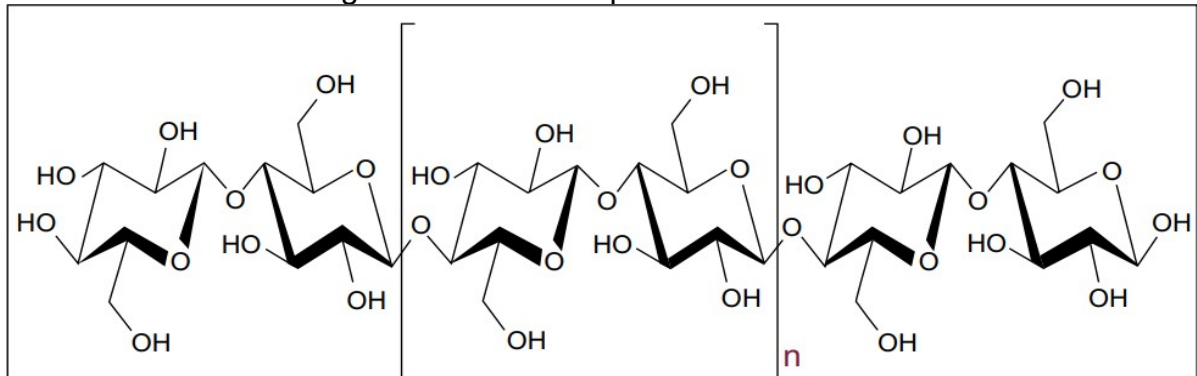
Maior componente da biomassa lignocelulósica, a celulose está presente, abundantemente, na madeira e no algodão. Outras plantas produtoras de celulose incluem as aquáticas, as gramíneas e algumas partes como folhas, caule, frutas etc., de vegetais específicos. Resíduos agrícolas – trigo e palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, serragem, coprodutos de algodão, entre outros –, também são usados para produção de celulose (EICHHORN *et al.*, 2001; GEORGE; SABAPATHI, 2015).

A celulose é formada por 200-5000 dímeros de celobiose (D-glicopiranosil-  $\beta$ -1-4 glicopiranosose), agregados em cadeias ou feixes lineares e condensada por ligações de hidrogênio em estruturas cristalinas, chamadas de microfibrilas, responsáveis pela força e resistência da madeira (SÁNCHEZ *et al.*, 2019; CULLEN; KERSTEN, 1992; MARTÍNEZ *et al.*, 2005; ISIKGOR; BECER, 2015) (FIGURA 4).

Ocorre naturalmente em conjunto sob a forma de microfibrila, ou seja, regiões cristalinas e amorfas, contendo a primeira porção formada por polímeros semicristalinos e, a segunda, é uma região amorfa não-cristalina (fração polimórfica). Convém destacar que a manutenção do alinhamento das microfibrilas, é devido às interações formadas por interações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (ATALLA, 1990; ISIKGOR; BECER, 2015; BALAT; BALAT, 2009; NISHIYAMA, 2009; GEORGE; SABAPATHI, 2015). A fórmula química da celulose é  $(C_6H_{10}O_5)_n$  e a estrutura da cadeia desse polímero é apresentada na Figura 4.



Figura 4 - Estrutura química da celulose.



Fonte: GEORGE; SABAPATHI, 2015.

Nota: Celulose é um polímero linear composto por unidades de  $\beta$ -D- glicopiranosose ligadas covalentemente por ligações glicosídicas (1-4).

### Propriedades físicas e estruturais da hemicelulose

As hemiceluloses são diferentes polissacarídeos presentes na parede celular vegetal e que podem ser extraídos usando tratamentos alcalinos, a saber, uma solução de hidróxido de sódio. O termo foi primeiramente usado por Schulzes, em 1981, que acreditava que esses polissacarídeos seriam precursores da celulose. Apesar de posteriormente ter sido comprovado que era uma abordagem falsa, o nome permaneceu sendo utilizado; anos após outra sugestão foi proposta por Sataudigner, que a chamou de polióis, entretanto, não teve boa aceitação por parte dos pesquisadores (HOLTZAPPLE, 1993; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Diante das inúmeras controvérsias quanto à definição de hemiceluloses, que são extraídas por tratamentos alcalinos, é possível agrupá-las em xiloglucanas, xilanas, mananas e glucomananas e os  $\beta$ -glucanos (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4) (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). As hemiceluloses são encontradas nas paredes celular primária e secundária dos tecidos vegetais, tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas, sendo estruturalmente muito diferentes quanto às suas propriedades físico-químicas, como também entre os diversos tipos de células e espécies (WALDRON; PARKER; SMITH, 2003).

Considerada o segundo polímero mais abundante na biomassa lignocelulósica, as hemiceluloses são formadas pela mistura de diversos monossacarídeos que apresentam como característica em comum a ligação do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Para exemplificação, encontra-se: a D-glicose, D-manose, D-galactose, D-xilose, D-arabinose, ácido 4-O-metil-glicurônico e resíduos de ácido galacturônico (BALAT; BALAT, 2009; CULLEN; KERSTEN, 1992; ZHONG; YE, 2015).

## **Xiloglicanas**

São as hemiceluloses provenientes da parede celular primária de vegetais e frutas comestíveis de dicotiledôneas, encontradas em menores quantidades nas paredes celulares de monocotiledôneas. São formadas pelo esqueleto de ligações  $\beta$ -(1-4) -glicose, como na celulose, além de ligações laterais (1-6) com resíduos de xilose. Determinada proporção de resíduos de açúcar estão ligados à xilose, incluindo a galactose (1-2), além de dissacarídeos de fucose e galactose. As xiloglicanas se associam às microfibrilas por meio de interações de hidrogênio e, em algumas sementes, esses polissacarídeos funcionam como material de reserva (WALDRON; PARKER; SMITH, 2003).

## **Xilanas**

As xilanas são conhecidas por vários nomes, quais sejam: glicuronoxilana, arabinoxilana, glicoronoarabinoxilana e L-arabino (4-O-metil-D-glicurano). Tais substâncias são um grupo de polissacarídeos formados, na maior parte das vezes, por resíduos de xilose (xil) com ligações tipo  $\beta$ -(1-4). Além disso, os resíduos de xilose podem ser acetilados no C2 ou C3. As xilanas fazem ligações cruzadas com microfibrilas e celulose e são encontradas na parede celular de plantas terrestres, nas quais podem representar mais de 30% do peso seco, sendo o principal componente da hemicelulose nas paredes primárias e secundárias de monocotiledôneas, onde os resíduos de arabinose podem estar ligados ao ácido ferúlico. Os xilanos também podem ser encontrados em dicotiledôneas (WALDRON; PARKER; SMITH, 2003; HOLTZAPPLE, 1993; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

## **Mananas, glucomananas e galactoglucomanana**

As mananas são polissacarídeos formados por ligações  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) e podem ser constituídos inteiramente por manose, ou associados a outros açúcares: com a glicose, formando glucomanana; com a galactose, formando galactomanana ou com mais de um açúcar, galactose-glicose, constituindo galactoglucomanana. Manana é o polímero de manose encontrado nas reservas alimentares de algumas sementes, os quais se encontram relativamente puros (> 95%). Glucomanana é um heteropolímero

de manose e glicose ligados por sequências aleatórias. Galactomanana é vastamente distribuída nas sementes de leguminosas. Esses açúcares são formados por ligações entre grupos laterais de galactose unidos à todas unidades de manose. A galactoglucomanana é formada por sequências aleatórias de manose e glicose, ligadas à grupos laterais de galactose, podendo unir-se à manose ou à galactose (SCHELLER; ULVSKOV, 2010; HOLTZAPPLE, 1993). Nas plantas, de uma forma geral, mananas e glucomananas geralmente estão na forma acetilada (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

## **Lignina**

A lignina é encontrada em plantas vasculares, sendo considerada, após a celulose, a maior fonte de carbono do mundo. Ela é geralmente a menor e mais complexa fração da biomassa vegetal (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; SÁNCHEZ *et al.*, 2019; SÁNCHEZ, 2009). É caracterizada como um complexo derivado do acoplamento oxidativo de três álcoois hidroxicinâmicos primários, o álcool p-coumaril, o coniferil e o sinapil, unidos por diferentes tipos de ligações carbono-carbono e ligações éter. A lignina é composta por unidades fenilpropanoides dimetoxilada [siringil (S)], monometoxilada [p-guaiacil (G)] e não-metoxilada [p-hidroxifenil (H)] (RALPH; LAPIERRE; BOERJAN, 2019; ISIKGOR; BECER, 2015).

As paredes celulares secundárias dos vegetais passam pelo processo de lignificação. Esse processo ocorre devido às reações de ligações cruzadas entre os diferentes monômeros, levando ao crescimento do polímero, ou pelo acoplamento de radicais polímero-polímero pela ação de enzimas oxidativas (KUBICEK, 2012).

## **Pectinas**

Em algumas células ou tecidos vegetais, as pectinas são consideradas o terceiro grupo de polissacarídeos estruturais da parede celular, conhecidas como polissacarídeos pécticos, pois apresentam diferentes grupos de polissacarídeos em sua constituição. Quimicamente, consistem em açúcares e ácidos, como o ácido galacturônico (GalA) e, muitas vezes, contêm quantidades significativas de ramnose (Rha), arabinose (Ara) e galactose (Gal), unidos por ligações O-glicosídicas  $\alpha$ -(1-4), parcialmente esterificadas por grupos metil-éster; e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases covalentes, formando uma matriz ao longo da

parede principal (UENOJO; PASTORE, 2007; STEELE; MCCANN; ROBERTS, 1997; WALDRON; PARKER; SMITH, 2003).

As funções exercidas pela pectina referem-se à troca de íons entre as células, ao ajuste de pH, ao estabelecimento da porosidade da parede celular, assim como a sinalização para a presença de microrganismos e insetos (TAIZ *et al.*, 2017; SIQUEIRA, 2010).

### **Biomarcadores usados em identificação de macrofungos**

Os fungos são organismos quimio-heterotóficos, capazes de absorver componentes orgânicos como fonte de energia. São em sua maioria aeróbios, podem ser uni ou multicelular, são formadores de micélio, se reproduzem de forma sexuada e assexuada. Suas células são compostas por parede celular constituída de quitina e glicana, e contém esteróis em sua membrana celular (RAVEN; EVERT; CURTIS, 2013).

Os fungos exibem um nível extraordinário de diversidade funcional com uma estimativa de 1,5 a 5,1 milhões espécies existentes. Cerca de 100.000 diferentes fungos estão descritos. O número de espécies identificadas continua aumentando, principalmente, devido ao desenvolvimento e aplicação de técnicas provenientes da era pós-genômica, sendo úteis na identificação e melhor estabelecimento de relações evolutivas entre as espécies (GUPTA; SREENIVASAPRASAD; MACH, 2015).

Macrofungos é um termo usualmente empregado para designar fungos com ampla variação e distribuição, apresentando ocorrência em todos os continentes. Pode-se apontar como característica principal, estruturas-suporte (esporos) visíveis a olho nú. Encontram-se nesse grupo os cogumelos, as trufas, as trufas-falsas, os fungos em formato de copo, os produtores de corpos de frutificação, entre outros. A grande maioria são pertencentes aos filos Ascomycota ou Basidiomycota e, alguns poucos, ao Zygomycota (MUELLER *et al.*, 2007).

A maior parte dos macrofungos são terrestres e podem viver na forma saprofítica, parasitária e/ou apresentar estilo de vida simbiótico. É bastante comum a presença desses organismos em substratos lenhosos, na forma de corpos de frutificação-cogumelos (TANG *et al.*, 2015). De acordo com Mueller *et al.*, (2007), existem aproximadamente 53.000 a 110.000 espécies de macrofungos; entretanto, esses autores chamam a atenção para as possibilidades de subestimativas, uma vez

que projeções apontam 530.000 - 1,1 milhões de espécies desses organismos. Os macrofungos são componentes essenciais dos ecossistemas, tendo em vista o seu papel insubstituível em processos de decomposição, conhecidos como reciclagem de matéria orgânica, papel este que o coloca como indispensáveis para a vida na Terra (DE MATTOS-SHIPLEY, 2016).

A preocupação com a qualidade do meio ambiente vem ganhando espaço nas políticas públicas em diferentes escalas. Nesse sentido, a inclusão de tópicos a respeito de diversidade dos recursos naturais tem se tornado constante em todo o mundo. Os macrofungos, como parte dessa biodiversidade, também têm estado presente entre esses assuntos, especialmente, no que diz respeito ao seu papel ambiental assim como a sua importância econômica referente às fontes de alimentos e medicamentos (DE MATTOS-SHIPLEY, 2016; ARNOLDS, 1992).

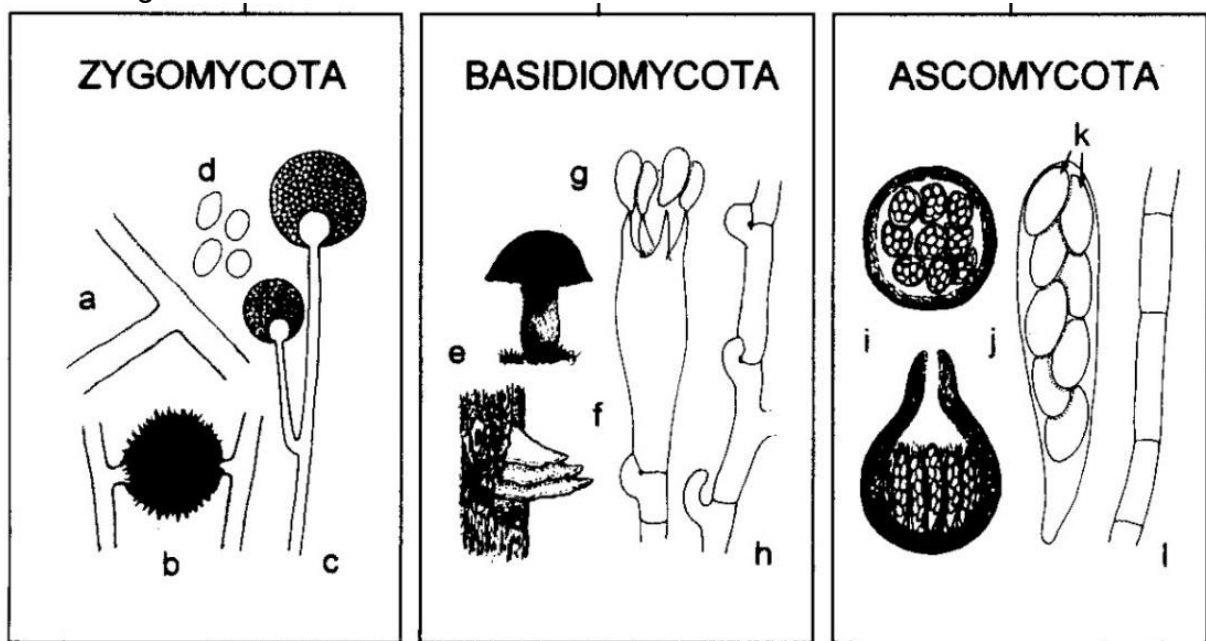
Várias pesquisas foram publicadas ou estão em desenvolvimento ao redor do mundo, tendo como escopo principal a busca por macrofungos produtores de substâncias bioativas. Apesar de sua importância, a identificação de fungos continua sendo uma tarefa difícil (DÍAZ-GODÍNEZ, 2015; RAJA *et al.*, 2017).

No estudo desenvolvido por Raja *et al.* (2017) foi mostrado um levantamento de diversos trabalhos que tiveram, entre os objetivos comuns, as identificações de fungos. Os autores constataram que aproximadamente 31% forneceram identificação fúngica baseada unicamente na morfologia; cerca de 28% não relataram nenhuma forma de identificação; 27% dos estudos usaram apenas dados moleculares, principalmente, da região do espaçador interno transcrito (ITS); e cerca de 14% usaram uma combinação de morfologia e dados moleculares, ambos rRNA e genes codificadores de proteínas. Identificações fidedignas dos microrganismos permitem o acesso a informações importantes, como suas características bioquímicas e, além disso, podem fornecer *insights* sobre o desenvolvimento de programas de rastreio para a descoberta de produtos, como também fornecer informações adicionais sobre ecologia, relações filogenéticas, genômica e transcriptômica.

Os fungos são organismos morfologicamente complexos que exibem diferentes formas estruturais ao longo de seus ciclos de vida. A estrutura vegetativa básica do crescimento consiste em um filamento tubular, conhecido como hifa, que se origina da germinação de um esporo reprodutivo. Como a hifa continua crescendo, pode se ramificar repetidamente para formar uma massa de filamentos, chamadas de micélio (PAPAGIANNI, 2004).

Características fisiológicas – cinética de crescimento, temperatura de crescimento ótimo e meio de crescimento –, métodos morfológicos, macroscópicos e microscópicos, foram utilizados durante muitos anos para identificar os macrofungos. Esses métodos incluem a morfologia da colônia, o desenvolvimento de frutificação, os caracteres micromorfológicos, entre eles a observação e avaliação de diferentes estruturas, verificando o tamanho, o tipo e a organização de hifas. Essas estruturas são avaliadas quanto às suas formas, se esférica, ovoide, elipsoide, com ou sem papila, bem como pelo seu tamanho e textura (PROCOP, 2014; CHALUPOVÁ *et al.*, 2014; GHERBAWY *et al.*, 2010). A Figura 5 apresenta as principais características utilizadas para identificação desse grupo de organismos.

Figura 5 - Características de relevância utilizadas na identificação morfológica de macrofungos



Fonte: Adaptada de GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999.

Nota: Zygomycota: a, hifa cenonítica; b, zigósporo; c, esporangióforo; d, esporangiósporos. Basidiomycota: e, basidioma; f, basídio; g, basidósporo; h, hifa com ansas conectivas (ou de anastomose); Ascomycota: i, Ascoma; j, asco; k, ascóporo; l, hifa septada.

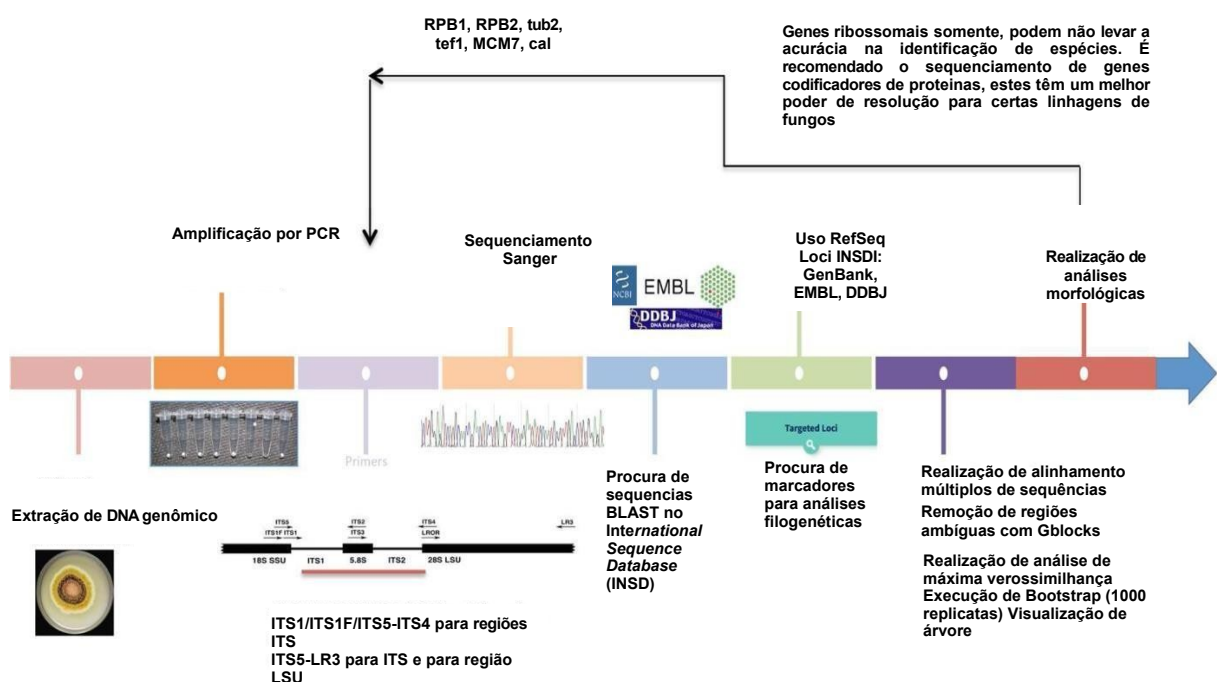
Apesar de importantes, métodos morfo-fisiológicos ainda apresentam falhas de robustez para identificação de vários fungos. Segundo Papagianni (2014), para uma melhor compreensão e identificação desses seres vivos, é imprescindível o desenvolvimento em conjunto de novas técnicas morfológicas e/ou bioquímicas, aliadas à instrumentação moderna de biologia molecular baseadas em proteínas ou ácidos nucleicos.

Outras características presentes em biomoléculas têm sido aplicadas para a classificação e identificação, alguns exemplos são os padrões isoenzimáticos, proteínas de superfície, ácidos graxos, composição da parede celular (açúcares, entre outros), além de metabólitos secundários. Outras análises podem ser baseadas em ácidos nucleicos, como DNA (análises *cluster* de genes codificadores de proteínas) ou RNA (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; JAMES *et al.*, 2006a; 2006b FRISVAD; FITELBORG, 1990; VOIGT; KIRK, 2011).

Análises moleculares para estabelecer diferentes relações filogenéticas e identificação de fungos, tendo como base informações de ácidos nucleicos e proteínas, têm tido ampla aceitação na comunidade científica (SHENOY; JEEWON; HYDE, 2007; MARTIN; RYGIEWICZ, 2005).

Ao contrário dos métodos fundamentados na morfologia, análises moleculares de ácidos nucleicos podem ser testadas diretamente e os isolados não requerem cultura. São baseados na técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) e, em contraste com os métodos convencionais morfológicos e bioquímicos, eles são rápidos, altamente específicos e podem ser realizados por meio de pequenas quantidades de DNA fúngico. A Figura 6 traz maiores detalhes das etapas comumente percorridas para identificação de fungos via técnicas moleculares.

Figura 6 - Fluxograma para identificação de fungos usando análise filogenética molecular

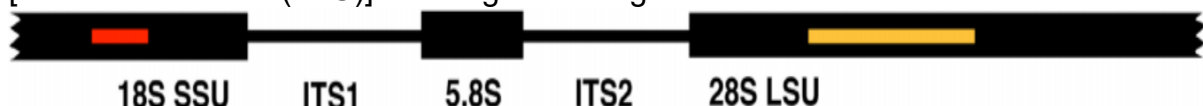


Fonte: Modificado de RAJA *et al.*, 2017.

Com métodos aprimorados de extração de DNA e controles adequados, o PCR pode ser realizado rotineiramente e não requer um alto nível de especialização para interpretação dos resultados. A partir das amplificações do DNA genômico, produtos do PCR, é realizado sequenciamento de DNA usando diferentes plataformas. As sequências obtidas são comparadas com sequências disponíveis em diferentes bancos de dados, buscando estabelecer sua identificação com base na relação entre estas (ATKINS; CLARK, 2004).

Nos últimos anos, para os macrofungos, o *cluster* de genes ribossomais têm sido escolha comum para identificação molecular devido à ampla aplicação aos organismos provenientes de fontes variáveis. Os genomas de fungos podem conter mais de 200 cópias desses *clusters* organizadas em sequências repetidas (*in tandem*), agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas. Esses *clusters* são formados por regiões gênicas codificantes de três subunidades do RNA ribossômico (18S) [subunidade menor (SSU)], RNAr (5.8S e 28S) [subunidade maior (LSU)], além de regiões intergênicas ou espaçadores internos – *internal transcribed spacer* (ITS) –, identificados como ITS1 e ITS2 (FIGURA 7). Ambos codificam moléculas de RNA não funcionais que são degradadas quando o rRNA funcional é transcrito e o gene que codifica para a subunidade 5.8S do ribossomo. Além destas, cada unidade de repetição do DNAr contém um espaçador externo – *external transcribed spacer* (ETS). Outros genes também utilizados são codificadores de moléculas funcionais como proteínas, incluindo o fator de tradução 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, actina, RNA polimerase II (RPB1 e RPB2) e proteína de manutenção do minicromossomo, MCM7 (MONEY, 2016; HIBBETT *et al.*, 2007; MARTIN; RYGIEWICZ, 2005; VOIGT; KIRK, 2011; JAMES *et al.*, 2006a; 2006b; SCHOCH *et al.*, 2012).

Figura 7 - Organização geral do DNA ribossômico de fungos, evidenciando as subunidades do RNA ribossômico (18S [subunidade menor (SSU)], RNAr 5.8S e 28S [subunidade maior (LSU)] e de regiões intergênicas ITS1 e ITS2



Fonte: Modificado de RAJA *et al.*, 2017.

O uso do *cluster* de genes ribossomais para essas análises se deve às seguintes características: exibem variações significativas entre fungos intimamente relacionados e, às vezes, entre populações dentro de uma única espécie. Essas variações são causadas por inserções, exclusões e mutações pontuais e são



conservadas porque ITS1 e ITS2 codificam moléculas de RNA não funcional (MONEY, 2016). O gene 18S é dotado de ampla variação, interessante característica para uso em estudos de evolução, sendo possível usá-lo em relações filogenéticas de diferentes classes de fungos. O gene 28S, por ser mais variável é usado na classificação em nível de gênero para um filo. Enquanto que o gene 5.8S, apesar de conter pouca informação é discriminatório na identificação de Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (CARLILE; GOODAY; WATKINSON, 2001; MITCHELL; ZUCCARO, 2006).

Além das técnicas moleculares para identificação de fungos mencionadas de um modo geral, as baseadas em composição proteica têm sido úteis ao longo dos anos como padrões de isoenzimas produzidos por técnicas eletroforéticas (zimograma), técnicas imunológicas (baseados em kits de detecção antígeno- anticorpo), além do sequenciamento de proteínas que tem recebido amplo destaque (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; LIMA; MENEZES, 2002; THORNTON *et al.*, 2002).

## **BASIDIOMICETOS**

Em termos gerais, durante muito tempo os fungos vêm sendo considerados elementos estratégicos promissores, capazes de contribuir efetivamente para o desenvolvimento da economia global. Durante as últimas décadas, inúmeros trabalhos já propuseram classificá-los. Dentre eles, o estudo de Hibbert *et al.* (2007) é um dos mais citados na literatura. Esta classificação foi alterada em todos os níveis, porém, sua estrutura fundamental permanece a mesma, constando um reino, um sub-reino, sete filós e dez subfilós (QUADRO 1).

Quadro 1 - Quadro de classificação dos fungos baseada em análises filogenéticas.

Reino	Subreino	Filo	Subfilo
Fungi	Dikarya	Ascomycota	Taphrinomycotina Saccharomycotina Pezizomycotina
		<b>Basidiomycota</b>	<b>Pucciniomycotina</b> <b>Ustilaginomycotina</b> <b>Agaricomycotina</b>
		Blastocladiomycota	
		Chytridiomycota	
		Glomeromycota	
		Microsporida	
		Neocalimastigomycota	
		Subfilo <i>Incertae sedis</i>	Mucoromycotina Kickxellomycotina Zoopagomycotina
			Entomophthoromycotina

\*Marcação em negrito: filo e subfilo de macrofungos utilizados neste trabalho.

Fonte: HIBBETT *et al.*, 2007.

Basidiomicetos são caracterizados, em parte, por produzirem seus esporos sexuais (basidiósporos) em uma célula chamada basídio. Muitos, mas nem todos, possuem hifas conectivas diferenciadas, exclusivas deste grupo. O basídio é o local da célula no qual ocorre a cariogamia (fusão nuclear) e meiose, geralmente levando à formação de quatro basidiósporos haplóides, estruturas localizadas nos esterigmas, pequenas projeções que se originam do basídio (ROBLES-HERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

O ciclo de vida dos basidiomicetos formadores de cogumelos pode ser dividido em pelo menos três fases que são o esporo, micélio e corpo de frutificação, também chamado carpóforo. Dadas as condições adequadas de temperatura, umidade e nutrientes, os esporos germinam dando origem a estruturas filamentosas e multicelulares, denominadas hifas e que secretam enzimas digestivas e absorvem moléculas do substrato (SOCCOL, 2017).

Os fungos basidiomicetos mais conhecidos formam estruturas de reprodução macroscópicas e são conhecidos, popularmente, por cogumelos e orelhas de pau, além de outros grupos que são menos conhecidos: os fungos gelatinosos, os “gasteromicetos”, as ferrugens e os carvões. Estão presentes em ambientes aquáticos e terrestres, podem ser parasitas, micorrízicos e sapróbios, nesse último caso, atuam decompondo folhas, galhos e troncos, entre outros (GIMENES, 2010).

Basidiomicetos são capazes de decompor tipos específicos de compostos orgânicos presente na parede celular vegetal. Convencionalmente, são divididos em duas categorias principais: fungos de podridão castanha/marrom – *Brown-Rot Fungi* (BRF) e fungos de podridão branca – *White-Rot Fungi* (WRF) (RILEY *et al.*, 2014; KUBICEK, 2012).

Os BRFs desconstruem, principalmente, a celulose presente na madeira por meio de enzimas celulolíticas e oxidativas, sem remover a lignina, deixando a madeira marrom-colorida; enquanto os WRFs são capazes de degradar completamente a lignina, por meio de ligninases, antes de quebrar enzimaticamente a celulose (RILEY *et al.*, 2014; KUBICEK, 2012), deixando a madeira com uma aparência branca, sem a cor marrom predominante dos compostos fenólicos da lignina (KUBICEK, 2012).

No presente manuscrito é descrita a capacidade de fungos pertencente ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, de degradar o agente toxicante e/ou antinutricional gossipol, presente em coprodutos de algodão. Levando em consideração agrupamentos gerais baseados nas funcionalidades dos basidiomicetos, esta tese aborda representantes de cogumelos comestíveis, formado pelas espécies do gênero *Pleurotus*: *Pleurotus ostreatus* (CC389), *Pleurotus sapidus* (CC28) e uma espécie do gênero *Panus*, *Panus lecomtei* (CC40); cogumelos medicinais, utilizados os macrofungos *Ganoderma lucidum* (lingzhi) (CC351) e *Pycnoporus sanguineus* (CC400).

O gênero *Pleurotus* (Fr.) Kumm. (Filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Agaricales, família Pleurotaceae) inclui cogumelos amplamente presentes na alimentação, tais como *P. ostreatus* (cogumelo ostra ou *shimeji*-Brasil) (*P. ostreatus*) (MILES; CHANG, 2004) e *P. sapidus* (FIGURA 8). Esse gênero apresenta diversas espécies vastamente utilizadas em múltiplos bioprocessos, incluindo o emprego em formulações nutraceuticas (KULSHRESHTHA; SHARMA, 2014, COHEN; PERSKY; HADARY, 2002, DREVINSKAS *et al.*, 2016, KOGBARA *et al.*, 2016, LINDNER, 2009; CARDOSO *et al.*, 2017).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são conhecidos pela capacidade em degradar diferentes resíduos lignocelulósicos, incluindo os que contenham fatores tóxicos e/ou antinutricionais (BOSE; KEHARIA, 2014; DA LUZ *et al.*, 2013b). Isso só é possível devido à capacidade desses organismos em produzir e emitir um arsenal de diferentes enzimas (FAN *et al.*, 2006; HOA *et al.*, 2015; OBODAI *et al.*, 2003; SAINOS *et al.*, 2006; REDDY *et al.*, 2003; JOB, 2004; ALANANBEH; BOUQELLAH;

AL KAFF, 2014; VIEIRA; DE ANDRADE, 2016; MKHIZE *et al.*, 2016; OYETAYO; ARIYO, 2017).

Figura 8 - Aspecto geral do corpo de frutificação de *Pleurotus* spp.



*P. sapidus*

*P. ostreatus*

Fonte: <http://calphotos.berkeley.edu> e <http://www.mykoweb.com>

O gênero *Pycnoporus* (filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales, família Pleurotaceae) ocorre dentro do grupo de WRFs. Ele é dividido em quatro espécies com diversas origens geográficas e são bastante eficientes na degradação da lignina por mecanismos distintos (LEVASSEUR *et al.*, 2014).

A espécie *Pycnoporus sanguineus* é um tipo de fungo saprófita, popularmente conhecido como orelha de pau, possui basidioma de coloração alaranjada e basidiósporos cilíndricos, originário de regiões tropicais e subtropicais bem como nos hemisférios (LEVASSEUR *et al.*, 2014).

Diversos estudos apontam inúmeras aplicações destes fungos, especialmente, envolvendo potencial biotecnológico. Podem ser usados como agentes biorremediadores (CHAN-CUPUL *et al.*, 2014), são capazes de colonizar vários substratos lignocelulósicos (MACHADO *et al.*, 2006), além de possíveis aplicações medicinais (GAMBATO *et al.*, 2016; CORREA *et al.*, 2006) (FIGURA 9).

Figura 9 - Aspecto geral do corpo de frutificação de *Pycnoprus sanguineus*.



Fonte: <https://cogumelosdosul.files.wordpress.com>

Outros nomes podem, normalmente, ser apresentados em trabalhos científicos para descrever essa mesma espécie, os mais comuns são *Polyporus sanguineus*, *Trametes sanguinea*, *Trametes cinnabarinavar*, *Trametes sanguinea*, *Coriolus sanguineus* (ARORA, 1986; KIRK *et al.*, 2008).

O gênero *Panus* Fr. pertence ao filo Basidiomycota subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales e família Polyporaceae (SCHMIDT-DANNERT, 2016). Loguercio-Leite (1985), tomando como base os estudos de Signer (1975), explica que os organismos deste gênero possuem *habitat* pleurotoide, píleo com estipe central, às vezes, sésseis; duros e revivescentes; lignícola. Todas as espécies processam ativamente madeira; apresentam himenóforo com lamelas decorrentes; esporada branca, com esporos hialinos, lisos; trama dimítica ou anfimítica; numerosas fíbulas; pantropical, com espécies predominantemente cosmopolitas. Esse grupo apresenta 25 espécies amplamente distribuídas no mundo.

Em comparação com outros gêneros apresentados até agora, este possui um número menor de publicações científicas, podendo ser considerado como pouco explorado. No entanto, alguns trabalhos têm mostrado o potencial de suas espécies, por exemplo, para *Panus tigrinus*, com demonstrações na produção de enzimas diversas e também a sua atuação como agente biorremediador (MUSTAFA *et al.*, 2017; LEONTIEVSKY *et al.*, 2002).

*Panus lecomtei* ocorre sob vegetação densa em áreas abertas. É considerado

um cogumelo comestível, podendo ser consumidos em diversos países, no entanto, não são amplamente comercializados. No Japão é conhecido como *Aragekawakitake*. No Brasil, em Roraima, é bastante popular entre os povos indígenas, das aldeias Yanomami do Auaris e Xitei/Xitdea; nessas localidades são, respectivamente, conhecidos como *Shio-Koni-amo* e *Kasikoirima* (VARGAS-ISLA, 2013; VARGAS-ISLA *et al.*, 2015) (FIGURA 10).

As publicações sobre a espécie *P. lecomtei* são escassas. Recentemente, Romero (2013) apontou a capacidade desse macrofungo em produzir lacases e peroxidases em diferentes tipos de cultivos e fontes de carbono em fermentação em estado sólido. Essa espécie tem sido alvo de estudos realizados pelo grupo de pesquisa da Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal.

Figura 10 - Aspecto geral do corpo de frutificação de *Panus lecomtei*.



Fonte: SIQUEIRA (2017).

O gênero *Ganoderma* (filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales, família Ganodermataceae) é o maior gênero da família, são formados por cogumelos amplamente utilizados no mundo devido às suas propriedades medicinais. O gênero apresenta 219 espécies e são conhecidas cerca de 80, em regiões tropicais (MONCALVO, 2000; KIRK *et al.*, 2008; GUGLIOTTA; ABRAHÃO; GIBERTONI, 2013).

*Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. é uma espécie de fungo sapróbio capaz de naturalmente frutificar durante o outono e inverno. Macroscopicamente,

apresenta tamanho de 10-12 cm (diâmetro) e, dependendo da fase da vida, pode variar a sua coloração de laranja-avermelhado para preto com diferentes graus de castanho. Seu himênio é formado por tubos/poros pequenos e circulares a angulares (4-5 poros/1mm). Os basidiocarpos são estipitados ou sésseis (MONCALVO; WANG; HSEU, 1995).

Essa espécie apresenta diversas sinonímias e, durante muito tempo, tem causado confusão taxonômica. Ao redor do mundo, *G. lucidum* em chinês é denominado *Lingzhi* ou *Reishi*, bastante conhecido, além de também ser denominado como Cogumelo da Imortalidade (BISHOP *et al.*, 2015). De acordo com (HENNICKE *et al.*, 2016) não é possível aplicar, com precisão, um nome amplamente mais aceito. Taxonomicamente, há a utilização do nome *Ganoderma lucidum* em publicações recentes e com cepas comercialmente cultivadas (HENNICKE *et al.*, 2016)

Conforme já citado, esse gênero apresenta diversas aplicações e há muitos anos têm sido utilizados na medicina tradicional chinesa. Trabalhos atuais têm corroborado tais evidências e apresentando suas diferentes ações.

Figura 11 - Aspecto geral do corpo de frutificação de *Ganoderma lucidum*.



Fonte: <https://amazon.com>

*Ganoderma lucidum* (FIGURA 11) apresenta diversos efeitos contra diabetes (MA; HSIEH; CHEN, 2015), propriedades contra células cancerígenas (FUJITA *et al.*, 2005;), atividades antioxidantes (JIA *et al.*, 2009.), imunostimuladores (KUO *et al.*, 2006), atividades antimicrobiana (SHEENA *et al.*, 2003), entre inúmeras outras aplicações.

### **Principais enzimas produzidas por macrofungos (*White-Rot Fungi*)**

Os fungos desempenham importante papel na ciclagem da matéria orgânica no planeta. A desconstrução da matéria orgânica vegetal é considerada um processo complexo; no entanto, os basidiomicetos lignocelulolíticos são eficientes nesse papel, dentre estes, os WRFs são conhecidos por reunir enzimas capazes de degradar componentes complexos como a lignina. Os WRF's degradam essa estrutura, extensivamente, antes de degradar a celulose. Este processo é efetivado por um conjunto de enzimas produzidas e secretadas em resposta ao ambiente e/ou ao substrato (ALFARO *et al.*, 2014; KUBICEK, 2012).

Os WRFs degradam a lignina através da ação de enzimas classificadas como oxidativas, a partir de manganês peroxidases (MnP, EC 1.11.1.13), peroxidases versáteis (VP, EC 1.11.1.16), lignina peroxidases (LiP, EC 1.11.1.14) e fenol oxidases (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase Pox, laccase, EC 1.10.3.2). Além dessas, há uma série de enzimas acessórias que participam no processo, incluindo hemeperoxidases como citocromo C peroxidases (EC 1.11.1.5), cloroperoxidases (CE 1.11.1.10), outras como peroxidases descolorantes (DyP, EC 1.11.1.19), além de glioxal oxidases (GLOX), aril álcool oxidases (AAO, EC 1.1.3.7), piranose desidrogenases (EC 1.1.99.29) e metanol oxidases (EC 1.113.13) (ALFARO *et al.*, 2014).

Dentre as enzimas supracitadas, as evidenciadas nesta tese (Capítulos III e IV) incluem as enzimas oxidativas, lacases (EC 1.10.3.2) e manganês peroxidase (MnP) (E.C. 1.11.1.13).

### **Lacases**

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas pertencentes a família “Multicopper oxidases” (MCOs), capazes de usar o oxigênio molecular para oxidar vários



compostos aromáticos e não aromáticos a partir de mecanismos de reação de catálise de radicais, reduzindo esses compostos a água e, para isso, requerem ou produzem peróxidos. Essa reatividade se dá devido à clivagem de ligações covalentes e à subsequente formação de monômeros. Em alguns casos, a enzima por si só pode não entrar em contato direto com os polímeros (devido à restrição estérica), quando isso ocorre as catálises são realizadas via ação de mediadores. Elas possuem grande potencial redox, com tamanho entre 60-70 kDa; além de degradar a lignina, também atuam na eliminação de ácidos húmicos e desempenham importante papel na desintoxicação de diversas substâncias (LEONOWICZ *et al.*, 2001; CLAUS; FILIP, 1998; STRONG; CLAUS, 2011).

### **Lignina peroxidase**

A lignina peroxidase (LiP - EC. 1.11.1.14) é uma enzima glicosilada que tem o grupo heme como grupo prostético, capaz de catalisar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) oxidando unidades não fenólicas de lignina e promovendo a mineralização de compostos aromáticos recalcitrantes (DATTA *et al.*, 2017). Pertencem à superfamília da catalase peroxidase (ZÁMOCKÝ; OBINGER, 2010). Essas enzimas possuem peso molecular por volta de 40 Da e, assim como as lacases, possuem alta capacidade redox, atuam oxidando anéis aromáticos ativos por meio da transferência de elétrons (óxido-redução). Esses anéis incluem grupos aminas, hidroxilas, entre outros. A catálise pode se dá mediante a produção de radicais de álcool veratrílico (KHINDARIA; YAMAZAKI; AUST, 1996; CHOINOWSKI *et al.*, 1999; PLÁCIDO; CAPAREDA, 2015).

### **Manganês peroxidase**

Também envolvida na degradação de lignina, a enzima manganês peroxidase (MnP) (E.C. 1.11.1.13) é uma hemoproteína que contém grupo prostético composto por ferro denominado protoporfirina IX e possuem massa molecular entre 38-62,5 Da. (WARIISHI; VALLI; GOLD, 1992; HATAKKA, 1994; HATAKKA, 2001). Requerem a presença do manganês para realizar suas reações, possuem ciclo catalítico semelhante a outras peroxidases, como a lignina peroxidase, esse ciclo está envolvido na transferência de elétrons do grupo heme através do  $H_2O_2$  e consequente oxidação de íons de manganês (II) ( $Mn^{2+}$ ) em íons de manganês (III) ( $Mn^{3+}$ ) que se acumula na

presença de Mn (II) ou ligantes estabilizadores, como óxido gálico (AITKEN; IRVINE, 1990; HOFRICHTER, 2002; MATSUBARA *et al.*, 1996).

### **Enzimas celulolíticas**

De modo geral, as enzimas celulolíticas atuam na porção da lignocelulose. Essas enzimas clivam ligações O-glicosídicas e podem ser divididas em três classes, classificadas de acordo com o local de ataque a cadeia principal de celulose: (i) enzimas endoglicanases (EC 3.2.1.4), capazes de hidrolisar as regiões internas amorfas, exoglicanases incluindo celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e glicanohidrolases (EC 3.2.1.74), atuam atacando as extremidades não redutoras, possibilitando a liberação de glicose e (iii)  $\beta$ -glicosidades (EC 3.2.1.21), enzimas que atuam hidrolisando celobiose em glicose (ALFARO, 2014; SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

### **Enzimas hemicelulolíticas**

Para a degradação de hemicelulose são necessários a hidrólise completa da de suas porções, requerendo, de tal modo, participação de enzimas responsáveis pelas clivagens tanto de cadeias principais quanto laterais dessa estrutura (DUARTE, 2016).

Entre as diversas enzimas envolvidas nessa degradação destaca-se a participação das endoxilanases (EC 3.2.1.8),  $\alpha$ -glucuronidases (EC 3.2.1.131), acetil-xilano esterases (EC 3.1.1.72), arabinofuranosidases (CE 3.2.1.55), esterases do ácido ferúlico (feruloil esterases, EC 3.1.1.73) e  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37). Além destas, também atuam a  $\beta$ -D-xilanase (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -D-mananase (EC 3.2.1.78),  $\beta$ -D-xilosidase (EC 3.2.1.37),  $\beta$ -D-manosidase (EC 3.2.1.35),  $\alpha$ -L-arabinanase (EC 3.2.1.99),  $\beta$ -D-galactanase (EC 3.2.1), acetil xilana esterase (EC 3.1.1.6),  $\alpha$ -D-galactosidase (EC 3.2.1.22),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e  $\alpha$ -D-glucuronidase (EC 3.2.1.131) (SUN *et al.*, 2012; FERREIRA FILHO, 2004a; FERREIRA FILHO, 2004b; SANCHEZ, 2009).

## **Macrofungos: Fermentação em estado sólido (FES) usando resíduos agroindustriais na obtenção de produtos biotecnológicos**

Os macrofungos podem ser encontrados em todo o mundo e seus *habitats* são bastante diversificados, como parques, jardins, pastos, prados e pântanos; e, também, ambientes hostis, como dunas de areia e regiões glaciais. Na maioria dos casos, são localizados na natureza fixados a suportes sólidos, como solo e árvores mortas ou vivas. Dessa forma, técnicas de fermentação em estado sólido estão entre as formas mais adequadas para cultivar macrofungos formadores de cogumelos em condições controladas (LETTI JUNIOR *et al.*, 2018).

Fermentação é a técnica de conversão biológica de substratos complexos em compostos simples por vários microrganismos, a exemplo, bactérias e fungos (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). Dois métodos de fermentação são os mais utilizados: fermentação em estado sólido (FES) e fermentação em estado submerso/líquido (FEL) (BON *et al.*, 1999; BON *et al.*, 2008; PANDEY, 2003).

A fermentação em estado sólido (FES) é geralmente definida como o crescimento de microrganismos em materiais sólidos na ausência ou em pequenas quantidades de água livre. O substrato, no entanto, deve estar úmido o suficiente, permitindo a absorção e metabolismo do microrganismo dentro da matriz sólida (PANDEY, 1992). A matriz sólida pode ser ela mesma a fonte de nutrientes ou, então, deve conter um suporte contendo nutrientes apropriados capazes de permitir o desenvolvimento dos microrganismos (PANDEY; RADHAKRISHNAN, 1992; SINGHANIA *et al.*, 2009).

De acordo com KRISHNA (2005), o processo de FES é formado por um sistema de diferentes fases. Nesse sistema há a presença do substrato sólido (SS) que pode ser formado por diferentes resíduos agroindustriais, por exemplo, composto por um suporte insolúvel em água, contendo uma solução aquosa de nutrientes. A fase que flui através do substrato sólido (SS) é chamada de contínua sendo composta por mistura de ar e gás. Outra fase é constituída pela solução aquosa de nutrientes, absorvido dentro da matriz com o suporte insolúvel, e contém, também, a fase formada pelos microrganismos que crescem aderidos ao suporte e/ou no espaço livre entre as partículas.

Além disso, a FES depende da presença de umidade. Esse processo suporta limites mínimos dessa variável, em até 12%. Níveis menores desse fator podem levar

a cessão das funções biológicas dos organismos utilizados. Portanto a definição do nível de umidade varia em função da absorção e, em consequência, altera dependendo da natureza orgânica do substrato (KRISHNA, 2005).

Na FES, a água está relacionada a dois parâmetros: o primeiro, a umidade, que diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio; o segundo, a atividade de água ( $a_w$ ), que se refere a um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas intermediações das partículas no substrato. Para o entendimento da FES, a umidade tem se mostrado menos elucidativa do que a atividade de água, pois esta última afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO *et al.*, 2005).

A tecnologia da FES tem muitas aplicações. Na Ásia, por exemplo, é usada na produção de Koji – alimento feito a partir de arroz e que tem o fungo *Aspergillus oryzae* na produção de bebidas como o saquê; produção de celulase, utilizando cepas de *Trichoderma*, na produção de Ang-khak, um tipo de arroz vermelho colorido constituído por metabólitos de *Monascus purpureus*.

O metabolismo de fungos filamentosos pode se adaptar bem a FES. Em escala laboratorial esta técnica tem sido amplamente empregada e muitos trabalhos foram publicados ou estão em desenvolvimento sobre os efeitos de vários fatores no metabolismo dos fungos, essa técnica é capaz de simular as condições de vida naturais de muitos fungos filamentosos e que, em aplicações industriais, este processo natural pode ser utilizado de forma controlada para produzir um produto desejado (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Ascomycetos, basidiomicetos e deuteromicetos se desenvolvem em ambientes terrestres úmidos e, por esta razão, a FES é o método de cultivo escolhido nos casos em que o processo biotecnológico requer diferenciação morfológica e metabólica, devido à penetração das hifas no substrato, como acontece com essas cepas. FES é utilizada na indústria de alimentos como, por exemplo, para a produção de conidiósporos para produção do queijo de mofo (*mould cheese*), aplicados os conidiósporos de *Penicillium roquefortii* ou *P. camemberti*, na melhoria de salames (conidiósporos de *P. nalgiovensis*), além da produção de agentes biodefensivos de plantas (*Coniothyrium minitans*) (HÖLKER; LENZ, 2005; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Diversos fatores são relevantes durante a FES. Parâmetros como o crescimento e atividade microbiana, partícula do substrato, o tamanho de partícula e teor de água/umidade representam os pontos mais cruciais (SARRETTE *et al.*, 1992;

KAR; BANERJEE; BHATTACHARYYA, 1998).

De acordo com Pandey, Soccol e Mitchell (2000), de modo geral, partículas pequenas do substrato fornecem maior área para a penetração do microrganismo e, portanto, deve ser considerado como um fator desejável. Entretanto, partículas muito pequenas podem levar, na maioria dos casos, à agregação do substrato, interferindo na respiração/aeração microbiana e, assim, pode resultar em crescimento deficiente. Porções maiores podem melhorar a eficiência da respiração/aeração, devido ao aumento de espaço entre partículas, porém limita a superfície para a penetração microbiana. Dessa forma, é necessário estabelecer um tamanho de partícula específico para cada tipo de processo.

Devido à capacidade dos fungos filamentosos em colonizar diferentes substratos lignocelulosicos por FES é possível produzir variados bioprodutos (enzimas, ácidos orgânicos, bioativos) empregando resíduos agroindustriais regionais, por exemplo, na produção de cogumelos comestíveis (*Pleurotus ostreatus*) (FAN *et al.*, 2000) e obtenção de enzimas oxidativas e hidrolíticas (ZILLY *et al.*, 2011).

Dentro da ampla literatura desta temática, se destaca o estado da arte, apontado por Fan *et al.* (2000), evidenciando diversos substratos como bagaço de cana de açúcar, farinha de milho, farelo de trigo, farelo e farinha de soja, espiga de milho, mandioca, torta de algodão, resíduos de batata, resíduos de arroz (farelo e casca de arroz). Estes, devido à sua rica natureza orgânica, podem servir como substratos ideais para processos microbianos utilizados no desenvolvimento de produtos de valor agregado (antibióticos, inseticidas, hormônios de crescimento de plantas, promotores de crescimento, imunossupressivos e drogas diversas).

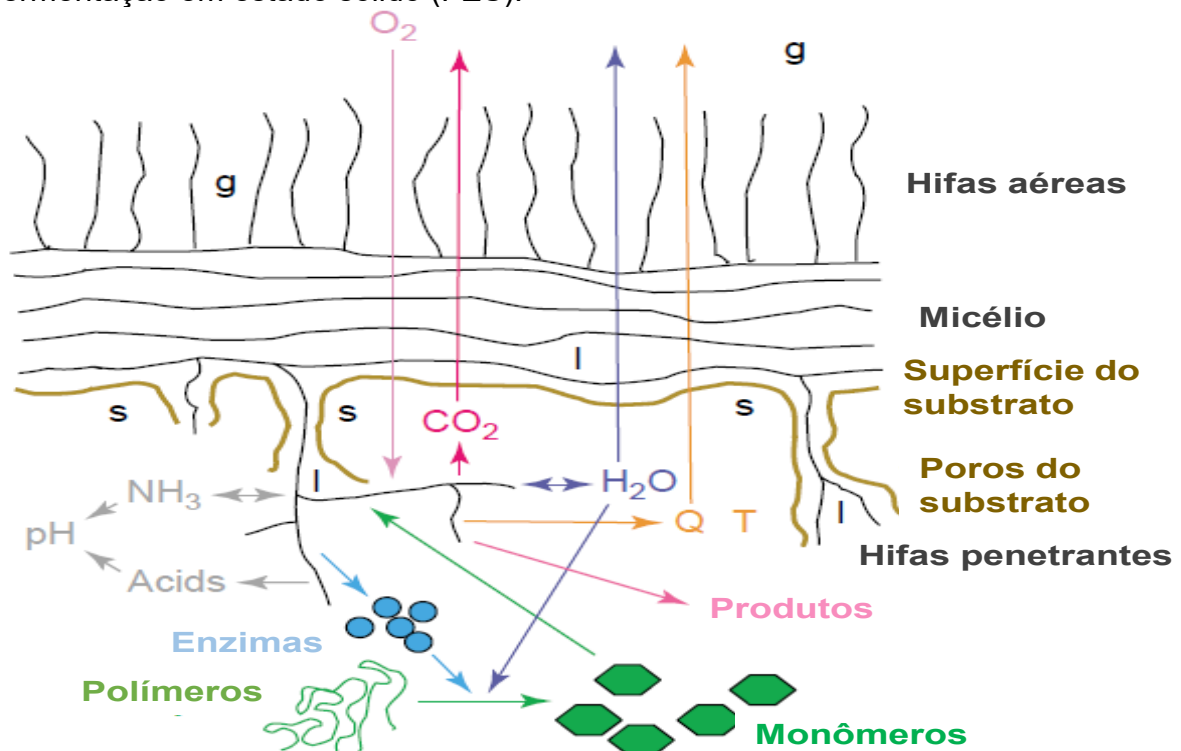
Diante da importância do uso e aplicação da FES baseado em crescimento e/ou colonização de fungos, cabe lembrar outras vantagens. Em relação à FEL, é um processo mais simples, mais adequado para técnicas de fermentação envolvendo fungos e microrganismos que exigem menores teores de umidade (baixa demanda de água) (SUBRAMANIYAM, VIMALA, 2012); outras como alta concentração do produto final formado, baixa taxa de contaminação, ausência de etapas de pré-cultivo, suporte sólido para os microrganismos, fermentação com substratos insolúveis em água, possibilidade de mistura de culturas de microrganismos, alto volume de produtividade, baixa demanda de energia para aquecimento, fácil aeração e ausência de adição de agentes antiespumantes (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004)

As principais desvantagens dessa técnica incluem: obstruções devido ao

acúmulo de gradientes, temperatura, pH, umidade; concentração do substrato ou  $pO_2$  durante o cultivo, que são difíceis de controlar sob disponibilidade limitada de água; variedade limitada de microrganismos que podem resistir à baixa umidade; dificuldade na rápida determinação de crescimento microbiano (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; KRISHNA, 2005).

Os fungos filamentosos são usualmente empregados em FES, devido às características intrínsecas desses seres em se ambientar dentro dos parâmetros simulados pela técnica. Entretanto, ainda se fazem necessários desenvolvimentos de tecnologias computacionais capazes de melhor controlar esse processo, haja visto a flexibilidade metabólica/fisiológica dos fungos quando submetidos a esse método de cultivo. A Figura 12 apresenta um esquema dos principais processos realizados pelos fungos em microescala e os possíveis fenômenos que podem influenciar, significativamente, o desempenho de produção.

Figura 12 - Esquema de alguns processos realizados em microescala durante a fermentação em estado sólido (FES).



Fonte: HÖLKER; HÖLFER e LENZ (2005).

Após a esporulação, as hifas fúngicas se desenvolvem formando a massa micelial (preto). Elas colonizam a superfície do substrato sólido (marrom). Da massa micelial, as hifas se projetam para o espaço aéreo/gasoso, formando hifas

aéreas, enquanto as outras penetram no substrato, crescendo entre os poros com água/líquido disponível. Em condições ideais de umidade, tem grande probabilidade de os espaços vazios entre as hifas aéreas serem preenchidas com gás (g), enquanto que os espaços vazios dentro da massa micelial e dentro do substrato são preenchidos por líquido (l). As atividades metabólicas mostradas ocorrem principalmente em torno do substrato e dentro dos poros. Entretanto, as áreas do micélio (por exemplo, as hifas aéreas) também são metabolicamente ativas e podem transportar substâncias devido à penetração dessas hifas. Enzimas hidrolíticas (azul claro) produzidas pelo micélio se difundem para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em monômeros (verde). As moléculas menores são então, absorvidas pelos fungos como exigência nutricional. O O<sub>2</sub> é consumido, enquanto CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O são formados durante o processo de colonização micelial. Assim, são formados gradientes dentro do local colonizado pelo fungo (biofilme-lilás). A formação de calor (Q; laranja) impulsiona o rápido aumento da temperatura (T). Esse parâmetro é um sério problema durante a FES. O calor é removido do substrato não somente por condução, mas também por evaporação, esse processo faz parte do complexo balanço hídrico no sistema (azul escuro).

Além da evaporação, o balanço hídrico inclui a absorção de água pelo micélio durante o crescimento, o consumo de água pelas reações de hidrólise, bem como a produção de água pelo processo de respiração. Outro fator importante no processo de FES é o pH local, uma vez que este pode ser alterado devido à liberação de ácidos e amônia (cinza). Durante a colonização micelial, os produtos bioquímicos de interesse (magenta) são liberados tanto na matriz sólida quanto na líquida. Para a obtenção desses bioprodutos é possível extraí-los de ambos os locais. Todos esses fenômenos, além de outros não abordados na imagem podem influenciar de forma significativa a eficiência da FES. A maior parte dos substratos para FES são resíduos lignocelulósicos, proteicos e amiláceos. Sendo assim, a maioria das enzimas produzidas incluem celulasas, xilanasas, lacases, proteases, amilases, enzimas oxidativas, lipases, pectinases e fitases. Estas enzimas são formadas, principalmente, durante os estágios iniciais do crescimento micelial, mas, também, podem ser produzidas a partir do substrato usado para a produção de corpos de frutificação (LETTI JUNIOR *et al.*, 2018; SÁNCHEZ, 2010). A Tabela 2 apresenta exemplos de macrofungos usados

em FES que fazem uso de diversos resíduos agroindustriais para a obtenção de bioprodutos.

Quadro 2 – Aspectos gerais de macrofungos usados em FES por meio de resíduos agroindustriais e suas aplicações biotecnológicas

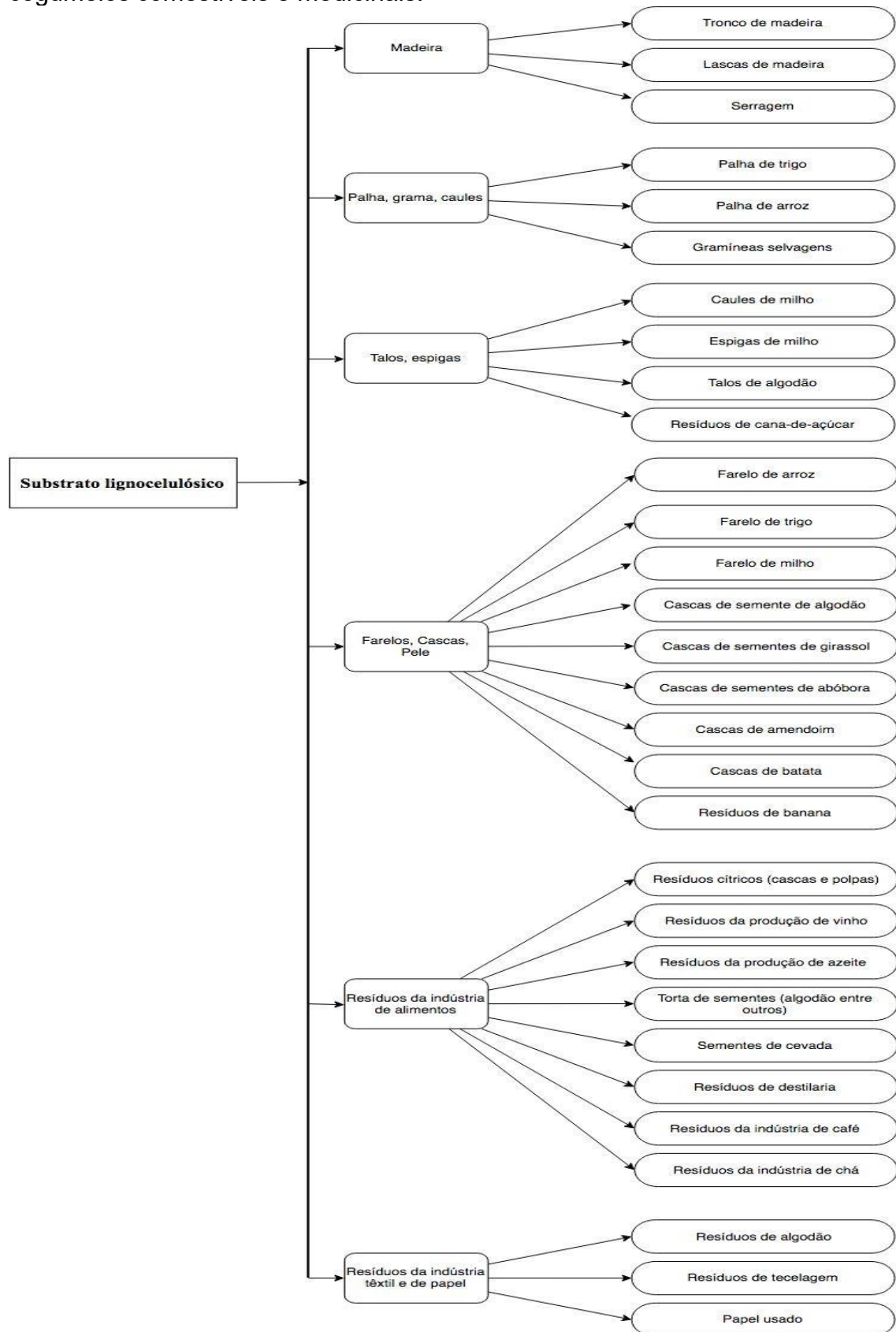
Fungos	Substrato (resíduo agroindustrial)	Aplicação
<i>Pleurotus spp.</i>	Casca de banana; Milho; Mandioca; Resíduos de batata; Resíduos de trigo;	Enriquecimento de proteínas; Produção de enzimas diversas;
<i>Cuprinus spp.</i>	Resíduos de trigo;	Enriquecimento de proteínas;
<i>Phanerochaete Chrysosporium</i>	Resíduos lignocelulósicos diversos;	Degradação de lignina;
<i>Phanerochaete sp.</i>	Resíduos lignocelulósicos; Resíduos de mandioca; Casca de soja; Palha de arroz;	Enzimas diversas (Xilanases, $\beta$ -xilosidase $\alpha$ -arabinofuranosidase, acetoesterase, catecol-oxidase); Degradação de lignina;
<i>Coprinus fumetarius</i>	Resíduos de trigo	Enriquecimento proteico
<i>Panus tigrinus</i>	Resíduos de trigo;	Produção de peróxido de hidrogênio;
<i>Lentinula edodes</i>	Resíduos lignocelulósicos;	Enzimas extracelulares;
<i>Polyporus spp.</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Enzimas (celulases e ligninase);
<i>Lentinula sp</i>	Resíduos lignocelulósicos; Resíduos de mandioca; Casca de soja; Palha de arroz;	Enzimas extracelulares diversas;
<i>Pleurotus sp., Phlebia radiata,</i>	Bagaço de cana-de-açúcar; Farelo e palha de trigo; Pó de serragem; Caule de algodão;	Produção de enzimas diversas (catalase e fenol-oxidase);
<i>Trametes versicolor; Flamulina velutipes e Polyporus sp.</i>	Celulose em pó; Tiras de madeira;	Produção de enzimas diversas (catalase e fenol-oxidase);
<i>Panus tigrinus, Trichoderma versicolor</i>	Celulose em pó; Tiras de madeira; Bagaço de cana-de-açúcar; Farelo e palha de trigo; Pó de serragem; Caule de algodão;	Produção de enzimas diversas (proteases neutras e alcalinas);

Fonte: Adaptado de Pandey (1992) e Pandey, Soccol e Mitchell (2000).

Vale destacar que modernos métodos de cultivo biotecnológico em biorreatores, permitem a produção rápida, eficiente e econômica de biomassa de fungos medicinais em quantidades suficientes para que possam ser aplicadas na indústria farmacêutica em larga escala para produção industrial. Uma importante vantagem do cultivo em estado sólido sobre outras técnicas, é que o produto concentrado pode ser obtido a partir de um substrato barato, como o resíduo com pouco pré-tratamento ou enriquecimento. Por outro lado, o uso de um meio indefinido, como serragem, pode tornar a purificação do produto mais difícil. Por essa razão, ele parece ser mais apropriado para a produção de suplementos alimentares farmacêuticamente ativos para os quais todo o substrato fermentado pode ser usado como produto (BEROVIC, 2019) (FIGURA 13).



Figura 13 – Diferentes substratos lignocelulósicos usados para cultivo artificial de cogumelos comestíveis e medicinais.



Fonte: Adaptado de BEROVIC, 2019.

## **Macrofungos: Produção de cogumelos e substâncias bioativas**

A fungicultura é relativamente nova na história da humanidade quando comparada à domesticação animal, havendo muito ainda a ser descoberto. O mercado de produção dos cogumelos, um dos ramos da fungicultura comercial, por outro lado, está bem estabelecido, composto por dois nichos principais, cogumelos comestíveis, incluindo as trufas, e produção de químicos bioativos para aplicações de suplementos alimentares e medicinais (LETTI JUNIOR *et al.*, 2018).

Os cogumelos representam uma importante fonte, ainda não totalmente aproveitada, de novos produtos farmacêuticos. Das cerca de 15.000 espécies conhecidas, 2.000 são seguras para consumo humano e cerca de 650 delas possuem propriedades medicinais. Muitas substâncias farmacêuticas com propriedades únicas e potentes são extraídas dos cogumelos em todo o mundo (RAI; TIDKE; WASSER, 2005). Têm sido usados há séculos na culinária asiática e na medicina tradicional, entretanto, suas propriedades permaneceram desconhecidas da comunidade científica por muito tempo.

Nas últimas décadas, uma grande quantidade de pesquisas concentrou-se nos tipos, nas fontes, na biossíntese, nas propriedades medicinais e nas aplicações de muitos cogumelos. A maioria dos metabólitos ativos comuns nestes fungos são os seus polissacarídeos (PSs) extracelulares, intracelulares ou de parede celular, que podem ter capacidade de imunoestimulação, efeitos antitumorais, antimicrobianos, antiinflamatórios, antioxidantes, prebióticos, hipoglicêmicos e hipocolesterolêmicos (GIAVASIS, 2014).

Os PSs são divididos em duas categorias, conhecidas como homopolissacarídeo (homo-PSs) e heteropolissacarídeos (hetero-PSs). Essa classificação foi realizada tomando como base a composição dos monossacarídeos, determinadas pelas diferenças químicas, tais como o tipo de ligação glicosídica, grau de ramificação e composição monossacarídica. Entre os homo-PSs, um exemplo conhecido são as glucanas (GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTINÉZ, 1996; WANG *et al.*, 2017). Diversos macro-basidiomicetos são relatados como capazes de produzir diferentes tipos de polissacarídeos. Como representantes desse grupo são recorrentemente apontadas as espécies *Agaricus blazei* (WASSER *et al.*, 2003), *Trametes trogii* (XU; GENG; ZHANG,

2013), *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* (SHI *et al.*, 2014), *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma applanatum* (MONTROYA; SÁNCHEZ; LEVIN, 2013; WASSER, 2002), *Pleurotus eryngii* (HE *et al.*, 2016), entre outros.

Relacionado à composição dos PSs, os carboidratos mais presentes são a glicose (Glc), manose (Man), galactose (Gal), xilose (Xil), arabinose (Ara), ramnose (Rha) e fucose (Fuc). Componentes encontrados nos PSs em menor frequência nesses cogumelos, incluem a frutose (Fru), ribose (Rib), ácido glucurônico (GlcA), ácido galacturônico (GalA), N-acetil-glucosamina (GlcNac, GlcN) e N-acetil-galactosamina (GalNac, GalN) (WANG *et al.*, 2017).

As propriedades medicinais de cogumelos basidiomicetos são frequentemente descritas em culturas antigas e algumas dessas propriedades foram utilizadas no desenvolvimento de aplicações farmacológicas. Especialmente nos países asiáticos, esses organismos são utilizados como agentes terapêuticos em diversas enfermidades humanas, que vão desde o resfriado comum até o tratamento de certas formas de câncer (ROBLES-HERNÁNDEZ, 2008).

Dentre as moléculas com propriedades medicinais, é relevante descrever aspectos gerais sobre as glicoproteínas. Essas proteínas, após a sua síntese, são glicosiladas enzimaticamente, ligando covalentemente aminoácidos, peptídeos ou proteínas a diferentes carboidratos como glicose, galactose, frutose, ácido siálico, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina (AMIGO-BENAVENT; VILLAMIEL; DEL CASTILLO, 2007; BERENDS *et al.*, 2011; DONALD; JUDITH, 1995; ROBLES-HERNÁNDEZ, 2008).

Durante os últimos anos foram observados o aumento significativo de publicações que trazem glicoproteínas produzidas por cogumelos, como as lectinas e os terpenoides. A obtenção dessas glicoproteínas pode se dar por extração dos organismos ou produtos deles derivados, como a sua parede celular (AMIGO-BENAVENT; VILLAMIEL; DEL CASTILLO, 2007).

As lectinas são proteínas/glicoproteínas que possuem pelo menos um domínio catalítico contendo ligação específica reversível com monossacarídeos ou oligossacarídeos. Estas glicoproteínas podem se ligar a porções de carboidratos na superfície de eritrócitos, aglutinando-os, sem alterar as propriedades dos carboidratos (ETZLER, 1985; LAM; NG, 2011).

Apesar das diferenças em termos físico-químicos, lectinas provenientes de diferentes fontes animais, vegetais ou de microrganismos podem apresentar atividades biológicas comuns, como atividades antitumorais, imunomoduladora, atividades antipatogênicas. A produção de medicamentos baseadas nessas características pode ser viável e a aplicação de lectinas é possível, dependendo de suas propriedades (LAM; NG, 2011).

De acordo com Hassan *et al.* (2015), maiores teores de lectinas foram detectados em *Lactarius* seguido por *Pleurotus*, *Agaricus*, *Amanita* e *Boletus*.

Um grande número de trabalhos vem mostrando as diversidades químicas apresentadas pelas lectinas. Dentro do grupo dos cogumelos, tal representação é, em grande parte, devido às características intrínsecas de cada espécie estudada, podendo ser encontradas em diversos exemplos como *Agaricus*, *Amanita pantherina*, *Boletus satanas*, *Coprinus cinereus*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceum*, *Ischnoderma resinosum*, *Lactarius deterrimus*, *Laetiporus sulphureus*, *Tricholoma mongolicum*, *Volvariella volvacea*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma campense*, *pleurotus spp.*, *Pleurotus ferulae*, *Volvariela volvaceae* (WANG *et al.*, 1998; SINGH *et al.*, 2015).

Conforme observado por Soccol (2017), até os dias atuais, é notável o crescimento no número de pesquisadores e de laboratórios envolvidos em variadas etapas de pesquisa, que buscam a avaliação de propriedades farmacológicas, identificação e caracterização molecular de princípios ativos derivados de cogumelos. No que tange aos terpenoides, as indústrias farmacêutica e alimentícia têm explorado seu potencial e eficácia como medicamentos e intensificadores de sabor, respectivamente (ZWENGER; BASU, 2008).

Os terpenoides (isoprenoides) são compostos naturais numerosos e estruturalmente diversos, que ocorrem em diversos seres vivos (animais, plantas, fungos). São formados pela combinação de duas ou mais moléculas de 2-metil-2, 3-butadieno, também conhecido como isopreno, uma unidade de cinco carbonos que é abreviada como C5. Terpenoides são subdivididos de acordo com o número de átomos de carbono. Para exemplificar, um monoterpene (C10) consiste em duas subunidades de isopreno, um sesquiterpene (C15) consiste em três unidades de isopreno, e assim por diante (ZWENGER; BASU, 2008; GARRETT; GRISHMAN, 1999; URABE; ASABA; INOUE, 2015).

Os terpenoides provenientes de cogumelos podem possuir atividades

biológicas variáveis tais como antibacteriano, anticancerígeno, anti-inflamatório, antimalárico, antioxidante e antitumoral (DURU; ÇAYAN, 2015). Outras utilizações terapêuticas importantes são: antiviral, anti-hiperglicêmico, antiparasitário e imunomodulador (BRAHMKSHATRIYA; BRAHMKSHATRIYA, 2013).

Entre as diversas espécies de cogumelos detentoras de uma das características supracitadas, vale destacar o *Pleurotus cornucopiae*, *Flammulina velutipes*, *Agrocybe salicicola*, *Flammulina velutipes*, *P. eryngii*, *Ganoderma lucidum* e *G. applanatum* (DURU; ÇAYAN, 2015; ROBLES-HERNÁNDEZ, 2008).

Outras moléculas com propriedades medicinais, provenientes de cogumelos e amplamente estudadas, são as biomoléculas de baixo peso molecular, com destaque, entre inúmeros exemplos, para as quinonas, catecolaminas e esteróides.

Quinonas são encontradas em plantas, fungos, bactérias e no reino animal. Elas são amplamente distribuídas e possuem grande variedade estrutural. Esses compostos são derivados de poucos intermediários chaves, principalmente, acetato, chiquimato e mevalonato, por uma série de reações que levam à formação de compostos benzenoides. Particularmente para as quinonas provenientes de fungos, a via mais comumente usada para biossíntese é a do acetato-mevalonato (VELÍŠEK; CEJPEK, 2011; THOMSON, 2012).

Entre as propriedades de aplicações das quinonas, a capacidade anti-inflamatória a antitumoral são as principais relatadas. As espécies descritas incluem *Panus conchatus*, *Panus rudis*, *Lentinus crinitus*, *Agaricus bisporus* e *Piptoporus betulinus* (ZAIDMAN *et al.*, 2005; TIFFANY *et al.*, 1978; LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005). Entre outras aplicações, tem-se como as espécies importantes: *Panus linteus*, *Gymnopilus marginatus*, *G. patriae*, *G. parvisporus*, *Ionotus hispidus*, entre outros (ZAIDMAN *et al.*, 2005; GONINDARD, 1997; SILBERBORTH, 2002).

### **Aspectos gerais de macrofungos e estudos proteômicos**

O primeiro genoma de macrobasidiomiceto (fungo de podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*) foi sequenciado no Joint Genome Institute (JGI) – WalnutCreek, CA, EUA (DE CASTRO *et al.*, 2010). Mais de 100 fungos foram sequenciados e os seus genomas armazenados (GRIGORIEV *et al.*, 2011). Recentemente, vários projetos visando as análises comparativas da maquinaria

enzimática utilizadas pelos principais fungos decompositores de parede celular vegetal, além de enzimas lignolíticas envolvidas nesse processo, estão em andamento (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005; JGI, 2018).

A maioria dos genomas de basidiomicetos atualmente disponíveis, são de fungos decompositores da parede celular vegetal (ordem Polyporales) (JGI, 2018). De acordo com Gómez Mendoza (2009), o conhecimento dos mecanismos de expressão, função e regulação da totalidade de proteínas codificadas pelos seus respectivos genomas, pode auxiliar no entendimento dos seus mecanismos fisiológicos. Para tal, é necessário o uso conjunto de estratégias pós genômicas, incluindo a proteômica.

O termo proteoma descreve o conjunto e tipos de proteínas em uma amostra biológica em um determinado tempo de cultivo ou desenvolvimento do organismo. A proteômica busca realizar análises em larga escala de proteína, incluindo sua identificação, analisa os níveis de expressão e caracterização parcial através de análises de modificações pré-, co- e pós-traducionais, suas estruturas e interações.

De um modo geral, a proteômica tem quatro objetivos principais: (i) identificar proteínas, a partir da criação de bancos de informações; (ii) analisar a expressão diferencial de proteínas em diferentes locais celulares; (iii) caracterizar proteínas, por meio da descoberta de sua função, localização celular, etc; e (iv) descrever e entender redes de interações de proteínas (PALAGI *et al.*, 2006).

A proteômica estuda de forma descritiva e quantitativa desde o conjunto de proteínas de uma organela subcelular até aquelas de um ecossistema, suas variações na população, mudanças em resposta a um ambiente ou decorrentes do desenvolvimento normal ou alterado, modificações e interações com outras proteínas (BARBOSA *et al.*, 2012). Devido às características citadas, entender o proteoma tem se tornado indispensável como abordagem para entender a complexa diversidade bioquímica em fungos. Nos últimos anos, essa área tem assumido importante papel entre os estudos "omicos" (BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008).

O termo proteoma é usualmente empregado para designar subpopulações de proteínas na célula. Enquanto que os conjuntos de proteínas secretados pelas células constituem os secretomas celulares (MUKHERJEE; MANI, 2013; GREENBAUM *et al.*, 2001).

Os fungos macro-basidiomicetos são notáveis devido à sua capacidade única em degradar todos os componentes principais da madeira e outras fontes lignocelulósicas eficientemente. Diante disso, alguns trabalhos têm procurado

entender e caracterizar os seus diferentes sistemas enzimáticos (BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008). Para entender esses mecanismos, entre os métodos disponíveis, a avaliação de secretomas tem se tornado frequente.

Diferentes técnicas têm sido utilizadas no estudo de secretomas de fungos, que se desenvolvem em substratos lignocelulósicos, com ênfase em resíduos agroindustriais. Esses trabalhos buscam caracterizar os sistemas hidrolíticos, avaliando a forma sinérgica de ação de enzimas durante o processo de hidrólise dos diferentes substratos.

De um modo geral, os secretomas de basidiomicetos podem ser estudados de forma *in silico*, baseados em análises de bioinfosecretomas (análises de bioinformática), a partir da predição de proteínas secretadas, advindas de peptídeos sinais anotados automaticamente em uma sequência do genoma. Outro método é baseado em análises experimentais, via utilização de diferentes técnicas de espectrometria de massa, para identificação de proteínas secretadas (ALFARO *et al.*, 2014; LUM; MIN, 2011).

Diante disso, diferentes estratégias podem ser empregadas tanto para o estudo de bioinfosecretomas quanto por secretomas via análises experimentais; diante dos objetivos desta tese, vale destacar que foi utilizada análise experimental com abordagem *Bottom-up* a partir de amostras *Gel-Free*.

Análises proteômicas de secretomas podem ser realizadas usando duas abordagens. A primeira é chamada de proteômica *Top-down*, nesse caso permite a análise das proteínas intactas, sem uma prévia digestão; a segunda é a *Bottom-up*, em que as proteínas, são previamente digeridas usando tripsina e, posteriormente, analisadas por espectrômetro de massas (ALFARO *et al.*, 2014; LUM; MIN, 2011).

Os secretomas correspondem à proteomas complexos, em seus estudos anteriormente ao emprego de espectrometria de massas, diferentes técnicas podem ser usadas para separação de proteínas e peptídeos; entre as mais comuns se encontram a eletroforese SDS PAGE e eletroforese bidimensional (2-DE). No entanto, alternativamente a essas técnicas, a Cromatografia Líquida (LC) tem ganhado espaço a cada dia (SCHIRMER *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2004; WASHBURN; WOLTERS; YATES, 2001). A LC pode ser baseada em diferentes métodos cromatográficos (exclusão molecular, troca iônica, fase reversa, afinidade). Após o emprego dessa técnica, o analito é introduzido finalmente ao espectrômetro de massas (SCHIRMER *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2004; WASHBURN; WOLTERS; YATES, 2001). Neste caso, o

analito é dissolvido em uma fase líquida sem interagir quimicamente com ela, e percola uma fase estacionária geralmente empacotada em uma ou em várias colunas com diferentes fases estacionárias (SCHIRMER *et al.*, 2003; MAY *et al.*, 2011; WASHBURN; WOLTERS; YATES, 2001).

Após o emprego de cromatografia líquida, os analitos deverão passar para a fase de identificação. Para isso, é feito uso de espectrometria de massa, considerada uma técnica analítica em que todos os átomos ou moléculas de uma determinada amostra são ionizados, via feixe de íons ou elétrons, gerando fragmentos separados de acordo com suas massas massa/carga ( $m/z$ ) que podem ser detectados e quantificados, uma vez que cada molécula possui um perfil de fragmentação (CHIARADIA *et al.*, 2008). O equipamento usado é constituído por uma fonte de ionização (gerador de íons peptídicos ou proteicos), um ou mais analisadores de massas e um detector (SCHIRMER *et al.*, 2003; MAY *et al.*, 2011; WASHBURN; WOLTERS; YATES, 2001; CHIARADIA *et al.*, 2008).

Finalmente, visando a identificação da proteína após determinação da  $m/z$  do peptídeo, pode ser realizado um segundo processo, conhecido como sequenciamento *in tandem* (LC-MS/MS), obtendo diferentes peptídeos, incluindo os mais abundantes e realizados fragmentação desses peptídeos por colisões. Uma vez ocorrendo a fragmentação dos peptídeos, feito ao longo do seu esqueleto, é possível gerar o espectro MS/MS, possibilitando a posterior dedução da sequência do peptídeo (WALTHER; MANN, 2010).

Conforme mostrado por Gómez Mendoza (2013) análises de secretomas fúngicos usando a técnica LC-MS/MS – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial – tem sido útil em diferentes trabalhos, possibilitando avanços das análises *shotgun* (usando técnica *gel-free*). Essa autora aponta, ainda, para o emprego da ferramenta em trabalhos de caracterização e quantificação das proteínas secretadas por diferentes espécies fúngicas. Por outro lado, de acordo com Pandey e Mann (2000), devido ao acúmulo de grandes quantidades de sequências de DNA em bancos de dados, os pesquisadores estão percebendo que apenas ter sequências completas de genomas não são suficientes para elucidar função biológica.



## **CAPÍTULO II:**

### ***DEVELOPMENT OF AN RP-UHPLC-PDA METHOD FOR QUANTIFICATION OF FREE GOSSYPOL IN COTTONSEED CAKE AND FUNGAL- TREATED COTTONSEED CAKE.***

**Artigo Publicado Em Plos One (2018)**




## Resumo

A biomassa torta de caroço de algodão, um resíduo da extração de óleo, é apropriado para o uso em ração animal, devidos aos seus altos teores de minerais, fibras e proteínas. No entanto, a presença de gossipol livre (GL), um pigmento tóxico presente nas glândulas do algodoeiro, tem limitado o uso dessa biomassa para alimentação de animais monogástricos. Um método promissor para desintoxicação da torta de caroço de algodão é a fermentação usando fungos, que pode eliminar até 100% de gossipol. Visando quantificar os níveis de gossipol livre em diferentes materiais de algodão, os seguintes métodos foram desenvolvidos e validados. Sob condições otimizadas, a extração foi realizada usando acetona 70%. O extrato foi então analisado por cromatografia líquida de ultra desempenho (UHPLC), com gradiente de eluição na coluna de fase reversa KINETEX® C18 (100 x 2,10 mm, 2,6 µm). Utilizou-se solução de metanol a 0,1% em TFA como fase móvel e detector PDA a 254 nm. O método otimizado foi validado por análise de especificidade, linearidade e alcance, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Os limites de detecção e quantificação foram observados em 0,2 e 0,5 µg/mL, respectivamente. Com boa reprodutibilidade, com precisão (RSD) <10% e recuperação superior a 94%, o desenvolvimento foi apropriado para a quantificação de baixas quantidades de gossipol livre. O método validado foi usado para determinar níveis de gossipol em algodão tratado com macrofungos e obtidos excelentes resultados de detecção. A partir do desenvolvimento desse método foram possíveis uma triagem de diferentes macrofungos nesses substratos, afim de avaliar os que melhor degradariam gossipol, além disso abriu possibilidades de utilizar diferentes pré-tratamentos para essas biomassas com vistas a eliminação de gossipol livre.


**Palavras-chave:** Gossipol, gossipol livre, macrofungos, métodos de detecção, validação, caroço de algodão.

## RESEARCH ARTICLE

# Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake

Aparecido Almeida Conceição<sup>1,2</sup>, Clemente Batista Soares Neto<sup>2,3</sup>, José Antônio de Aquino Ribeiro<sup>2</sup>, Felix Gonçalves de Siqueira<sup>2</sup>, Robert Neil Gerard Miller<sup>3</sup>, Simone Mendonça<sup>2\*</sup>

**1** Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil, **2** Embrapa Agroenergia, Brasília, Federal District, Brazil, **3** Universidade de Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

 These authors contributed equally to this work.

\* [simone.mendonca@embrapa.br](mailto:simone.mendonca@embrapa.br)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Conceição AA, Soares Neto CB, Ribeiro JAdA, Siqueira FGd, Miller RNG, Mendonça S (2018) Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. PLoS ONE 13(5): e0196164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164>

**Editor:** Salah A Sheweita, Alexandria University, EGYPT

**Received:** August 8, 2017

**Accepted:** April 6, 2018

**Published:** May 23, 2018

**Copyright:** © 2018 Conceição et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are available at Protocols.io (<https://www.protocols.io/view/extraction-and-detection-of-free-gossypol-in-cotto-kmcv5e/>) and Figshare (<https://figshare.com/s/72a49f6ca2b044e5d232>). The DOI for Protocols.io is ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kmcv5e/](https://doi.org/10.17504/protocols.io.kmcv5e/)).

**Funding:** SM, FGS, JAAR and AAC received funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - ([www.cnpq.br](http://www.cnpq.br)) (404786/2013-8); RINGM received funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - ([www.cnpq.br](http://www.cnpq.br)) (307035/2013-1); AAC was supported by fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (<http://www.fapesb.ba.gov.br/>) and CBSN was supported by fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) ([www.capes.gov.br/](http://www.capes.gov.br/)). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Cottonseed cake biomass, which is a residue of oil extraction, is potentially appropriate for use as animal feed, given the high mineral, fibre and protein content. The presence of free gossypol, however, a toxic pigment in the glands of the cotton plant, limits use of this biomass for monogastric livestock. A promising method to detoxify cottonseed cake relies on fermentation by fungi, which can eliminate up to 100% of gossypol. In order to quantify trace levels of free gossypol in different cotton materials, including cottonseed cake treated with macrofungi, a simple and rapid chromatographic detection method was developed and validated. Under optimized conditions, extraction was performed using 70% acetone. The extract was then analysed by Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC), with gradient elution on a C-18 reverse phase column KINETEX® (100 x 2.10 mm, 2.6 µm). Methanol-0.1% TFA aqueous solution was employed as mobile phase and PDA detection conducted at 254 nm. The optimized method was validated by analysis of specificity, linearity and range, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy. Detection and quantification limits were observed at 0.2 and 0.5 µg/mL, respectively. With good reproducibility, with precision (RSD) <10% and recovery greater than 94%, the developed assay was appropriate for quantification of low quantities of free gossypol. The validated method was successfully applied to determine trace levels of free gossypol cottonseed treated with a macrofungus.

## INTRODUCTION

Gossypol is a polyphenolic compound that provides protection in cotton (*Gossypium* sp.) against predators that include insects, fungi and nematodes [1–4]. This yellow pigment is produced and stored in specialized glands present in the leaves, seeds, stems and flower buds [5–7]. Biosynthesis of gossypol occurs by peroxidation of hemigossypol, giving rise to two enantiomers: (+)- and (-)-gossypol [8–10]. (±)Gossypol is found in cottonseed cake (CSC) in two forms: as free gossypol (FG) and as gossypol bound to proteins [11]. According to AOCS official methods, FG is defined as all the gossypol content that is extractable with aqueous acetone [12].

The FG content in intact cottonseed (CS) is typically around 0.7% (7000 ppm) [7], whilst the detectable remaining free gossypol in CSC, after cotton oil extraction, varies between 0.1 and 0.6%, when extracted using solvent-based methods. If initial extrusion or expansion steps are employed prior to solvent extraction, however, FG content may appear to be lower, with levels as low as 0.05% documented. Levels can also be sub-estimated when mechanical extraction methods are applied, such as those involving pressure and temperature treatment. In these methods, the detected content of FG in the CSC has also been reported in the region of only 0.05% [7,13].

CSC represents a rich nutrient source, with abundant protein, mineral, fat, and fiber content [14]. However, several animal species, including humans, are sensitive to the toxic effects of FG. Of particular importance are monogastric livestock, which are frequently negatively affected by even low quantities of this polyphenolic pigment [7,15–21]. For example, color alteration has been noted in eggs from chickens fed with feed containing 220 ppm of FG [22], which represents only 0.022% of the feed. The directive 2002/32 of the European Union (2002L00032- February of 2013) states that the maximum FG concentration for cottonseed cake for complete feedstuffs are 20 ppm for laying hens and piglets, 60 ppm for pigs, 100 ppm for poultry and calves, and 500 ppm for cattle, sheep and goats [7]. Given such toxicity and the strict maximum permitted levels for FG, CSC needs to be further processed to decrease the toxic molecule to the permissible levels for non-ruminants feed [23–26].

Chemical, physical and biological treatments have been employed to reduce the toxic effects of FG in CSC [24,27–29]. A promising method for eliminating gossypol is through biodegradation by filamentous fungi such as *Aspergillus oryzae* [30], *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* [31–33] and *Pleurotus florida* [34]. This process also increases substrate value, with gain in crude protein, total amino acids [31] and antioxidant activities [30], leading to improvement in livestock growth performance [26]. The white rot fungi (Basidiomycetes) have also been shown to be capable of detoxifying up to 100% of pure gossypol when incorporated into growth media [34]. When tested for cottonseed detoxification, such fungi have also been reported to simultaneously decompose pollutants and well as macromolecules such as lignin [35], as well as environmental pollutants such as synthetic and aromatic dyes, polycyclic aromatic hydrocarbons, tri-nitro-toluene (TNT), and polychlorinated biphenyls [36,37].

For precise evaluation of biodegradation of gossypol, analytical methods that enable accurate quantification of this polyphenol at trace levels are required [38]. In situations demanding quantitation of multiple samples, it is also desirable that methods offer low cost and short sample analysis times. Numerous analytical approaches for detection and quantification of free and total gossypol in different sample matrices have been reported, including spectrophotometric, colorimetric, gravimetric and titrimetric methods [39–52]. Currently, recommended methods for detection and quantification of gossypol

are based on liquid chromatography with UV detection [42,53,54]. Such methods, however, are inappropriate for accurate analysis of gossypol in situations where the analyte is present in very low concentrations, such as in fermented cottonseed cake (FCSC). All previous investigations into gossypol detoxification in cottonseed cake have employed only such less sensitive quantitative methods available, which are more appropriate for untreated samples where concentrations of gossypol are considerably higher [26,32,34, 55–57].

Extra attention needs to be applied during FG extraction and detection when dealing with samples containing very low gossypol content. FG can be easily degraded under certain conditions, such as when employing high temperatures [58], extraction with alcoholic solvents or long exposure to oxygen [40]. Such care has not been adopted in many previously published extraction methodologies for FG. In addition to the risk of FG degradation, others factors, such as the employment of complex solvent mixtures [58,59] and time-consuming extraction methods [41,42,60] limits the uptake of a considerable number of published procedures for FG extraction and detection. The official AOCS method indicated to determine free and total gossypol in cottonseed, cottonseed meats and cake is based on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). This method, however, employs a long, complex and expensive sample preparation process, which is inappropriate for analysis of large numbers of samples [61]. Considering the sensitivity offered by HPLC, this approach has been employed for accurate analysis of FG content in diverse samples, ranging from glandless cotton plants [42,53,54] to animal and human samples [49,62–64]. The advantages of HPLC also go beyond the high sensitivity, with technical errors minimized due to the low number of steps employed in analysis methods. Recently developed liquid chromatography technologies such as Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) may enable even further improvement in FG detection, appropriate for accurate analysis of levels in FCSC following treatment for theoretical elimination of gossypol, or for determination of safety for livestock consumption.

In consideration of the need for a highly sensitive, selective, rapid and specific technique for determining trace levels of FG in FCSC, we developed an UHPLC method capable of efficient and rapid extraction and detection of trace level FG in cottonseed cake following detoxification by fungi.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

All organic solvents were of HPLC grade. Acetone and methanol were purchased from TEDIA<sup>1</sup>. Trifluoroacetic acid HPLC grade and (±)-Gossypol standard ( $\leq 95\%$  purity HPLC) were purchased from SIGMA<sup>1</sup> (St. Louis, USA). High purity deionized water (resistivity 18.2 MO.cm) was obtained by using a Milli-Q Direct system (Millipore, Billerica, MA, USA).

### **COTTON MATERIAL AND FUNGAL STRAIN**

Processed cottonseed cake was provided by a cotton processing company located in Buritis, MG, Brazil. A white rot basidiomycete fungal strain of a *Pleurotus sp.* was obtained from a local collection of microorganisms and microalgae utilized in agroenergy and biorefinery research applications (Embrapa, Brasília, Federal District, Brazil). This strain, previously identified as an efficient biodetoxifier of FG, was employed to enable validation of the extraction and detection methods developed for detection of gossypol at trace levels following biodetoxification.

### **FUNGAL INOCULATION ON COTTONSEED CAKE**

Samples of 70 g of CS or CSC with moisture adjusted to 60% were autoclaved in 350 mL Erlenmeyer flasks for 60 min at 121°C. Under aseptic conditions, 5 mm mycelial discs of the *Pleurotus* sp. strain, previously grown on potato dextrose agar with CSC medium for 15 days at 28°C, were inoculated onto both CS and CSC. Inoculated cotton material was then incubated at 28°C for a 30-day period. Colonized material was dried at 65°C for 48 h (dry matter), resulting in fermented cottonseed (FCS) and fermented cottonseed cake (FCSC) samples. All experiments were conducted in triplicate.

## SAMPLE EXTRACTION

Extraction was based on the AOCS official method [11], with modifications for optimized sample extraction with regard to solvent, temperature and time of extraction, ultra-sonication and speed vacuum sample concentration. Following autoclaving, or autoclaving followed by fermentation, extraction was conducted for FCS, CSC, autoclaved CSC and FCSC as follows: dried samples were finely ground with an ultra-centrifugal mill and 1 gram samples transferred into 15 mL centrifuge tubes. Extraction was conducted with two sequential cold ultra-sonication steps of 5 minutes, first with 3 mL of ultrapure water, followed by addition of 7 mL acetone directly onto the sample. Tubes were centrifuged at 9000 rpm (8370 rcf) for 5 minutes at 8°C and 2 mL of supernatant then transferred to fresh 15 mL centrifuge tubes. Solvent was evaporated using a speed vacuum at room temperature. The residue was re-suspended with 200 µL of 70% aqueous acetone, transferred into a 1.5 mL microtube and centrifuged at 14000 rpm (20590 rcf) for 10 minutes at 8°C. The supernatant was transferred to a sample vial with glass inserts. Given the high content of FG in CS and autoclaved CS, these samples were not evaporated by speed vacuum ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.krncv5e](https://doi.org/10.17504/protocols.io.krncv5e) [protocols.io])

## ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPLC)

A number of different parameters were tested during method development, which comprised: reversed phase columns Acquity<sup>1</sup> UPLC HSS T3 (2.1 x 150 mm, 1.8 µm), BEH C18 and BEH C8 (2.1 x 150 mm, 1.7 µm), ZORBAX<sup>1</sup> HPLC SB-C18 and SB-CN (4.6 x 250 mm, 5 µm), column temperature, organic mobile phase (acetonitrile, methanol or mixture of both), elution mode (isocratic or gradient), and modifiers of mobile phase (acetic acid, formic acid, or trifluoroacetic acid (TFA)). The final optimized method was performed on a Waters ACQUITY UPLC H-Class system (Waters, Milford, USA) equipped with a Photodiode Array (PDA) detector. Gradient elution was conducted using a mobile phase starting with 40% aqueous (TFA 0.1%, v/v) and 60% organic (100% methanol) solvent on a KINETEX<sup>1</sup> reversed phase (RP) C18 column (100 x 2.1 mm, 2.6 µm) at 35°C (Table 1). A solvent flow rate of 0.4 mL/min was employed, with a total run time of 14 minutes (including column re-equilibration). The signal was monitored at 254 nm. The sample manager temperature was maintained at 8°C, with a 2 µL sample injected. Data acquisition and integration were performed using Empower (version 3.0, Empower software, Milford, USA) ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.krncv5e](https://doi.org/10.17504/protocols.io.krncv5e) [protocols.io]).

Table 1. Gradient elution applied for free gossypol (FG) detection by UHPLC.

Time (min)	Aqueous (%)	Organic (%)
Initial	40	60
8	0	100
10	0	100
10.01	40	60
14	40	60

## VALIDATION PARAMETERS

Validation of the method comprised evaluation of selectivity, linearity, limit of detection, limit of quantitation, precision (repeatability) and accuracy (recovery), in accordance to the International conference of harmonisation guideline Q2(R) [65].

Specificity was assessed by comparing the retention time of the analyte in the cottonseed cake sample to retention time of the gossypol standard. Gossypol identity was also confirmed based on the purity spectra of the peak extracted from a cottonseed cake sample fortified with standard solution (50 µg/mL).

Linearity was evaluated using a calibration curve of gossypol, in the range of 0.5 to 100 µg/mL (0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL). Gossypol standard was firstly solubilized in chloroform (5 mg/mL) and then diluted in 70% aqueous acetone solution to obtain standard concentrations. Curves of peak area versus concentration were constructed by means of a least squares method. Coefficient of determination and residuals were evaluated for fitting data to the model.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined by injecting gossypol standard solutions in the range of 0.05 to 1 µg/mL. Chromatograms were visually inspected and signal-to-noise ratios were calculated. The LOD was defined as the lowest concentration with ratio signal-to-noise greater or equal to three. The LOQ was defined as the lowest concentration with ratio signal-to-noise greater or equal to 10, with acceptable precision and accuracy.

For analysis of precision, the repeatability of the analytical method was assessed in six replicate determinations of gossypol in a homogeneous cottonseed cake sample. Inter-day precision was assessed by analyzing the same homogeneous sample over three consecutive days.

Relative Standard Deviation (RSD) was calculated for each determination series, using acceptance criteria of  $RSD \leq 15\%$  for repeatability. Inter-day precision was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) at the 5% significance level.

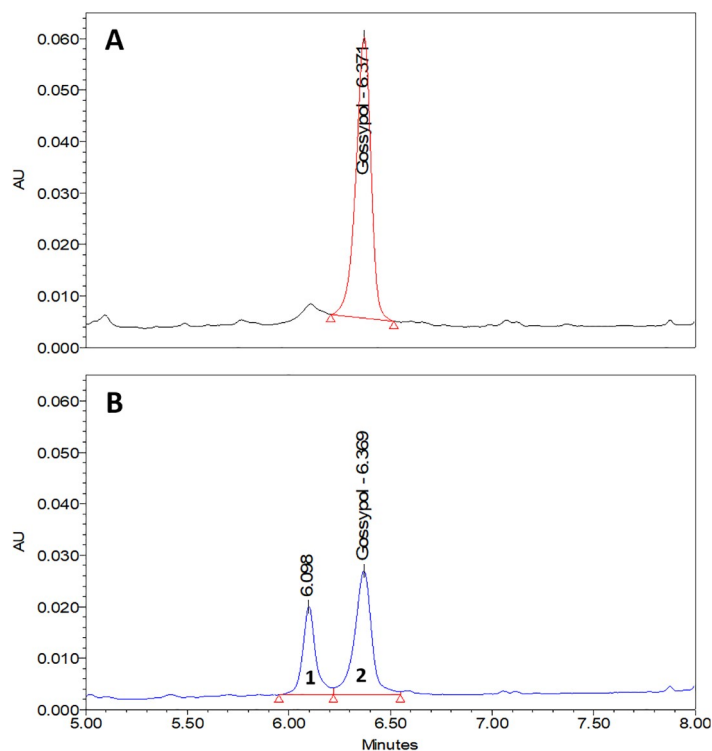
Accuracy was determined by a recovery test. Three sets of samples were evaluated: standard solutions at concentrations of 2 µg/mL (low), 20 µg/mL (medium), and 80 µg/mL (high) in 70% aqueous acetone, 1 g of CSC and 1 g of CSC fortified with the standard. The experiment was conducted over three consecutive days. Absolute recovery was calculated after extraction and analysis of all sample sets.

## RESULTS

### Optimized extraction

The principle objective of this study was to optimize extraction of FG in FSCM whilst assuring molecule stability. For this, numerous procedures were evaluated, including sonication with or without ice, evaporation on a rotary evaporator or a speed vacuum, and extraction using different solvents.

Extraction with 100% acetone or 70% acetone rendered the greatest amount of FG. However, when extraction was performed using a CSC sample spiked with gossypol standard (40 µg/µL), an unknown peak near to that for gossypol (Fig 1B) occurred when using 100% acetone, in contrast to its absence when using 70% acetone (Fig 1A). In Fig 2, the spectrum of the two peaks from Fig 1B are compared, revealing that both substances are correlated, with peak 1 as a result of gossypol degradation (peak 2). Based on these findings, employment of a final concentration of 70% acetone (application of 3 mL of water, followed by 7 mL of acetone) under cold ultra-sonication conditions, was demonstrated to be appropriate for extraction of FG from samples whilst maintaining gossypol stability.



**Fig 1. UHPLC chromatograms of free gossypol (FG) extracted from cottonseed cake (CSC) using different acetone concentrations.** Identical gradient elution conditions and extraction conditions with sonication on ice were applied throughout. For both samples, 1g CSC were spiked with 80  $\mu$ L of a 5 mg/mL gossypol solution. (A) Extraction with 70% acetone (peak area = 282558); (B) extraction with 100% acetone (peak 1 area = 142704, peak 2 area = 77803).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164.g001>

Different columns, temperatures, elution's gradients and solvents were compared for the optimization of elution for gossypol detection by UHPLC. Acquity<sup>1</sup> UPLC HSS T3 (2.1 x 150 mm, 1.8  $\mu$ m), BEH C18 and BEH C8 (2.1 x 150 mm, 1.7  $\mu$ m), ZORBAX<sup>1</sup> HPLC SB-C18 and CB-CN (4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m) columns all resulted in only broad peaks for gossypol, as well as inappropriately long elution time periods. The KINETEX<sup>1</sup> C18 column presented narrow peaks for gossypol with a short elution time. Column temperature was also a factor that interferes in the gossypol elution process. Temperatures above 40°C resulted in a decrease in the peak resolution when compared to elution at 35°C. The employment of 100% methanol (MeOH) (Fig 3C) as eluting solvent resulted in an optimal peak shape when compared with 100% acetonitrile (ACN) (Fig 3A) and a mixture of 50% MeOH and 50% ACN (Fig 3B).

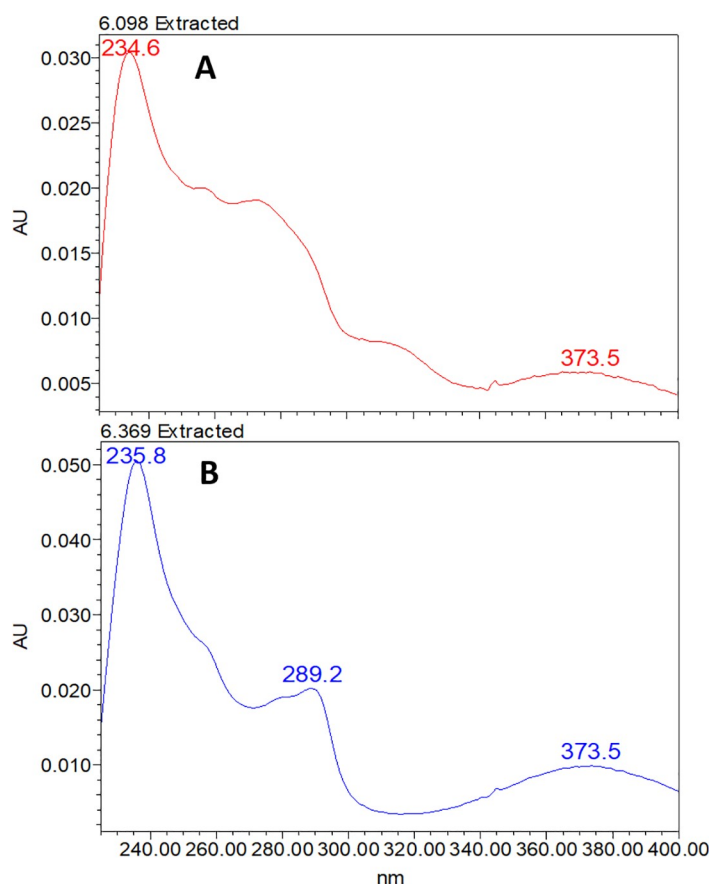
## VALIDATION

An optimal sensitivity and peak shape was obtained when performing gradient elution with methanol and 0.1% aqueous TFA as mobile phase, and a KINETEX<sup>1</sup> reversed phase C18 column at 35°C. The retention time for the molecule was observed at 6.3 min (Fig 4).

The RP-UPLC-PDA method showed good linearity in the range of 0.5  $\mu$ g/mL to 100  $\mu$ g/mL with  $R^2 > 0.999$ . Detection and quantitation limits were 0.2  $\mu$ g/mL and 0.5  $\mu$ g/mL, respectively. At low, medium and high levels, recovery was greater than 94%, with good precision (RSD < 10%, n = 6).

Specificity and identity confirmation of the optimized method were assessed by observing the retention time and spectrum of the peak of gossypol standard (40  $\mu$ g/mL) (Fig 5A),





**Fig 2. Spectrum extracted from peaks observed in Fig 1B.** The spectrum was extracted from the respective retention times of the peaks observed in Fig 1B. (A) Spectrum from peak 1 (6.098 min); (B) spectrum from peak 2 (6.369 min).

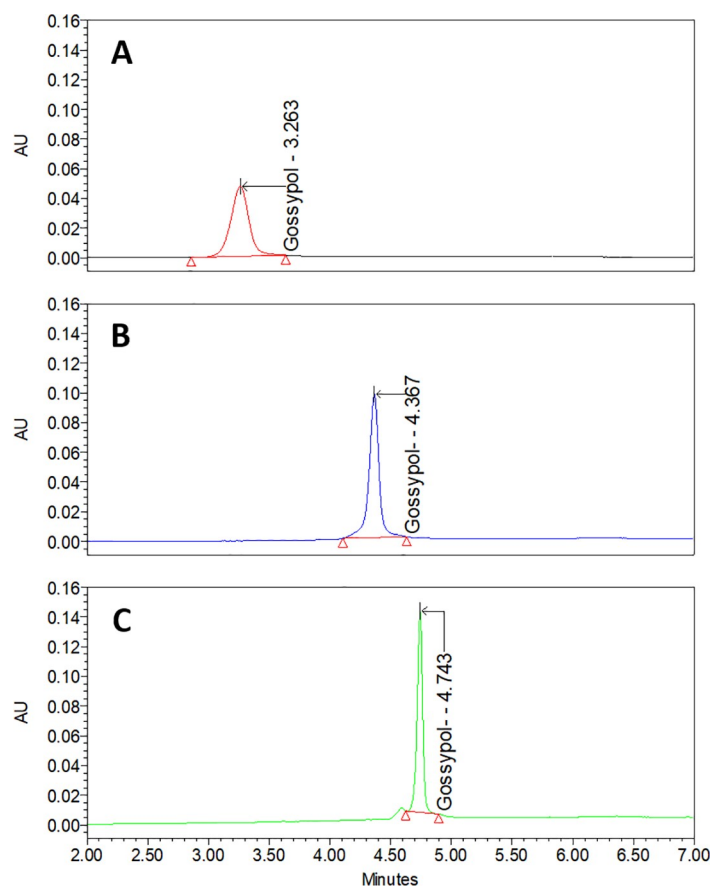
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164.g002>

cottonseed sample spiked with standard gossypol (Fig 5B), and cottonseed extract (Fig 5C). Visual data prove that the method is specific to analyse free gossypol in cottonseed samples.

Linearity was evaluated by injection of eight concentrations of gossypol standard, in the range of 0.5  $\mu\text{g/mL}$  to 100  $\mu\text{g/mL}$ . Regression lines were constructed, and plots were visually and statistically evaluated. The proposed RP-UPLC-PDA method showed good linearity with  $R^2 > 0.999$ . Residuals were randomly distributed around the fit line, indicating data was well adjusted to the regression model. LoD is defined as lowest amount of analyte in a sample which can be detected, with LoQ the lowest amount of analyte in a sample which can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy [65]. A limit of detection was observed at 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , with a limit of quantitation at 0.5  $\mu\text{g/mL}$ .

The precision validation parameter employed was the closeness of agreement between a series of measurements obtained from multiple sampling of the same homogeneous sample under the prescribed conditions [65]. The method was repeatable for determination of free gossypol in cottonseed samples, with RSD  $< 10\%$  for each of replicate determination series. ANOVA-based analysis indicated that gossypol amounts in samples were found to be statistically equivalent in the three determination series.

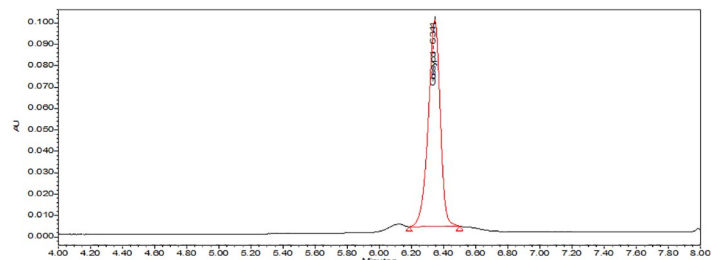
Accuracy of a measurement result refers to the closeness of agreement between the measured value and the true value [66]. The spike recovery method is one of the most common



**Fig 3. UHPLC chromatograms of standard gossypol generated following comparison of different elution organic phases.** (Gradient elutions with organic phases composed of (A) 100% acetonitrile (ACN), (B) 50% ACN/50% methanol (MeOH), and (C) 100% MeOH.

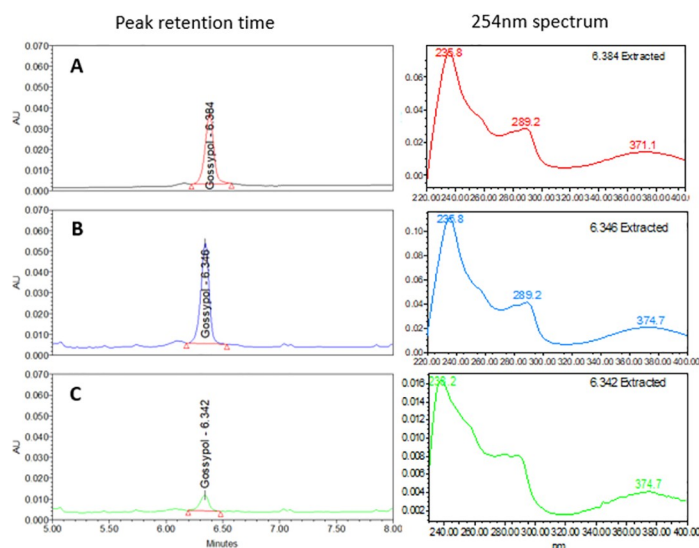
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164.g003>

technique for determining accuracy parameters during analysis of natural products. The accuracy of the UHPLC method was determined by a recovery study. The percent recovery determined fell within the range of 94 to 112%. Recovery values of 109%, 112% and 94% were observed for low, medium and high concentrations, respectively.



**Fig 4. UHPLC chromatogram of cottonseed sample spiked with standard gossypol (50 µg/mL).** A retention time of min was observed for the gossypol peak. Gossypol was analyzed on a KINETEX<sup>1</sup> C18 column using a gradient elution with solvent consisting of 0.1% TFA in methanol-water. Absorbance was measured at 254 nm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164.g004>



**Fig 5. UHPLC chromatograms and respective spectra at 254 nm of gossypol from standard solution and cottonseed sample extracts.** (A) Standard gossypol at 40 $\mu$ g/mL and its spectrum extracted at 6.384 min; (B) cottonseed sample spiked with standard gossypol (40 $\mu$ g/mL) and spectrum at 6.346 min; (C) cottonseed sample extract and spectrum at 6.342 min.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164.g005>

## SAMPLE ANALYSIS

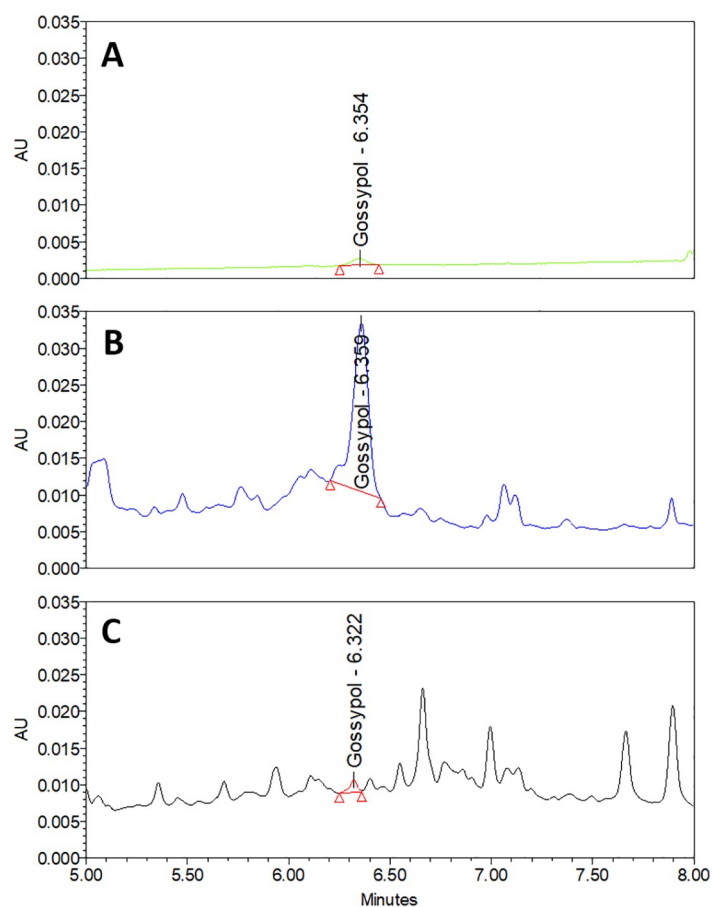
The strain of the *Pleurotus sp.* fully colonized the autoclaved CS and CSC samples over the 30-day incubation period, confirming its ability to grow on cottonseed substrates in accord with previous observations [67,68]. The optimized extraction and quantification method developed for FG was able to efficiently detect residual traces of FG in both FCS and FCSC.

Although additional peaks appeared following fungal fermentation of CSC, which could potentially interfere in the detection and quantification of FG, the method employed for integration of peaks was able to identify gossypol at the correct retention time, without obstruction by any other peak (Fig 6). This identification was also confirmed on the basis of the UV spectrum of the peak. No deviation of the retention time was noted for gossypol when eluted from different sample materials, with a constant period observed from standard gossypol (Fig 6A), non-fermented samples (Fig 6B) and fermented samples (Fig 6C).

The significant reduction in FG in the autoclaved substrates subjected to fermentation is indicative of the efficiency of the biological detoxification of gossypol by macrofungal species such as *Pleurotus*. The percentage of free gossypol remaining in these fermented sample, when compared to values in the original (non-treated) samples were 0.6% and 6.1% for FCS and FCSC, respectively. In contrast, cottonseed samples subjected only to autoclaving, maintained relatively high FG values, at 48% for CS and 23.75% for CSC. Based on the results summarized in Table 2, the method for FG extraction and quantification was appropriate for detection of FG not only in non-treated and autoclaved CS and CSC, but also in the autoclaved then fermented substrates FCS and FCSC, revealing the suitability of the method for FG detection at trace levels.

## DISCUSSION

The typically high concentrations of FG observed in CSC after cotton oil extraction are a limiting factor in the application of cotton biomass as feed for livestock [11, 69]. This applies not only to non-ruminants such as pigs, birds, fish, and rodents, but also to ruminants such as



**Fig 6. UHPLC chromatogram for standard gossypol and free gossypol (FG) extracts from CSC and FCSC.** (A) Standard gossypol (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (peak area = 4365); (B) FG from CSC extraction. (peak area = 141266); (C) FG from FCSC extraction (peak area = 4830). Gradient elution conditions were equal for all samples, with extraction conditions identical for CSC and FCSC samples.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164.g006>

sheep and goats [7,70]. As each animal species will vary in its' tolerance to FG [69], and as concentrations in cottonseed cake differ according to cotton plant variety and oil extraction method employed [7,53], efficient detoxification methods are required to guarantee elimination of the toxic compound for safe application of CSC as feed for different livestock species. In this context, accurate and sensitive quantitation methods for FG in such biomass materials are essential [71].

**Table 2. Free gossypol concentrations detected in different samples.**

Samples	Free gossypol (mg/kg)
CS	4886.84 $\pm$ 6.85
Autoclaved CS	2345.50 $\pm$ 14.76
FCS	15.26 $\pm$ 2.23
CSC	56.88 $\pm$ 2.98
Autoclaved CSC	13.51 $\pm$ 0.57
FCSC	0.847 $\pm$ 0.078

CS (cottonseed); FCS (Fermented Cottonseed); CSC (Cottonseed cake (Fermented Cottonseed)); CSC (Cottonseed cake); FCSC (Fermented Cottonseed cake).

Whilst chemical and physical approaches can be employed for detoxification of CSC, there are disadvantages in such methods, with further processing required to eliminate chemical residues and loss of biomass protein content common [57,72]. Such problems can be avoided, however, through

biological treatments for CSC detoxification. Considerable promise lies in the application of filamentous fungi, with basidiomycete white rot fungi effectively employed in CSC detoxification [31,33,34]. Given the need for a highly sensitive, rapid and specific technique to analyze FG in FCSC, an optimized UHPLC method was developed in this study, suitable for efficient and rapid extraction and trace level quantification of FG in cottonseed cake following detoxification by fungi.

The method developed here for FG guarantees the preservation of this unstable molecule throughout the extraction and UHPLC detection procedure. In comparison with previously published liquid chromatographic methods for detection of gossypol, as summarized in Table 3, this RP-UHPLC-PDA method provides a lower limit of detection and quantification for analysis of cotton samples. The chromatogram generated by UHPLC, which requires a shorter run time and offers enhanced sensitivity [73], showed very narrow well-defined peaks, allowing quantification and detection limits of 0.5 and 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. When compared to Cai et al. [41] for example, who reported a minimum detection limit of 3  $\mu\text{g/mL}$  for gossypol, the present method demonstrated an improved performance for free gossypol analysis.

Previous studies have reported that the stability of gossypol can be affected by the extraction solvent employed [40,41]. Here, 70% acetone was used successfully for efficient extraction. At this concentration, solubility of free gossypol is known to be high [41], with the compound also remaining stable [58]. When testing 100% acetone to extract spiked gossypol on CSC

**Table 3. Comparison of different liquid chromatographic methods for analysis of free gossypol.**

Cotton material	Extraction solvent	Equipment/ Column	Elution time(min)	Detector/ absorbance(nm)	Injection volume ( $\mu\text{L}$ )	LoD/LoQ <sup>m</sup> (linear range)	Reference
Seed, Cottonseed cake and Fungi fermented cottonseed meal	70% acetone	UHPLC/ KINETEX <sup>1</sup> C18 (100 x 2.1 mm, 2.6 $\mu\text{m}$ )	14	PDA/254	2	0.4/1ng (1-200ng)	Present method
Seed, leaves, and flower buds	Ethanol-water-ether-acetic acid (59:24:17:0.2)	HPLC/ Scientific Glass Engineering LC-18 (4.6 mm X 25 cm, 5 $\mu\text{m}$ )	NA	PDA/272	20	NA/25ng(25 - 6000ng)	[74]
Seed, stems and roots	95% ethanol-deionized water-diethyl ether-glacial acetic acid	HPLC/ C18 Cartridge	NA	UV/254	50	NA/5ng (5-2000ng)	[58]
Seed	95% ethanol-distilled water-diethyl ether-glacial acetic acid.	HPLC/ $\mu$ Bondapak C18 (30 cm x 3.9 mm)	30	UV/254	25	NA/10ng (10-10000ng)	[39]
Cotton materials (seed)	Acetone	HPLC/ Hewlett-Packard Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	13.5	UV/254	5	NA/15ng (15-300ng)	[42]
Seeds	70% Acetone	HPLC/ Waters NOVA-PAK C18 (3.9 mm X 15 cm, 4 $\mu\text{m}$ )	10	UV/254	50	NA/50ng (50-5000ng)	[60]
Seeds	80% acetonitrile-0.1% phosphoric acid	HPLC/Waters Novapak C18 (150 mm x 3.9 mm, 4 $\mu\text{m}$ )	30	UV/272 and 254	20	140ng/NA (NA)	[75]
Stem, root, seed or seed cake	Acetone	HPLC/ Lichrosorb-C18 (250 x 4.0 mm, 10 $\mu\text{m}$ )	NA	UV/254	4	NA/100ng (100-800ng)	[41]

NA: data not available;

<sup>m</sup>original values were transformed to ng after calculation based on injection volume.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164.t003>

(Fig 1B), by contrast, the presence of an extra peak on the chromatogram indicated the likely conversion

of gossypol to another organic group. Such an extra peak has also been reported in experiments related to photodecomposition [76]. This extra peak is likely to be similar in structure to that of the gossypol molecule, since a correlated spectrum can be observed (Fig 2). Previous attempts employing acetonitrile as solvent resulted in less efficient extraction of FG, with this compound unstable in several solvents, including acetonitrile, when maintained at 37 °C or at room temperature [58]. As gossypol has been widely reported to be unstable in alcohols [38, 39, 56], this class of solvent was not tested in the current study for FG extraction.

Elevated temperatures are also known to cause degradation of gossypol [27,58]. In order to prevent such degradation during extraction, sonication was performed on ice, with low temperatures employed during centrifugation steps, room temperature conditions used for evaporation via speed vacuum, and low temperatures (8 °C) employed for sample maintenance during UHPLC. A two-step extraction procedure using a final concentration of 70% aqueous acetone (following application of 3 mL water, followed by 7 mL acetone) was demonstrated to be more appropriate for extraction than a one step process (70% aqueous acetone solution). Apparently, sonication in water facilitates rupture of the pigment glands in cotton, allowing FG to be released before solubilisation in acetone [77].

Centrifugation of the sample allowed a separation of the FG dissolved in the acetone solution from the solid CSC mass, in contrast to published assays that employ filtration with filter paper at this step [38,43,78,79]. Centrifugation is more appropriate, as evaporation of the solvent, or sample oxidation are then avoided. Similarly, sample concentration in a speed vacuum at room temperature caused less degradation of FG than when compared to rotary evaporation at 40 °C.

Attempts at extraction using different columns, mobile phases and isocratic elution resulted in a non-satisfactory broad peak. By contrast, the KINETEX<sup>1</sup> RP-C18 column gradient elution with methanol:water (TFA 0.1%) resulted in a sharper peak, with high sensitivity for gossypol detection. Although alcoholic solvents are known to increase the instability of gossypol [58], elution in alcoholic systems using short retention times does not negatively affect accurate gossypol detection [40,41].

Under such conditions, with gradient elution, methanol was successfully employed as mobile phase in this method. The typically observed formation of a broad peak during gossypol elution may be due to the partial ionization of the molecule, which can be reduced by adding 0.1% of phosphoric acid in the elution system [39]. In this study, 0.1% TFA, which shows the same efficiency of phosphoric acid, was employed to reduce such ionization. The short elution time required when using the KINETEX<sup>1</sup> column also supports a rapid and economically efficient analysis of large numbers of samples.

## CONCLUSION

The optimized extraction procedure developed was able to efficiently extract FG from cottonseed and its derivatives, maintaining molecule stability. The RP-UHPLC-PDA detection method developed enabled rapid (14 minutes) and sensitive (quantitation limits: 0.2 µg/mL) determination and quantification of low concentration FG from FCSC. This procedure will facilitate accurate analysis of the efficiency of methods for biodetoxification of FG to trace levels using promising microorganisms such as basidiomycete fungi.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Farmotec Company (Buritis, MG-Brazil) for the kind provision of cottonseed and cottonseed cake employed in this work.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

**Conceptualization:** Felix Gonçalves de Siqueira, Robert Neil Gerard Miller, Simone Mendonça.

**Funding acquisition:** Felix Gonçalves de Siqueira, Simone Mendonça.

**Investigation:** Aparecido Almeida Conceição, Clemente Batista Soares Neto, José Antônio de Aquino Ribeiro.

**Methodology:** Aparecido Almeida Conceição, Clemente Batista Soares Neto, José Antônio de Aquino Ribeiro.

**Supervision:** Felix Gonçalves de Siqueira, Simone Mendonça.

**Validation:** Aparecido Almeida Conceição.

**Visualization:** Clemente Batista Soares Neto.

**Writing – original draft:** Aparecido Almeida Conceição, Clemente Batista Soares Neto, José Antônio de Aquino Ribeiro.

**Writing – review & editing:** Felix Gonçalves de Siqueira, Robert Neil Gerard Miller, Simone Mendonça

## REFERENCES

1. Gao W-HW, Long L, Zhu L-F, Xu L, Gao W-HW, Sun L-Q, et al. Proteomic and virus-induced gene silencing (VIGS) Analyses reveal that gossypol, brassinosteroids, and jasmonic acid contribute to the resistance of cotton to *Verticillium dahliae*. *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12: 3690–3703. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031013> PMID: 24019146
2. Du L, Ge F, Zhu S, Parajulee MN. Effect of cotton cultivar on development and reproduction of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) and its predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae). *J Econ Entomol*. 2004; 97: 1278–1283. PMID: 15384338
3. Bottger GT, Sheehan ET, Lukefahr MJ. Relation of Gossypol Content of Cotton Plants to Insect Resistance. *J Econ Entomol*. 1964; 57: 283–285. <https://doi.org/10.1093/jee/57.2.283>
4. Veech JA, McClure MA. Terpenoid aldehydes in cotton roots susceptible and resistant to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J Nematol*. 1977; 9: 225–9. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620247/> PMID: 19305600
5. Xie Y, Liang Y, Mi Y, Liu X, Cai Y. Research on activities of antioxidant enzymes during pigment gland morphogenesis in cotton. *Agric Sci Technol*. 2012; 13: 44–48. Available: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123331041>
6. Moore AT, Rollins ML. New information on the morphology of the gossypol pigment gland of cottonseed. *J Am Oil Chem Soc*. 1961; 38: 156–160. <https://doi.org/10.1007/BF02641241>
7. Gadelha ICN, Fonseca NBS, Oloris SCS, Melo MM, Soto-Blanco B. Gossypol toxicity from cottonseed products. *Sci World J*. 2014; 2014: 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/231635> PMID: 24895646
8. Benedict CR, Liu J, Stipanovic RD. The peroxidative coupling of hemigossypol to (+)- and (-)-gossypol in cottonseed extracts. *Phytochemistry*. 2006; 67: 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.015> PMID: 16403543
9. Liu J, Stipanovic RD, Bell AA, Puckhaber LS, Magill CW. Stereoselective coupling of hemigossypol to form (+)-gossypol in moco cotton is mediated by a dirigent protein. *Phytochemistry*. 2008; 69: 3038–3042. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.06.007> PMID: 18639908
10. Wagner TA, Liu J, Stipanovic RD, Puckhaber LS, Bell AA. Hemigossypol, a constituent in developing glanded cottonseed (*Gossypium hirsutum*). *J Agric Food Chem*. 2012; 60: 2594–2598. <https://doi.org/10.1021/jf2051366> PMID: 22369216
11. Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi J, Dogliotti E, Di Domenico A, et al. Gossypol as undesirable substances in animal feed. *EFSA J*. 2009; 2008: 1–55. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.908>
12. AOCS. Free gossypol, Method Ba 7–58. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Washington, DC; 2009.
13. Cheeke PR. Natural toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants. 2nd ed. Danville: Interstate Publishers; 1998.
14. Briggs HM, Gallup WD, Darlow AE. The nutritive value of cottonseed meal, soybean meal, and peanut meal when used separately and together to supplement the protein of prairie hay in experiments with steers. *J Agric Res*. 1946; 73: 167–176. Available: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19461404979>
15. Lee CG, Moon YS, Yuan JH, Chen AF. Enzyme inactivation and inhibition by gossypol. *Mol Cell Biochem*. 1982; 47: 65–70. <https://doi.org/10.1007/BF00234406> PMID: 7144742
16. Ikeda M. Inhibition kinetics of NAD-linked enzymes by gossypol acetic acid. *Andrologia*. 1990; 22: 409–416. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1990.tb02019.x> PMID: 2073051
17. Kovacic P. Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer. *Curr Med Chem*. 2003; 10: 2711–2718. <https://doi.org/10.2174/0929867033456369> PMID: 14529461
18. Menaul P. XXIX. The Poisonous Substance in Cotton Seed. *Proc Oklahoma Acad Sci*. 1922; 2: 68–70. Available: [http://digital.library.okstate.edu/OAS/oas\\_htm\\_files/v2/index.html](http://digital.library.okstate.edu/OAS/oas_htm_files/v2/index.html)
19. Royer RE, Vander Jagt DL. Gossypol binds to a high-affinity site on human serum albumin. *FEBS Lett*. 1983; 157: 28–30. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)81109-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)81109-0) PMID: 6862017
20. Royer RE, Kibirige M, Tafoya CR, Deck LM, Vander Jagt DL. Binding of Gossypol derivatives to Human Serum Albumin. *J Pharm Sci*. 1988; 77: 237–240. <https://doi.org/10.1002/jps.2600770311> PMID: 3373428
21. Uzal FA, Puschner B, Tahara JM, Nordhausen RW. Gossypol toxicosis in a dog consequent to ingestion of cottonseed bedding. *J Vet Diagnostic Investig*. 2005; 17: 626–629. <https://doi.org/10.1177/104063870501700622> PMID: 16475530
22. Viana PG. Desempenho e avaliação da carcaça de ovinos Santa Inês suplementados com caroço de algodão (*Gossypium ssp.*) e seus co-produtos [Internet]. University of Brasília. 2011. <http://repositorio.unb.br/handle/10482/9451>
23. Cai C, Li E, YE Y, Krogdahl A, Jiang G, Wang Y, et al. Effect of dietary graded levels of cottonseed meal and gossypol on growth performance, body composition and health aspects of allogynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* x *Cyprinus carpio*. *Aquac Nutr*. 2011; 17: 353–360. <https://doi.org/10.1007/s10841-011-9388-8>



[org/10.1111/j.1365-2095.2010.00801.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00801.x)

24. Gaber MM, Elhalfawy MM, Ramadan AM. Utilization of Cottonseed Meal Supplemented with Iron for Detoxification of Gossypol in Nile Tilapia, Broodstock and their Impact on the Hatchability of their Progenies. *J Aquac Res Dev.* 2012; 3: 3–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000151>
25. Wang X, Howell CP, Chen F, Yin J, Jiang Y. Gossypol-A polyphenolic compound from cotton plant. In: Taylor S, editor. *Advances in Food and Nutrition Research.* Elsevier Inc.; 2009. p. 270. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58006-0](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58006-0)
26. Nie C, Zhang W, Ge W, Wang Y, Liu Y, Liu J. Effects of fermented cottonseed meal on the growth performance, apparent digestibility, carcass traits, and meat composition in yellow-feathered broilers. *Turkish J Vet Anim Sci.* 2015; 39: 350–356. <https://doi.org/10.3906/vet-1410-65>
27. Gallup WD. Heat and Moisture as Factors in the Destruction of Gossypol in Cottonseed Products. *Ind Eng Chem.* 1927; 19: 726–728. <https://doi.org/10.1021/ie50210a027>
28. Danke RJ, Tillman AD. Effect of Free Gossypol and Supplemental dietary Iron on Blood Constituents of Rats. *J Nutr.* 1965; 87: 493–498. Available: <http://jn.nutrition.org/content/87/4/493.extract> PMID: 5897732
29. Liu FK, Jou SY, Jung LY. A new method of detoxification of cottonseed by means of mixed solvent extraction. *J Am Oil Chem Soc.* 1981; 58: A93–A96. <https://doi.org/10.1007/BF02672199>
30. Lim SJ, Lee KJ. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00491.x>
31. 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; 7: 690–695. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0690> PMID: 16909468
32. Khalaf MA, Meleigy SA. Reduction of free gossypol levels in cottonseed meal by microbial treatment. *Int J Agric Biol.* 2008; 10: 185–190. Available: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083140752>
33. Yang X, Guo J, Sun J. Biodegradation of free-gossypol by a new fungus isolated from cotton planted soil. *African J Microbiol Res.* 2011; 5: 3066–3072.
34. Rajarathnam S, Shashirekha MN, 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; 17: 221–227. <https://doi.org/10.1023/A:1016603510901>
35. Fackler K, Gradinger C, Hinterstoisser B, Messner K, Schwanninger M. Lignin degradation by white rot fungi on spruce wood shavings during short-time solid-state fermentations monitored by near infrared spectroscopy. *Enzyme Microb Technol.* 2006; 39: 1476–1483. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.043>
36. Jayasinghe C, Imtiaj A, Lee GW, Im KH, Hur H, Lee MW, et al. Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes. *Mycobiology.* 2008; 36: 114–20. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2008.36.2.114> PMID: 23990745
37. Reddy CA. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr Opin Biotechnol.* 1995; 6: 320–328. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80054-9](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80054-9)
38. Knutsen HK, Barregård L, Bignami M, Brüscheweiler B, Ceccatelli S, Dinovi M, et al. Presence of free gossypol in whole cottonseed. *EFSA J.* 2017; 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4850>
39. Abou-donia SA, Lasker JM, Abou-Donia MB. High-performance liquid chromatographic analysis of gossypol. *J Chromatogr A.* 1981; 206: 606–610. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88933-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88933-5)
40. Benson CG, Grant Wyllie S, Leach DN, Mares CL, Fitt GP. Improved method for the rapid determination of terpenoid aldehydes in cotton. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 2181–2184. <https://doi.org/10.1021/jf0010836> PMID: 11368574
41. Wang M. Analysis of Gossypol By High Performance Chromatography. *J Ethnopharmacol.* 1987; 20: 1–11. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90112-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90112-7) PMID: 3626590
42. Cai Y, Zhang H, Zeng Y, Mo J, Bao J, Miao C, et al. An optimized gossypol high-performance liquid chromatography assay and its application in evaluation of different gland genotypes of cotton. *J Biosci.* 2004; 29: 67–71. <https://doi.org/10.1007/BF02702563> PMID: 15286405
43. Botsoglou NA. Determination of “Free” Gossypol in Cottonseed and Cottonseed Meals by second-derivative ultraviolet spectrophotometry. *J Agric Food Chem.* 1991; 39: 478–482. <https://doi.org/10.1021/jf00003a010>
44. Halverson JO, Smith FH. Extraction of Gossypol from Cottonseed Meal. *Ind Eng Chem.* 1934; 6: 356–357. <https://doi.org/10.1021/ac50091a025>
45. Admasu a, Chandravanshi BS. Spectrophotometric determination of total gossypol in cottonseeds and cottonseed meals. *Anal Chem.* 1984; 56: 30–32. <https://doi.org/10.1021/ac00265a010> PMID: 6546479
46. Chamkasem N. Gossypol analysis in cottonseed oil by HPLC. *J Am Oil Chem Soc.* 1988; 65: 1601–1604. <https://doi.org/10.1007/BF02912562>
47. Lee KJ, Dabrowski K. High-performance liquid chromatographic determination of gossypol and gossypolone enantiomers in fish tissues using simultaneous electrochemical and ultraviolet detectors. *J Chromatogr B.* 2004; 812: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.05.010>

- matogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2002; 779: 313–319. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00402-6](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00402-6)
48. Botsoglou NA. Short Communication High-performance liquid chromatographic method for the determination of free gossypol in chicken liver. *J Chromatogr.* 1991; 587: 333–337. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)85179-J](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)85179-J) PMID: 1783672
  49. Lin H, Gounder MK, Bertino JR, Kong A-NT, DiPaola RS, Stein MN. A validated HPLC assay for the determination of R-(-)-gossypol in human plasma and its application in clinical pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 66: 371–375. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.029> PMID: 22483642
  50. Pons WA, Mitcham D, O'Connor RT, Stansbury MF. Improved method for determining gossypol in crude cottonseed oils. *J Am Oil Chem Soc.* 1956; 33: 324–330. <https://doi.org/10.1007/BF02639344>
  51. Lyman CM, Holland BR, Hale F. Determination of free gossypol in cottonseed meal—A colorimetric method. *Ind Eng Chem Ed.* 1943; 15: 489–491. <https://doi.org/10.1021/I560120a005>
  52. Carruth FE. Contribution To the Chemistry of Gossypol, the Toxic Principle of Cottonseed. *J Am Chem Soc.* 1918; 40: 647–663. <https://doi.org/10.1021/ja02237a008>
  53. Karishma R, Lakshmi US, Suneetha P, Chinna VBN, Krishna MSR. Determination of Total Gossypol and Free Gossypol Content in different varieties of Bt and Non Bt Cotton seed extracts by High- Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Res J Biotechnol.* 2016; 11: 70–74. Available: <https://www.researchgate.net/publication/291748079>
  54. Chandrashekar R, Kudle KR, Chaitanya PJ, Bhavani NL. Gossypol Analysis in Bt and Non-Bt Cotton Seed Extracts by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Int J Herb Med.* 2013; 1: 53–58. Available: <http://www.florajournal.com/vol1issue2/15.1.html>
  55. Sun Z-T, Liu C, Du J-H. Optimisation of fermentation medium for the detoxification of free gossypol in cottonseed powder by *Geotrichum candidum* G07 in solid-state fermentation with response surface methodology. *Ann Microbiol.* 2008; 58: 683–690. <https://doi.org/10.1007/BF03175575>
  56. Zhang WJ, Xu ZR, Zhao SH, Sun JY, Yang X. Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal. *Anim Feed Sci Technol.* 2007; 135: 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.003>
  57. Yu F, McNabb WC, N Barry T, Moughan PJ. Effect of heat treatment upon the chemical composition of cottonseed-meal and upon the reactivity of cottonseed condensed tannins. *J Sci Food Agric.* 1996; 72: 263–272.
  58. Nomeir AA, Abou-Donia MB. Gossypol: High-Performance Liquid Chromatographic Analysis and Stability in Various Solvents. *J Am Oil Chem Soc.* 1982; 59: 546–549. <https://doi.org/10.1007/BF02636320>
  59. Smith FH. Estimation of Free Gossypol in Cottonseed Meal and Cottonseed Meats: Modified Method. *J Am Oil Chem Soc.* 1968; 45: 903. <https://doi.org/10.1007/BF02540182>
  60. Hron RJ, Kuk MS, Abraham G. Determination of Free and Total Gossypol by High Performance Liquid Chromatography. *J Am Oil Chem Soc.* 1990; 67: 182–187. <https://doi.org/10.1007/BF02539622>
  61. AOCS. Determination of (+)-, (-)-, and total gossypol in cottonseed, cottonseed meats, and meal by HPLC, recommended practice Ba 8a-99. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS.* Washington, DC; 1999. pp. 1–4.
  62. Coutinho EM, Athayde C, Atta G, Gu ZP, Chen ZW, Sang GW, et al. Gossypol blood levels and inhibition of spermatogenesis in men taking gossypol as a contraceptive. *Contraception.* 2000; 61: 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(99\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(99)00117-1) PMID: 10745071
  63. Santos JEP, Mena H, Huber JT, Tarazon M. Effects of source of gossypol and supplemental iron on plasma gossypol in Holstein steers. *J Dairy Sci. Elsevier;* 2005; 88: 3563–74. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73041-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73041-1)
  64. Wang JM, Tao L, Wu XL, Lin LX, Wu J, Wang M, et al. Differential binding of (+) and (-) gossypol to plasma protein and their entry into rat testis. *J Reprod Fertil.* 1992; 95: 277–282. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950277> PMID: 1625243
  65. ICH. International conference of harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.* 2005. p. 17. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
  66. Krueve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. *Anal Chim Acta. Elsevier B.V.;* 2015; 870: 8–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016> PMID: 25819784
  67. Girmay Z, Gorems W, Birhanu G, Zewdie S. Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates. *AMB Express.* Springer Berlin Heidelberg; 2016; 6: 87. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0265-1> PMID: 27704469
  68. Ahmad W, Iqbal J, Salim M, Ahmad I, Sarwar MA, Shehzad MA, et al. Performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on cotton waste amended with maize and banana leaves. *Pakistan J Nutr.* 2011; 10: 509–513. Available: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012064226>
  69. Morgan SE. Gossypol as a toxicant in livestock. *Vet Clin North Am Food Anim Pract. Elsevier Masson SAS;* 1989; 5: 251–262. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30975-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30975-0)
  70. Câmara ACL, Gadelha ICN, Borges PAC, De Paiva SA, Melo MM, Soto-Blanco B. Toxicity of gossypol

- from cottonseed cake to sheep ovarian follicles. *PLoS One*. 2015; 10: 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143708> PMID: 26600470
71. Kaya S, Ustaoglu A. Nutrient Contents and Gossypol Levels of Cotton Seed Meal Produced in Hatay Region of Turkey. *Asian J Chem*. 2009; 21: 1897–1902. Available: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093256379>
  72. Mohamed SS. Effect of some degossypolisation treatments of cottonseed meal on its functional properties. *Grasas y Aceites*. 1993; 44: 279–283. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i4-5.1080>
  73. Taleuzzaman M, Ali S, Gilani S, Imam, Hafeez A. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)—A Review. *Austin J Anal Pharm Chem*. 2015; 2: 1056–6. Available: <http://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v2-id1056.php>
  74. Stipanovic RD, Altman DW, Begin DL, Greenblatt GA, Benedict JH. Terpenoid aldehydes in upland cottons: analysis by aniline and HPLC methods. *J Agric Food Chem*. 1988; 36: 509–515. <https://doi.org/10.1021/jf00081a026>
  75. Brubaker CL, Benson CG, Miller C, Leach DN. Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the “glandless” seeds of Australian *Gossypium* species. *Aust J Bot*. 1996; 44: 601–612. <https://doi.org/10.1071/BT9960601>
  76. Nomeir AA, Abou-Donia MB. Photodecomposition of gossypol by ultraviolet irradiation. *J Am Oil Chem Soc*. 1985; 62: 87–89 <https://doi.org/10.1007/BF02541497>
  77. Cheeke PR. *Natural toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*. 2nd ed. Danville: Interstate Publishers; 1998.
  78. Briggs HM, Gallup WD, Darlow AE. The nutritive value of cottonseed meal, soybean meal, and peanut meal when used separately ad together to supplement the protein of prairie hay in experiments with steers. *J Agric Res*. 1946; 73: 167–176. Available: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19461404979>
  79. Lee CG, Moon YS, Yuan JH, Chen AF. Enzyme inactivation and inhibition by gossypol. *Mol Cell Biochem*. 1982; 47: 65–70. <https://doi.org/10.1007/BF00234406> PMID: 7144742
  80. Ikeda M. Inhibition kinetics of NAD-linked enzymes by gossypol acetic acid. *Andrologia*. 1990; 22: 409–416. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1990.tb02019.x> PMID: 2073051
  81. Kovacic P. Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer. *Curr Med Chem*. 2003; 10: 2711–2718. <https://doi.org/10.2174/0929867033456369> PMID: 14529461
  82. Menaul P. XXIX. The Poisonous Substance in Cotton Seed. *Proc Oklahoma Acad Sci*. 1922; 2: 68–70. Available: [http://digital.library.okstate.edu/OAS/oas\\_htm\\_files/v2/index.html](http://digital.library.okstate.edu/OAS/oas_htm_files/v2/index.html)
  83. Royer RE, Vander Jagt DL. Gossypol binds to a high-affinity site on human serum albumin. *FEBS Lett*. 1983; 157: 28–30. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)81109-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)81109-0) PMID: 6862017
  84. Royer RE, Kibirige M, Tafoya CR, Deck LM, Vander Jagt DL. Binding of Gossypol derivatives to Human Serum Albumin. *J Pharm Sci*. 1988; 77: 237–240. <https://doi.org/10.1002/jps.2600770311> PMID: 3373428
  85. Uzal FA, Puschner B, Tahara JM, Nordhausen RW. Gossypol toxicosis in a dog consequent to ingestion of cottonseed bedding. *J Vet Diagnostic Investig*. 2005; 17: 626–629. <https://doi.org/10.1177/104063870501700622> PMID: 16475530
  86. Viana PG. Desempenho e avaliação da carcaça de ovinos Santa Inês suplementados com caroço de algodão (*Gossypium* ssp.) e seus co-produtos [Internet]. University of Brasília. 2011. <http://repositorio.unb.br/handle/10482/9451>
  87. Cai C, Li E, YE Y, Krogdahl A, Jiang G, Wang Y, et al. Effect of dietary graded levels of cottonseed meal and gossypol on growth performance, body composition and health aspects of allogynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* x *Cyprinus carpio*. *Aquac Nutr*. 2011; 17: 353–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00801.x>
  88. Gaber MM, Elhalfawy MM, Ramadan AM. Utilization of Cottonseed Meal Supplemented with Iron for Detoxification of Gossypol in Nile Tilapia, Broodstock and their Impact on the Hatchability of their Progenies. *J Aquac Res Dev*. 2012; 3: 3–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000151>
  89. Wang X, Howell CP, Chen F, Yin J, Jiang Y. Gossypol-A polyphenolic compound from cotton plant. In: Taylor S, editor. *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Inc.; 2009. p. 270. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58006-0](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58006-0)
  90. Nie C, Zhang W, Ge W, Wang Y, Liu Y, Liu J. Effects of fermented cottonseed meal on the growth performance, apparent digestibility, carcass traits, and meat composition in yellow-feathered broilers. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2015; 39: 350–356. <https://doi.org/10.3906/vet-1410-65>
  91. Gallup WD. Heat and Moisture as Factors in the Destruction of Gossypol in Cottonseed Products. *Ind Eng Chem*. 1927; 19: 726–728. <https://doi.org/10.1021/ie50210a027>
  92. Danke RJ, Tillman AD. Effect of Free Gossypol and Supplemental dietary Iron on Blood Constituents of Rats. *J Nutr*. 1965; 87: 493–498. Available: <http://jn.nutrition.org/content/87/4/493.extract> PMID: 5897732
  93. Liu FK, Jou SY, Jung LY. A new method of detoxification of cottonseed by means of mixed solvent extraction. *J Am Oil Chem Soc*. 1981; 58: A93–A96. <https://doi.org/10.1007/BF02672199>

94. Lim SJ, Lee KJ. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00491.x>
95. 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; 7: 690–695. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0690> PMID: 16909468
96. Khalaf MA, Meleigy SA. Reduction of free gossypol levels in cottonseed meal by microbial treatment. *Int J Agric Biol*. 2008; 10: 185–190. Available: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083140752>
97. Yang X, Guo J, Sun J. Biodegradation of free-gossypol by a new fungus isolated from cotton planted soil. *African J Microbiol Res*. 2011; 5: 3066–3072.
98. Rajarathnam S, Shashirekha MN, 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; 17: 221–227. <https://doi.org/10.1023/A:1016603510901>
99. Fackler K, Gradinger C, Hinterstoisser B, Messner K, Schwanninger M. Lignin degradation by white rot fungi on spruce wood shavings during short-time solid-state fermentations monitored by near infrared spectroscopy. *Enzyme Microb Technol*. 2006; 39: 1476–1483. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.043>
100. Jayasinghe C, Imtiaj A, Lee GW, Im KH, Hur H, Lee MW, et al. Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes. *Mycobiology*. 2008; 36: 114–20. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2008.36.2.114> PMID: 23990745
101. Reddy CA. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr Opin Biotechnol*. 1995; 6: 320–328. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80054-9](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80054-9)
102. Knutsen HK, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, Dinovi M, et al. Presence of free gossypol in whole cottonseed. *EFSA J*. 2017; 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4850>
103. Abou-donia SA, Lasker JM, Abou-Donia MB. High-performance liquid chromatographic analysis of gossypol. *J Chromatogr A*. 1981; 206: 606–610. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88933-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88933-5)
104. Benson CG, Grant Wyllie S, Leach DN, Mares CL, Fitt GP. Improved method for the rapid determination of terpenoid aldehydes in cotton. *J Agric Food Chem*. 2001; 49: 2181–2184. <https://doi.org/10.1021/jf0010836> PMID: 11368574
105. Wang M. Analysis of Gossypol By High Performance Chromatography. *J Ethnopharmacol*. 1987; 20: 1–11. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90112-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90112-7) PMID: 3626590
106. Cai Y, Zhang H, Zeng Y, Mo J, Bao J, Miao C, et al. An optimized gossypol high-performance liquid chromatography assay and its application in evaluation of different gland genotypes of cotton. *J Biosci*. 2004; 29: 67–71. <https://doi.org/10.1007/BF02702563> PMID: 15286405
107. Botsoglou NA. Determination of “Free” Gossypol in Cottonseed and Cottonseed Meals by second-derivative ultraviolet spectrophotometry. *J Agric Food Chem*. 1991; 39: 478–482. <https://doi.org/10.1021/jf00003a010>
108. Halverson JO, Smith FH. Extraction of Gossypol from Cottonseed Meal. *Ind Eng Chem*. 1934; 6: 356–357. <https://doi.org/10.1021/ac50091a025>
109. Admasu a, Chandravanshi BS. Spectrophotometric determination of total gossypol in cottonseeds and cottonseed meals. *Anal Chem*. 1984; 56: 30–32. <https://doi.org/10.1021/ac00265a010> PMID: 6546479
110. Chamkasem N. Gossypol analysis in cottonseed oil by HPLC. *J Am Oil Chem Soc*. 1988; 65: 1601–1604. <https://doi.org/10.1007/BF02912562>
111. Lee KJ, Dabrowski K. High-performance liquid chromatographic determination of gossypol and gossypolone enantiomers in fish tissues using simultaneous electrochemical and ultraviolet detectors. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2002; 779: 313–319. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00402-6](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00402-6)
112. Botsoglou NA. Short Communication High-performance liquid chromatographic method for the determination of free gossypol in chicken liver. *J Chromatogr*. 1991; 587: 333–337. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)85179-J](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)85179-J) PMID: 1783672
113. Lin H, Gounder MK, Bertino JR, Kong A-NT, DiPaola RS, Stein MN. A validated HPLC assay for the determination of R-(-)-gossypol in human plasma and its application in clinical pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2012; 66: 371–375. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.029> PMID: 22483642
114. Pons WA, Mitcham D, O'Connor RT, Stansbury MF. Improved method for determining gossypol in crude cottonseed oils. *J Am Oil Chem Soc*. 1956; 33: 324–330. <https://doi.org/10.1007/BF02639344>
115. Lyman CM, Holland BR, Hale F. Determination of free gossypol in cottonseed meal—A colorimetric method. *Ind Eng Chem Ed*. 1943; 15: 489–491. <https://doi.org/10.1021/I560120a005>
116. Carruth FE. Contribution To the Chemistry of Gossypol, the Toxic Principle of Cottonseed. *J Am Chem Soc*. 1918; 40: 647–663. <https://doi.org/10.1021/ja02237a008>
117. Karishma R, Lakshmi US, Suneetha P, Chinna VBN, Krishna MSR. Determination of Total Gossypol and Free Gossypol Content in different varieties of Bt and Non Bt Cotton seed extracts by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Res J Biotechnol*. 2016; 11: 70–74. Available: <https://www.researchgate.net/publication/291748079>

118. Chandrashekar R, Kudle KR, Chaitanya PJ, Bhavani NL. Gossypol Analysis in Bt and Non-Bt Cotton Seed Extracts by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Int J Herb Med*. 2013; 1: 53–58. Available: <http://www.florajournal.com/vol1issue2/15.1.html>
119. Sun Z-T, Liu C, Du J-H. Optimisation of fermentation medium for the detoxification of free gossypol in cottonseed powder by *Geotrichum candidum* G07 in solid-state fermentation with response surface methodology. *Ann Microbiol*. 2008; 58: 683–690. <https://doi.org/10.1007/BF03175575>
120. Zhang WJ, Xu ZR, Zhao SH, Sun JY, Yang X. Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal. *Anim Feed Sci Technol*. 2007; 135: 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.003>
121. Yu F, McNabb WC, Nbarry T, Moughan PJ. Effect of heat treatment upon the chemical composition of cottonseed-meal and upon the reactivity of cottonseed condensed tannins. *J Sci Food Agric*. 1996; 72: 263–272.
122. Nomeir AA, Abou-Donia MB. Gossypol: High-Performance Liquid Chromatographic Analysis and Stability in Various Solvents. *J Am Oil Chem Soc*. 1982; 59: 546–549. <https://doi.org/10.1007/BF02636320>
123. Smith FH. Estimation of Free Gossypol in Cottonseed Meal and Cottonseed Meats: Modified Method. *J Am Oil Chem Soc*. 1968; 45: 903. <https://doi.org/10.1007/BF02540182>
124. Hron RJ, Kuk MS, Abraham G. Determination of Free and Total Gossypol by High Performance Liquid Chromatography. *J Am Oil Chem Soc*. 1990; 67: 182–187. <https://doi.org/10.1007/BF02539622>
125. AOCS. Determination of (+)-, (-)-, and total gossypol in cottonseed, cottonseed meats, and meal by HPLC, recommended practice Ba 8a-99. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*. Washington, DC; 1999. pp. 1–4.
126. Coutinho EM, Athayde C, Atta G, Gu ZP, Chen ZW, Sang GW, et al. Gossypol blood levels and inhibition of spermatogenesis in men taking gossypol as a contraceptive. *Contraception*. 2000; 61: 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(99\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(99)00117-1) PMID: 10745071
127. Santos JEP, Mena H, Huber JT, Tarazon M. Effects of source of gossypol and supplemental iron on plasma gossypol in Holstein steers. *J Dairy Sci*. Elsevier; 2005; 88: 3563–74. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73041-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73041-1)
128. Wang JM, Tao L, Wu XL, Lin LX, Wu J, Wang M, et al. Differential binding of (+) and (-) gossypol to plasma protein and their entry into rat testis. *J Reprod Fertil*. 1992; 95: 277–282. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950277> PMID: 1625243
129. ICH. International conference of harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. 2005. p. 17. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
130. Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. *Anal Chim Acta*. Elsevier B.V.; 2015; 870: 8–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016> PMID: 25819784
131. Girmay Z, Gorems W, Birhanu G, Zewdie S. Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates. *AMB Express*. Springer Berlin Heidelberg; 2016; 6: 87. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0265-1> PMID: 27704469
132. Ahmad W, Iqbal J, Salim M, Ahmad I, Sarwar MA, Shehzad MA, et al. Performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on cotton waste amended with maize and banana leaves. *Pakistan J Nutr*. 2011; 10: 509–513. Available: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012064226>
133. Morgan SE. Gossypol as a toxicant in livestock. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. Elsevier Masson SAS; 1989; 5: 251–262. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30975-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30975-0)
134. Câmara ACL, Gadelha ICN, Borges PAC, De Paiva SA, Melo MM, Soto-Blanco B. Toxicity of gossypol from cottonseed cake to sheep ovarian follicles. *PLoS One*. 2015; 10: 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143708> PMID: 26600470
135. Kaya S, Ustaoglu A. Nutrient Contents and Gossypol Levels of Cotton Seed Meal Produced in Hatay Region of Turkey. *Asian J Chem*. 2009; 21: 1897–1902. Available: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093256379>
136. Mohamed SS. Effect of some degossypolisation treatments of cottonseed meal on its functional properties. *Grasas y Aceites*. 1993; 44: 279–283. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i4-5.1080>
137. Taleuzzaman M, Ali S, Gilani S, Imam, Hafeez A. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)—A Review. *Austin J Anal Pharm Chem*. 2015; 2: 1056–6. Available: <http://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v2-id1056.php>
138. Stipanovic RD, Altman DW, Begin DL, Greenblatt GA, Benedict JH. Terpenoid aldehydes in upland cottons: analysis by aniline and HPLC methods. *J Agric Food Chem*. 1988; 36: 509–515. <https://doi.org/10.1021/jf00081a026>
139. Brubaker CL, Benson CG, Miller C, Leach DN. Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the “glandless” seeds of Australian *Gossypium* species. *Aust J Bot*. 1996; 44: 601–612. <https://doi.org/10.1071/BT9960601>
140. Nomeir AA, Abou-Donia MB. Photodecomposition of gossypol by ultraviolet irradiation. *J Am Oil Chem Soc*. 1985; 62: 87–89 <https://doi.org/10.1007/BF02541497>

## **CAPÍTULO III:**

### ***A COMPARISON OF PHYSICAL, CHEMICAL, BIOLOGICAL AND COMBINED TREATMENTS FOR DEGRADATION OF FREE GOSSYPOL IN CRUSHED WHOLE COTTONSEED***

**MANUSCRITO SUBMETIDO PARA  
PUBLICAÇÃO, 2019**

## Resumo

O gossipol livre (GL) é considerado um fator tóxico e/ou antinutricional presente em caroço de algodão restringindo o seu uso e a aplicação em setores industriais. Neste trabalho, diferentes métodos de pré-tratamento para a redução do GL em caroço de algodão (CA) foram comparados. O método usando autoclavagem mostrou que a concentração de GL foi reduzida em 96% após 60 minutos. Enquanto o método químico, empregando  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  eliminou o GL em 99,96%. Apesar dessas reduções, o teor de proteína total, assim como no tratamento físico foram reduzidos, nesse caso diminuíram de 23,62 para 20,82% após a aplicação de 1% e 2% de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , respectivamente. O tratamento usando pré-compostagem, reduziu o conteúdo de GL em até 99% após 6 dias de incubação, como também reduziu o conteúdo de proteínas totais para 21,04%. No método empregando combinação entre tratamento físico (autoclavagem) e a fermentação em estado sólido (FES) utilizando os fungos *Ganoderma lucidum* (CC351), *Panus lecomtei* (CC40), *Pleurotus ostreatus* (CC389), *Pleurotus sapidus* (CC28) e *Pycnosporus sanguineus* (CC400), diferentes níveis de reduções de GL foram alcançados. A combinação entre os tratamentos físico e biológico apresentou degradações de GL maiores que aqueles alcançados pelos tratamentos individualmente empregados; Além de reduções de lípidos totais e incremento no teor de proteína total, melhorando a qualidade nutricional da biomassa. Durante esse cultivo, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *P. lecomtei* CC40 foram capazes de secretar lacase (2222,2 UI/mL) e manganês peroxidases (58,1 UI/ml) enzimas potencialmente envolvidas na desintoxicação de GL. Os métodos empregados foram eficientes para desintoxicação de gossipol residual, podendo por exemplo, ser usado em eliminação desse fator antinutricional em indústrias de ração animal.

**Palavras-chave:** algodão, gossipol, desintoxicação, fungos basidiomicetos, macrofungos.

## **A comparison of physical, chemical, biological and combined treatments for degradation of free gossypol in crushed whole cottonseed**

Clemente B. Soares Neto<sup>1</sup>; Aparecido A. Conceição<sup>2,3</sup>; Taisa G. Gomes<sup>1</sup>; José A. De Aquino Ribeiro<sup>3</sup>; Raquel Bombarda Campanha<sup>3</sup>; Paulo Augusto Vianna Barroso<sup>3</sup>; Antony Enis Virginio Machado<sup>3</sup>; Simone Mendonça<sup>3</sup>; Félix G. De Siqueira<sup>3†</sup>; Robert N. G. Miller<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Vitória da Conquista, 45029-094, BA, Brazil

<sup>3</sup>Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/nº, Caixa Postal 40.315, 70770-901, Brasília, DF, Brazil

### **Corresponding authors**

\*E-mail: robertmiller@unb.br. Phone: +55-61-3107-3048.

ORCID ID:

Robert Miller: 0000-0002-5798-4552

†E-mail: felix.siqueira@embrapa.br. Phone: +55-61-3448-2324.

ORCID ID:

Felix Goncalves de Siqueira: 0000-0001-5239-4994

### **ABSTRACT:**

Toxic free gossypol (FG) in cottonseed biomass residue limits application in animal feed industries. Herein, pretreatment methods for reducing FG in crushed whole cottonseed (CWCS) were compared, with residual FG quantified by Ultra High-Performance Liquid Chromatography. Physical treatment by autoclaving resulted in up to 96% degradation of FG, without reduction in crude protein (CP) content. Chemical treatment with 1% and 2% Ca(OH)<sub>2</sub> eliminated FG to as low as 0.04%, although a reduction in CP content was observed. Similarly, pre-composting, whilst reducing FG content by 99.66% after 6 days incubation, also reduced CP content. In combined physical and biological solid-state



fermentation (SSF), basidiomycetes *Ganoderma lucidum*, *Panus lecomtei*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sapidus* and *Pycnoporus sanguineus* degraded FG in autoclaved CWCS to trace levels often lower than obtained by individual treatments. A reduction in total lipids and increase in CP were also observed, improving nutritional quality. The most efficient fungi, *P. ostreatus* and *P. lecomtei*, secreted considerable laccase and manganese peroxidases during SSF, potentially involved in FG degradation. Cost effective, non-polluting, value-adding approaches for FG degradation offer potential in animal feed industries.

**KEYWORDS:** cottonseed, gossypol, detoxification, macrobasidiomycete

## INTRODUCTION

The processing of oilseed plants such as cotton (*Gossypium* sp.) generates abundant biomass residue with significant levels of edible oil, crude proteins and other desirable biomolecules for industrial sectors such as those devoted to animal nutrition. The application of cottonseed cake (CSC), a by-product of the cotton industry, in animal feed is limited due to the natural presence of toxic free gossypol (FG) in the plant. Gossypol is a terpenopolyphenol secondary metabolite produced in pigment glands in cotton plant leaves, flower buds, stems and seed, as a possible defense chemical against diverse pathogens and herbivore insects (Dalle Zotte et al., 2013; Gao et al., 2013; Kong et al., 2010; Puckhaber et al., 2018; Stipanovic et al., 2006). Greatest concentration occurs in seeds, with values of up to 7000 mg/kg of FG documented (Alexander et al., 2008). Considered an anti-nutritional factor, monogastric livestock are sensitive to this polyphenol, with the European Union directive 2002L00032 limiting FG in cottonseed cake feedstuffs to 20 ppm for laying hens and piglets, 100 ppm for poultry and calves, and 500 ppm for cattle, goats and sheep (Gadelha et al., 2014). Toxicity is associated with reactions of the aldehyde groups with amino acids of proteins, with cross linking resulting in inhibition of enzyme activities. The linking of phenolic group with amino acids and minerals can also result in the accumulation of inert and indigestible complexes which are detrimental to animal health. Decreased growth, reduced fertility and abnormalities in internal organs are common symptoms in non-ruminant monogastrics (Atia and Rahim., 2009; Zhang et al., 2018).

A number of physical and chemical methods have been described for degradation of FG in CSC to permissible levels for feed, such as ultraviolet radiation (Nomeir and Donia., 1985; Gallup., 1927; Hron et al., 1994; Gerasimidis et al., 2007). Solvent-based chemical treatment, although able to significantly reduce FG content in CSC, is typically costly, and, requiring considerable volumes of water for neutralization, generates contaminated effluents. Solvents may also alter the organoleptic characteristics of feed products, as observed with anhydrous acetone (Gerasimidis et al., 2007; Zhang et al., 2006; Wang et al., 2009). Other methods, such as mineral application (Zhang et al., 2006; Nagalakshmi et al., 2002; Nagalakshmi et al., 2003), or extrusion processes, have also been reported, which, whilst offering varying efficiencies in FG degradation in different cotton co-products (Thomasson et al., 1998; Buser and Abbas., 2001) are often unsuitable due to the deleterious effects on CSC. Treatment with iron sulphate, for example, causes

discolouration and reduces palatability of feed (Nagalakshmi et al., 2003). Similarly,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , whilst reducing FG levels, also reduces protein and vitamin content in CSC.

Given such limitations, research has also examined the potential for microbial biodetoxification of FG in cottonseed residues through solid state fermentation (SSF). A number of fungi have been reported to efficiently detoxify FG, including the ascomycetes *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang et al., 2006, Lim et al., 2011). Macrobasidiomycetes, such as the white rot fungi (WRF), are well known degraders of complex carbon sources such as lignocelluloses and xenobiotic compounds (Kulikova et al., 2011). In this context, a number of species have also been shown to detoxify both pure gossypol and FG in cottonseed (Rajarithnam et al., 2001; Fackler et al., 2006).

This study was conducted to evaluate the efficiency of physical, chemical, biological or combined (physical and biological) methods in the degradation of FG in crushed whole cottonseed (CWCS). The development of cost effective, non-polluting, value-adding approaches for FG degradation in CSC offers potential in animal feed industries.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cotton seed**

Cottonseed was obtained from FARMOTEC®, Buritis, MG, Brazil. Material was crushed in a commercial forage crusher (Trapp TRF400 super, SC, Brazil) using a number 2 sieve. Crushed whole Cottonseed (CWCS) samples were then stored at room temperature prior to treatment.

### **Physical treatment**

CWCS samples (20 g dry matter) were transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks and humidity adjusted to 60% using sterile distilled water. Samples were subjected to different autoclave time periods at 121°C: for 15, 30 or 60 min. Autoclaved samples were stored at -20°C until analysis. Physical treatment experiments were performed in triplicate.

### **Chemical treatment**

CWCS samples (100 g dry matter) were mixed with 1% and 2% (m/v) solutions of

Ca(OH)<sub>2</sub> in 1000 mL Erlenmeyer flasks. Material was agitated at 120 rpm for 14 hours at 30°C, filtered using cotton gauze and filtrate stored at -20°C. Chemical treatment experiments were performed in triplicate.

### **Biological pre-composting treatment**

A total of 120 kg of cottonseed was crushed in a commercial forage crusher (Trapp TRF400 super, SC, Brazil) using a number 2 sieve. Resultant CWCS was transferred to a commercial mixer (Maqtron M-400, SC, Brazil), 60 L of water added and the material mixed for 15 min. The moistened CWCS was transferred to 0.6m<sup>3</sup> metal bin composting structures. Triplicate pre-composting samples were disassembled at three time points (2, 4 and 6 days) for evaluation of degradation of FG. For each sample, the temperature at the center of the pile was monitored. Sample material was dried in a hot air oven at 60°C for two days then stored at -20°C.

### **Combined physical and biological treatments**

Macrobasidiomycete fungi were selected for evaluation in detoxification of FG by solid-state fermentation (SSF). Fungal strains *Pleurotus ostreatus* CC389, *Panus lecomtei* CC40, *Ganoderma lucidum* CC351, *Pycnoporus sanguineus* CC400 and *Pleurotus sapidus* CC28 were selected as candidate biodetoxifiers from a local collection of microorganisms based on previous investigations by this research group (Conceição et al., 2018). A total of 70 g (dry matter) of CWCS, previously moistened to 60% with sterile distilled water, was autoclaved at 121 °C for 15 min (physical treatment). After cooling, substrate was inoculated with 5 mm discs containing mycelial plugs of each fungal strain, previously grown for 7 days on potato dextrose agar plates. SSF cultures were then incubated for 15 days at 28°C. All experiments were conducted in triplicate.

### **Molecular identification of fungi**

For molecular-based confirmation of each fungal strain tested, genomic DNA was extracted from 150 mg of mycelium using an Ultra Clean Gel Spin DNA Extraction kit (MoBio Laboratories, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. For species level identification, sequence data was analyzed for the nuclear ribosomal DNA Internal Transcribed spacers (rDNA ITS), using the primers ITS1 and ITS4 (Gardes and Bruns., 1993), together with partial sequences of the Large Subunit (LSU) of the nuclear ribosomal RNA gene, amplified using the primers LROR and LR5 (Menolli Junior et al.,

2010). Where necessary, the RNA polymerase II gene (RPB2) was also employed for improved species resolution, following amplification with primers fRPB2-5F and bRPB2-7.12 (Liu et al., 1999; Matheny et al., 2007). PCR products were enzymatically purified with ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio, USA) and sequenced on a Genetic Analyser 3500xL capillary sequencer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's guidelines. Sequences were compared against the NCBI nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLAST algorithm and phylogenetic analysis conducted by the Maximum Likelihood method using the program MEGA, version 6.06 (Kumar et al., 2016).

### **Enzymatic Assays**

Based upon FG bioremediation data following combined physical (autoclaving) and biological treatment (SSF), fungal strains *P. lecomtei* CC40 and *P. ostreatus* CC389 were selected for further evaluation of enzymatic activities during SSF periods. Repeat cultures were prepared as described previously, with samples taken from colonized and control non-colonized substrate at 5, 10 and 15 days after inoculation. Crude extracts were obtained from homogenized samples (40 g) and 200 mL distilled water added (4°C). Samples were vortexed at 100 rpm for 30 min, centrifuged for 10 min at 10,000 g and the supernatant filtered using filter paper. The supernatant was denominated as crude extract (CE) and stored at 4 °C until evaluation of enzymatic activities. Lacase (Lac, EC 1.10.3.2) activity was determined based on oxidation of ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) following mixing of 180 µl of crude extract in 180 µl of 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5, 25°C). The oxidation of ABTS was monitored for 90 seconds at 25°C using a spectrophotometer at an absorbance of 420 nm ( $\epsilon_{420}=36000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Wolfenden and Willson., 1982). Mn-peroxidase (MnP EC1.11.1.1) activities were determined by spectrophotometric measurement of the oxidation of phenol red at 610nm ( $\epsilon_{610}=460 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Kuwahara et al., 1984). For this, 0.5 mL CE was mixed with 0.1 mL phenol red (1%), 0.05 mL MnSO<sub>4</sub>(2mM), 0.02 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2mM), 0.1mL sodium lactate (250 mM), 0.2 mL serum albumin (0.5%) and sodium succinate buffer (pH 4.5) and incubated for 5 min at 30°C. The reaction was interrupted by the addition of 40 µL 2M NaOH. All enzymatic activities were expressed in international units as UI.mL<sup>-1</sup>, defined as the amount of enzyme required to convert 1 µmol of substrate or to produce 1 µmol of product per minute of reaction (µmol min<sup>-1</sup>). All enzymatic assays were performed in triplicate.

### **Estimation of FG**

Residual FG in untreated and treated CWCS samples was accurately measured by reversed phase Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC), according to Conceição et al (25). This method developed by our group enables analysis of trace levels in cottonseed materials, with FG detectability limited at 0.2 µg/mL.

### **Bromatological analysis**

Untreated and treated CWCS samples were dried for 48 h using a hot air circulation drying oven ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) and ground with a Wiley mill with a 60 mesh sieve screen. The dry matter was determined following drying at  $105^{\circ}\text{C}$  for 12 hours, while the mineral matter (ash) was determined following heating in a muffle furnace at  $600^{\circ}\text{C}$  for 3h. Analysis of ethereal extracts and total lipids and of crude protein (CP) according to AOAC (1995).

### **Statistical Analysis**

Results of gossypol traces, crude protein and enzymatic activities were expressed as mean values  $\pm$  standard error of the mean. Analysis of variance with multiple comparisons (ANOVA) was conducted, followed by the Tukey post-test. Differences at  $p < 0.05$  were considered as significant.

## **RESULTS**

### **Molecular identification of fungi**

Molecular identification of the macrobasidiomycete fungi was based upon sequence analysis of rDNA ITS, and where increased resolution was necessary, based on analysis of LSU regions and RPB2 gene sequences. Following comparison against the nucleotide database NCBI using BLASTn (data not shown), together with clustering in a consensus phylogenetic tree based on alignment of rDNA ITS sequences (Supplementary Figure 1), the fungal strain identities were confirmed as: *Ganoderma lucidum* strain CC351; *Panus lecomtei* strain CC40; *Pleurotus ostreatus* strain CC389; *Pycnoporus sanguineus* strain CC400 and *Pleurotus sapidus* strain CC28. For the respective fungi, sequences enabling molecular identification were deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) under accession numbers MK603977, MK603978, MK603976, MK603979 and MK603975.

### **Physical and chemical treatments**

In comparison to non-autoclaved controls, a 60 minute period of autoclaving reduced FG content by 96.35%, from 2,446.93  $\mu\text{g/g}$  to 89.26  $\mu\text{g/g}$  (Figure 1 and Table 1). Whilst shorter autoclaving times also resulted in degradation of FG, percentage reductions were lower, with 15 and 30 minutes reducing FG in CWCS by 86.64 and 91.33%, respectively. Chemical treatment using  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  also resulted in efficient degradation of FG in CWCS, with a 1%  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  solution reducing FG content by 98.9% and a 2% solution by 99.6% (Figure 1).

### **Biological treatment: pre-composting**

Biological treatment of CWCS by means of pre-composting was evaluated after 2, 4 and 6 days incubation. Prior to pre-composting (control), FG was detected at a concentration of 2,446.93  $\mu\text{g/g}$ , whereas after 6 days incubation only 8.26  $\mu\text{g/g}$  of FG remained, representing degradation in excess of 99%. Following the six day pre-composting period, samples were autoclaved for 60 minutes at 121°C, resulting in a slight further increase in FG degradation, to 99.88% (Figure 2, Table 1).

### **Combined physical and biological treatments**

Combined physical (autoclaving for 15 minutes) and biological (15 day SSF cultures) treatment with the macrobasidiomycete fungi reduced FG in CWCS to levels lower than those obtained exclusively through autoclaving. The five fungi were able to further degrade FG residue remaining after autoclaving for 15 minutes (Figure 3). *P. lecomtei* CC40 and *P. ostreatus* CC389 were the most efficient in FG degradation through SSF, reducing concentrations by 99.47 and 99.43%, respectively.

Bromatological analysis revealed an increase in dry matter and ash following all treatments, which can be considered as an indicator of mineralization. A significant increase in CP content was also apparent after autoclaving and SSF for *P. lecomtei*, *G. lucidum*, *P. sanguineus* and *P. sapidus* (Table 2).

### **Enzymatic activities in MBFs**

Laccase and manganese peroxidase enzyme activities were evaluated over the 15 day time course of SSF of CWCS in the two most efficient species observed for FG degradation. *P. lecomtei* CC40 and *P. ostreatus* CC389 both secreted these oxidases over the time course (Table 3). Whilst manganese peroxidase activities were similar in both fungi, peaking at 10 days, laccase activities were greater in *P. lecomtei* CC40, with highest activity at 2.222,21

IU/mL after five days SSF (Table 3).

## DISCUSSION

Efficient methods for degradation and detoxification of FG are necessary for application of CSC in animal feed industries. In this study, the efficiency of different physical, chemical, biological and combined methods for FG degradation in CWCS were compared. Physical treatment through autoclaving resulted in significant decreases in FG content according to exposure time. Such efficiency in autoclaving for FG degradation has been described previously (Gallup., 1927). Heat treatment without autoclaving has also been widely employed in FG degradation (Bose et al., 2014; Yu et al., 1996; Zhang et al., 2006; Chai et al., 2016) with efficiency increasing according to exposure time and temperature. Whether volatilization and/or transformation of gossypol are responsible for the reduction in FG has also been investigated<sup>38</sup>, with detection of molecules related to gossypol indicative of transformation after 1 hour at 260°C. Gossypol has a molecular weight of 518 Daltons and a boiling point of 707°C. As such, volatilization under the conditions tested would not be possible. Transformation products detected were mainly gossypolone, with other products also present, though less abundant. Other studies have also reported that heat treatment can transform FG into bound gossypol, involving links between proteins and amino acids, mainly lysine (Nagalakshmi et al., 2002; Atia and Rahim., 2009). Temperature-based treatment, however, has also been reported to significantly negatively affect the quality of cottonseed, decreasing protein value and reducing amino acid content, mainly for lysine and arginine (Yu et al., 1996; Chai et al., 2016; Wang et al., 2012). Although autoclaving did not significantly affect protein content in CWCS in our study, such reports highlight that reliance exclusively on heat treatment for FG elimination may not be appropriate for feed applications.

Phenolic oxidative coupling of hemigossypol is known to occur during the biosynthesis of gossypol. Chemical conversion of gossypol, by contrast, can result in decoupling and accumulation of hemigossypol, together with additional products such as gossypolone, apogossypol and apogossypolone (Lu et al., 2017; Mellon et al., 2012; Sun et al., 2008).

In our study, chemical treatment with calcium hydroxide using concentrations up to 2.0% resulted in an almost total degradation of FG. Previous reports using calcium hydroxide, by contrast, have achieved reductions of up to only 40% (Nagalakshmi et al., 2002). Whilst a combination of 1.5% calcium hydroxide and 0.2% ferrous sulphate has also been shown to reduce FG levels to 0.04%, resultant meal can be inappropriate as feed (Aslam et al., 1970).



Previously, Kannan et al. (2013) reported that, whilst no benefits could be observed following incorporation of calcium hydroxide-treated CWCS into feed, no adverse effects were noted in blood parameters or animal performance. Such chemical treatment, however, can reduce both CP and total lipid (etheral extract) content in meal, as observed in our study, with 2% Ca(OH)<sub>2</sub> significantly reducing both protein and etheral content in CWCS. Although therefore a potentially a negative effect, the availability of Ca(OH)<sub>2</sub> at the farmer level in cotton growing countries, together with the absence of residue problems, continues to make this approach for FG detoxification an attractive alternative.

Pre-composting of biological material involves the addition of water to organic substrate, followed by the appropriate stacking of material to favor growth of naturally present mesophilic and thermophilic microorganisms. Although the process does not require the addition of specific microorganisms, water content, aeration and temperature must be optimized for microbial growth (Knox et al., 2006). Aerobic composting of cotton residue biomass has been employed in the degradation of chemical toxins and for the control of phytopathogens (Hills et al., 1981; Li et al., 2010; Knox et al., 2006). To date, however, this approach has not been tested for degradation of FG in CWSC or CSC. Whilst complete composting will only be achieved after C/N ratios become constant, pre-composting over a shorter time period may theoretically be sufficient for FG degradation. Here, degradation of FG by more than 99.6% was achieved after only six days pre-composting. It is likely that FG degradation occurs as a result of the combined effect of the elevated temperature and the ecological succession of the thermophilic microbiota, secreting extracellular enzymes capable of degrading gossypol and components of the plant cell wall. The action of fungal enzymes in the degradation of gossypol has been reported previously, for example in *Pleurotus florida* (Rajarathnam et al., 2001), with laccase production correlating with gossypol degradation. Further investigation into the potential in pre-composting for FG degradation is necessary, involving analysis of the influence of physical factors on FG degradation, such as pH, temperature, and CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations. Analysis of the microbial ecology during pre-composting of CWCS is also warranted, as described on non-autoclaved cottonseed meal (Chai et al., 2016). Whilst these authors observed a variable bacterial community, mostly comprising *Acinetobacter sp.*, *Enterobacter sp.* and *Bacillus sp.*, there have been no reports on the presence of fungi in such composting, despite their widely documented ability to degrade FG (Lim et al., 2011; Zhang et al., 2007; Khalaf and

Meleigy., 2008; Yang et al., 2011; Rajarathnam et al., 2001; Nie et al., 2015; Mageshwaran and Parvez., 2016; Mageshwaran et al., 2017).

The employment of promising fungi or their enzymes in pre-composting offers commercial potential in FG detoxification associated with gains in the degradability of organic matter for animal nutrition.

Certain macrobasidiomycete fungi are able to colonize diverse agroindustrial residues (Obodai et al., 2003; Reddy et al., 2003; Fan et al., 2006; Sainos et al., 2006; Hoa et al., 2015; Mkhize et al., 2016; Oyetayo et al., 2013). *G. lucidum*, *P. sanguineus* and *Pleurotus* sp. for example, have been employed in the bioremediation of toxic heavy metals and other xenobiotic compounds in effluents and soils (Kulikova et al., 2011; Ajith and Janardhanan., 2007; Silambarasan et al., 2014; Bose and Keharia., 2014). Such fungi secrete ligninolytic extracellular enzymes and other oxidative enzymes, capable of degrading complex aromatic pollutants through catalytic oxidation-reduction reactions (Kulshreshtha et al., 2014; Chagas and Durrant., 2001; Mustafa et al., 2017). Certain macrobasidiomycetes have also been applied in the degradation of toxic and/or anti-nutritional factors in plant biomass, such as phorbol esters in jatropha cake, with degradation occurring during lignocellulose decomposition (Gomes et al., 2018; da Luz et al., 2013; Bose and Keharia., 2014). Here, the combination of physical treatment (autoclaving) followed by axenic cultivation with macrobasidiomycetes resulted in the degradation of FG to levels close to 100%, depending on the fungal species employed. Toxicological analysis of the biomass with arthropods (*Artemia salina*) and rats (data not presented) also confirmed detoxification.

Bromatological analysis revealed significant increases in CP content after autoclaving and SSF with the majority of the macrobasidiomycetes evaluated. This is likely due to an increase in proteinaceous microbial biomass following fungal growth. Together with the deconstruction of plant biomass, liberation of soluble proteins and metabolites, species-specific SSF can be an effective approach for increasing nutritional value and digestibility of lignocellulosic material (Nagpal et al., 2015; Wang et al., 2018; Gunturu et al., 2019; Arora and Sharma., 2011; Sharma and Arora., 2010; Nayan et al., 2018). Single-cell protein derived from such fungal biomass has also been applied as animal feed (Kamra and Zadrazil., 1988; Villas-Bôas et al., 2002; Sousa et al., 2018).

In our study, *P. ostreatus* CC389 and *P. lecomtei* CC40 were the most efficient macrobasidiomycetes in the SSF degradation of FG. Previous studies have highlighted the potential in both culture of *Pleurotus* sp. and employment of crude enzymatic extracts for

efficient biodegradation of FG in rice straw (Lim and Lee., 2011). Ongoing analysis of crude extracts from both fungi, following 15 day growth periods on CWCS, as well as their purified protein fractions, has revealed efficient degradation of FG. Here, laccases and manganese peroxidases were secreted in *P. ostreatus* CC389 and *P. lecomtei* CC40 throughout the time period during which FG was degraded, indicating their potential involvement in toxin degradation. Such phenol oxidases, which are involved in the ligninolytic system of white rot fungi, offer potential in the treatment of industry residues and in soil bioremediation. To date, the characterization of enzyme activities for species within the genus *Panus* has been limited. Mustafa et al. (2017) reported an ability of *Panus tigrinus* to discolor textile dyes, with Leontievsky et al. (2002) reporting this species for degradation of a mixture of 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-TCP, and pentachlorophenol, attributed to manganese peroxidase activity. Whilst mechanisms responsible for gossypol biodegradation are poorly understood, analysis of upregulation and silencing of genes encoding cytochrome P450 monooxygenases in the Lepidopteran pests of cotton, *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*, has clearly linked this family of monooxygenases with detoxification of gossypol (Leontievsky et al., 2002; Mao et al., 2007). Considering their recognized role in metabolism of xenobiotic compounds, including in macrobasidiomycete fungi such as *Phanerochaete* sp. (Hirose et al., 2011), the potential involvement of this superfamily of monooxygenases in gossypol biodegradation in the macrofungi tested here also warrants investigation.

Although a number of physical and chemical methods are appropriate for degradation of FG, potential reduction in final crude protein content in treated cottonseed residues limits the applicability of such approaches for animal feed industries. Our data showed that combined physical and pre-composting methods, as well as combined physical and SSF approaches, all result in both efficient biodegradation and gains in organic matter degradability for animal feedstuff. Continued screening of macrobasidiomycetes is recommended, together with transcriptomic and proteomic approaches for elucidation of cellular mechanisms controlling the enzymatic degradation of FG. Downstream targeted genetic modification in microorganisms offers potential for efficient FG degradation in this important residue for animal feed industries.

### **Funding**

This work was financially supported by CAPES (Program 53001010007P8) and

CNPq/Embrapa (project number 404786/2013-8). RNGM was supported by a fellowship from CNPq (project number 305418/2017-3).

## Notes

The authors declare no competing financial or scientific interest.

## Supporting Information

**Supporting Figure 1. Consensus Maximum Likelihood phylogenetic tree resulting from the analysis of rDNA ITS sequence data.** The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein., 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. Evolutionary distances were computed using the Jukes-Cantor (Jukes et al., 1969) method and are represented in the scale bar as the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated.

## REFERENCES

- Ajith, T. A., Janardhanan, K. K., 2007. Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *J Clin Biochem Nutr* 40, 157-162.
- Alexander, J., Andersson, H. C., Bernhoft, A., Brimer, L., Cottrill, B., Fink-Gremmels, J., Sørensen, H., 2008. Gossypol as undesirable substance in animal feed: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA* 908, 1-55.
- Arora, D. S., Sharma, R. K., 2011. Effect of different supplements on bioprocessing of wheat straw by *Phlebia brevispora*: changes in its chemical composition, in vitro digestibility and nutritional properties. *Bioresour. Technol* 102, 8085-8091.
- Aslam, M., Arshad, M., Ali, S. M., 1970. Biochemical and nutritional studies on indigenous cottonseeds for the production of detoxified cottonseed flour. *Pak J Sci Ind* 13, 271-275.
- Atia, A. I., Rahim, G. A. A., 2009. Detoxification treatments of free gossypol in cottonseed meal by microbial treatment of mixed cultures and biochemical evaluation on rabbits. *J. Rad. Res. Appl. Sci* 2, 397-415.
- Bose, A., Keharia, H., 2014. Phorbol ester degradation in *Jatropha* seedcake using white rot fungi. *3 Biotech* 4, 447-450.
- Buser, M. D., Abbas, H. K., 2001. Mechanically processing cottonseed to reduce gossypol and aflatoxin levels. *Int J Toxicol Rev* 20, 179-208.
- Chagas, E. P., Durrant, L. R., 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microb Technol* 29, 473-477.
- Chai, X., Bi, Y., Sun, S., 2016. Free fatty acids increase gossypol losses in soybean oil during heating. *Eur J Lipid Sci Technol* 118, 584-591.
- Conceição, A. A., Neto, C. B. S., de Aquino Ribeiro, J. A., de Siqueira, F. G., Miller, R. N.

- G., Mendonça, S., 2018. Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. *PLoS One* 13, 1-17.
- da Luz, J. M. R., Paes, S. A., Nunes, M. D., da Silva, M. D. C. S., Kasuya, M. C. M., 2013. Degradation of oxo-biodegradable plastic by *Pleurotus ostreatus*. *PLoS one* 8, 1-7.
- Dalle Zotte, A., Brand, T. S., Hoffman, L. C., Schoon, K., Cullere, M., Swart, R., 2013. Effect of cottonseed oilcake inclusion on ostrich growth performance and meat chemical composition. *Meat Sci* 93, 194-200.
- De la Paz Celorio-Mancera, M., Ahn, S. J., Vogel, H., Heckel, D. G., 2011. Transcriptional responses underlying the hormetic and detrimental effects of the plant secondary metabolite gossypol on the generalist herbivore *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics* 12, 1-16.
- Fackler, K., Gradinger, C., Hinterstoisser, B., Messner, K., Schwanninger, M., 2006. Lignin degradation by white rot fungi on spruce wood shavings during short-time solid-state fermentations monitored by near infrared spectroscopy. *Enzyme Microb Technol* 39, 1476-1483.
- Fan, L., Soccol, A. T., Pandey, A., Vandenberghe, L. P. D. S., Soccol, C. R., 2006. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. *Braz. J. Microbiol* 37, 420-424.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39,783-791.
- Gadelha, I. C. N., Fonseca, N. B. S., Oloris, S. C. S., Melo, M. M., Soto-Blanco, B., 2014. Gossypol toxicity from cottonseed products. *SCI WORLD J.* 1-11.
- Gallup, W. D., 1927. Heat and Moisture as Factors in the Destruction of Gossypol in Cottonseed Products. *Industrial & Engineering Chemistry* 19, 726-728.
- Gao, W., Long, L., Zhu, L. F., Xu, L., Gao, W. H., Sun, L. Q., Zhang, X. L., 2013. Proteomic and virus-induced gene silencing (VIGS) analyses reveal that gossypol, brassinosteroids, and jasmonic acid contribute to the resistance of cotton to *Verticillium dahliae*. *Mol & Cell Proteomics* 12, 3690-3703.
- Gardes, M., Bruns, T. D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2, 113-118.
- Gerasimidis, K., Fillou, D. T., Babatzimcpoulou, M., Tassou, K., Katsikas, H., 2007. Preparation of an edible cottonseed protein concentrate and evaluation of its functional properties. *Int J Food Sci Nutr* 58, 486-490.
- Gomes, T. G., Hadi, S. I., Costa Alves, G. S., Mendonça, S., De Siqueira, F. G., Miller, R. N., 2018. Current strategies for the detoxification of *Jatropha curcas* seed cake: A review. *J Agric Food Chem.* 2510-2522.
- Gunturu, D. R., Yegireddy, M., Mannem, S., Mekapogu, A. R., Tollamadugu, N. P., 2019. *Effective Role of Microorganisms in Livestock Development*. In *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. 185-194.
- Hills, D. J., Curley, R. G., Knutson, J. K., Seiber, J. N., Winterlin, W. L., Rauschkolb, R. S., Elmore, C. L., 1981. Composting treatment for cotton gin trash fines. *Transactions of the ASAE* 24, 14-19.
- Hirosue, S., Tazaki, M., Hiratsuka, N., Yanai, S., Kabumoto, H., Shinkyō, R., Ichinose, H., 2011. Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 407, 118-123.
- Ho, H. T., Wang, C. L., Wang, C. H., 2015. The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology* 43, 423-434.
- Hron, R. J., Kuk, M. S., Abraham, G., Wan, P. J., 1994. Ethanol extraction of oil, gossypol and aflatoxin from cottonseed. *J Am Oil Chem Soc* 71, 417-421.

Jukes, T. H., Cantor, C. R., Munro, H. N., 1969. Mammalian protein metabolism. New York: Academic Press.

Kamra, D. N., Zadrazil, F., 1988. Microbiological improvement of lignocellulosics in animal feed production: a review. Treatment of lignocellulose with white rot fungi. Elsevier Applied Science. 56-63.

Kannan, A., Sastry, V. R. B., Agrawal, D. K., Kumar, A., 2013. Effect of feeding of calcium hydroxide-treated or vitamin E-supplemented cottonseed meal on plasma gossypol levels, blood parameters, and performance of Bikaneri lambs. Trop Anim Health Prod 45, 1289-1295.

Khalaf, M. A., Meleigy, S. A., 2008. Reduction of free gossypol levels in cottonseed meal by microbial treatment. Int J Agric Biol 10, 185-90.

Knox, O., Rochester, I., Vadakattu, G., Lawrence, L., 2006. Composting in Australian cotton production. The Australian Cottongrower. 46-48.

Kong, G., Daud, M. K., Zhu, S., 2010. Effects of pigment glands and gossypol on growth, development and insecticide-resistance of cotton bollworm (*Heliothis armigera* (Hübner)). Crop Prot 29, 813-819.

Kulikova, N. A., Klein, O. I., Stepanova, E. V., Koroleva, O. V., 2001. Use of basidiomycetes in industrial waste processing and utilization technologies: Fundamental and applied aspects. Appl Biochem Micro+ 47, 619-634.

Kulshreshtha, S., Mathur, N., Bhatnagar, P., 2014. Mushroom as a product and their role in mycoremediation. AMB Express 4, 1-7.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 33, 1870-1874.

Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., Gold, M. H., 1984. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett 169, 247-250.

Leontievsky, A., Myasoedova, N., Golovleva, L., Sedarati, M., Evans, C., 2002. Adaptation of the white-rot basidiomycete *Panus tigrinus* for transformation of high concentrations of chlorophenols. Appl. Microbiol. Biotechnol 59, 599-604.

Li, L., Frey, M., Browning, K. J., 2010. Biodegradability study on cotton and polyester fabrics. J Eng Fiber FABR 5, 42-52.

Lim, S. J., Lee, K. J., 2011. A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J World Aquacult Soc 42, 494-503.

Liu, Y. J., Whelen, S., Hall, B. D., 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. Mol Biol Evol 16, 1799-1808.

Lu, Y., Li, J., Dong, C. E., Huang, J., Zhou, H. B., Wang, W., 2017. Recent advances in gossypol derivatives and analogs: a chemistry and biology view. Future Med Chem 9, 1243-1275.

Mageshwaran, V., Parvez, N., 2016. Gossypol detoxification and lysine enrichment in cottonseed cake by solid state fermentation. J Pure Appl Microbio 10, 1333-1339.

Mageshwaran, V., Sharmila, B.M., Kuppusamy, P., 2017. Isolation and Identification of Potential Gossypol Degrading Fungal Strains from Cotton Growing Soil. Microbiol Res J Int 21, 1-6.

Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., Chen, X. Y., 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. Nat Biotechnol 25, 1307-1313.

Matheny, P. B., Wang, Z., Binder, M., Curtis, J. M., Lim, Y. W., Nilsson, R. H., Langer, E., 2007. Contributions of *rpb2* and *tefl* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). Mol Phylogenet Evol 43, 430-451.

Mellon, J. E., Zelaya, C. A., Dowd, M. K., Beltz, S. B., Klich, M. A., 2012. Inhibitory

effects of gossypol, gossypolone, and apogossypolone on a collection of economically important filamentous fungi. *J Agric Food Chem* 60, 2740-2745.

Menolli Junior, N., Asai, T., Capelari, M., Paccola-Meirelles, L. D., 2010. Morphological and molecular identification of four Brazilian commercial isolates of *Pleurotus spp.* and cultivation on corncob. *Braz. arch. biol. Technol* 53, 397-408.

Mkhize, S. S., Cloete, J., Basson, A. K., Zharare, G. E., 2016. Performance of *Pleurotus ostreatus* mushroom grown on maize stalk residues supplemented with various levels of maize flour and wheat bran. *LWT Food Sci. Technol* 36, 598-605.

Mustafa, M. M., Jamal, P., Alkhatib, M. A. F., Mahmud, S. S., Jimat, D. N., Ilyas, N. N., 2017. *Panus tigrinus* as a potential biomass source for Reactive Blue decolorization: Isotherm and kinetic study. *Electron. J. Biotechnol* 26, 7-11.

Nagalakshmi, D., Sastry, V. R. B., Agrawal, D. K., 2002. Detoxification of undecorticated cottonseed meal by various physical and chemical methods. *Anim Nutr Feed Techn* 2, 117-126.

Nagalakshmi, D., Sastry, V. R. B., Pawde, A., 2003. Rumen fermentation patterns and nutrient digestion in lambs fed cottonseed meal supplemental diets. *Anim Feed Sci Technol* 103, 1-14.

Nagpal, R., Shrivastava, B., Kumar, N., Dhewa, T., Sahay, H., 2015. Microbial Feed Additives. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 161–175.

Nayan, N., Sonnenberg, A. S., Hendriks, W. H., Cone, J. W., 2018. Screening of white-rot fungi for bioprocessing of wheat straw into ruminant feed. *J. Appl. Microbiol* 125, 468-479.

Nie, C., Zhang, W., Ge, W., Wang, Y., LIU, Y., Liu, J., 2015. Effects of fermented cottonseed meal on the growth performance, apparent digestibility, carcass traits, and meat composition in yellow-feathered broilers. *Turk Vet Anim SCI* 39, 350-356.

Nomeir, A. A., Abou-Donia, M. B., 1985. Photodecomposition of gossypol by ultraviolet irradiation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62, 87-89.

Obodai, M., Cleland-Okine, J., Vowotor, K. A., 2003. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30, 146-149.

Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 1995. 16 ed. Washington, DC, USA.

Oyetayo, V. O., Ariyo, O., 2013. Antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fries) cultivated on different tropical woody substrates. *Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology* 1, 28-32.

Puckhaber, L. S., Zheng, X., Bell, A. A., Stipanovic, R. D., Nichols, R. L., Liu, J., Duke, S. E., 2018. Differences in Active Defense Responses of Two *Gossypium barbadense* L. Cultivars Resistant to *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* Race 4. *J Agric Food Chem* 66, 12961-12966.

Rajarithnam, S., Shashirekha, M. N., Bano, Z., 2001. Biodegradation of gossypol by the white oyster mushroom, *Pleurotus florida*, during culturing on rice straw growth substrate, supplemented with cottonseed powder. *World J Microb Biot* 17, 221-227.

Reddy, G. V., Babu, P. R., Komaraiah, P., Roy, K. R. R. M., Kothari, I. L., 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry* 38, 1457-1462.

Sainos, E., Díaz-Godínez, G., Loera, O., Montiel-González, A. M., Sánchez, C., 2006. Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat-grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 72, 812-815.

Sharma, R. K., Arora, D. S., 2010. Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of in vitro digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. *Bioresour. Technol* 101, 9248-9253.

Silambarasan, S., Abraham, J., 2014. Efficacy of *Ganoderma sp.* JAS4 in bioremediation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP from agricultural soil. *J. Basic Microbiol* 54, 44-55.

Sousa, D., Venâncio, A., Belo, I., Salgado, J. M., 2018. Mediterranean agro-industrial wastes as valuable substrates for lignocellulolytic enzymes and protein production by solid-state fermentation. *J. Sci. Food Agric* 98, 5248-5256.

Stipanovic, R. D., Lopez, J. D., Dowd, M. K., Puckhaber, L. S., Duke, S. E., 2006. Effect of racemic and (+)-and (–)-gossypol on the survival and development of *Helicoverpa zea* larvae. *J Chem Ecol* 32, 959-968.

Sun, Y., Wu, J., Aboukameel, A., Banerjee, S., Arnold, A. A., Chen, J., Wang, S., 2008. Apogossypolone, a nonpeptidic small molecule inhibitor targeting Bcl-2 family proteins, effectively inhibits growth of diffuse large cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 7, 1418-1426.

Thomasson, J. A., Anthony, W. S., Williford, J., Johnson, W., Gregory, S., Calhoun, M., Stewart, R. Processing cottonseed and ginwaste together to produce a livestock feed. 1998. In Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Memphis, National Cotton Council of America. 169581698.

Van Soest, P. J., 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2 Ed.; Ithaca, New York. AOAC - Association of Official Analytical Chemists.

Villas-Bôas, S. G., Esposito, E., Mitchell, D. A., 2002. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Anim Feed Sci Technol* 98, 1-12.

Wang, J., Cao, F., Su, E., Zhao, L., Qin, W., 2018. Improvement of Animal Feed Additives of Ginkgo Leaves through Solid-state Fermentation using *Aspergillus niger*. *Int J Biol Sci* 14, 736-747.

Wang, X., Tang, J. W., Yao, X. H., Wu, Y. F., Sun, H., Xu, Y. X., 2012. Effect of *Bacillus cereus* Br on bacterial community and gossypol content during fermentation in cottonseed meal. *AFR J MICROBIOL RES* 6, 6537-6544.

Wang, X., Howell, C. P., Chen, F., Yin, J., Jiang, Y., 2009. Gossypol-a polyphenolic compound from cotton plant. *Adv Food Nutr Res* 58, 215-263.

Wolfenden, B. S., Willson, R. L., 1982. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 805-812.

Yang, X., Guo, J., Sun, J., 2011. Biodegradation of free-gossypol by a new fungus isolated from cotton planted soil. *Afr J Microbiol RES* 5, 3066-3072.

Yu, F., McNabb, W. C., Barry, T. N., Moughan, P. J., 1996. Effect of heat treatment upon the chemical composition of cottonseed meal and upon the reactivity of cottonseed condensed tannins. *J Sci Food Agric* 72, 263-272.

Zhang, W. J., Xu, Z. R., Sun, J. Y., Yang, X., 2006. 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* 9, 690-695.

Zhang, W. J., Xu, Z. R., Zhao, S. H., Jiang, J. F., Wang, Y. B., 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, 221-226.

Zhang, W. J., Xu, Z. R., Zhao, S. H., Sun, J. Y., Yang, X., 2007. Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal. *Anim Feed Sci Technol* 135, 176-186.

Zhang, Y., Zhang, Z., Dai, L., Liu, Y., Cheng, M., Chen, L., 2018. Isolation and characterization of a novel gossypol-degrading bacteria *Bacillus subtilis* strain Rumen *Bacillus Subtilis*. *Asian-AJAS* 31, 63-70.



**Figure captions**

**Figure 1. Free gossypol content in crushed whole cottonseed following physical and chemical treatments.** Treatments: physical (autoclaving at 121 °C for 15, 30 or 60 minutes); chemical (1 and 2% solutions of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ); control: untreated CWCS 100%. Bars for FG values followed by the same letter do not differ statistically from each other (Tukey test, differences at  $p < 0.05$  were considered significant).

**Figure 2. Free gossypol content in crushed whole cottonseed following pre-composting and following combined pre-composting and physical treatment (COMBO- Compost-Phys).** Bars for FG values followed by the same letter do not differ statistically from each other (Tukey test, differences at  $p < 0.05$  were considered significant).

**Figure 3. Free gossypol content in crushed whole cottonseed following combined physical and biological solid state fermentation (COMBO-Phys-SSF) treatment with macrobasidiomycete fungi.** Bars for FG values followed by the same letter do not differ statistically from each other (Tukey test, differences at  $p < 0.05$  were considered significant).

**Table 1. Comparison of physical, chemical, biological and combined (COMBO) treatments on the degradation of free gossypol in crushed whole cottonseed**

Treatment for degradation of Free Gossypol (FG)	Residual FG ( $\mu\text{g/g}$ )	Percentage degradation of FG
Control CWCS	2.446.93	-
<b>Physical (Autoclave)</b>		
15 minutes	326.76	86.64
30 minutes	212.13	91.33
60 minutes	89.26	96.35
<b>Chemical (<math>\text{Ca}(\text{OH})_2</math>)</b>		
$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1%	24.33	99.00
$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 2%	0.74	99.96
<b>Biological (pre-composting)</b>		
2 days	562.80	76.99
4 days	60.80	97.51
6 days	8.2	99.66
<b>COMBO: Physical + Biological</b>		
60 minutes Autoclave + Pre-Composting 6 days	2.91	99.88
<b>COMBO: Physical (15 min autoclaving) + Biological (basidiomycete fungi)</b>		
<i>Pleurotus ostreatus</i> CC389	12.83	99.47
<i>Panus lecomtei</i> CC40	13.73	99.43
<i>Ganoderma lucidum</i> CC351	19.08	99.22
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CC400	25.69	98.95
<i>Pleurotus sapidus</i> CC28	26.98	98.89

**Table 2. Bromatological analyses of CWCS samples following biological, chemical and combined (COMBO) physical and biological treatment**

Treatment	Results
	<b>Dry matter content (%)</b>
Control ( <i>in natura</i> )	94.56 $\pm$ 0.14 A
Pre-composting 2 days	93.44 $\pm$ 0.03 B
Pre-composting 6 days	92.76 $\pm$ 0.22 C
Chemical $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1%	97.62 $\pm$ 0.07 D
Chemical $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 2%	97.76 $\pm$ 0.03 D
Physical (autoclave 15 min.)	94.49 $\pm$ 0.01 A
COMBO: Autoclave + SSF_CC389 <i>P. ostreatus</i>	91.54 $\pm$ 0.00 B
COMBO: Autoclave + SSF_CC40 <i>P. lecomtei</i>	89.08 $\pm$ 0.00 C
COMBO: Autoclave + SSF_CC351 <i>G. lucidum</i>	90.21 $\pm$ 0.00 D
COMBO: Autoclave + SSF_CC400 <i>P. sanguineus</i>	91.33 $\pm$ 0.03 B
COMBO: Autoclave + SSF_CC28 <i>P. sapidus</i>	91.74 $\pm$ 0.12 B
	<b>Ash content (%)</b>
Control ( <i>in natura</i> )	4.00 $\pm$ 0.19 A
Pre-composting 2 days	4.09 $\pm$ 0.07 A
Pre-composting 6 days	6.36 $\pm$ 0.33 B
Chemical $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1%	3.86 $\pm$ 0.24 A
Chemical $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 2%	4.49 $\pm$ 0.09 A
Physical (autoclave 15 min.)	3.79 $\pm$ 0.09 A
COMBO: Autoclave + SSF_CC389 <i>P. ostreatus</i>	4.61 $\pm$ 0.02 A
COMBO: Autoclave + SSF_CC40 <i>P. lecomtei</i>	5.23 $\pm$ 0.13 B
COMBO: Autoclave + SSF_CC351 <i>G. lucidum</i>	4.75 $\pm$ 0.06 A
COMBO: Autoclave + SSF_CC400 <i>P. sanguineus</i>	4.78 $\pm$ 0.16 A
COMBO: Autoclave + SSF_CC28 <i>P. sapidus</i>	4.40 $\pm$ 0.06 A

	<b>Crude protein (%)</b>
Control ( <i>in natura</i> )	23.62 ± 0.09 A
Pre-composting 2 days	23.01 ± 1.09 A
Pre-composting 6 days	21.04 ± 0.49 B
Chemical Ca(OH) <sub>2</sub> 1%	20.62 ± 1.09 C
Chemical Ca(OH) <sub>2</sub> 2%	20.82 ± 2.28 C
Physical (autoclave 15 min.)	26.46 ± 1.47 A
COMBO: Autoclave + SSF_CC389 <i>P. ostreatus</i>	25.82 ± 0.54 A
COMBO: Autoclave + SSF_CC40 <i>P. lecomtei</i>	32.52 ± 0.46 B
COMBO: Autoclave + SSF_CC351 <i>G. lucidum</i>	29.99 ± 1.29 C
COMBO: Autoclave + SSF_CC400 <i>P. sanguineus</i>	31.98 ± 0.54 B
COMBO: Autoclave + SSF_CC28 <i>P. sapidus</i>	27.89 ± 0.54 C
	<b>Ethereal extract (%)</b>
Control ( <i>in natura</i> )	16.32 ± 0.57 A
Pre-composting 2 days	17.81 ± 0.65 A
Pre-composting 6 days	12.81 ± 0.39 B
Chemical Ca(OH) <sub>2</sub> 1%	17.61 ± 0.63 A
Chemical Ca(OH) <sub>2</sub> 2%	12.57 ± 0.49 C
Physical (autoclave 15 min.)	10.02 ± 0.29 A
COMBO: Autoclave + SSF_CC389 <i>P. ostreatus</i>	8.75 ± 0.21 B
COMBO: Autoclave + SSF_CC40 <i>P. lecomtei</i>	7.59 ± 0.24 C
COMBO: Autoclave + SSF_CC351 <i>G. lucidum</i>	8.18 ± 0.24 B
COMBO: Autoclave + SSF_CC400 <i>P. sanguineus</i>	8.69 ± 0.09 B
COMBO: Autoclave + SSF_CC28 <i>P. sapidus</i>	6.21 ± 0.42 D

**Table 3. Free gossypol content in crushed whole cottonseed over a 15 day time course of solid state fermentation (COMBO-Phys-SSF) treatment with *Pleurotus ostreatus* CC389 and *Panus lecomtei* CC40, together with fungal laccase and manganese peroxidase enzyme activities**

	<i>In natura</i>	Control	5 days		10 days		15 days	
			CC389	CC40	CC389	CC40	CC389	CC40
<b>Free Gossypol (µg/g)</b>	2.446.93 ± 10.19	326.76 ± 3.15	228.14 ± 2.89	222.54 ± 5.03	204.22 ± 1.31	200.01 ± 1.48	101.23 ± 0.73	97.15 ± 0.66
<b>Laccase (UI/mL)</b>	-	-	488.89 ± 4.44	2.222.21 ± 2.89	559.56 ± 3.55	1.111.11 ± 10.89	55.56 ± 1.36	1.138.82 ± 12.34
<b>Manganese Peroxidase (UI/mL)</b>	-	-	0.89 ± 0.04	8.78 ± 0.06	2.80 ± 0.09	60.04 ± 0.63	0.0	0.0

## Figure graphics

Figure 1.

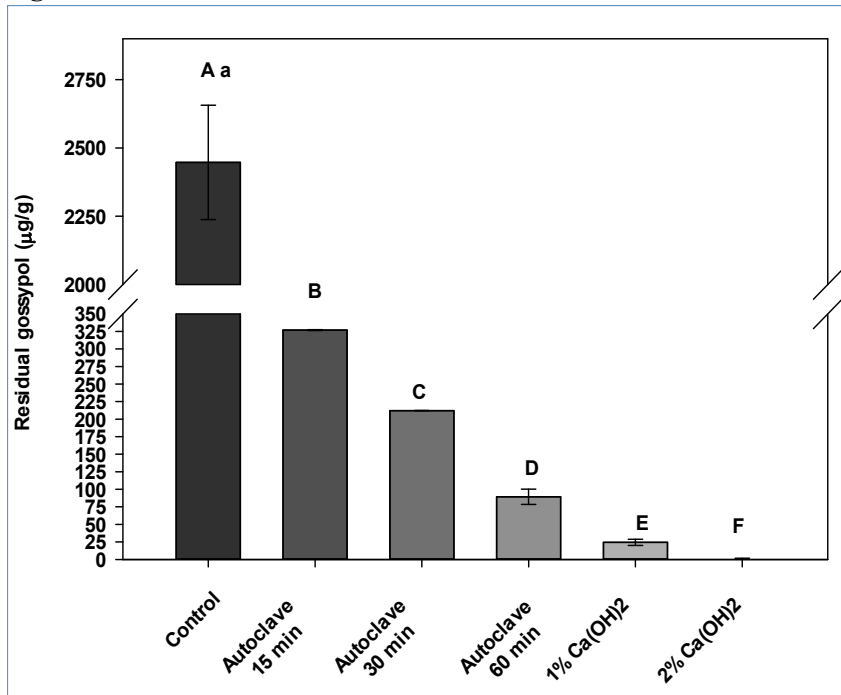


Figure 2.

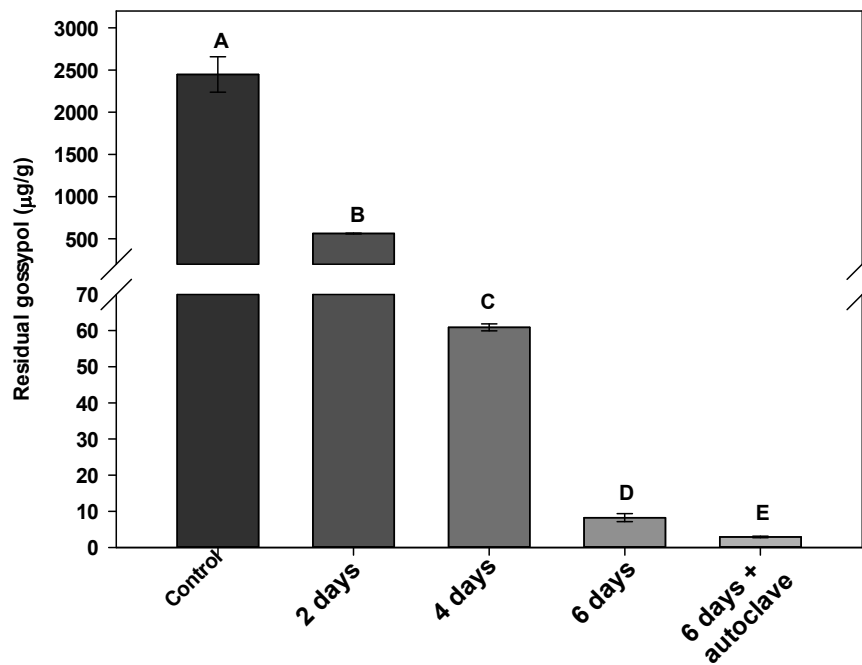
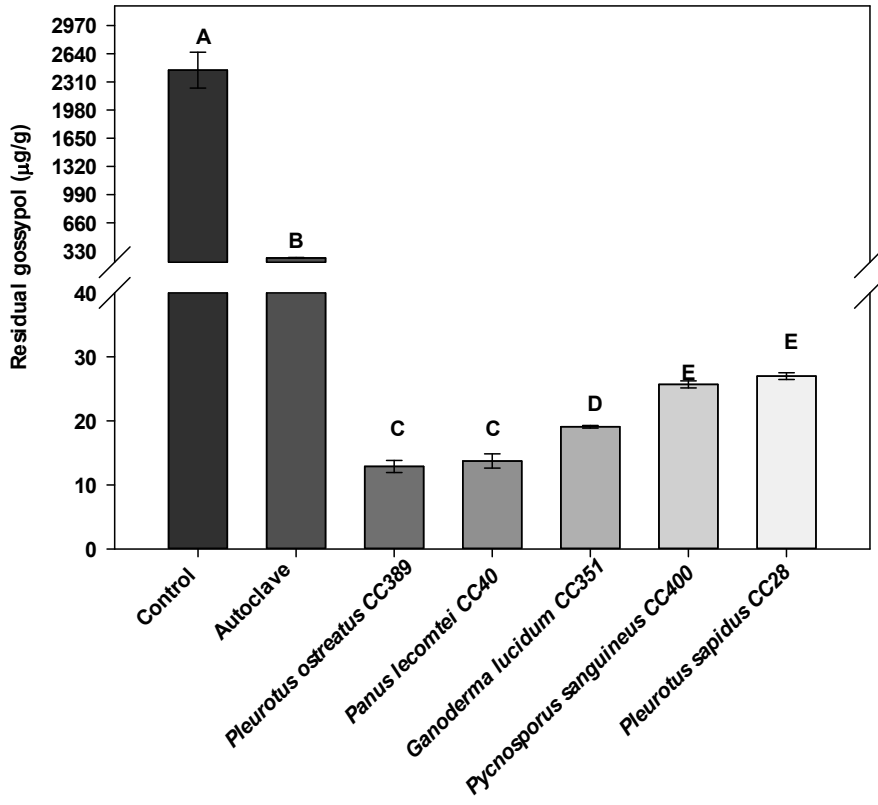
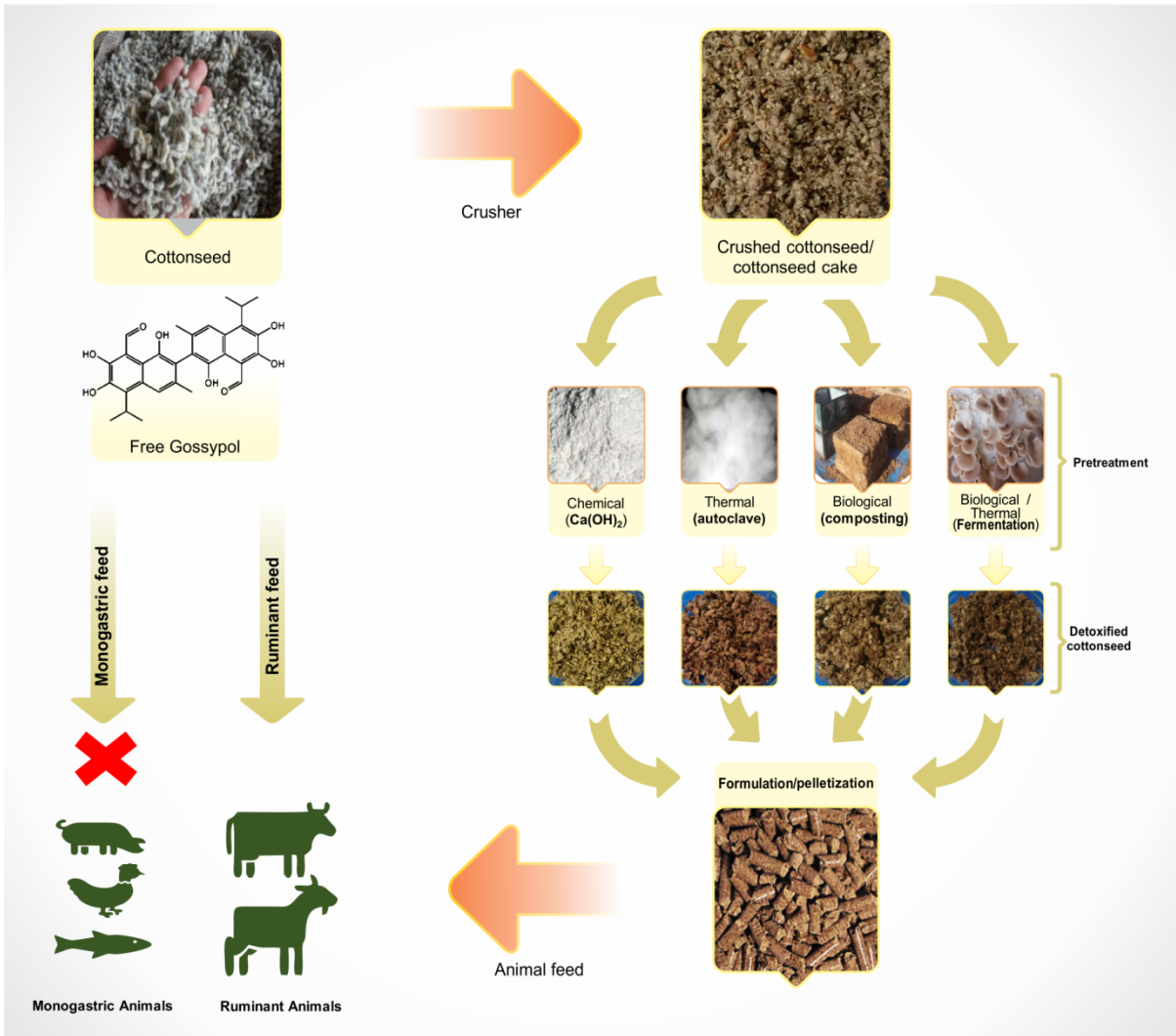


Figure 3.



TOC Graphic



## **CAPÍTULO IV:**

# **CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DO SECRETOMA DO EXTRATO BRUTO DO MACROFUNGO *PANUS LECOMTEI* EM CAROÇO DE ALGODÃO**

## RESUMO

O caroço de algodão é uma importante matéria-prima para óleo vegetal (biodiesel e alimentação), fonte de proteínas e carboidratos (torta/farelo - nutrição de ruminantes). No entanto, a presença de fatores tóxicos como o gossipol livre (GL) em sua composição tem limitado o seu uso em processos industriais e na alimentação para animais monogástricos. O fungo basidiomiceto *Panus lecomtei* é capaz de colonizar o caroço de algodão quando cultivados em fermentação em estado sólido (FES). Como resultado da secreção de diferentes enzimas pelos fungos, que agem sinergisticamente, substâncias recalcitrantes das plantas, como lignocelulose e moléculas tóxicas como o GL podem ser degradadas de forma eficiente. Uma vez que a compreensão dos mecanismos moleculares que controlam a degradação do GL pelos fungos ainda é limitada, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência dos extratos obtidos pelo cultivo em FES com *P. lecomtei* CC40 em degradar GL e identificar possíveis proteínas envolvidas nesse bioprocessamento. Inicialmente, foram determinados os tempos de cultivos para análise do secretoma fúngico em resposta ao cultivo em caroço de algodão *in natura* (CAT) e caroço de algodão quimicamente tratado (CAT-TR), ambos autoclavados por 15 minutos. A cinética de degradação do GL foi observada por um período de crescimento de 15 dias, alcançando 70,27% de degradação. Foram analisadas as atividades enzimáticas para lacase, manganês peroxidase e protease em todos os tempos avaliados. Os tempos de cultivo de 6 e 12 dias foram escolhidos para as análises de secretoma por LC-MS/MS. Os extratos brutos (EBs) obtidos dos cultivos de *P. lecomtei* em CAT, CAT-TR e caroço de algodão geneticamente modificado (CAT-OGM) foram testados para a degradação de GL, avaliando-os quanto à: 1) eficiência da degradação quando incubados em biomassa contendo diferentes concentrações de GL; 2) eficiência da degradação do gossipol sintético (gossipol acetato) após os períodos de incubação de 60, 120 e 240 minutos; e, 3) degradação de inibidores enzimáticos. A análise enzimática da degradação de GL pelo extrato bruto (EB) indicou que: 1) após 8 horas de incubação, foi observada degradação do GL em até 99% nas biomassas CAT e CAT-OGM (alto e baixo nível de GL); 2) Os EBs foram capazes de degradar alguns inibidores enzimáticos, sendo que o EBs de CAT-TR apresentou maior eficiência na degradação de ácido sinápico (95%); 3) Os EBs degradaram completamente gossipol sintético após somente 60 minutos de incubação. Esses extratos foram ultrafiltrados (diferentes *cut-offs*) e purificados parcialmente por cromatografia de exclusão molecular. A degradação de GL foi mais evidente na fração do concentrado de 50 kDa, e as frações com atividades de lacases foram mais efetivas na degradação do GL. Deste modo, algumas atividades enzimáticas de *P. lecomtei* demonstraram potencial para degradar GL e gossipol sintético. Em última análise de dados, os secretomas fúngicos apresentaram diferenças fisiológicas considerando o cultivo nas biomassas CAT ou CAT-TR e em relação à diferença do tempo de incubação (6 e 12 dias). As proteínas/enzimas tais como lacases, peroxidases, oxidoredutases, *shock protein*, metaloproteases, glucanases e citocromo b5 mostraram ser atuantes em vias de oxidação de diferentes substratos, no estresse oxidativo, na quelatação de metais, na degradação de lignina e respiração celular. Portanto, possivelmente foram produzidas como mecanismo de resposta do fungo à presença do gossipol, ou seja, potencialmente envolvidas na biodestoxificação.

**Palavras-chave:** Gossipol; proteoma fúngico; secretoma; caroço de algodão; detoxificação; LC-MS/MS.



## ABSTRACT

Cottonseed is an important raw material for vegetable oils (biodiesel and feed), proteins and carbohydrates (cottonseed cake – ruminant nutrition). However, the presence of toxic factors such as free gossypol (FG) in its composition has limited its use in industrial processes and in feed for monogastric animals. The basidiomycete fungus *Panus lecomtei* CC40 is able to colonize cottonseed when cultured in solid state fermentation (SSF). As a result of the secretion of different enzymes by the fungus, which act synergistically, recalcitrant plant substances such as lignocellulose, as well as toxic molecules such as free gossypol (FG) can be efficiently degraded. As understanding of the molecular mechanisms controlling fungal degradation of FG is currently limited, the objective of this work was to evaluate the efficiency of extracts obtained from solid state fermentation culture with *P. lecomtei* CC40 in degrading FG and to identify possible proteins participating in this bioprocess. Initially, culture growth periods were determined for analysis of the fungal secretome following growth on cottonseed *in natura* (CSC) and chemically treated cottonseed (CSC-TR), both autoclaved for 15 minutes. The kinetics of FG degradation was observed over a 15 day growth period, reaching 70.27% degradation. Enzymatic activities were evaluated for laccase, manganese peroxidase and proteases across a number of investigated time periods. Culture period time points of 6 and 12 days were chosen for secretome analysis by LC-MS/MS. Crude extracts from *P. lecomtei* culture on CSC, CSC-TR, and CSC-GM were tested for FG degradation, with assessment for: 1- degradation efficiency when incubated on biomass containing different concentrations of free gossypol; 2 - degradation efficiency on synthetic gossypol (gossypol acetate) after 60, 120 and 240 minutes incubation; and 3- degrading enzymatic inhibitors. Analysis of enzymatic degradation of FG using crude extract (CE) indicated that: 1- after 8 hours of incubation, up to 99% FG degradation was observed in the CSC and CSC-GM biomass (high and low level of FG); 2 - The CEs were able to degrade certain enzymatic inhibitors, where CEs from CSC-TR demonstrated the most efficiency in processing synaptic acid (95%); 3 - The CEs completely degraded synthetic gossypol after only 60 minutes incubation. These extracts were ultra-filtered (different *cut-offs*) and partially purified by molecular exclusion chromatography. FG degradation was more evident in the 50 KDa concentrated fraction, with fractions harbouring laccase activities the most effective in FG degradation. As such, certain *P. lecomtei* enzymatic activities exhibited potential in processing FG and synthetic gossypol. In a final analysis, the fungal secretomes exhibited physiological differences following growth on CSC or CSC-TR biomasses and in relation to difference in incubation time (6 and 12 days). Proteins/enzymes as laccases, peroxidases, oxidoreductases, shock protein, metalloproteases, glucanases and cytochrome b5 were shown to be acting in oxidation pathways on different substrates, detoxification of toxic factors, in oxidative stress, in metal chelation, lignin degradation and cellular respiration. Therefore, it is possible that they were produced as a response mechanism of the fungus due to the presence of gossypol, thus, potentially involved in biodetoxification.

**Keywords:** Gossypol; fungi proteome; secretome; cottonseed; detoxification; LC-MS/MS.

## INTRODUÇÃO

Os subprodutos farelo ou torta de semente de algodão são resultados dos processos de extração de óleo vegetal desta matéria prima. O óleo obtido do processamento destas sementes pode ser utilizado em diferentes indústrias. No Brasil, o óleo de semente de algodão tem sido utilizado para compor a matriz de biodiesel em conjunto com o óleo de soja e o sebo de animais, principalmente, bovinos. A porção sólida do processo de extração, farelo/torta, tem características interessantes para nutrição animal em função dos teores significativos de proteínas, lipídios e carboidratos (ANP, 2012; RODRIGUES; RONDINA, 2013).

Em países com alta produção de algodão, como o Brasil, a Índia, a China e os EUA, o farelo de semente de algodão tem sido utilizado como fonte de proteína para composição da formulação da ração animal, em substituição parcial ao farelo de soja (ANP, 2012).

Diferentes métodos de extração podem ser empregados para obtenção das tortas ou farelos de algodão, resultando, assim, em diferentes composições físico-químicas de seus subprodutos. Em relação extração de óleo de semente de algodão, os processos mais comuns aplicados para são a extração mecânica, a extração com solventes (direto) e a pré-extração com solventes (ARAÚJO *et al.*, 2003; BOMFIM *et al.*, 2007).

O farelo e torta de semente de algodão são usados como alimentos para composição de dietas nutricionais para animais poligástricos. Entretanto, sua principal limitação para ampla aplicação na indústria de nutrição animal é a presença da substância química gossipol que, a depender da concentração e tipo de animal alimentado, pode provocar injúrias significativas e até mesmo ser letal (TANKSLEY JUNIOR, 1992; PAIM *et al.*, 2010).

O gossipol é uma substância química com características fenólicas naturais derivadas do algodoeiro, gênero *Gossypium*. De coloração amarelada, é considerado um aldeído polifenólico que permeia as células e atua como inibidor de diversas enzimas, incluindo as desidrogenases. Essa molécula é formada metabolicamente a partir de processos de derivação do acetato por meio da via isoprenoide. O dímero sesquiterpênico sofre uma reação de acoplamento radical para formar o gossipol. A

biossíntese começa quando o geranyl pirofosfato (GPP) e o isopentenil pirofosfato (IPP) são combinados para formar o precursor sesquiterpênico farnesil difosfato (FPP) (MCCAUGHEY *et al.*, 2005; KONG; DAUD; ZHU, 2010; EGBUTA *et al.*, 2017).

O gossipol atua como um mecanismo de defesa natural da planta (WANG XI *et al.*, 2009; SUN; LIU; DU, 2008; GADELHA *et al.*, 2014). Pode ser encontrado na sua forma livre (FG) ou na forma ligada a proteína (BG) (BENEDICT *et al.*, 2004; ABDURAKHIMOV *et al.*, 2009; KONG; DAUD; ZHU, 2010). A forma livre é considerada tóxica, podendo causar efeitos deletérios, principalmente, para animais não-ruminantes (MORGAN, 1989).

Tendo em vista a sua toxicidade, ao longo das últimas décadas tentativas de desenvolvimento de métodos – físicos, químicos, biológicos ou combinados – para degradação dessa biomolécula, têm sido foco de pesquisadores (NAGALAKSHMI; SASTRY; PAWDE, 2003; NAGALAKSHMI; SASTRY; AGRAWAL, 2002; BRESSANI *et al.*, 1964).

Apesar de constantes na literatura, os métodos físicos e químicos apresentam alguns pontos controversos, quais sejam: o alto gasto de água utilizado no meio químico reacional; os dispendiosos gastos de energia, por exemplo, quando aplicado o método físico de autoclavagem; as possíveis perdas na qualidade organoléptica, diminuindo a qualidade nutricional dos coprodutos de algodão (LUSAS, JIVIDEN, 1987; STIPANOVIC *et al.*, 1986).

Os tratamentos biológicos por meio do emprego de microrganismos, especificamente, têm sido apontados como uma alternativa interessante na degradação do GL. Quando comparados a outros métodos, entre as suas vantagens, destaca-se a possibilidade de, ao final do processamento, haver aumento na qualidade nutricional dos coprodutos (LIM; LEE, 2011; ZHANG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2011; RAJARATHNAM *et al.*, 2001).

Entre os métodos biológicos, a técnica de fermentação em estado sólido (FES) tem sido uma alternativa versátil para biodesintoxicação simultânea de toxinas e/ou antinutrientes presentes em biomassas vegetais (GOMES *et al.*, 2018; JOSHI; K KHARE; N GUPTA, 2014).

A biodesintoxicação baseada em FES de resíduos agroindustriais, tem sido utilizada com êxito na remoção de ésteres de forbol presentes em sementes de *Jatropha curcas* (GOMES *et al.*, 2018), ricina (em torta de mamona), cafeína (em casca de café), gossipol (em farelo de algodão) e glucosinolatos (em farelo de colza-

canola), além do emprego na degradação de compostos químicos xenobióticos (JOSHI; K KHARE; N GUPTA, 2014).

Vias de degradação biológica utilizando microrganismos só são possíveis devido à capacidade destes seres vivos extraírem nutrientes da biomassa vegetal, gerando metabólitos primários e secundários, durante seu período de crescimento e consequente colonização do substrato. O entendimento desses processos por meio de técnicas de microbiologia industrial e biologia molecular podem trazer importantes descobertas, levando à possibilidade de obtenção de bioprodutos de valor agregado. Exemplos desses bioprodutos incluem diferentes tipos de exoenzimas, tais como celulases, amilase, protease, lipases, fitases, lacases e diferentes vitaminas.

Nos últimos anos, diversos estudos vêm apontando a degradação de fatores tóxicos e/ou antinutricionais (ANFs) por ação de fungos de podridão branca, denominados *white-rot fungi* (WRF) (RAJARATHNAM *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2012). O tratamento biológico por meio destes macrofungos ou macrobasidiomicetos tem se mostrado eficaz nessa função. Sendo assim, há hipóteses de que maquinarias enzimáticas estejam envolvidas na desconstrução da lignina, entre outros, através de seu potencial de oxidação em diversos substratos (REDDY, 1995; SCHMIDT-DANNERT, 2016).

O portfólio biocatalítico dos WRFs compreendem a secreção de enzimas oxidoredutases capazes de modificar ou decompor os polímeros constitutivos da biomassa lignocelulolítica como também atuam na degradação dos compostos tóxicos do meio de crescimento micelial. Também são secretados diversos tipos de monooxigenase do citocromo P450 (P450s) (SYED; YADAV, 2012). Muitas dessas enzimas estão envolvidas na produção de metabólitos secundários (WAWRZYN *et al.*, 2012; QUIN *et al.*, 2013). Outras, especialmente as do complexo P450s, são responsáveis pela constituição do sistema de defesa fúngico contra xenobióticos (ICHINOSE, 2013).

A geração constante de dados do genoma de fungos decompositores de biomassa vegetal tem facilitado estudos comparativos que vêm auxiliando na compreensão da importância destes microrganismos (RILEY *et al.*, 2014; FLOUDAS *et al.*, 2012). Esses estudos e dados possibilitam acesso a uma fonte quase inexplorada de novas enzimas e vias biossintéticas, que podem ser validadas por técnicas de proteômica, transcriptômica e metabolômica. As ferramentas ômicas têm possibilitado a descoberta de vias metabólicas dos microrganismos como os WRFs,

quanto à desconstrução ou destoxificação de biomassas vegetais.

Visando a entender esses processos, pesquisas têm buscado explorar ferramentas proteômicas e alguns resultados, até então obtidos, têm mostrado a participação de um sistema oxidoreductase independente da peroxidase, qual seja, o sistema monoxigenase do citocromo P450 na degradação desses fatores tóxicos e antinutricionais (SYED; YADAV, 2012).

O GL está entre os principais ANFs presente nos coprodutos do algodão, ocorrendo em diferentes concentrações (LIM; LEE, 2011; RAJARATHNAM *et al.*, 2001). Apesar de ser comprovada a habilidade dos microrganismos em degradá-lo, não se sabe como isso acontece e quais biomoléculas ou rotas são utilizadas; portanto, essa é uma área que permanece pouco explorada.

Estudos proteômicos que visam a identificação de proteínas possivelmente envolvidas na degradação desses ANFs ainda são escassos na literatura. O trabalho de Yang *et al.* (2012), usando espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS) mostrou que o fungo *Aspergillus sp.* atua agente degradador de GL, os resultados desse trabalho revelaram 20 proteínas possivelmente envolvidas nessa degradação, tais como: uma proteína da família quinesina, duas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma citrato sintase, uma ubiquitina, uma proteína não nomeada e 14 proteínas hipotéticas. Esses mesmos autores sugerem a necessidade de mais trabalhos visando alcançar um melhor entendimento do processo.

Análises de secretomas fúngicos usando a técnica LC-MS/MS (Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial) têm sido úteis em diferentes trabalhos, permitindo assim, avanços das análises *shotgun* (usando a técnica gel-free) (GÓMEZ MENDOZA, 2013). Assim, o emprego dessa ferramenta em trabalhos de caracterização e quantificação das proteínas secretadas por diferentes espécies fúngicas possam ser eficazes como formas de elucidar e caracterizar proteínas envolvidas na degradação de fatores tóxicos e antinutricionais.

Nos últimos anos, pesquisadores da Embrapa Agroenergia em associação com instituições parceiras, como a Universidade de Brasília, têm mostrado a capacidade de macrofungos em degradar gossipol livre, conforme os dados apresentados nos capítulos anteriores dessa tese, além do trabalho realizado por Araújo (2018). Entre os fungos avaliados, *Panus lecomtei* CC40 se mostrou como um dos mais promissores em colonizar diferentes substratos contendo derivados de algodão na fermentação em estado sólido (FES), degradando gossipol livre. Diante desses dados,

essa estirpe foi escolhida para as análises descritas no presente capítulo.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a degradação de gossipol livre pelo fungo *P. lecomtei* CC40 ao longo de 15 dias de cultivo em caroço de algodão comum (CAT) e caroço de algodão quimicamente tratado (CAT-TR).
- Determinar atividades enzimáticas lacases, peroxidases e proteases durante os 15 dias de cultivo do *P. lecomtei* CC40 em caroço de algodão comum (CAT) e caroço de algodão quimicamente tratado (CAT-TR).
- Avaliar o potencial dos extratos brutos, ultrafiltrados e parcialmente purificados de *P. lecomtei* crescidos em CAT ou CAT-TR como agentes degradadores de GL.
- Avaliar a capacidade isolada do extrato bruto obtido de FES em CAT e CAT-TR em degradar inibidores enzimáticos.
- Analisar o secretoma do basidiomiceto *P. lecomtei* CC40 cultivado em substrato contrastante quanto à presença e ausência de gossipol livre em caroço de algodão *in natura*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau HPLC. Os substratos para ensaios enzimáticos e análises de degradação de gossipol foram da marca Sigma Aldrich (St. Louis, EUA) assim como o gossipol padrão ( $\geq 95\%$  de pureza) (código G8761). Os solventes utilizados nas análises de espectrometria de massas, acetonitrila, ácido fórmico e água, foram de grau de pureza apropriado para LC-MS/MS (Sigma Aldrich). A tripsina utilizada na digestão prévia das proteínas para a identificação por LC-MS/MS foi adquirida da Promega (Madison, WI, EUA). Acetona, metanol e ácido trifluoroacético foram provenientes da marca TEDIA®.

## **Biomassa vegetal, origem e cultivo do fungo**

Foi utilizado o macrofungo *P. lecomtei* CC40, proveniente da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Biorefinaria (CMMABio) da Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal, Brasil. As biomassas caroço de algodão comum (CAT) e caroço de algodão tratado quimicamente (CAT-TR) foram cedidas pela empresa Farmotec, Buritis, Minas Gerais, Brasil. A biomassa caroço de algodão geneticamente modificado (CAT-OGM) foi proveniente do banco de germoplasma da Embrapa Algodão, Campina Grande, Brasil, e consiste na variedade *Empire Glandless*, com repressão dos genes *gl2gl2* e *gl3gl3*, que determina a ausência de glândulas de gossipol nas sementes.

O cultivo e a colheita dessa variedade foram executados pelo grupo de pesquisa da Embrapa Agroenergia e parceiros, no Instituto Agronômico de Campinas, Centro, e Grãos e Fibras-IAC, São Paulo, Brasil, entre novembro de 2015 e julho de 2016, exclusivamente, para esse experimento.

Cabe ressaltar que o tratamento químico foi descrito no Capítulo III.

## **Pré-tratamento das biomassas**

As três biomassas mostradas no tópico biomassa vegetal, origem e cultivo do fungo – CAT, CAT-TR e CAT-OGM –, foram utilizadas como meio de cultivo em estado sólido para o crescimento do macrofungo *P. lecomtei*. Esses substratos foram divididos de acordo com o conteúdo de gossipol livre, em três grupos: (i) altos níveis (CAT), (ii) baixos níveis (CAT-OGM) e (iii) ausência de GL (CAT-TR). Um total de 20 g dessas biomassas com umidade a 60% foram autoclavadas à 121°C, por 20 minutos. Posteriormente a essa etapa, o macrofungo foi inoculado e incubado a 28 °C por até 15 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Visando avaliar o nível de degradação do gossipol livre foram determinados os teores de gossipol presentes em CAT e CAT-OGM de acordo com Conceição *et al.*, (2018).

## **Obtenção e caracterização de extrato bruto**

As biomassas de algodão colonizadas ou miceliadas pelo *P. lecomtei* CC40 após o tempo 5 dias de cultivo foram acrescentados tampão fosfato de sódio (100

mM) pH 6,5 3:1 (m:v), homogeneizados e incubados a 4°C em agitação por 140 rpm durante 40 minutos, filtrados e centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C, obtendo-se os extratos brutos (EB's). Nos EB's foram dosadas as proteínas solúveis totais e atividades enzimáticas: lacases, manganês peroxidase, lignina peroxidase e proteases. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

As concentrações de proteínas foram determinadas a partir do método proposto por Bradford, utilizando um *kit* específico (BioRad, Hercules, CA, EUA).

A atividade de Lacase (Lac, EC 1.10.3.2) foi determinada com base na oxidação de ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato), após mistura de 180 µl de extrato bruto e 180 µl de tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5, 25 °C). A oxidação do ABTS foi monitorada por 90 segundos a 25°C, em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 420 nm ( $\epsilon_{420}$ : 36000 L.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) (WOLFENDEN; WILLSON, 1982).

A atividade de manganês peroxidase (MnP EC1.11.1.1) foi determinada por mensuração da oxidação do vermelho de fenol, via espectrofotometria, a 610 nm ( $\epsilon_{610}$  = 460L.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) (KUWAHARA *et al.*, 1984). Para isso, 0,5 mL de extrato bruto foi misturado com 0,1 mL de vermelho de fenol (1%), 0,05 mL de MnSO<sub>4</sub> (2 mM), 0,02 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM), 0,1 mL de lactato de sódio (250 mM), 0,2 mL de albumina sérica (0,5 %) e tampão succinato de sódio (pH 4,5), sendo incubados por 5 min a 30°C. A reação foi interrompida pela adição de 40 µL de NaOH 2M.

As atividades de proteases foram monitoradas utilizando o método colorimétrico de Charney e Tomarelli (1947), com modificações, usando tubos Eppendorf® de 1,5 ml com 500 µL do extrato enzimático e 500 µL de azocaseína 5%, foram incubados a 37°C por 30 minutos em banho-maria, para posterior precipitação com 500 µL de TCA 100% (ácido tricloroacético) e centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi analisado. Para o branco do ensaio, precipitou-se a azocaseína com TCA 100% antes de adicionar o extrato. Após 150 µL dos sobrenadantes foram acrescentados de 20 µL de KOH 0,5 M, e a leitura foi feita a 430 nm no espectrofotômetro.

A atividade de Lignina peroxidase (LiP) foi determinada pela oxidação de álcool veratrílico na presença de peróxido de hidrogênio, segundo Tien e Kirk (1984). O meio reacional foi composto de 500 µL de sobrenadante do extrato enzimático centrifugado, 200 µL de álcool veratrílico (2 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M; pH 3,0) e 200 µL de peróxido de hidrogênio (2 mM). A formação de aldeído veratrílico foi



acompanhada pela leitura da absorvância a 310 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP-2000 UV) por 5 minutos, com registros a cada 10 segundos.

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

### **Testes de solubilidade do gossipol sintético**

Diferentes solventes foram avaliados quanto à capacidade de solubilizar gossipol sintético (SIGMA-ALDRICH). Para isso, foi utilizado gossipol sintético, isto é, o ácido acético dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido 10 mg/mL).

Foram testados água mili-Q, acetonitrila e tampão fosfato de sódio pH 6,5 (100 mM), após a adição de 10  $\mu\text{L}$  da solução de gossipol ácido acético em 1 mL para cada solvente. Como controle, foi utilizado gossipol dissolvido em DMSO. Todas as amostras foram incubadas em agitação de 240 rpm a 37 °C, durante 120 minutos. Em seguida, foram determinadas as concentrações do gossipol.

### **Degradação do gossipol sintético a partir da utilização de extrato bruto fungico**

Os extratos brutos, obtidos a partir de CAT e CAT-TR, foram filtrados através do sistema Amincon, com uma pressão de 2,5 kgf/cm<sup>2</sup> produzida pela injeção de ar comprimido na câmara de ultrafiltração. Os extratos foram ultrafiltrados em membranas de celulose regeneradas, com diferentes *cut-offs*: 300, 100 e 50 kDa (PM10 Millipore Co., MA, EUA), resultando em frações concentradas e ultrafiltradas para cada uma das membranas usadas.

Logo após, aos extratos fracionados (1 mL) foram adicionados gossipol sintético (10 mg/mL), incubados em agitação de 240 rpm por 60, 120 e 240 minutos. Após esse tempo, foram adicionados (10  $\mu\text{L}$ ) ao tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,5 (1 mL), centrifugados a 8.000 rpm por 5 minutos a 5 °C. Por fim, os sobrenadantes foram utilizados para quantificações de gossipol. Como controles, foram utilizados solução de gossipol sintético 100% e extratos brutos, sem GL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## **Purificação parcial do extrato bruto e separação das proteínas**

O ultrafiltrado-retido na membrana de 50 kDa (UF-R50) foi utilizado para purificação parcial em FPLC por meio de cromatografia de exclusão molecular.

O UF-R50 foi dialisado por três vezes em tampão Tris HCl pH 7,0 contendo 0,15 M de NaCl pra aplicação em coluna de exclusão molecular Superdex S-200, previamente acoplada em Akta Pure (GE Helthcare). A coluna foi equilibrada com o mesmo tampão da diálise (48 mL) da amostra, em fluxo de 0,5 mL/min. Os processos de injeção e eluição de proteínas foram conduzidos em fluxo de 0,5 mL/min. Na etapa de eluição foram coletadas as frações (2 mL) que apresentavam pico de absorbância a 280 nm.

As frações provenientes das amostras CAT (S1; S2; S3; S4; S5; S6; S7; S8 e S9) e CAT-TR (S2; S3; S4; S5; S6; S7; S8) foram eluídas após as etapas cromatográficas (2 mL), foram utilizadas em ensaios de degradação de gossipol sintético (gossipol ácido acético 10 mg/mL), como também para dosagem de proteína total (A280 nm) e atividades de lacase.

Para os ensaios de degradação de GL o volume de 2 mL das frações eluídas foram concentradas e dialisadas em sistema Amicon por 4 vezes em tampão fosfato de sódio (100 mM) pH 6,5. Foram usados 200 µL de cada fração e incubadas em 2 µL de gossipol sintético, incubados a 37 °C durante 120 minutos a 240 rpm. Do resultante da amostra de 10 µL foram diluídos em 1 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,5 e quantificado o gossipol residual.

## **SDS-PAGE: Eletroforese desnaturante**

O perfil proteico das frações eluídas em coluna superdex S 200 foi analisado quanto ao grau de pureza, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio SDS PAGE (12% p/v), em condições desnaturantes, conforme método preconizado por Laemmil (1970). A coloração foi feita com uma solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>).

Após a diálise, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra 1X [(tampão Tris-HCl 1M; pH 6,8 – 1,2 % (v/v)], β-mercaptoetanol – 1 % (v/v) e fervidas à 100 °C por 10 minutos para desnaturação das proteínas; em seguida, foram aplicadas ao gel de proteína. A eletroforese foi realizada em um sistema Hoefer mini

VE system (Amersham Pharmacia Biotech), contendo tampão tris-glicina 1X à temperatura ambiente, a 32 mA. Após eletroforese, o gel foi corado para proteínas, utilizando o método descrito por Nesterenko, Tilley e Upton (1994).

O gel foi colocado em solução fixadora [60 mL acetona p.a. 50% (v/v); 1,5 mL ácido tricloroacético p.a. 50% (v/v); 25 µL formaldeído p.a. 37%(v/v)], por 5 minutos. Posteriormente, foi rinsado usando água destilada por 3 vezes durante 5 segundos cada, seguidas de lavagens com água destilada por 5 minutos e, novamente, rinsadas com água destilada por 3 vezes por 5 segundos cada. Na sequência, foi realizado o pré-tratamento do gel. Foram adicionados 60 mL de acetona p.a. 50% (v/v) e mantidos por 5 minutos, seguido de incubação com 100 µL de tiosulfato de sódio pentahidratado p.a. 10% (previamente diluído em 60 mL de água destilada) por 1 minuto e, então, realizadas 3 lavagens usando água destilada por 5 segundos cada.

A próxima etapa consistiu da impregnação do gel. Para tal, foi utilizado 0,8 mL de  $\text{AgNO}_3$  (nitratato de prata) e 0,6 mL formaldeído p.a 37% dissolvidos em 60 mL de água destilada. Foi novamente rinsado (lavagem com água destilada por 2x durante 5 segundos cada). Posteriormente, foi adicionado ao gel uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (carbonato de sódio) previamente dissolvido em água destilada (1,2 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 60 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada;), além de 25 µL de formaldeído p.a 37% (v/v) e 25 µL  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (tiosulfato de sódio pentahidratado). O gel foi mantido nessa solução entre 10-20 segundos para revelação das bandas de proteínas. Ao final, a reação foi parada pelo emprego de ácido acético 1% (v/v) por 30 segundos, seguida da última rinsada por 10 segundos. Todas as etapas foram realizadas sob agitação.

### **Análises do extrato bruto na degradação de inibidores enzimáticos**

Os extratos brutos obtidos a partir do cultivo do macrofungo em CAT e CAT-TR, foram utilizados para avaliar sua efetividade na degradação de diferentes inibidores enzimáticos. Nesse ensaio foram utilizadas algumas substâncias químicas: ácido sinápico, ácido cumárico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido ferúlico, hidroximetilfurfural (HMF), furfural, vanilina, seringaldeído, ácido láctico, ácido succínico, ácido levulínico, ácido acético e ácido fórmico. Foram preparadas soluções contendo 1 g/L para cada inibidor. Dois *mix* destas soluções foram obtidos: o primeiro, contendo os nove primeiros inibidores mencionados e, o segundo, todos os outros.

Foram usados 0,5 mL de cada *mix* e incubados separadamente em 0,5 mL dos extratos brutos de CAT e CAT-TR, incubados por 240 minutos a 37 °C a 240 rpm. Foram realizados controles contendo gossipol sintético, bem como o extrato sem o GL. Todos os ensaios em triplicata.

### **Determinação da degradação dos inibidores enzimáticos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Soluções padrões 1 g/L de cada inibidor foram utilizadas. A partir dessas soluções de estoque, foram realizadas diluições para a confecção das curvas analíticas, permitindo a determinação da linearidade na faixa dinâmica de trabalho e do limite.

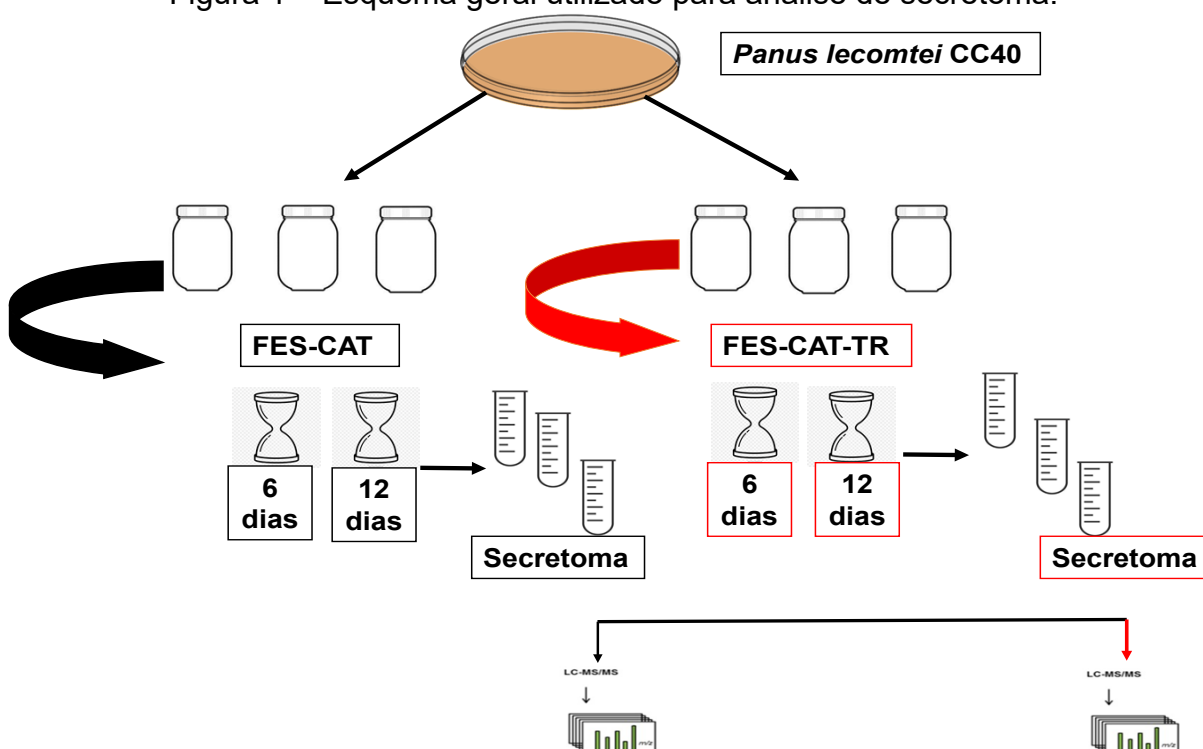
O sistema instrumental foi um cromatógrafo líquido de ultra eficiência-(UHPLC), com detectores PDA e índice de refração (RID), modelo Agilent 1290 Infinity. Dois métodos foram utilizados para detecção dos inibidores presentes em cada *mix* incubado com os EB's. Para o primeiro método foi utilizado o injetor automático e detector de arranjos de diodos (DAD). A eluição do gradiente foi realizada utilizando uma fase móvel começando com A (Ácido Fórmico 0.1% v/v) como solvente aquoso, e orgânico B (Acetonitrila), com diferentes variações 0 min (90% de A e 10% de B), 5 min (80% de A e 20% de B), 7.5 min (75% de A e 25% de B) e 12.5 min (55% de A e 45% de B), numa coluna Acquity UPLC HSS T3 (2.1 X 150 nm, 2.6 µm) com pré-coluna. Foi utilizado um fluxo de 0,4 mL/minuto. Os sinais foram monitorados a 270 nm (Ácido Gálico, Ácido Vanílico), 280 nm (HMF, Furfural e Vanilina), 315 nm (Ácido Cumárico, Siringaldeído, Ácido Ferulico e Ácido Sinápico). A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C, com um volume de injeção de 1 µl da amostra.

O segundo método foi realizado em um sistema com injeção manual e detectores de índice de refração (RID). A eluição do gradiente foi realizada utilizando uma fase móvel contendo 5 mM de ácido sulfúrico, numa coluna Aminex HPX-87H com pré-coluna. Foi aplicado um fluxo de 0,6 mL/ minuto. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C, e do detector a 45 °C, com um volume de injeção de 10 µl da amostra. Tal método foi utilizado para monitorar ácido láctico, ácido succínico, ácido levulínico, ácido acético, ácido fórmico. Os índices de quantificação de degradação dos inibidores foram plotados em termos percentuais.

## Análise do secretoma global do fungo *Panus lecomtei* CC40

O perfil proteico do secretoma do *P. lecomtei* CC40 foi obtido da fermentação em estado sólido utilizando os substratos CAT (com gossipol livre) e CAT-TR (sem gossipol livre) nos tempos de cultivo 6 e 12 dias (FIGURA 1). Os tempos de fermentação para obtenção dos secretomas foram escolhidos com base nos resultados da curva de degradação de gossipol e produção de enzimas conforme descrito em etapas anteriores.

Figura 1 – Esquema geral utilizado para análise de secretoma.



Fonte: O autor.

\* O secretoma global do fungo *Panus lecomtei* CC40 foi obtido a partir do seu crescimento nos substratos caroço de algodão comum (CAT) e caroço de algodão tratado quimicamente (CAT-TR).

## Preparo e processamento das amostras

As amostras foram obtidas conforme mencionado no item obtenção e caracterização de extrato bruto. Após a obtenção, foram feitas dessalinizações, dosagem de proteínas (método BCA), redução com DTT, alquilação com iodoacetamida e digestão triptica. Os peptídeos obtidos foram dessalinizados em microcolunas C-18 e quantificados pelo sistema Qubit. Alíquotas dos secretomas (CC40-CAT e CC40-CAT-TR) contendo 20 µg de proteína total foram precipitadas

(CROWELL; WALL; DOUCETTE, 2013), secas sob vácuo e reconstituídas em 150  $\mu$ L de ureia (8 M), NaCl (7,5 M), bicarbonato de trietilamina 50 mM (TEAB), NaCl 7,5 mM, bicarbonato de trietilamina 50 mM (TEAB), ditioneitol 5 mM (DTT), pH 8,2 e incubado a 55 °C durante 25 minutos. Iodoacetamida foi acrescentada a uma concentração final de 14 mM seguido de 40 min de incubação a 25 °C no escuro. Adicionou-se DTT numa concentração final de 10 mM e a mistura reacional foi, então, diluída cinco vezes em 25 mM de TEAB, pH 7,9, seguida de adição de  $\text{CaCl}_2$  até uma concentração final de 1 mM. As amostras foram, então, digeridas com tripsina porcina modificada (1  $\mu$ g por 50  $\mu$ g de proteína total) a 37 °C, seguindo-se de acréscimo de ácido trifluoroacético (TFA) até uma concentração final de 0,5% (v/v). As amostras foram secas a vácuo, reconstituídas em TFA a 0,1% (v/v) e dessalinizadas, usando StageTips (preenchidas com membrana Empore C18) (RAPPSILBER; MANN, 2007). Os peptídeos trípticos foram quantificados por fluorometria (Qubit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

### **Análise por LC-MS/MS**

A análise cromatográfica e de espectrometria de massas foi realizada como descrito por Arshid *et al.* (2017) e Kalli *et al.* (2013), com as adaptações descritas a seguir.

### **Cromatografia**

Os peptídeos obtidos foram injetados em sistema cromatográfico (Dionex Ultimate 3000 RSLCnano UPLC, Thermo, USA), configurado com coluna de aprisionamento (*trap column*) de 3 cm x 100  $\mu$ m contendo partículas de C18 5  $\mu$ m, 120 Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH), conectada em série à coluna analítica de 24 cm x 75  $\mu$ m contendo partículas de C18 3  $\mu$ m, 120 Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH). As amostras foram injetadas de forma a se obter 1  $\mu$ g na coluna, submetidas à gradiente linear de eluição com os solventes A (ácido fórmico 0,1% em água) e B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila), de 2% B a 35% B durante 155 min.

### **Espectrometria**

As frações separadas no sistema cromatográfico foram eluídas diretamente na fonte de ionização de um espectrômetro de massas Orbitrap Elite (Thermo, USA), configurado para operar em modo DDA (*data dependent acquisition* – aquisição de dados dependente), sendo que os espectros de MS1 foram adquiridos no analisador orbitrap, com resolução de 120000 e faixa de m/z entre 300 e 1650. Os 20 íons mais intensos, acima do limite de intensidade de 3000 foram fragmentados, gerando espectros de MS2, no analisador ion trap por CID (HAWKRIDGE, 2014; ADREWS *et al.*, 2011). A reanálise de íons já fragmentados foi inibida por exclusão dinâmica (ASHID *et al.*, 2017), favorecendo a identificação de peptídeos menos abundantes.

## **Análise de dados**

Os espectros obtidos foram analisados de forma qualitativa e quantitativa, permitindo que fosse possível identificar o conjunto total de proteínas detectáveis nas amostras, bem como avaliar, quantitativamente, as proteínas que apresentaram abundância relativa significativamente diferente entre as condições. Estas proteínas foram analisadas em maior detalhe, fornecendo informações sobre os componentes que melhor distinguem entre as condições e agrupadas quanto às vias, aos termos GO e às interações. Os métodos utilizados, de forma geral, seguem a estratégia descrita em Arshid *et al.* (2017) com adaptações detalhadas a seguir.

## **Análise Qualitativa**

O conjunto completo de espectros foi analisado utilizando-se o *software* Peaks versão 7.0 (BSI, USA), com os seguintes parâmetros: banco de dados obtido do repositório Uniprot em outubro de 2018, filtrado para a ordem Polyporales, tax. ID 5303 que contém a espécie *Panus lecomtei*, tax ID 38810 (Polyporales – Panaceae – *Panus* – *Panus lecomtei*), adicionado ao banco filtrado para a espécie *Gossypium hirsutum*, tax ID 3635. O banco combinado foi submetido à remoção de sequências redundantes utilizando-se o *software* FASTAtools<sup>1</sup>. A busca foi realizada com base em sequenciamento de novo e em PSM, tolerância para a massa do precursor de 10 ppm, e para os fragmentos de 0,5 Da, tolerância de até duas clivagens perdidas,

---

<sup>1</sup> <http://lbqp.unb.br/LBQPtools/>.

carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. Além disso, foram ativados os módulos de busca por modificações do banco Unimod com base em padrões de fragmentação, bem como busca de mutações pontuais (VALIKANGAS; SUOMI; ELO, 2017).

### **Análise Quantitativa**

Os espectros foram analisados com auxílio do programa Progenesis Q1 for Proteomics (Waters, USA) (CHONG *et al.*, 2018), com o qual foi realizado o alinhamento dos cromatogramas, a quantificação por área dos picos extraídos (XIC – *extracted ion chromatogram*), normalização e análise estatística (ANOVA) dos eventos de MS1. Os eventos significativamente diferentes ( $p$ -valor  $<0,05$ ), tiveram seus espectros de MS2 submetidos à identificação utilizando-se o programa Peaks, com os mesmos parâmetros descritos no tópico anterior. Após a inferência de proteínas, a quantificação foi refinada, considerando a média dos peptídeos atribuídos a cada proteína, e foi realizada a análise estatística em nível de proteínas, sendo consideradas reguladas, as proteínas que apresentaram ANOVA  $p$ -valor  $<0.05$ . Tais proteínas foram submetidas à análise multivariada de PCA e agrupamento em *clusters* de acordo com os perfis de abundância relativa. Para compatibilidade com os demais experimentos previamente realizados, optou-se por analisar as condições comparando-se 6 CAT x 6 CAT-TR e 12 CAT X 12 CAT-TR correspondente, respectivamente, a *Panus lecomtei* CC40 cultivado em caroço de algodão (CAT) comum no tempo 6 dias; e *Panus lecomtei* CC40 cultivado em caroço de algodão (CAT-TR) tratado quimicamente no tempo 6 dias, ou seja, na presença e ausência de gossipol livre. A mesma nomenclatura foi usada para o tempo 12 dias.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

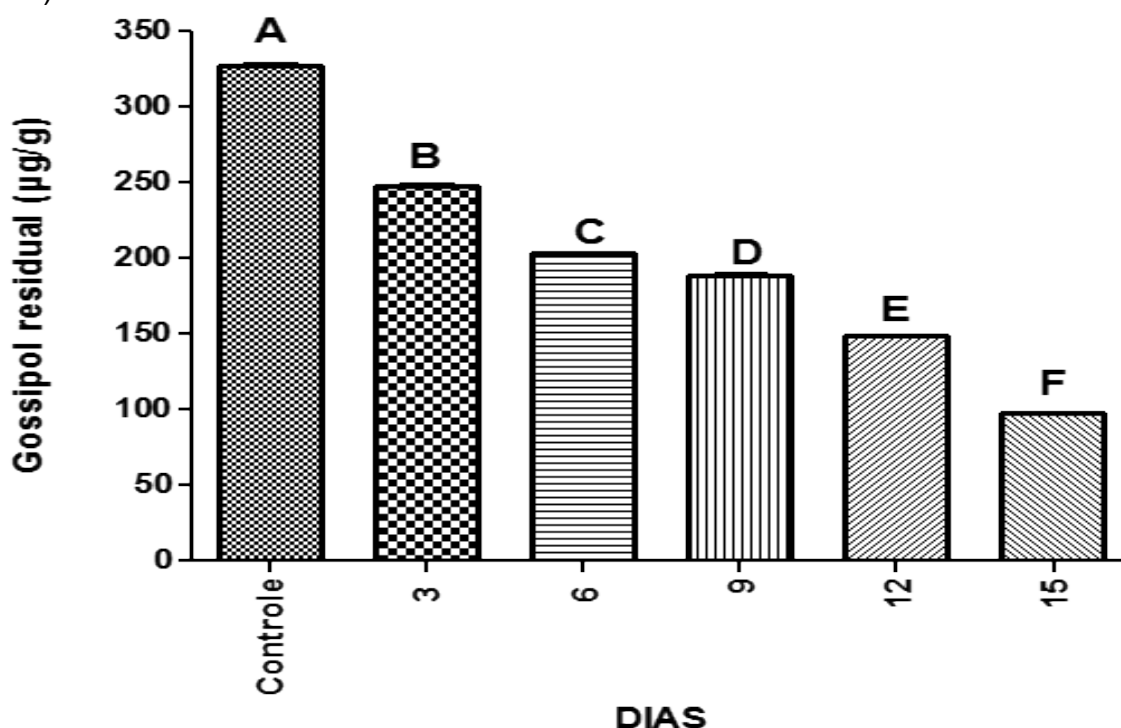
### **Degradação de gossipol livre pelo macrofungo *Panus lecomtei* CC40 durante 15 dias de cultivo em estado sólido.**

Os resultados das avaliações de degradação de gossipol livre por ação do macrofungo *Panus lecomtei* CC40 incubado em caroço de algodão comum (CAT) em fermentação em estado sólido após 15 dias são mostrados na Figura 2.



A degradação do GL foi aumentando com passar dos dias de cultivo do *P. lecomtei*, alcançando mais de 70% em 15 dias. O tratamento por autoclavagem do caroço de algodão *in natura* por 15 minutos, necessário para esterilização do cultivo fungico, apresentou quantidade acima de 350 µg/g de GL, utilizadas aqui como controle.

Figura 2 - Degradação de gossipol livre por ação do macrofungo *Panus lecomtei* CC40 durante 15 dias de cultivo em fermentação em estado sólido de caroço de algodão (CAT) comum.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Quando comparados os diferentes níveis de degradação entre os pontos, levando em consideração o tempo anterior como controle, em termos percentuais, a maior diferença foi alcançada no tempo 15º dia em relação ao 12º dia, com índice de correspondente a 34,46%. Os dados mostraram que a maior taxa de degradação foi alcançada no último tempo avaliado (15º dia) representada por 70,27% (em relação ao controle). Desse modo, os resultados evidenciam que a degradação de GL no substrato caroço de algodão por ação do macrofungo é dado em função do seu tempo de crescimento, provavelmente em função da liberação das enzimas destoxicadoras e acesso das mesmas as regiões já colonizadas.

Diante dessas informações, o experimento foi repetido, e além das avaliações de degradação de GL, também foram investigadas produções de enzimas (lacase,

peroxidases e proteases) relatadas na literatura como capazes de atuar na degradação de fatores tóxicos e antinutricionais.

Inúmeros trabalhos têm mostrado a ação de microrganismos em diferentes processos como na destoxificação e degradação de compostos tóxicos e xenobióticos. Cupul e Vasquez (2016) relataram que os extratos fúngicos do monocultivo de *Trametes maxima* e/ou quando em cocultivo com *Paecilomyces carneus* foram capazes de degradar a atrazina em solo agrícola. Os macrofungos podem processar diversos xenobióticos, por meio das atividades de enzimas (peroxidases e lacase), tais como as dioxinas, bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarbonetos de petróleo, HAP, trinitroluenos, efluentes de corantes industriais, herbicidas e pesticidas (FERNANDO; AUST, 1994; NOVOTNÝ *et al.*, 1997, BARR; AUST, 1994a, 1994b; CAMERON *et al.*, 2001; DOSORETZ; ŠAŠEK, 2000; REDDY; ADINARAYANA; MATHEW, 2001; MAGAN; FRAGOEIRO; BASTOS, 2010).

Outros grupos de substâncias como fatores tóxicos e/ou antinutricionais presentes em vegetais também foram degradados pela ação de macrofungos. Gomes *et al.*, (2018) relatam em revisão que dentre os métodos com potencial de degradação de ésteres de forbol (fator tóxico presente em sementes de pinhão-mansão), o cultivo microbiano, macrofungos principalmente, está na lista dos mais promissores.

Em relação ao gossipol, estudos apontam potencial degradação por ação de fungos (MAGESHWARAN; MAJEE; PANDIYAN, 2017). Neste trabalho, os autores cultivaram diferentes espécies fungos em torta de caroço de algodão, verificando taxas de degradação de gossipol livre de até 65,2%. Visando mostrar possíveis mecanismos pelos quais os fungos realizam esse processo, Yang *et al.* (2012) mostraram a participação de enzimas proteases; entretanto, não apresentam como essas enzimas realizam o processamento.

De acordo com Kulshreshtha e Sharma (2014) e Carvalho (2011), possivelmente, a principal enzima relacionada com a degradação do GL seja a manganês peroxidase, enquanto que para Ardon *et al.* (1996), a responsável primordial seria a lacase. De certo modo, é consensual as hipóteses levantadas nas literaturas consultadas de que a degradação é realizada por rotas enzimáticas, apesar de não serem, ainda, identificadas e/ou bem compreendidas. Portanto, não é possível dizer ao certo quais mecanismos fisiológicos os fungos utilizam para a degradação de GL. Há autores propondo que as reações possam envolver interações com diferentes sistemas bioquímicos como as enzimas lignolíticas, quando associado com o sistema

citocromo P450 monooxigenase, glicosiltransferases, além de possíveis diferentes reações com radicais hidroxílicos presentes na molécula de gossipol (KULSHRESHTHA; SHARMA, 2014).

Conforme mostrado não há descrições moleculares sobre os mecanismos realizados pelos fungos na degradação de GL. Por outro lado, diferentes ferramentas usadas em áreas de estudo como genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e secretômica são essenciais para o entendimento da degradação de diferentes compostos tóxicos e antinutricionais (GOMES *et al.*, 2018).

### **Curva de produção de enzimas x degradação de gossipol livre por ação do macrofungo durante 15 dias de fermentação em estado sólido.**

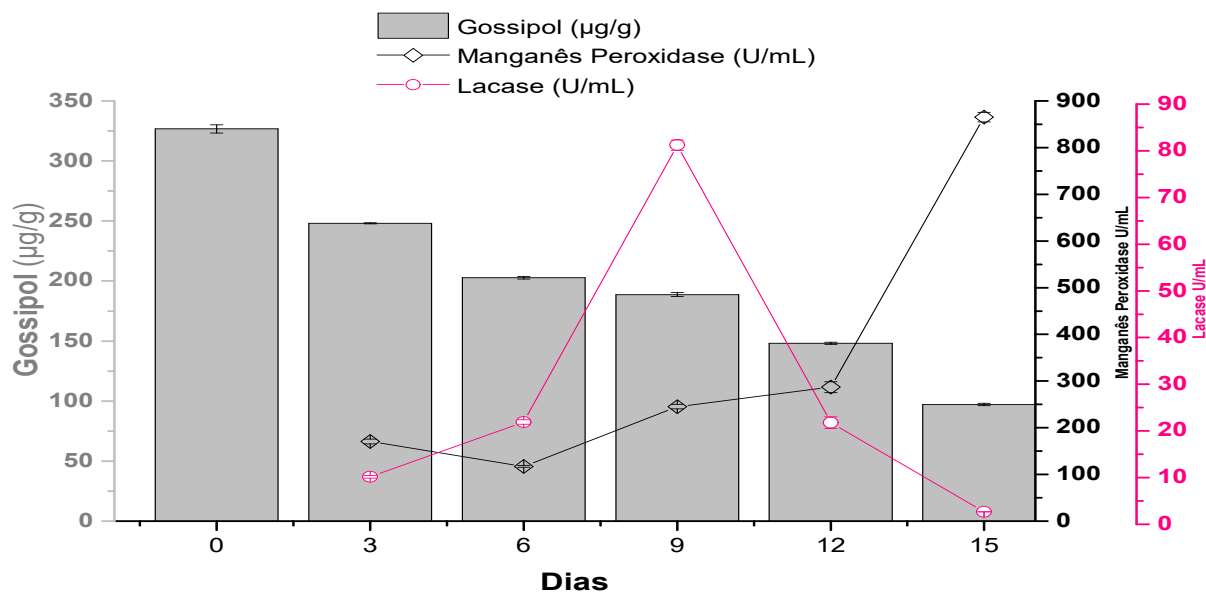
Conforme mostrado no tópico anterior, a degradação do gossipol livre é realizada em função do tempo de crescimento do macrofungo. Neste experimento, buscou-se avaliar a produção de enzimas durante esses períodos. A degradação do GL versus a produção de enzimas lignocelulolíticas foi realizada utilizando como substrato de crescimento para o macrofungo, o caroço de algodão comum (CAT-pH 6.0). Além disso, visando verificar se o fungo seria capaz de colonizar e produzir enzimas em um substrato sem gossipol livre, também foi estudado o caroço de algodão tratado quimicamente (CAT-TR). Esse meio, conforme relatado no Capítulo III, consiste em uma pré-exposição do CAT em substância alcalina (pH 12).

Os resultados mostraram a capacidade do macrofungo *P. lecomtei* CC40 em crescer nas duas condições testadas, sem diferença na velocidade de crescimento (dados não mostrados). Foram monitoradas as enzimas lacase, manganês peroxidase e protease durante todo o tempo de cultivo (15 dias). Em ambos os cultivos (CAT e CAT-TR), o macrofungo foi capaz de produzir todas as enzimas em diferentes níveis, em todos os pontos analisados (3, 6, 9, 12 e 15 dias), conforme mostrado nas Figuras 26, 27, 28 e 29. Diante destes dados, buscou-se estabelecer uma provável relação entre a degradação de gossipol livre e as atividades das enzimas lignocelulolíticas e proteases avaliadas. Posteriormente, estes resultados serviram como direcionamento para análises dos secretomas desse fungo em dois diferentes substratos (CAT: presença e CAT-TR: ausência de gossipol livre).

A enzima lignina peroxidase também foi avaliada, entretanto, de acordo com os métodos empregados nesta tese (espectrofotometria) não foi possível detectar

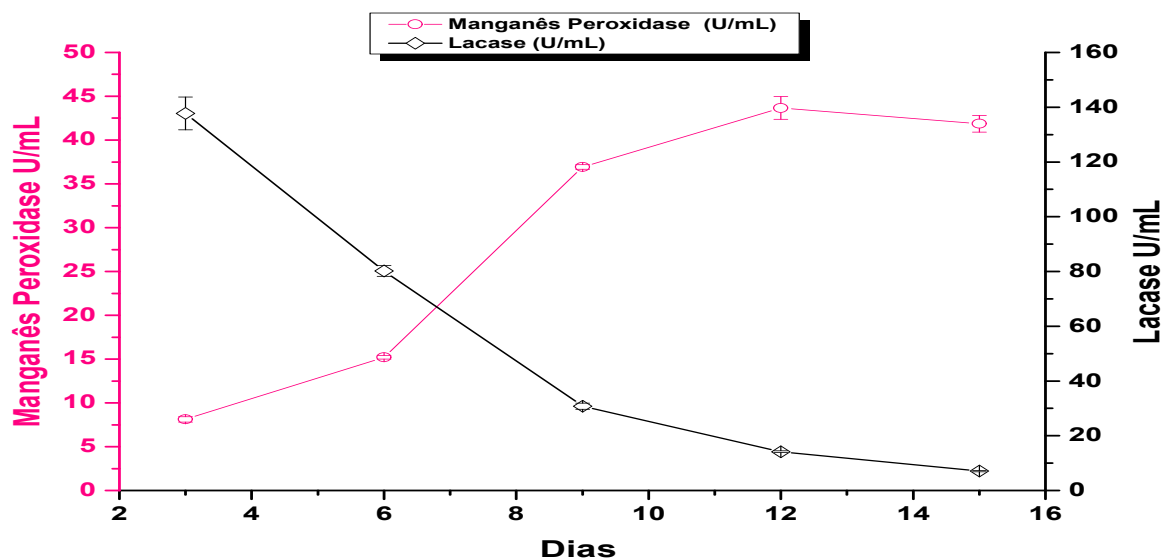
essa enzima nas duas condições avaliadas. Enquanto que as atividades para lacase e manganês peroxidase foram observadas durante cultivo em ambas condições (FIGURAS 3; 4)

Figura 3 - Curva de indução de atividades enzimáticas de manganês peroxidase e lacase (UI/mL), do macrofungo CC40 *Panus lecomtei*, crescidas em caroço de algodão comum (CAT) durante 15 dias.



Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

Figura 4 - Curva de indução de atividades enzimáticas de manganês peroxidase e lacase (UI/mL), do macrofungo CC40 *Panus lecomtei*, crescidas em caroço de algodão tratado quimicamente (CAT-TR) comum durante 15 dias.



Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

Diferentes perfis de produção de lacase foram observados nos dois substratos colonizados por *P. lecomtei*. No substrato CAT, a enzima é produzida e aumenta progressivamente desde o tempo inicial (3º dia) até o 9º dia (o maior valor encontrado foi de 81,13 UI/mL). Após esse período, o teor decresce em função do tempo, chegando a 2,86 UI/mL no tempo final 15º dia. Diferente do observado para o substrato CAT-TR, no qual o tempo inicial 3º dia é iniciado com o maior valor encontrado 140,66 UI/mL (maior valor para essa enzima também quando comparado os dois substratos), e diminui,  $\pm 50\%$ , no tempo 6º dia (80,20 UI/mL), seguindo com decréscimos até o tempo final 15º dia (7,05 UI/mL), sendo este o menor valor encontrado.

Ao comparar os dados de degradação de gossipol livre com a produção de lacase, verifica-se uma provável relação entre o aumento na degradação de gossipol livre e o aumento de produção para essa enzima até o tempo 12º dia (CAT). As análises do substrato sem gossipol livre (CAT-TR), mostram maiores valores de lacases no tempos iniciais e diminuições em função do tempo de colonização.

Os maiores percentuais observados para lacase no extrato proveniente de CAT-TR podem ter ocorrido devido ao duplo pré-tratamento nos quais esse substrato passou (físico: autoclavagem; químico: hidróxido de cálcio), uma vez que, sabidamente, os pré-tratamentos alcalinos estão entre os mais efetivos na remoção de lignina, o que pode ter viabilizado o acesso do fungo em coprodutos inespecíficos derivados da biomassa, utilizando das enzimas secretadas por estes (KUBICEK, 2012). Portanto, o macrofungo *Panus lecomtei* CC40 foi capaz de se ligar aos substratos inespecíficos gerados por esses tratamentos.

Análises enzimáticas da colonização pelo macrofungo para a enzima manganês peroxidase mostraram, para o substrato CAT, a produção inicial de 169,48 UI/mL com decréscimo no ponto seguinte avaliado (6º dia), e aumentos em função do tempo de colonização, obtendo o maior valor no tempo final 15º dia (869,70 UI/mL). Para o substrato CAT-TR, inicialmente, o tempo 3º dia começa com baixa produção (8,24 UI/mL) e aumenta até o tempo 12º dia (ponto com maior valor: 43,89 UI/mL), com acentuada diminuição no último ponto avaliado (41,99 UI/mL). De forma geral, diferente do apresentado para a enzima lacase, o maior valor para essa enzima foi observado no cultivo em CAT.

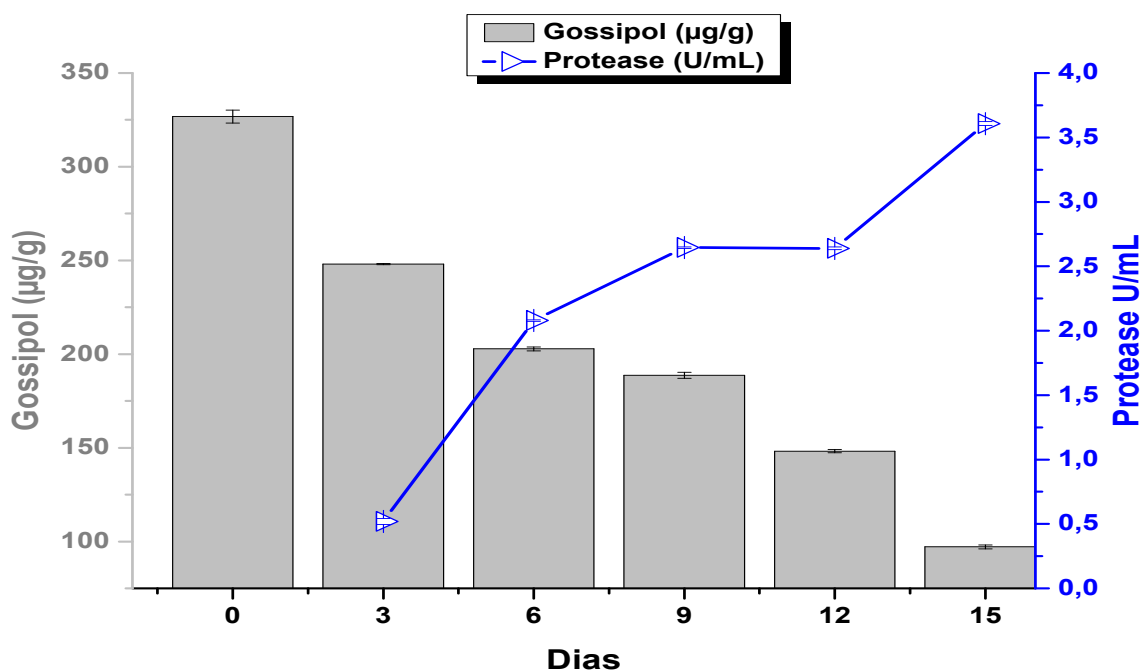
Comparando os dados de produção dessa enzima com a degradação de gossipol livre, é evidenciado que, no tempo inicial (3º dia), manganês peroxidase já é excretada; apesar da diminuição no tempo 6º dia, nos tempos seguintes analisados

há aumentos proporcionais aos acréscimos na degradação de gossipol livre. O maior valor observado foi no último ponto (15º dia), mesmo momento em que há as menores concentrações de gossipol residual.

Os perfis de produção da enzima protease (FIGURAS 5; 6) foram similares em ambos os substratos avaliados, sendo que, de modo geral, apresentaram aumentos em função do tempo de incubação e foi proporcional ao aumento na degradação de GL. A quantificação dessa enzima mostrou que no substrato CAT, os teores variaram de 0,53 UI/mL (tempo 3º dia) a 3,61 UI/mL no tempo 15º dia (maior valor detectado). Nesse substrato, os menores e maiores valores de protease corresponderam ao tempo de início e final dos tempos avaliados para degradação de gossipol (3º e 15º dia). Assim como o substrato CAT-TR que variou de 0,08 (tempo 3º dia) a 0,79 UI/mL no tempo 15º dia (maior valor observado), também correspondente ao tempo inicial e final de degradação de gossipol.

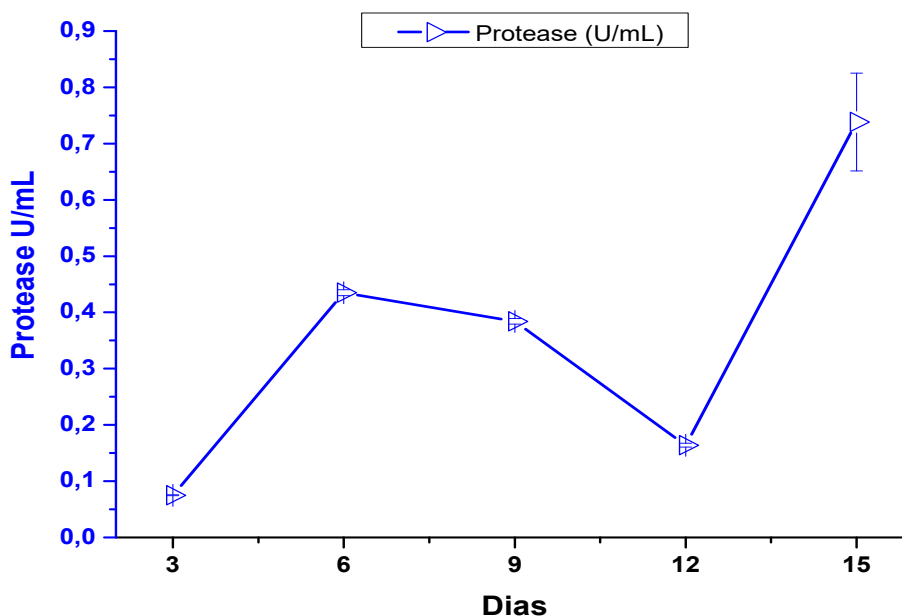
Quando realizada uma comparação global entre os dois substratos, observa-se maiores produções para essa enzima no substrato CAT quando comparados com o CAT-TR.

Figura 5 - Curva de indução de atividades enzimáticas de proteases (UI/mL), do macrofungo CC40 *Panus lecomtei*, crescidas em caroço de algodão comum (CAT) durante 15 dias.



Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

Figura 6 - Curva de indução de atividades enzimáticas de proteases (UI/mL), do macrofungo CC40 *Panus lecomtei*, crescidas em caroço de algodão tratado quimicamente (CAT-TR) durante 15 dias.



Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

Os macrofungos secretam diversas enzimas oxidativas capazes de metabolizar os componentes fenólicos presentes nos materiais lignocelulósicos (FIGUEIRÓ, 2009). Elas também são chamadas de ligninases, termo utilizado para designar enzimas que degradam a lignina (DASHTBAN *et al.*, 2009). Todavia, as atividades das enzimas lignolíticas nem sempre estão correlacionadas com a degradação da lignocelulose, como também outros compostos presentes na célula vegetal, de modo que as funções do complexo enzimático lignolítico podem variar e ainda não são totalmente compreendidas (MILLATI *et al.*, 2011; SHRIVASTAVA *et al.*, 2011, VAN KUIJK *et al.*, 2015).

Enzimas lingocelulolíticas incluem lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase, que são capazes de degradar a lignina de forma seletiva e não seletiva (SOUZA; ROSADO, 2009). Enquanto as lacases oxidam uma variedade de compostos fenólicos presentes na molécula de lignina, a lignina peroxidase e manganês peroxidase oxidam os compostos não fenólicos (MILLATI *et al.*, 2011).

Os tempos de cultivo 6 e 12 dias foram escolhidos como os pontos para as análises de secretoma com base no perfil de secreção e enzimas, esses tempos

corresponderam as fases log e estacionária de crescimento do fungo.

### **Degradação de gossipol livre por extratos brutos enzimáticos de *P. lecomtei* CC40.**

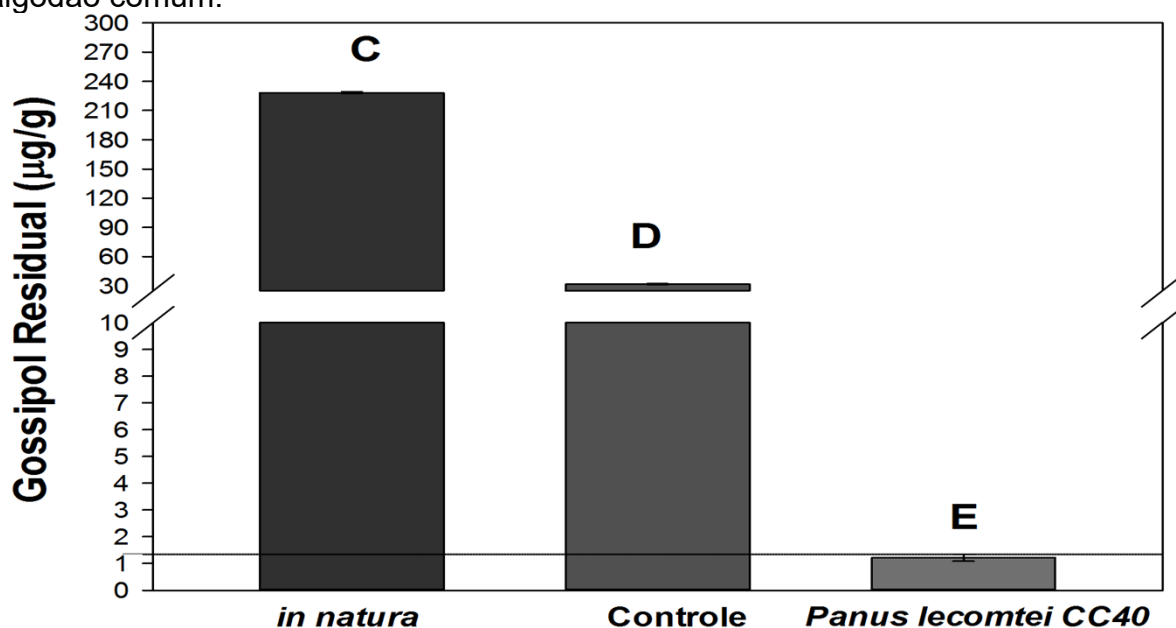
De acordo com os dados apresentados no Capítulo III e nos tópicos anteriores deste Capítulo, o macrofungo *Panus lecomtei* CC40 foi capaz de degradar gossipol livre presente em caroço de algodão *in natura* quando cultivado em fermentação em estado sólido e, durante esse processo, foram produzidas enzimas hidrolíticas oxidativas e proteolíticas.

A partir dos resultados obtidos com a degradação do GL obtidos do cultivo em FES de *P. lecomtei* e, também, devido às afirmações encontradas na literatura de que enzimas extracelulares de microrganismos se apresentam como agentes degradadores de tal composto, montou-se um experimento para degradação de GL por EB's do CC40. Deste modo buscou-se analisar se os EB's (CC40-CAT) seriam eficientes na degradação de gossipol livre presente em caroço de algodão *in natura* (CAT) – maior concentração de GL; e, em caroço de algodão geneticamente modificado (CAT-OGM) – menor concentração de GL. Os ensaios enzimáticos foram realizados com os substratos (CAT e CAT-OGM) previamente autoclavados, como forma de controle.

Os resultados obtidos mostraram que após 240 minutos de incubação, os Ebs de CC40 foram capazes de degradar o gossipol livre nos dois tipos de amostras de CAT, alcançando valores acima de 99% (FIGURAS 7; 8).



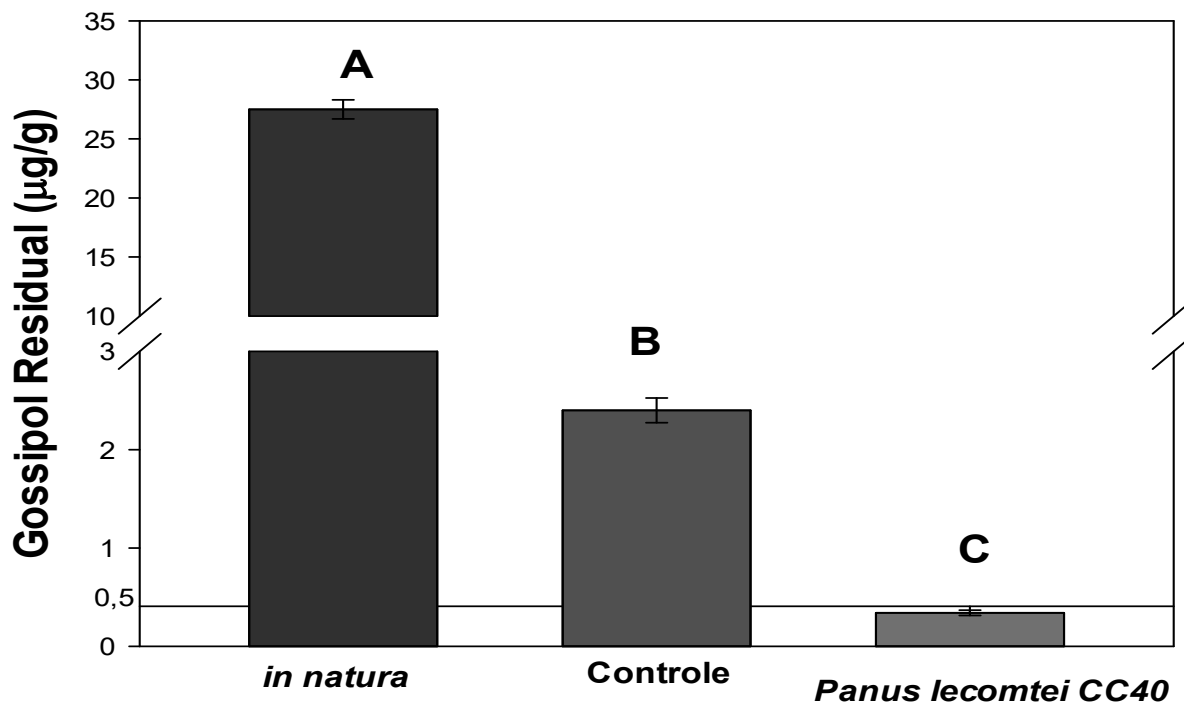
Figura 7 - Degradação de gossipol livre após 18 horas de incubação do extrato bruto (obtido por fermentação em estado sólido) de *Panus lecomtei* CC40 com Carozo de algodão comum.



Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

\* *In natura*: Carozo de algodão não autoclavado; Controle:carozo de algodão autoclavado; *Panus lecomtei* CC40: resultante da incubação do extrato bruto do macrofungo em carozo de algodão.

Figura 8 - Degradação de gossipol livre após 18 horas de incubação do extrato bruto (obtido por fermentação em estado sólido) de *Panus lecomtei* CC40 com Carozo de algodão geneticamente modificado.



Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

\* *In natura*: Carozo de algodão não autoclavado; Controle:carozo de algodão autoclavado; *Panus lecomtei* CC40: resultante da incubação do extrato bruto do macrofungo em carozo de algodão.

Diante dessas informações e dos resultados apontados, a ação dos extratos parece ser similar independente da quantidade de gossipol presente no substrato, (CAT possuía quase nove vezes mais gossipol em comparação com CAT-TR), permitindo, portanto, que esses resultados possam servir como base para possíveis projetos que avaliem a aplicação desses extratos.

Diferentes coprodutos de algodão contêm concentrações variáveis de GL. Essas variações podem ainda ser superiores aos dados apresentados. Seria interessante a realização de experimentos utilizando esses coprodutos, avaliando os diferentes níveis de GL por meio de métodos analíticos, o que poderia mostrar com precisão, por exemplo, as concentrações presentes dessa molécula na torta usada na alimentação do gado. Em termos nacionais ou mesmo regionais, no Brasil, quando o assunto é a regulamentação dos níveis de GL nos diferentes co-produtos de algodão, foram detectados a inexistência de quaisquer tipos de lei ou congêneres sobre esse tema.

Apesar da situação citada, existem alguns marcos regulatórios em outros Países. Para a *Food and Drug Administration-USA* (FDA), o gossipol livre em produtos alimentares não deve exceder 0,045%, isto é, 450 ppm. Para o grupo de Especialista em Proteínas da Organização da Agricultura e Alimentos das Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), os limites estabelecidos são de 0,060% ou 600 ppm de gossipol livre e 1,2% ou 12.000 ppm de gossipol total para consumo humano (LIADAKIS *et al.*, 1993; POORE; ROGERS, 1995). Mais recentemente, Alexander *et al.* (2008) descrevem um relatório técnico publicado para a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) sobre o nível máximo aceitável de gossipol na alimentação animal, a depender do animal pode chegar à até 500 mg/Kg. No presente estudo foram encontradas concentrações de GL que variaram de níveis máximos encontrados em sementes de algodão *in natura* de  $4886.84 \pm 6.85$  e níveis mínimos em torta de caroço de algodão após tratamento combinado (autoclavagem + FES) de  $0.847 \pm 0.078$ .

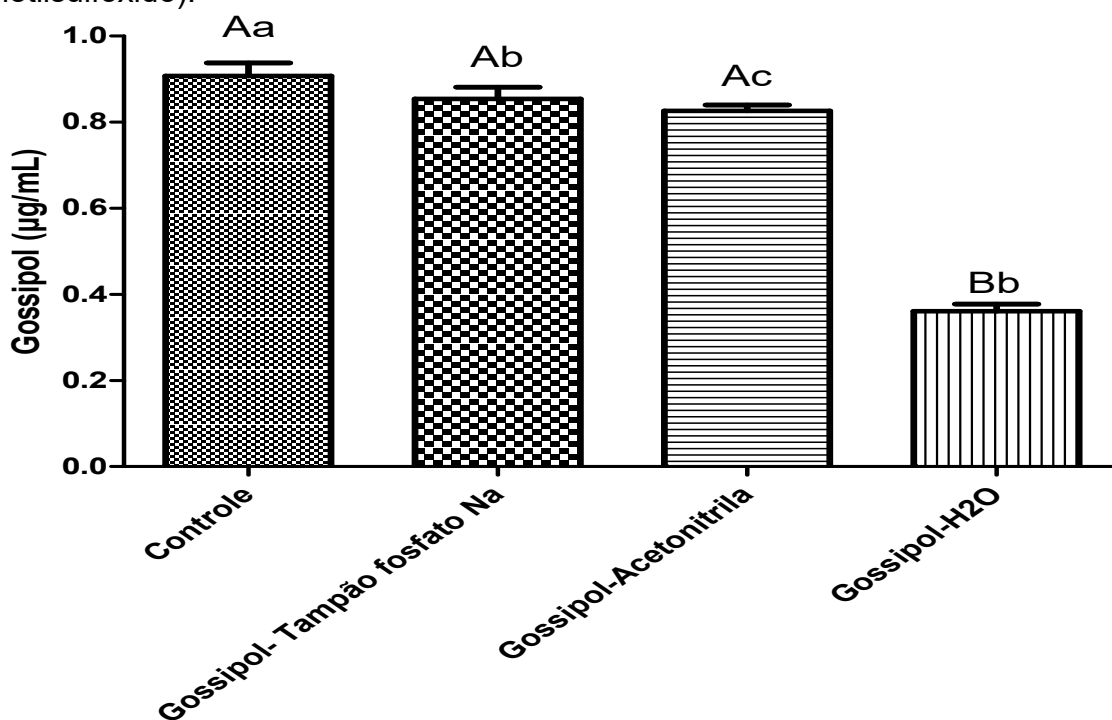
### **Testes de solubilidade de gossipol sintético em diferentes solventes**

Os dados apresentados anteriormente, mostraram que os EB's são capazes de degradar GL presentes na biomassa *in natura*. Assim, possivelmente os EB's também

seriam capazes de degradar gossipol sintético (gossipol acetato). Visando testar essa hipótese, primeiramente, foi estabelecido um solvente que pudesse ser eficaz na obtenção do extrato e que, ao mesmo tempo, permitisse uma adequada solubilidade para o gossipol sintético. Para isso, foram selecionados para testes os solventes: água, acetonitrila e tampão fosfato de sódio 100 MM pH 6,5.

Os resultados desse experimento mostraram diferentes níveis de recuperação de gossipol nos diferentes solventes (FIGURA 9). O tampão fosfato de sódio e acetonitrila não diferiram do controle (gossipol acetato dissolvido em DMSO), com taxas de recuperação superiores a 99% nos dois solventes. Por outro lado, houve diferença significativa quando utilizado a água como solvente, alcançando resultados de recuperação de até 50%. Isso demonstra que quando o gossipol é solubilizado diretamente em água ocorrem precipitações, inviabilizando a utilização desse solvente em extrações e testes de degradação de gossipol. De tal modo, o solvente tampão fosfato de sódio e a acetonitrila, seriam escolhas interessantes com base nas taxas de recuperação, porém, acetonitrila pode alterar as propriedades biológicas do extrato provocando inibição e desnaturação de enzimas, por exemplo, de modo que o tampão fosfato de sódio se tornou a escolha mais apropriada.

Figura 9 - Avaliação de solubilidade de gossipol sintético (gossipol acetato) em diferentes solventes, tendo como controle gossipol sintético dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido).



Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

### **Extratos brutos de *P. lecontei* na degradação do gossipol livre: ultrafiltração e purificação parcial.**

As amostras dos extratos fungicos (CAT e CAT-TR) obtidos a partir dos retidos na membrada de 50 kDa, aqui designados de CAT-R50 e CAT-TR-R50 foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular em coluna S-200.

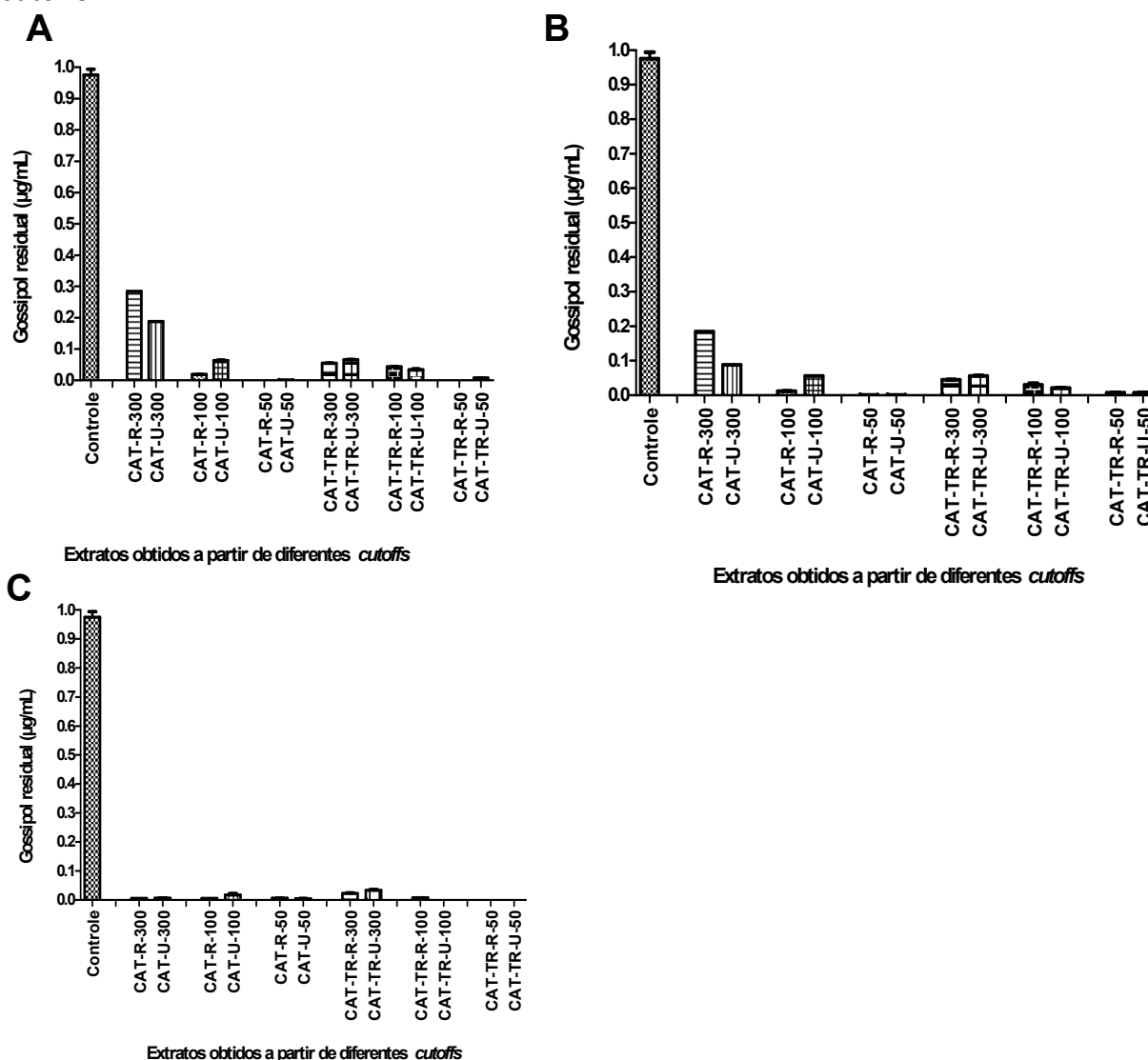
Extratos brutos de *P. lecontei* cultivados em CAT obtidos com 12 dias de cultivos foram ultrafiltrados e purificados parcialmente por cromatografia de exclusão molecular e avaliados quanto ao pontencial de degradação de GL sintético.

Os extratos ultrafiltrados do CC40 nas duas condições de cultivo – fontes de carbono (CAT ou CAT-TR) foram capazes de degradar o GL sintético em todos os tempos avaliados (60, 120 e 240 minutos) (FIGURAS 10-A; B; C). A degradação do GL foi progressiva ao longo do tempo, independente do tamanho da membrana utilizada.

As amostras retidas na membrana de 50 kDa para ambos os tipos de EB's ultrafiltrados foram mais eficientes na degradação do gossipol no menor tempo de incubação (60 minutos), apresentando valores proximos de zero ou zero de GL remanescente. Deste modo, as amostras dos retidos de 50 kDa dos dois EB's foram selecionados para purificação parcial por cromatografia por exclusão molecular.

Tal processo se tornou necessário, uma vez que extratos brutos provenientes desses tipos de amostras possuem diferentes interferentes (extrativos), que poderiam prejudicar as amostras qaundo aplicadas na coluna cromatográfica, facilitando, portanto, a busca de potenciais proteínas degradadoras de GL.

Figura 10 - Gossipol sintético remanescente após incubação com diferentes extratos obtidos da FES de *Panus lecomtei* CC40 em caroço de algodão comum (CAT) e tratado quimicamente (CAT-TR) com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e após ultrafiltrados com diferentes *cutoffs*-membrana.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Controle: 10 µg/mL (gossipol sintético); Tempos de incubação: A- 60 minutos; B- 120 minutos e C- 240 minutos. CAT: Caroço de Algodão Comum seguidos de: R-300 (ultrafiltrado retido em 300 kDa) e U-300 (ultrafiltrado permeado em 300 kDa), R-100 (ultrafiltrado retido em 100 kDa) e U-100 (ultrafiltrado permeado em 100 kDa), R-50 (ultrafiltrado retido em 50 kDa) e U-50 (ultrafiltrado permeado em 50 kDa). CAT-TR: Caroço de Algodão tratado com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , mesmo padrão de nomenclatura adotado conforme mostrado em CAT. Amostras realizadas em triplicatas e incubadas a 37 C por 240 rpm.

### Purificação Parcial: cromatografia de exclusão molecular e avaliação da efetividade de degradação de gossipol livre

As amostras dos s extratos fungicos (CAT e CAT-TR) obtidos a partir dos retidos na membrada de 50 kDa, aqui designados de CAT-R50 e CAT-TR-R50 foram

submetidos à cromatografia de exclusão molecular em coluna S-200.

As frações observadas para os dois retidos dos EB's apresentaram diferentes perfis. Para CAT-R50 foram obtidas nove (9) frações, enquanto que CAT-TR-R50 foram sete (7). Todas as frações foram quantificadas quanto à presença de proteína total (A280 e Bradford) e atividade da enzima lacase (usada como marcador).

Apenas as frações S2 e S3 (CAT) e S3 (CAT-TR), apresentaram atividade para a enzima lacase, conforme pode ser observado na Tabela 1.

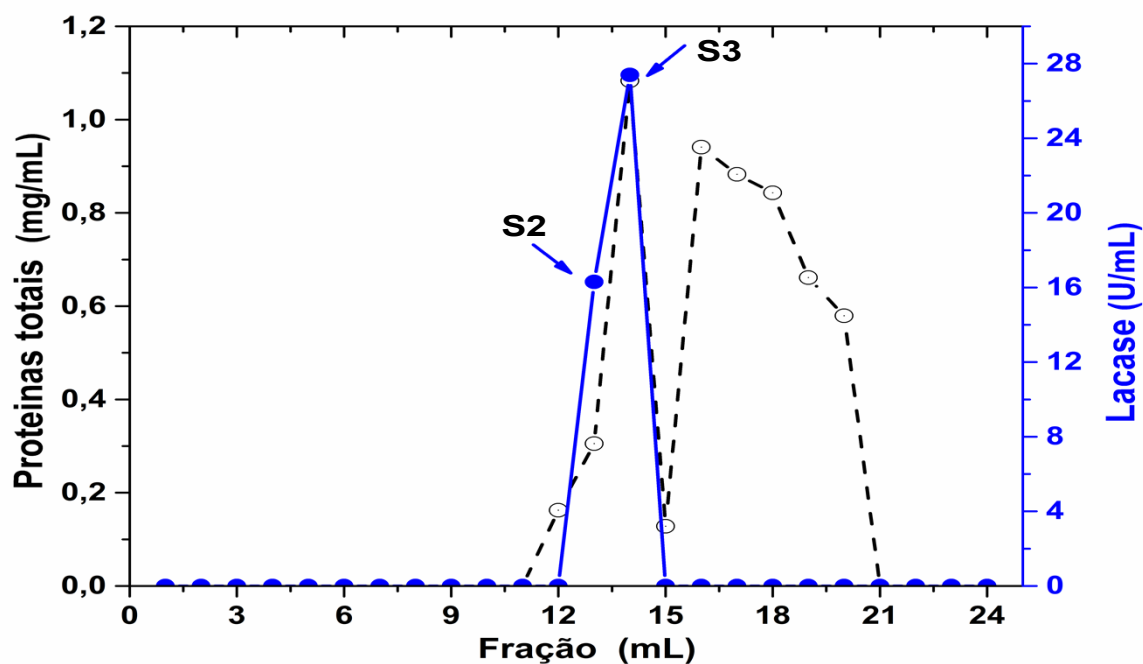
Tabela 1 - Análise de purificação da enzima lacase por meio de cromatografia de exclusão molecular de frações obtidos a partir do cultivo de *Panus lecomtei* CC 40 por 12 dias em Carvão de Algodão comum (CAT) e Carvão de Algodão tratado com  $\text{Ca(OH)}_2$  (CAT-TR).

Fração	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade de lacase (UI/mL)
CAT-Diálise ([ ] 5X)	10	5,28	316,68
CAT-S1	2	0,15	0,00
CAT-S2	2	0,30	16,67
CAT-S3	2	1,15	27,78
CAT-S4	2	0,12	0,00
CAT-S5	2	0,96	0,00
CAT-S6	2	0,88	0,00
CAT-S7	2	0,85	0,00
CAT-S8	2	0,65	0,00
CAT-S8	2	0,63	0,00
CAT-TR-Diálise ([ ] 5X)	10	2,34	51,08
CAT-TR-S2	2	0,11	16,67
CAT-TR-S3	2	0,30	0,00
CAT-TR-S4	2	0,12	0,00
CAT-TR-S5	2	0,92	0,00
CAT-TR-S6	2	0,91	0,00
CAT-TR-S7	2	0,79	0,00
CAT-TR-S8	2	0,83	0,00

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

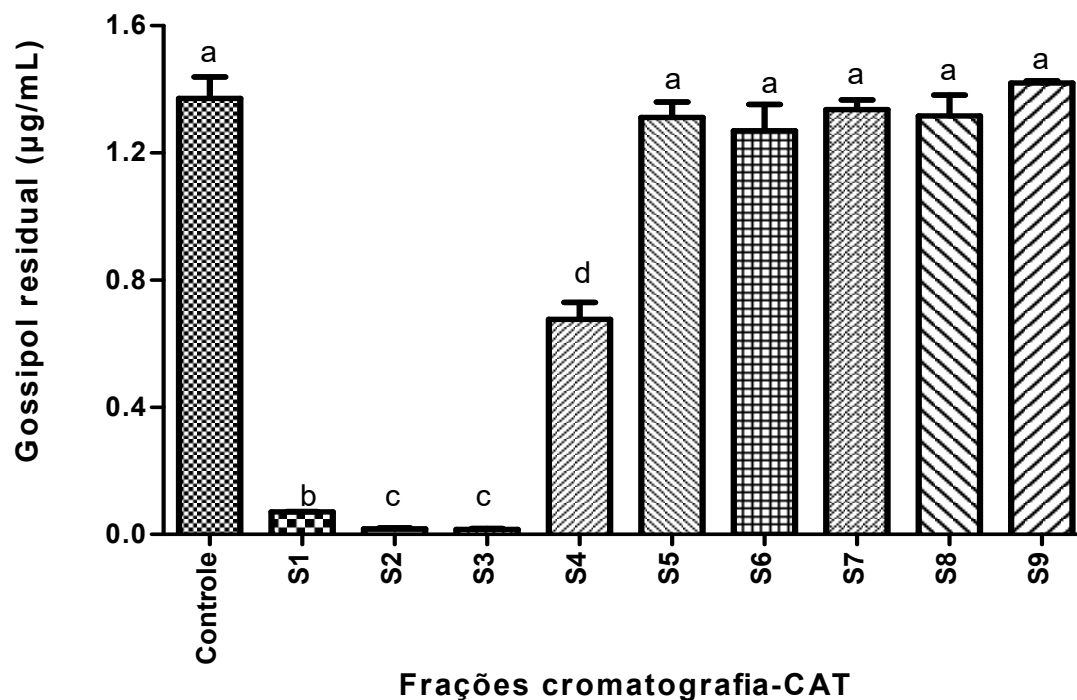
Todas as frações foram submetidas a ensaios de degradação de gossipol sintético por 60 minutos a 240 rpm. Dentre as frações provenientes de CAT-R50, três foram capazes de degradar gossipol em diferentes níveis, diferindo em relação ao controle, conforme é possível observar nas Figuras 11 e 12. É oportuno frisar que somente as frações de CAT-R50 que apresentaram atividade de lacase (S2 e S3) degradaram completamente o gossipol sintético (FIGURA 12).

Figura 11 - Perfil comatográfico do extrato do fungo *Panus lecomtei* CC 40 após cultivo em caroço de algodão comum (CAT) evidenciando as frações degradadoras de gossipol livre (S2 e S3).



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Figura 12 - Degradação de gossipol sintético através de extrato bruto parcialmente purificado obtido da FES de *Panus lecomtei* CC40, crescido em CAT comum após cromatografia de exclusão molecular.

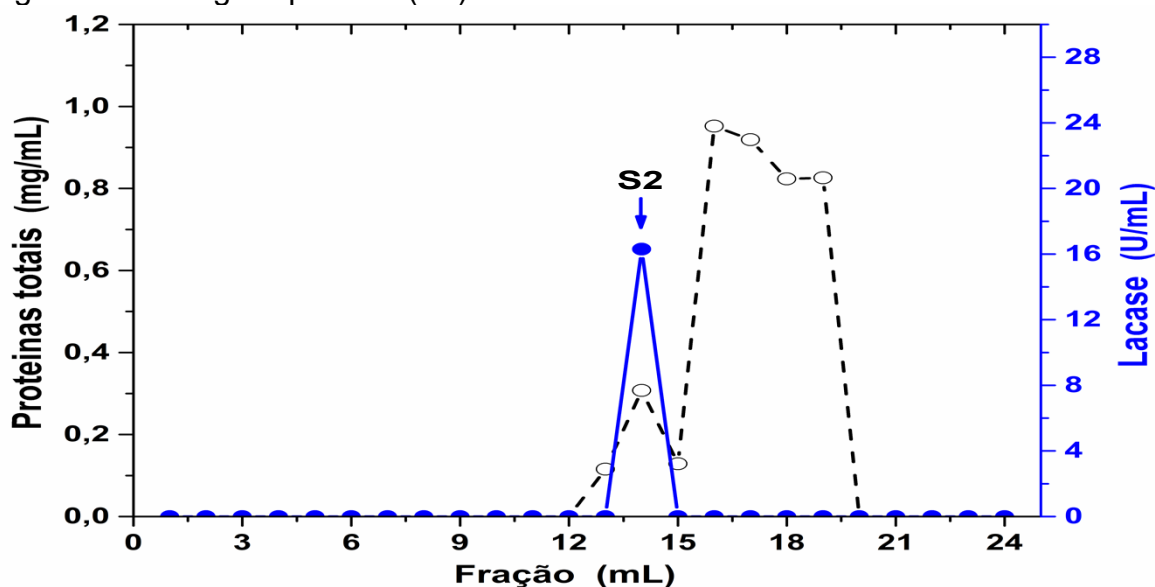


Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Controle: gossipol sintético. As frações cromatográficas e os extratos foram incubados por 60 min.

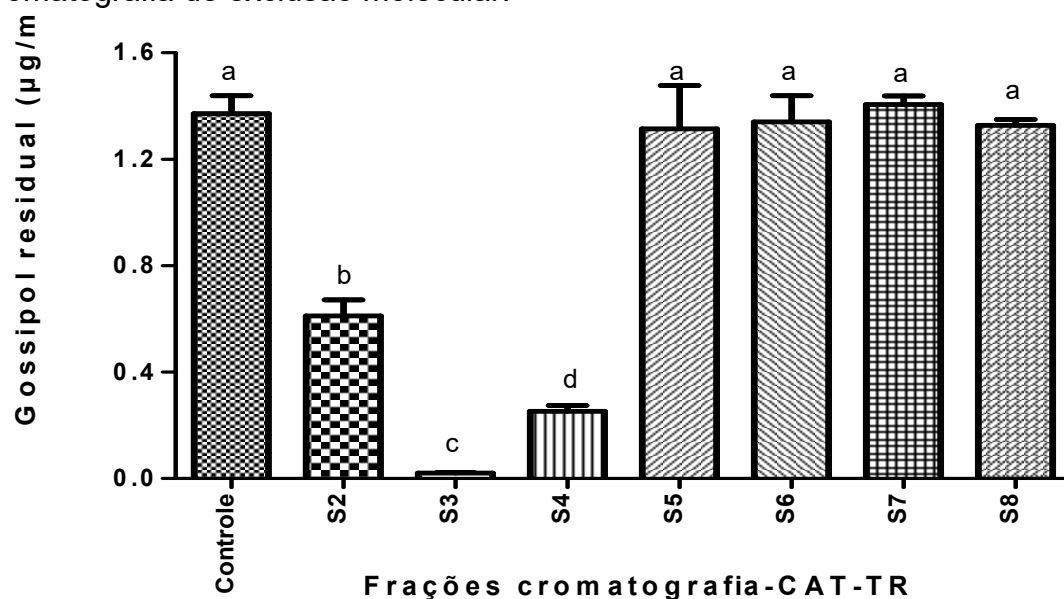
As análises de degradação das frações de CAT-TR-R50 apresentadas nas Figura 13 e 14, mostraram assim como para CAT-R50, três frações positivas para degradação de gossipol; e somente a fração (S3), com atividade de lacase (TABELA 1), degradou completamente gossipol sintético.

Figura 13 - Perfil comatográfico do extrato do fungo *Panus lecomtei* CC 40 após cultivo em caroço de algodão comum tratado com  $\text{Ca(OH)}_2$  CAT-TR) evidenciando a fração degradadora de gossipol livre (S2).



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Figura 14 - Degradação de gossipol sintético usando extrato bruto enzimático obtido da FES de *Panus lecomtei* CC 40, crescido em CAT tratado com  $\text{Ca(OH)}_2$  após cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Controle: gossipol sintético. As frações cromatográficas e os extratos foram incubados por 60 min.



Os dados sugerem que independentemente do substrato utilizado, quando se refere ao caroço de algodão contendo ou não gossipol livre, há a ativação de enzimas oxidativas (lacases). Ambos os extratos são capazes de degradar GL em um curto período de tempo (60 minutos) e com níveis similares de eficiência. Os dados confirmaram a hipótese de degradação de gossipol por ação de extratos fúngicos, mostrando que esse processo é realizado por rotas enzimáticas.

Entre os estudos consultados na literatura, foram encontrados trabalhos com resultados similares, por exemplo, Rajarathnam *et al.* (2001) mostraram que extratos obtidos a partir do cultivo de macrofungo *Pleurotus ostreatus v. florida* também foram capazes de degradar GL.

Com o objetivo de explicar como os extratos fúngicos atuam na degradação de gossipol, diferentes trabalhos têm apontados a participação de rotas enzimáticas e, recorrentemente, é citada a participação de enzimas lignolíticas oxidativas (lacases) proteases e/ou outros produtos proteicos (YANG *et al.*, 2012; WENG, SUN, 2006; SUN *et al.*, 2008; ZHANG, WENJU *et al.*, 2006). Assim como nesses trabalhos, os dados aqui apresentados aumentam o suporte para essa hipótese.

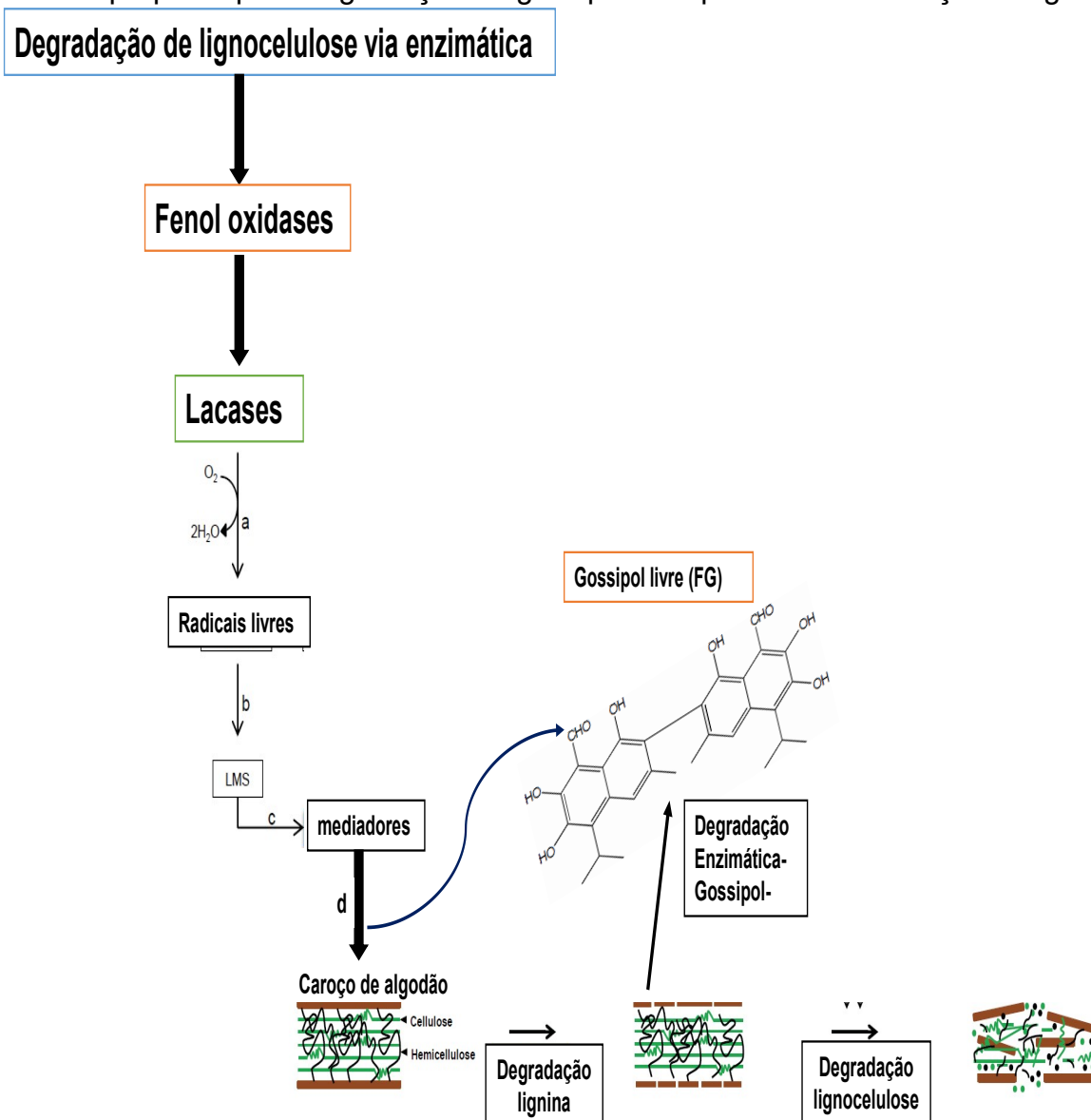
De acordo com Dashtban *et al.* (2010), em uma ampla descrição sobre biodegradação de lignina por ação de WRF's, foi evidenciada a participação de mecanismos enzimáticos. Para esses autores, diferentes enzimas participam desse processo como, fenol oxidases (lacases), heme peroxidases (lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidases versáteis), além de enzimas acessórias.

A degradação de lignocelulose realizada por lacases, ocorre por meio de reações de acoplamentos de elétrons, reduzindo O<sub>2</sub> em duas moléculas de água e oxidando vários substratos como fenois, arilaminas, anilinas, tiois e ligninas (FIGURA 15a). No centro catalítico dessa enzima existem quatro íons de cobre mediando o processo redox. As reações de oxidação catalisadas levam à formação de radicais livres que atuam como substratos intermediários para outras enzimas (FIGURA 15b). Os radicais livres produzidos podem ir até os sítios de ligação de enzimas com alto potencial redox e reagir com uma ampla gama de substratos, criando, até mesmo, rotas de oxidação não enzimáticas como polimerização e despolimerização (FIGURA 15c). Finalmente, o sistema mediador de lacase (LMS) participa de reações como a lignólise (FIGURA 15d) (DASTTBAN *et al.*, 2010).

Com bases nos resultados alcançados neste Capítulo e nos dados apontados por Dashtban *et al.* (2010), a provável ação de lacase na degradação de gossipol é

devido à formação de coprodutos durante o processo de oxido-redução catalisada por essa enzima. Esse processo ocorre como produto do metabolismo do fungo durante a lignólise, em sinergia com a colonização do substrato e conseqüente crescimento fúngico. No entanto, não é possível descartar a possibilidade de ação por outras enzimas oxidativas, bem como de outros produtos protéicos, durante esse processamento. De tal modo, a provável degradação de gossipol ocorre por meio da ação de enzimas oxidativas, participando além de reações como a lignólise, também biodegradação/destoxificação, obedecendo aos princípios mostrados na Figura 15.

Figura 15 - Provável mecanismo enzimático (lacase) de macrofungos como o *P. lecontei* proposto para degradação de gossipol livre presente em caroço de algodão.



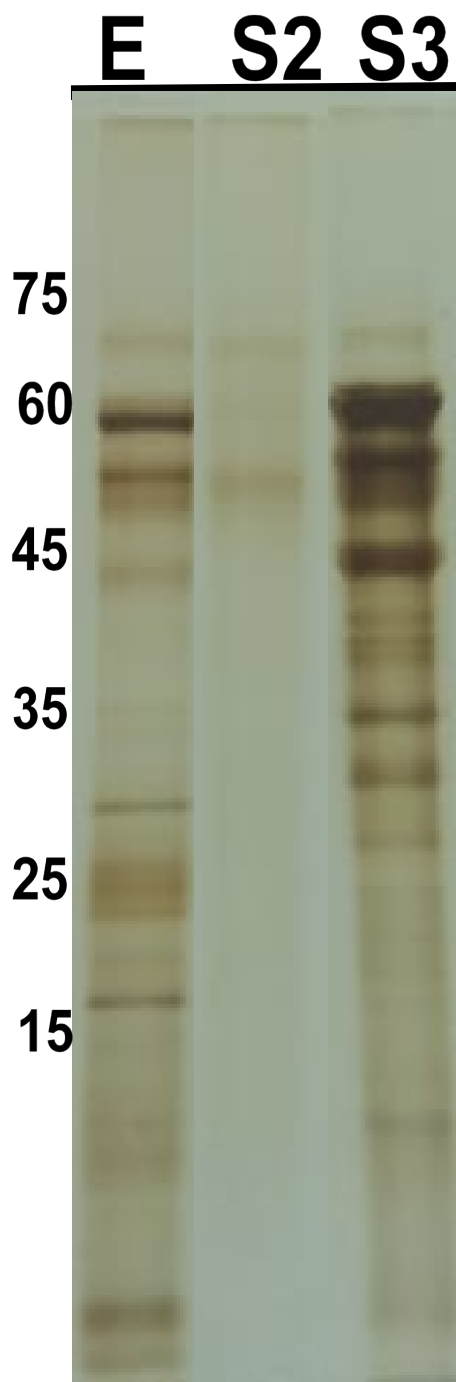
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

## SDS-PAGE

O perfil de proteínas das frações cromatográficas eluídas provenientes dos extratos brutos do *Panus lecomtei* CC40 nos substratos CAT e CAT-TR, como também os respectivos ultrafiltrados CAT-R50 (frações S2 e S3) e CAT-TR-R50 estão demonstrados nas Figuras 22 e 23, respectivamente. De acordo com a análise do perfil eletroforético verifica-se para o extrato bruto ultrafiltrado CAT-R50 fração S3, seis bandas intensas, com diferenças de intensidades entre as mesmas, com massas moleculares entre 30 e 60 kDa. Enquanto que para a fração S2, com pouca intensidade (pouca concentração – provavelmente) a presença de uma banda entre 50 e 60 kDa (FIGURA 16). Para o extrato bruto ultrafiltrado CAT-TR-R50, mostrado pela fração S3 observou-se a presença de três bandas intensas de massa molecular entre 25 e 60 kDa (FIGURA 17).

Avaliando as atividades das frações foi detectada grande abundância em ambos os secretomas da enzima lacase para esse macrofungo em resposta aos substratos de incubação (CAT e CAT-TR). Esses dados mostram diferenças quanto aos possíveis tamanhos moleculares das enzimas presentes nos extratos eluídos após a cromatografia. De acordo com a literatura consultada, as lacases de um modo geral possuem tamanhos moleculares variáveis, ocorrendo numa faixa entre 40-100 kDa (LEONOWICZ *et al.*, 2001; MADHAVI, LELE, 2009; MADHAVI, LELE, 2009; STRONG; CLAUS, 2011).

Figura 16 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas presentes nas frações cromatográficas eluídas provenientes do extrato bruto e ultrafiltrados (50 kDA) do cultivo de *Panus lecomtei* CC40 em caroço de algodão comum (CAT).



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Nota: Os números se encontram nas posições dos marcadores moleculares. EB: extrato bruto; S2: fração 02 eluída após cromatografia de exclusão molecular; S3: fração 03 eluída após cromatografia de exclusão molecular.

Figura 17 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas presentes nas frações cromatográficas eluídas provenientes do do extrato bruto e ultrafiltrados (50 kDA) cultivo de *Panus lecomtei* CC40 em caroço de algodão comum tratado quimicamente (CAT-TR).



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

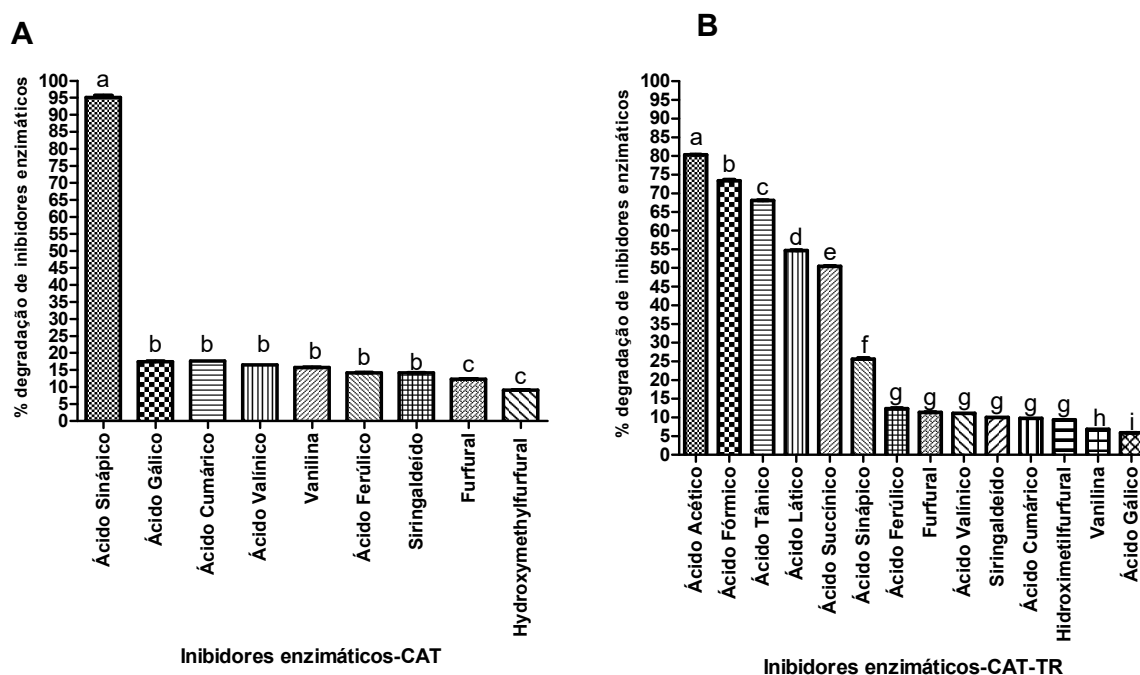
Nota: Os números se encontram nas posições dos marcadores moleculares. EB: extrato bruto; S3: fração 03 eluída após cromatografia de exclusão molecular.

## Análises do extrato bruto na degradação de inibidores enzimáticos

Durante o processo de desconstrução de um substrato lignocelulósico são produzidos diferentes inibidores enzimáticos, incluindo os compostos fenólicos. As atividades enzimáticas de ligninasas na desconstrução da parede celular vegetal por vezes liberam vários desses inibidores, que podem ser ou não metabolizados por fungos, tal como *P. lecomtei*. Para o uso de extratos brutos ou coquetéis enzimáticos visando desconstruir a parede celular vegetal para obtenção de açúcares solúveis ou na degradação de ANF's, como o gossipol, são requeridos o uso de enzimas capazes de agir degradando os compostos inibidores da lignina. Pensando no processo de degradação de GL nas tortas ou farelos de algodão por meio de extratos brutos ou formulações enzimáticas, é necessário compreender a capacidade de tais enzimas em degradar esses compostos, incluindo os inibidores de atividades enzimáticas classificados como compostos fenólicos.

Os extratos brutos de *P. lecomtei* cultivados em CAT ou CAT-TR foram capazes de degradar os alguns inibidores enzimáticos já conhecidos (FIGURAS 18 A; B).

Figura 18 - Degradação de compostos fenólicos usando extrato bruto enzimático obtido da FES de *Panus lecomtei* CC 40, crescido em CAT comum (A) e CAT tratado (B) com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Nota: Os compostos fenólicos e o extrato bruto foram incubados por 60 minutos.

O extrato proveniente de CAT-TR foi capaz de degradar nove dos 14 compostos fenólicos avaliados. Com destaque para o maior valor de degradação para ácido sináptico com 95%, seguido de ácido gálico com 15,0% e com menores valores para os compostos furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente com 10 e 8%.

Os resultados evidenciam que, diferente do extrato de CAT, o extrato proveniente CAT-TR foi capaz de degradar todos os compostos testados. O maior valor encontrado foi para ácido acético, 80%, seguido por ácido fórmico com degradação de 72%. Os menores valores foram para a valinina (5%) e ácido gálico com 4%.

Neste trabalho foram realizados os pré-tratamentos físico (autoclavagem), seguido do biológico (macrofungo) no substrato CAT e físico (autoclavagem), seguidos de químico (tratamento alcalino) e biológico (macrofungo) no substrato CAT-TR.

É possível supor que em conjunto, esses tratamentos podem ter sido capazes de eliminar, parcialmente, as barreiras físicas e químicas que fazem com que as biomassas sejam recalcitrantes, tornado a celulose passível de hidrólise pelas enzimas produzidas pelo macrofungo. Essa etapa é de crucial importância por permitir o crescimento fúngico ao mesmo tempo que elimina fatores tóxicos e antinutricionais como o gossipol livre.

Entende-se pertinente mencionar sobre os princípios básicos desses pré-tratamentos. Primeiramente, os físicos (como a autoclavagem) compreendem o emprego de tecnologias com base na área e volume da biomassa. Realizados por mecanismos de hidrólise, incluem o calor seco, o calor úmido, o calor úmido vibratório, a radiação gama, entre outros. Contudo, apesar de efetivos, em alguns tipos de biomassas apresentam, entre as desvantagens, a exigência de alto consumo de energia.

Por outro lado, os métodos químicos (nesse trabalho representado pelo hidróxido de cálcio), podem ser realizados por meio do uso de ácidos e bases (métodos alcalinos) e são fundamentados no processo de oxido-redução (KUBICEK, 2012). Tratamentos químicos usando cal (hidróxido de cálcio) são capazes de hidrolisar grupos acetil das hemiceluloses e ligações éster presentes em carboidratos como a lignina. Entre os tratamentos alcalinos, o emprego de cal é considerado o mais barato e com boas taxas de recuperação (DA COSTA SOUSA, 2009; KIM; HOLTZAPPLE, 2005).

Os tratamentos biológicos são conhecidos pela utilização de microrganismos, principalmente, fungos por meio da fermentação. Esse processo é baseado no mecanismo fisiológico de secreção de enzimas capazes de desconstruir lignocelulose e destoxificação. Enquadrados nessa categoria, o uso de extratos brutos via processo de hidrólise enzimática são fundamentados nos mecanismos bioquímicos básicos de catálise enzimática.

Diversas enzimas podem ser usadas em hidrólises. Anteriormente ao uso desse tratamento, otimizações de alguns parâmetros são necessários como o pH, temperatura, concentração enzimática e substrato, entre outros, com a finalidade de obter o melhor rendimento possível no final do processo. Nesse trabalho, não foram feitas otimizações, etapa fundamental quando se trata da aplicação em escala industrial. Dessa forma, é provável que os dados apresentados podem ter ainda melhores rendimentos.

De acordo com Jönsson e Martín (2016), apesar do pré-tratamento químico expor a celulose para sacarificação enzimática e fracionar os principais componentes da matéria-prima, essa tecnologia geralmente leva à efeitos colaterais, como a formação de subprodutos da lignocelulose que são inibitórios da etapa de biorreação (fermentação pelo macrofungo), além de prejudicial à etapa *downstream* (obtenção do produto). A maioria dos inibidores enzimáticos são formados durante o pré-tratamento, quando as hemiceluloses e/ou a lignina são parcialmente solubilizadas e degradadas.

Os pré-tratamentos empregados levaram à formação de compostos químicos inibitórios, como os inibidores de enzimas. Esses compostos podem ter agido inibindo ou estimulando a secreção de enzimas durante o crescimento fúngico. Neste capítulo são mostradas diferenças de degradação de inibidores em função do tipo de extrato usado (proveniente de CAT ou CAT-TR). Uma possível explicação está no fato do extrato CAT-TR ter passado por um pré-tratamento a mais (tratamento químico), o que pode ter levado à liberação de maior quantidade e/ou diferentes inibidores. Para o fungo conseguir se desenvolver nesse meio, acabou por secretar enzimas eficientes na degradação desses inibidores, refletindo, assim, na diferença apresentada.

Yang e Wyman (2008) relatam que tratamentos alcalinos são capazes de desconstruir parcialmente a lignina, aumentando a digestibilidade da celulose e, em consequência, formação de inibidores. Diferentes métodos alcalinos podem ser empregados, como o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, amônia, hidróxido de cálcio (cal), sendo que esse último, utilizado nesta pesquisa, pode ser considerado

uma forma viável para produção e extratos enzimáticos fúngicos capazes de degradar esses inibidores.

Em relação à capacidade de inibição ou aumento de atividades enzimáticas causado pelo efeito dos inibidores enzimáticos, não há um consenso na literatura. Para Duarte *et al.* (2012b) eles podem bloquear atividades enzimáticas, enquanto que para Monclaro (2014), muitos podem aumentar essas atividades.

Diante dessa realidade, é interessante destacar o trabalho realizado por Kapoor, Rajan e Carrier (2015), no qual foram usados diferentes extratos contendo atividade de lacase, comerciais ou provenientes do cultivo de *Trametes versicolor* para degradação de diferentes inibidores (ácido p-cumárico, ácido trans-ferúlico, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido salicílico, siringaldeído, ácido trans-cinâmico, ácido valínico e vanilina). Os autores concluíram que tanto os extratos usando enzimas comerciais quanto o extrato desse macrofungo, foram capazes de degradar os inibidores. Cabe frisar que, assim como foi relatado nesse Capítulo, os autores também verificaram diferenças em relação às ações dos extratos, apontando inibidores que não foram reduzidos/degradados.

As enzimas lacases são tidas como responsáveis na degradação de inibidores. Ainda de acordo com Kapoor, Rajan, Carrier (2015), o processo realizado por essas enzimas depende, das suas características químicas, como o número de grupos hidroxila, a presença de grupos laterais e a sua posição no anel aromático. De modo que grupos metoxi, por meio da sua capacidade de doar elétrons, aumentam a taxa de oxidação enquanto que sua ação de retirada de elétrons tem o efeito de redução.

Seguindo o que foi descrito, é possível acreditar que, de fato, o modelo de degradação trazido por Canfora *et al.* (2008), nos quais as lacases são eficazes na transformação de misturas fenólicas simples e complexas, também pode explicar os resultados encontrados neste Capítulo.

De qualquer modo, é importante pontuar que os dados apontados nesse capítulo podem servir como base para o desenvolvimento de estudos mais aprofundados desses extratos, visando a compreender de forma individual, como podem degradar cada inibidor e como a otimização dos padrões usados poderiam alterar as taxas de degradação. Também é possível propor trabalhos que visem o estudo da cinética e interação de diferentes enzimas presente nos extratos, avaliando participação de tais enzimas durante a degradação, além da avaliação do papel desses inibidores no aumento ou diminuição das atividades enzimáticas (presente no



extrato).

### **Secretoma global e análise proteômica de extrato bruto de *Panus lecomtei* CC40 cultivado em caroço de algodão.**

As análises dos experimentos apresentados nos tópicos anteriores evidenciaram a capacidade dos extratos do macrofungo *P. lecomtei* em degradar gossipol em diferentes condições. Diante disso, foi proposto a hipótese de que a degradação desse fator antinutricional é devida à participação de substâncias protéicas como as enzimas. Diante do exposto, foram escolhidos como pontos para análises de secretoma global dos extratos (CAT e CAT-TR) os tempos de cultivo 6 e 12 dias a partir da fermentação em estado sólido usando caroço de algodão. Assim sendo, os resultados discutidos nos próximos tópicos visaram, de um modo geral, identificar possíveis proteínas envolvidas na degradação de gossipol.

#### **Secretoma global durante 6 dias**

A partir do extrato bruto do macrofungo *P. lecomtei* foram identificadas 307 proteínas reguladas entre as condições analisadas (CAT e CAT-TR) no tempo 6 dias, que permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre condições, conforme ilustra a Figura 19. As proteínas reguladas foram agrupadas em *clusters* de acordo com seus perfis de abundância, mostrados nas Figuras 19, 21 e 23. Dentre as proteínas reguladas nas condições, 18 foram identificadas no banco do vegetal (*Gossypium hirsutum*), que permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre condições. Como critério adicional de estrinência, foram consideradas apenas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídeos, limitando o total de proteínas reguladas a 143, nenhuma das quais pertencente a *Gossypium hirsutum* (algodoeiro).

Dessa forma, foi realizada uma segunda etapa de análise estatística utilizando-se a plataforma MetaboAnalyst (CHONG *et al.*, 2018). Foi incrementada a análise multivariada de forma a se obterem os *Variable Importance Projection scores* (VIP-scores), provenientes das 143 proteínas, indicando as proteínas que melhor discriminam entre as condições (FIGURA 25), e *partial least squares discriminant analysis* (PLS-DA) como forma de aprimorar, em relação à análise de PCA (307 proteínas), a detecção de grupos de proteínas diferencialmente abundantes (LÊ CAO,

BOITARD, BESSE, 2011), mostrado na Figura 27-A.

Foram também gerados gráficos de correlações entre as 307 proteínas reguladas (dados não mostrados) e após correções estatísticas, foi gerado novo mapa de correlação (*heatmap*) entre condições por perfis de abundância para as 143 proteínas iniciais (dados não mostrados) e também as 50 principais proteínas em seis dias de cultivo, conforme mostrado na Figura 28-A, apontados pela nova análise.

### **Secretoma global durante 12 dias**

Foram identificadas 122 proteínas reguladas entre as condições analisadas no tempo 12 dias, que permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre condições, conforme ilustra a Figura 20. As proteínas foram agrupadas em *clusters* de acordo com seus perfis de abundância, mostrados nas Figuras 20, 22 e 24. Dentre essas proteínas, apenas quatro foram identificadas no banco do vegetal (*Gossypium hirsutum*), que permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre condições. Como critério adicional de estrinência, foram consideradas apenas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídeos, limitando o total de proteínas reguladas a 49, nenhuma das quais pertencente a *Gossypium hirsutum* (algodoeiro).

Dessa forma, assim como em seis dias, também foi realizada uma segunda etapa de análise estatística utilizando-se a plataforma MetaboAnalyst (CHONG *et al.*, 2018). Foi incrementada a análise multivariada para se obter os *Variable Importance Projection scores* (VIP-scores) (49 proteínas), indicando as proteínas que melhor discriminam entre as condições (FIGURA 26) e *partial least squares discriminant analysis* (PLS-DA) como forma de aprimorar, em relação à análise de PCA (a partir das 122 proteínas), a detecção de grupos de proteínas diferencialmente abundantes (LÊ CAO; BOITARD; BESSE, 2011) é mostrado na Figura 27-B, usando as 49 proteínas com mais de dois peptídeos únicos.

Foram também gerados gráficos de correlações entre as 122 proteínas reguladas (dados não mostrados) e após correções estatísticas, foi elaborado novo mapa de correlação (*heatmap*) entre condições por perfis de abundância para as 49 proteínas (dados não mostrados), em 12 dias de cultivo e também para as 20 principais proteínas, conforme mostrado na Figura 28-B., apontadas pela nova análise.

Trabalhos envolvendo estudos de degradação de compostos tóxicos e/ou

antinutricionais visando identificar possíveis proteínas e/ou moléculas produzidas por fungos têm sido realizados ao redor do mundo (POTIN; VEIGNIE; RAFIN; 2004; DRITSA *et al.*, 2007; FACKLER *et al.*, 2006). Todavia, trabalhos a respeito de degradação de gossipol, apesar de existirem, ainda são incipientes e de, sobremaneira, pouco conclusivos (RAJARATHNAM *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2012).

### **ASPECTOS GERAIS: proteínas envolvidas na degradação de gossipol**

Os dados apontados nesse Capítulo mostram a primeira descrição de um trabalho envolvendo um macrofungo que produz cogumelo comestível (*P. lecomtei*) na degradação de gossipol livre quando submetidos à fermentação em estado sólido em caroço de algodão. São descritas identificações de proteínas, obtidas após crescimento desse fungo nesses substratos, após submetidos à diferentes pré-tratamentos.

No que se refere à quantidade de trabalhos abordando estudos comparativos sobre proteomas de fungos (secretomas), quando cultivados em diferentes resíduos lignocelulósicos, ainda é uma área que necessita de exploração através de estudos diversos (YANG *et al.*, 2012; MEDINA; KIERNAN; FRANCISCO, 2004; SHAH *et al.*, 2009; GÓMEZ MENDOZA, 2009; GÓMEZ MENDOZA, 2013; GOMES, 2017; GOMES, 2019). Esse trabalho, portanto, enriquece a discussão dentro dessa temática.

Uma discussão mais aprofundada dos dados mostram que, no tempo seis dias, 35 proteínas foram identificadas entre as que melhor discriminaram as duas condições testadas. Desse conjunto, 17 são não nomeadas/hipotéticas; convém ressaltar que a maioria (16) estavam reguladas positivamente na condição CAT. As demais proteínas (12) estiveram mais expressas na condição CAT com destaque para proteínas ribossomais, aconitato hidratase, metaloproteinase, acetil-CoA Carboxilase, isocitrato desidrogenase, redutase e oxidoredutase, e somente 6 na condição CAT-TR sendo as proteínas: glucanase, peroxidase, lacase e citocromo b5, proteinase dependente de Mn (III) e tiredoxina redutase.

No tempo 12 dias, um número menor de proteínas foi identificadas entre as que melhor discriminaram as duas condições (15 proteínas). Destas, três são proteínas não nomeadas/hipotéticas. A maioria das proteínas (12) estiveram *upregulated* na condição CAT, com destaque para peroxidase, lacase, fosfoenolpiruvato desidrogenase, hidrolase, isocitrato desidrogenase, *heat shock* (choque térmico),

redutase e enolase. Similar aos dados apontados para seis dias, também foi visualizado um menor número de proteínas mais abundantes na condição CAT-TR, sendo a pirofosfatase, desidrogenase e proteína ribossomal. De um modo geral, é evidenciado que a presença de gossipol estimula o fungo a secretar uma maior quantidade de proteínas, refletindo na maior abundância mostrada sempre na condição CAT.

As proteínas identificadas como não nomeadas foram identificadas usando base de dados, comparando com estirpes filogeneticamente próximas. Entre outros fatores e devido as baixas quantidades desses tipos de estudos, os resultados apontados não são capazes de refletir a funcionalidade dessas proteínas, principalmente em relação ao alvo desse estudo (degradação de gossipol). Por outro lado, cabe destacar que o genoma de *P. lecomtei* ainda não foi sequenciado apesar de estar sendo realizado pelo grupo de pesquisa, os dados ainda não foram disponibilizados. Uma vez disponíveis, esses poderão servir como base para decifrar as funcionalidades dessas proteínas.

No substrato contendo gossipol, entre as proteínas em *upregulated* foram encontradas: proteínas ribossomais, a função está envolvida basicamente na montagem das subunidades de ribossomos (organelas presentes em células eucarióticas) que atuam no processo de síntese de proteínas diversas. De tal maneira, essas proteínas são indispensáveis ao processo de crescimento e manutenção do metabolismo de fungos (metabolismos primário e secundário). Em relação à degradação de gossipol, atuam mantendo a produção de diferentes proteínas envolvidas na degradação dessa molécula.

Outro destaque foi para acetil-CoA carboxilase. Essa enzima está presente na primeira etapa (condensação) da síntese de ácidos graxos saturados, responsável pela conversão irreversível de acetil-CoA (acetil coenzima A) em malonil-CoA. A presença de gossipol nesse substrato pode elevar o seu nível de complexidade.

Apesar da complexidade do substrato, o macrofungo dispõe de um sofisticado sistema de controle para crescimento nesse meio, o que pode ser corroborado pela presença da enzima acetil-CoA carboxilase, uma vez que esta constitui um passo limitante e regulador na biossíntese de ácidos graxos, de modo que o fungo age convertendo os substratos complexos em ácidos graxos ao mesmo tempo que disponibilizando coprodutos e/ou cofatores para outras reações metabólicas. Portanto, propõe-se que o fungo direciona essa via para participar do processo de degradação

de gossipol, enquanto realiza o seu crescimento e, em consequência, obtenção de energia.

Por outro lado, para obtenção de energia, os dados mostraram que os fungos secretam as seguintes enzimas (*upregulation*), quando na presença de gossipol sendo elas: (i) piruvato desidrogenase, faz parte de um complexo de enzimas que atuam no primeiro estágio do ciclo do ácido cítrico (TCA), tendo seu papel na formação do Acetil-CoA a partir da descarboxilação oxidativa do piruvato, ainda na matriz mitocondrial; (ii) aconitato hidratase, também chamadas de aconitase e (iii) isocitrato desidrogenase. Todas as três atuam ciclo do ácido cítrico (TCA), a primeira está presente no primeiro estágio, enquanto que as duas últimas no segundo estágio.

A aconitato hidratase é responsável pelo 2º passo dessa via (TCA), catalisando a conversão reversível do citrato para isocitrato por meio da formação do intermediário cis-aconitato. Enquanto a isocitrato desidrogenase é responsável pelo 3º passo, catalisando a descarboxilação oxidativa do isocitrato para formar o  $\alpha$ -cetoglutarato. Logo, necessitam de um amplo aparato de vias enzimáticas envolvidas direta e/ou indiretamente na síntese de ATP, dada a complexidade e toxicidade do substrato.

Tais achados são corroborados pelo estudo de Yang *et al.* (2012). Esses autores discutem que o gossipol é um derivado do naftaleno e, para o crescimento microbiano na presença desse composto, os microrganismos requerem a participação de um maior número de proteínas envolvidas na produção de energia em comparação, por exemplo, ao crescimento em um meio mais simples, como em glicose.

Nessa perspectiva, a hipótese levantada é de que para o crescimento fúngico em CAT, é necessário direcionar mais enzimas para rotas de síntese de energia para as células (formação de ATP); como há, também, substâncias tóxicas, há a necessidade de ativar vias intermediárias para atuarem nos processos de biodestoxificação.

Os dados obtidos mostram que outras diferentes proteínas são secretadas pelo metabolismo fúngico (substrato CAT) e que podem estar envolvidas nessa degradação, com destaque para enzimas oxido-redutases, metaloproteinase e hidrolases, que estão catalisando reações de hidrólise vias processos de oxido-redução. De tal modo, aparentemente, as proteínas encontradas permitem inferir sobre o metabolismo fungico, ao que tudo indica, seguindo o modelo clássico de crescimento microbiano.

É provável que *P. lecomtei* ao entrar na fase log (correspondente as análises

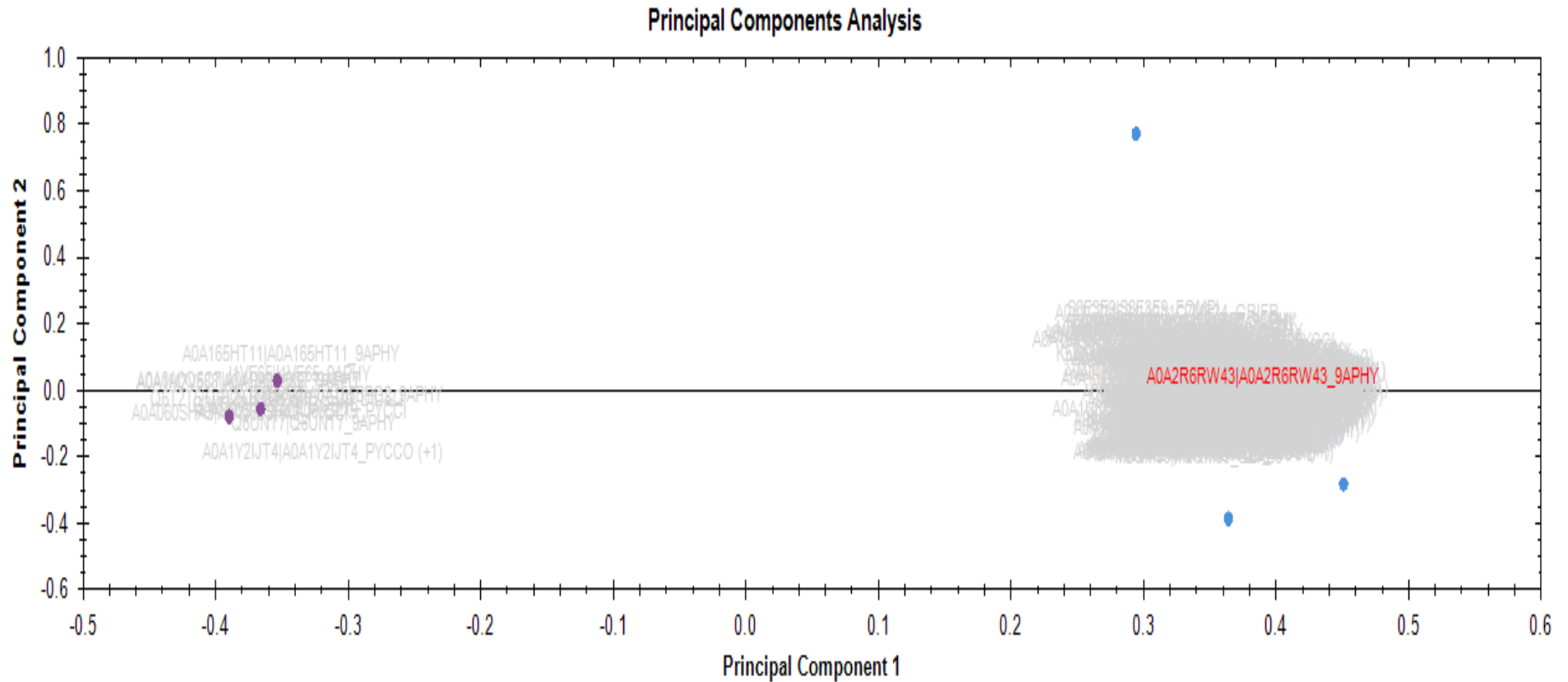
do ponto seis dias) seja, logo nesse tempo, no qual inicia a ativação de enzimas que degradam a lignocelulose, conforme mostrado pela presença de glucanase. A partir da ação dessas enzimas, diferentes coprodutos são gerados, levando à existência de substratos inespecíficos. Esses substratos são, então, utilizados pelas enzimas lacases e peroxidases que permitem a contínua degradação da lignocelulose bem como (ainda que em taxas basais) a degradação de gossipol.

O macrofungo continua seu crescimento e, após o tempo 12 dias, pode ser o tempo correspondente a fase estacionária. Baseando nas proteínas encontradas nesse momento, há uma provável relação entre a presença destas e a necessidade do fungo em se manter metabolicamente ativo nos dois meios usados, ocorre que nesse momento, há uma provável iminuição de nutrientes, e o fungo pode direcionar a secreção de mais proteínas envolvidas na degradação de gossipol, bem como utilizá-lo como fonte secundária para o seu crescimento.

Diferentes proteínas podem assegurar a hipótese descrita no parágrafo anterior, como as proteínas *heat shock* (proteína choque térmico) e formate *dehydrogenase* (realiza catálise de NAD<sup>+</sup>- dependente da oxidação de CO<sub>2</sub>) que estão presentes somente no tempo 12 dias, e estão envolvidas em respostas a estresse celular. Outros dados também corroboram essa idéia, como as análises de curva de degradação de gossipol, também apontadas nesse Capítulo.

Ainda no tempo 12 dias, outras proteínas estão em *up regulation* na condição tóxica, como as da classe das liases, representada pela proteína fosfoenolpiruvato carboxilase. Esta enzima realoca o oxaloacetato no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ao catalisar no sentido contrário. A reação prossegue em duas etapas: formação de carboxifosfato e enolato de piruvato, seguida de carboxilação do enolato e liberação de fosfato. Logo, essa enzima está presente nesse momento do crescimento fúngico, devido à diminuição de nutrientes e sua presença permite captar/utilizar compostos orgânicos disponíveis e ainda não explorados para abastecer e dar seguimento à produção de energia. Além disso, outras enzimas como as liases podem agir agregando ou removendo diferentes grupos carboxílicos possivelmente presentes em compostos presentes no meio tóxico (substrato CAT), podendo por exemplo atuar diretamente no GL. Outras proteínas como a enolase por outro lado, podem estar presentes *up-regulated* no substrato CAT devido a necessidade do fungo em metabolizar diferentes compostos devido a necessidade de crescimento no meio complexo contendo GL.

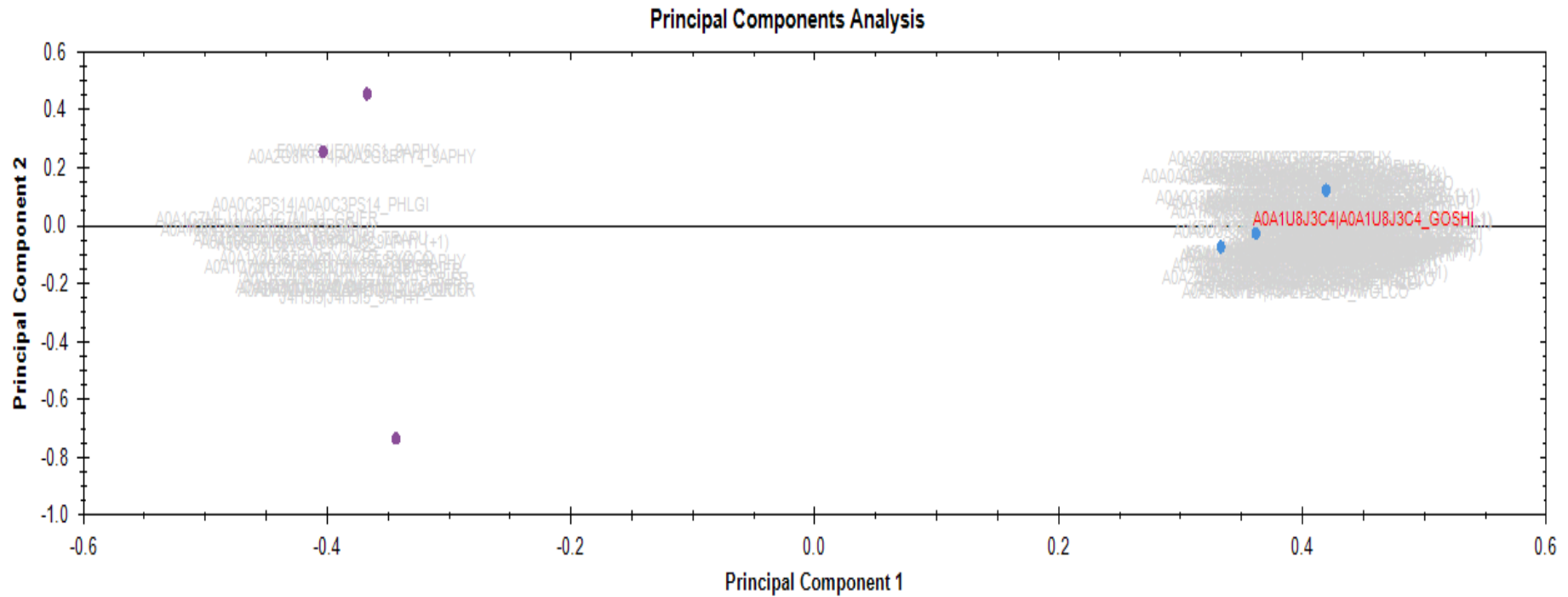
Figura 19 - Análises de PCA em cinza indicando cada proteína identificada durante o tempo 6 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Nota: As cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam replicatas. Azul = 6 CAT (caroço de algodão comum, obtido após 6 dias de incubação); roxo = 6 CAT-TR (caroço de algodão tratado quimicamente, obtido após 6 dias de incubação).

Figura 20 - Análises de PCA em cinza indicando cada proteína identificada durante o tempo 12 dias.

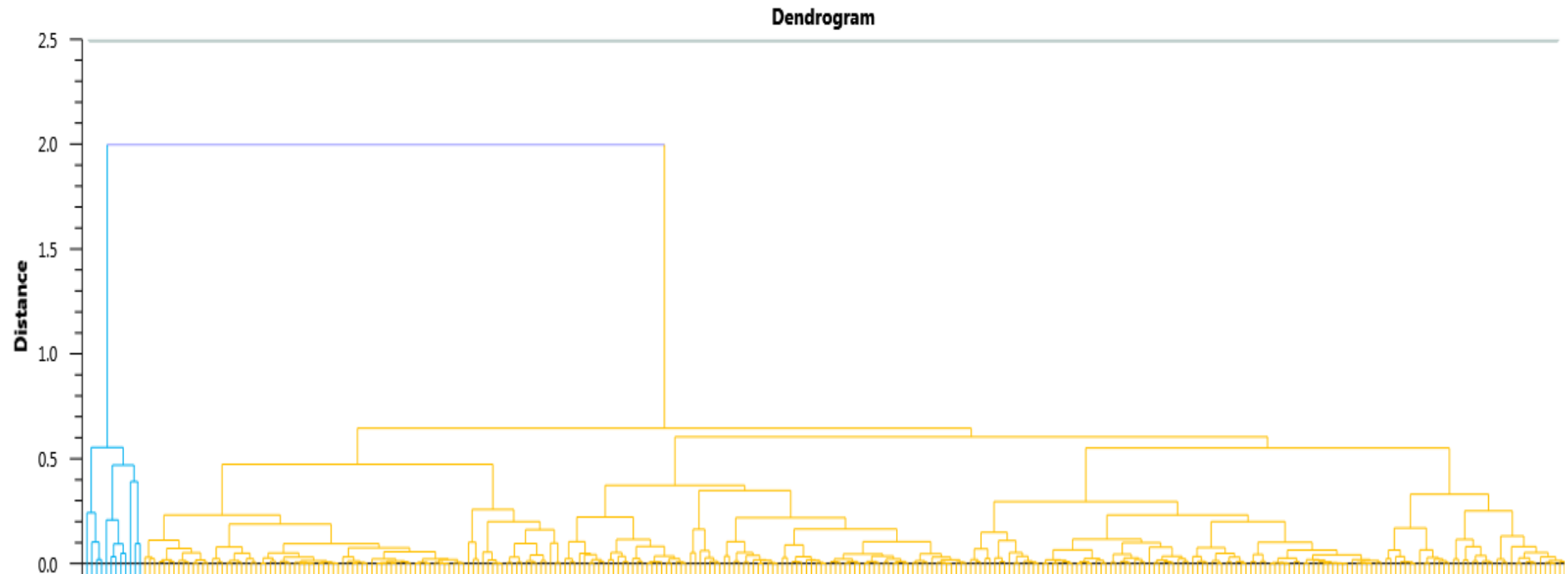


Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Nota: As cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam replicatas. Azul = 12 CAT (caroço de algodão comum, obtido após 12 dias de incubação); roxo = 12 CAT-TR (caroço de algodão tratado quimicamente, obtido após 12 dias de incubação).



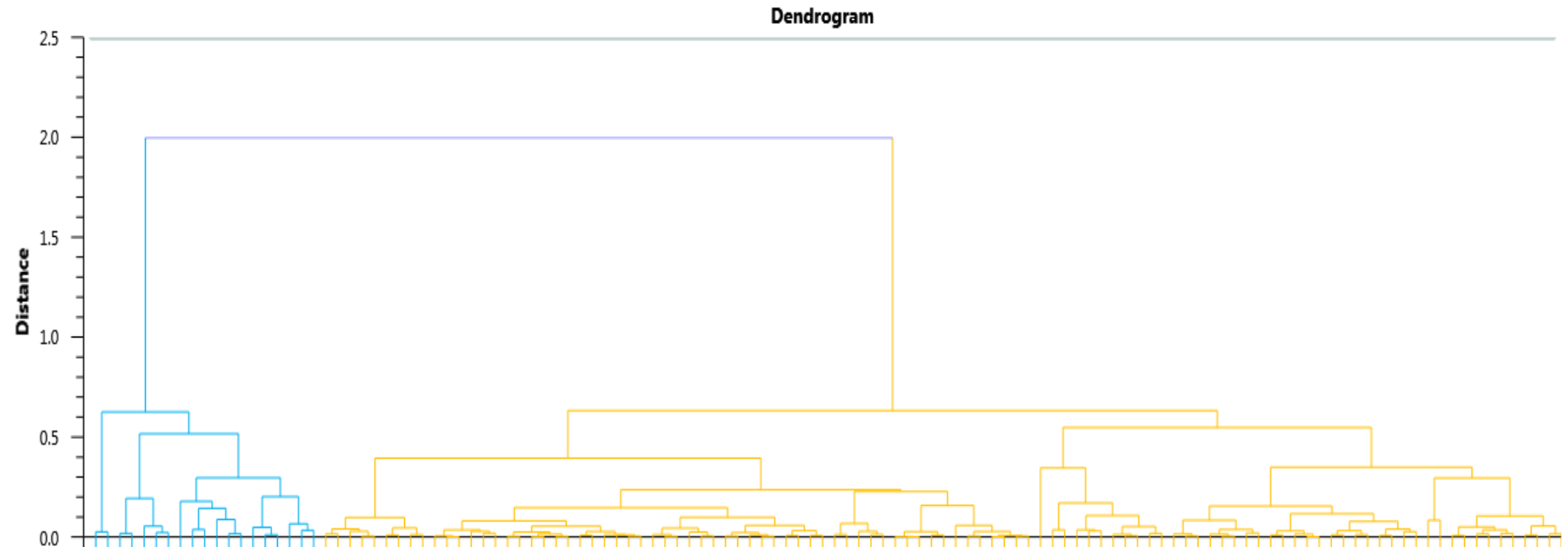
Figura 21 - Dendrograma mostrando o agrupamento de proteínas de acordo com seus perfis de abundância, durante o tempo 6 dias



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Nota: As cores dos grupos (*clusters*) fazem referência às cores dos perfis de abundância relativa mostrados na 22.

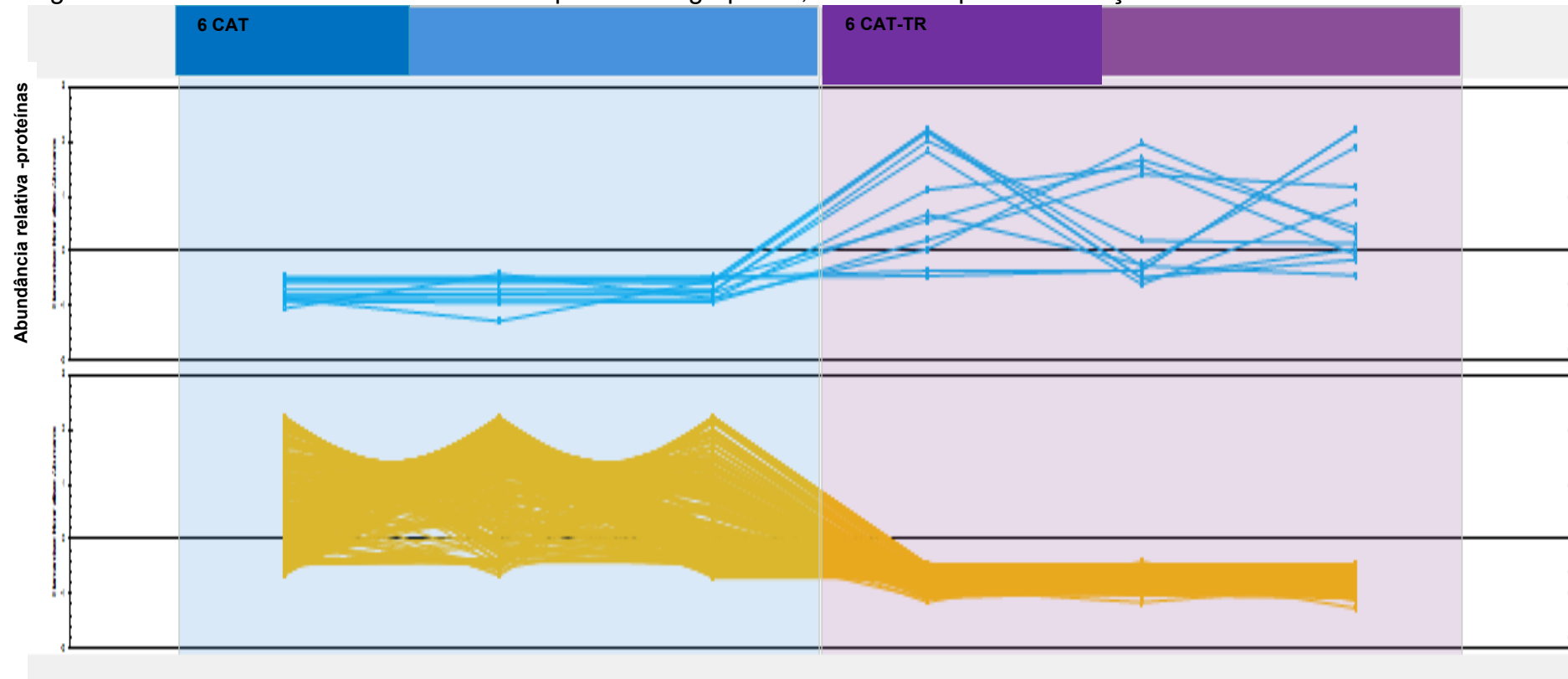
Figura 22 - Dendrograma mostrando o agrupamento de proteínas de acordo com seus perfis de abundância, durante o tempo 12 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

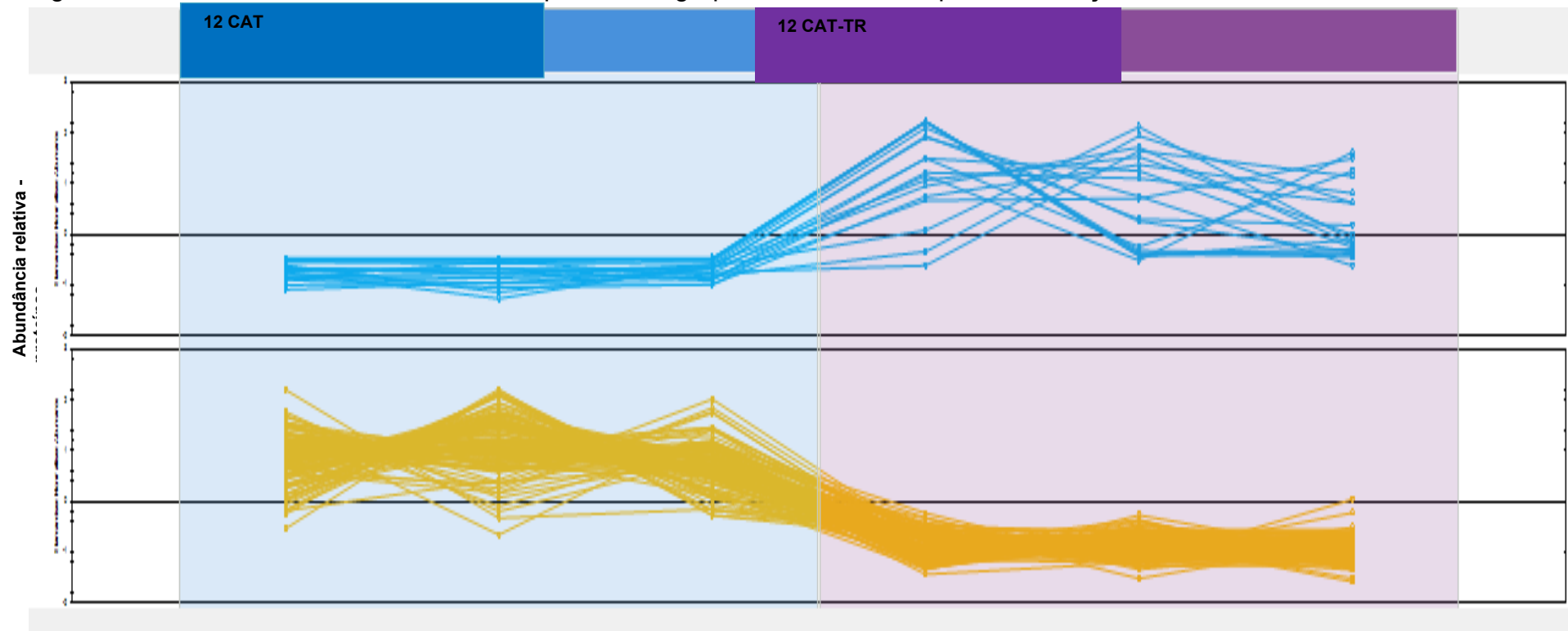
Nota: As cores dos grupos (*clusters*) fazem referência às cores dos perfis de abundância relativa mostrados na 23.

Figura 23 - Perfis de abundância relativa de proteínas agrupados, durante tempo de incubação de 6 dias.



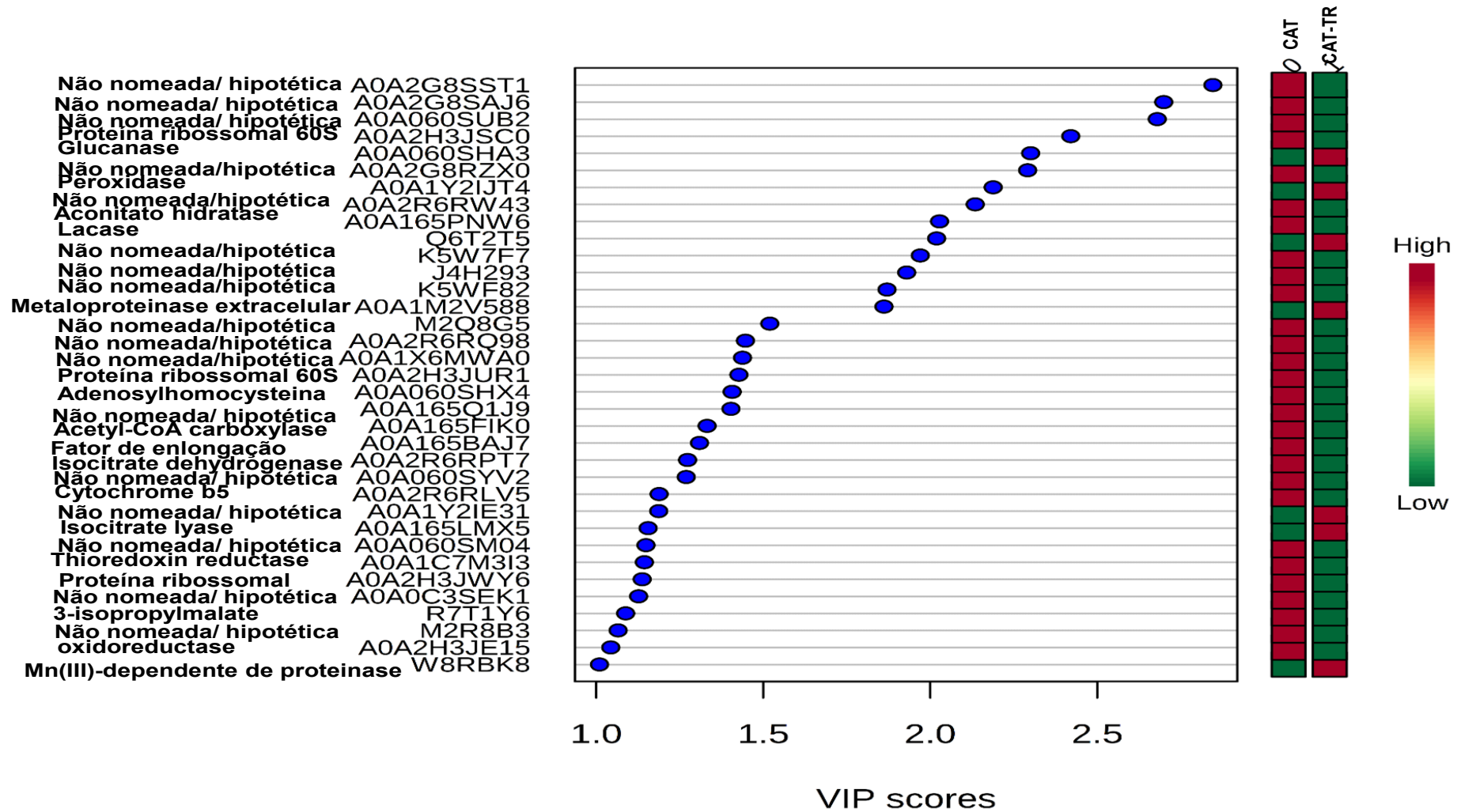
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Figura 24 - Perfis de abundância relativa de proteínas agrupados, durante tempo de incubação de 12 dias.



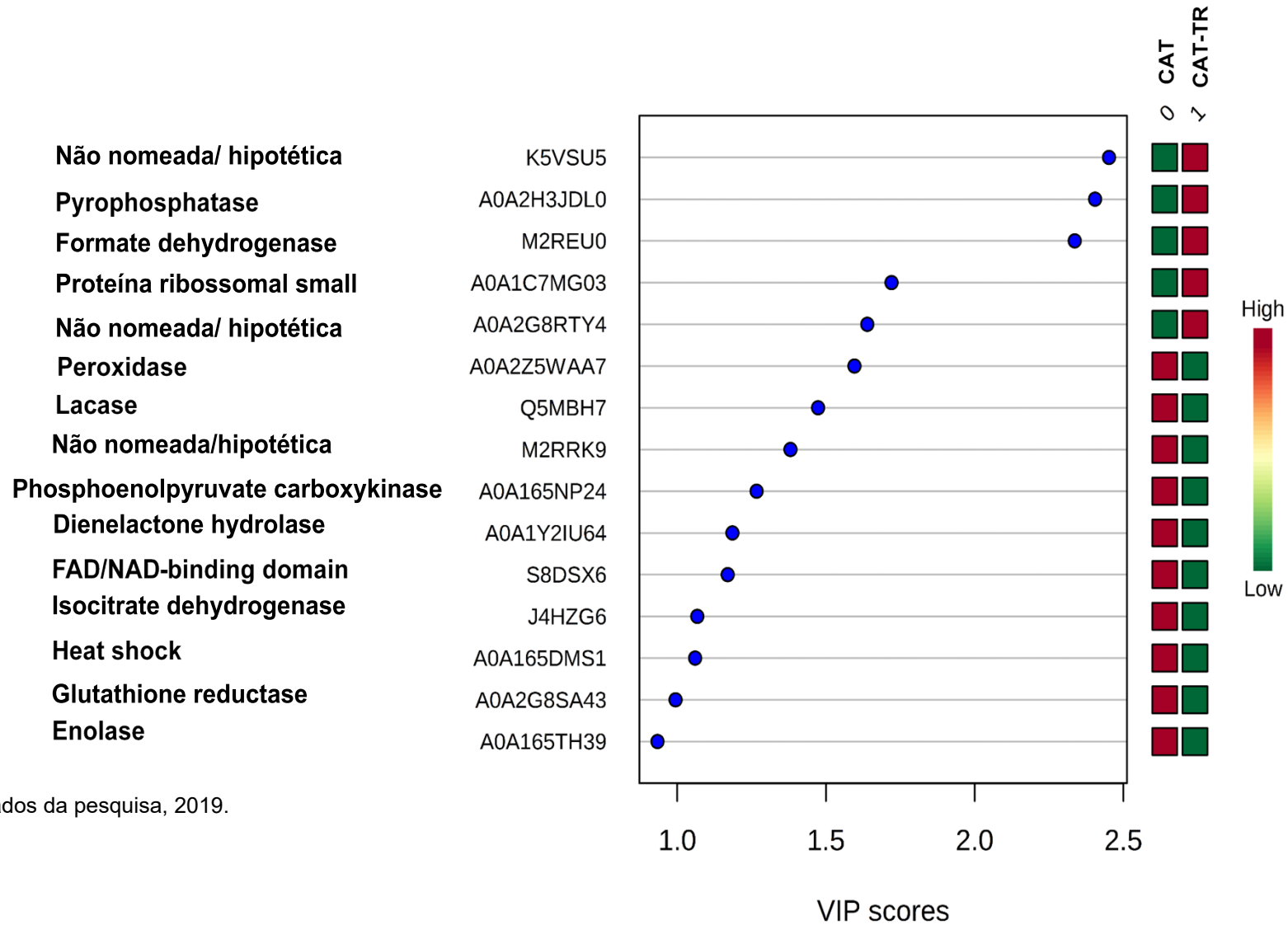
Fonte: Dados da pesquisa, 2019

Figura 25 - VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições- CAT e CAT-TR no tempo 6 dias.



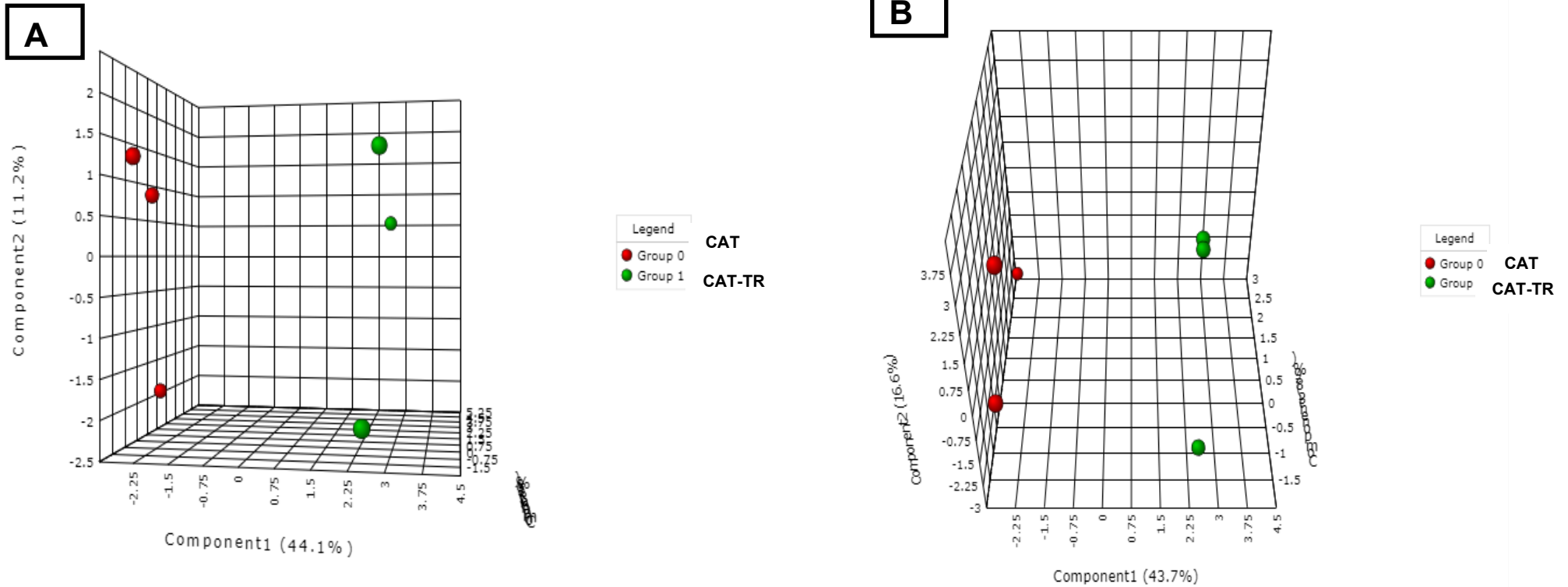
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Figura 26 - VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições- CAT e CAT-TR no tempo 12 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

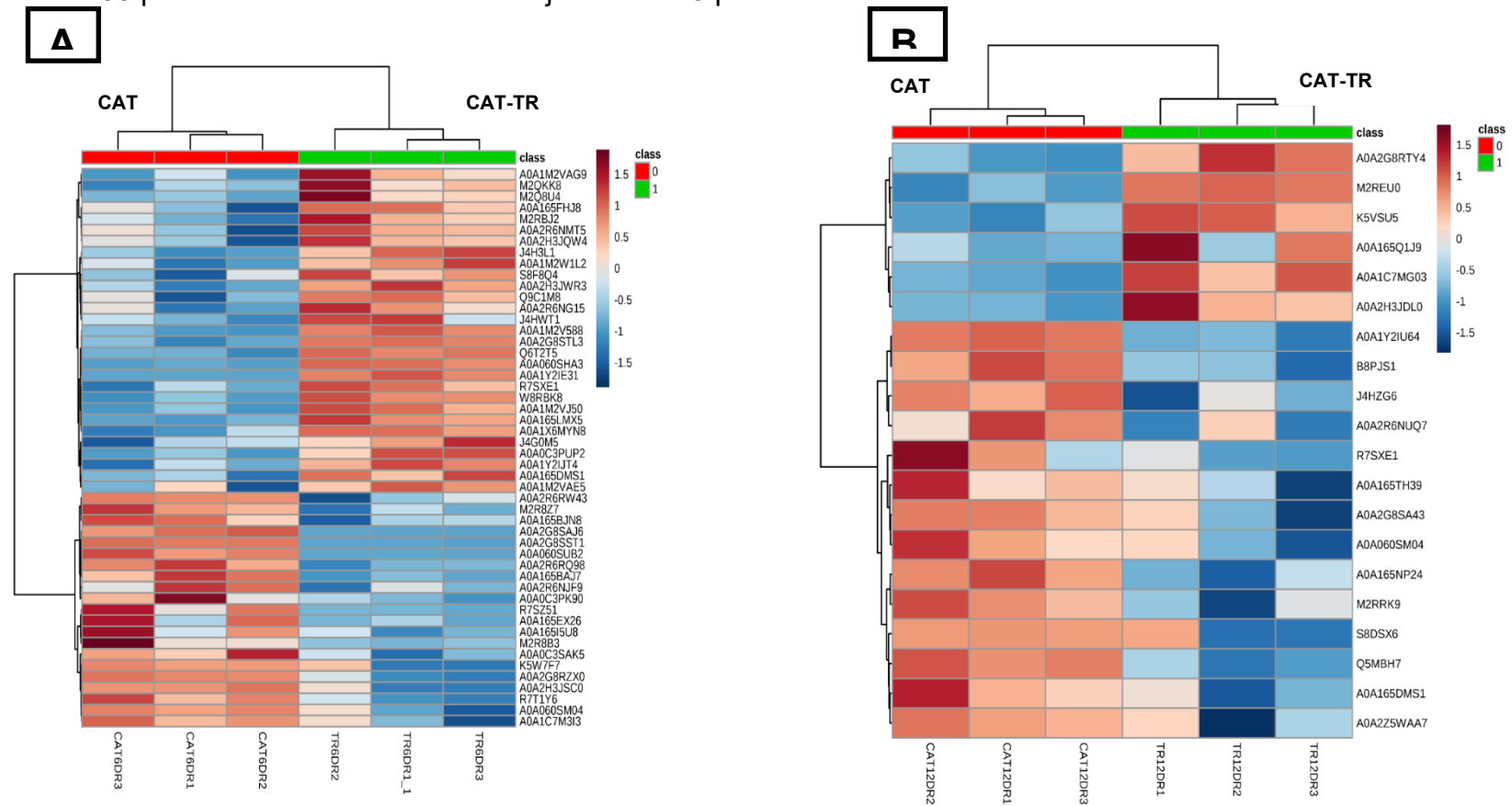
Figura 27 – A e B: sPLS-DA 3D mostrando agrupamento de replicatas e diferenciação entre condições.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Grupo 0: CAT e grupo 01: CAT-TR. A: tempo 6 dias e B: 12 dias. Fonte: Autor

Figura 28 – Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições. Em A: 6 DIAS conjunto das 50 proteínas e em B: 12 DIAS conjunto das 20 proteínas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Em ambos os conjuntos, usados proteínas com menor p-valor, tomando-se como fator limitante o agrupamento das replicatas em cada condição.

Classe 0 em vermelho: Classe 0 em vermelho: CAT e Classe 1 em verde: CAT-TR. Fonte: O autor.



## ***Gene Ontology e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes***

As categorias funcionais de *Gene Ontology* (GO) e vias de *Kegg* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) foram geradas para as proteínas reguladas nos tratamentos avaliados, caroço de algodão comum (CAT) e caroço de algodão tratado (CAT-TR). Para permitir uma análise adequada de representação de vias e termos GO, foi realizado um mapeamento dos códigos de acesso das proteínas para códigos de genes nos bancos pertinentes aos programas de predição. Para isso, foram utilizadas as plataformas de mapeamento Blast2GO, Revigo, Panther e WebGestalt para identificar as vias de Keeg e Blast2GO para gerar os termos de GO. A plataforma Revigo revelou agrupamentos semânticos entre os termos GO mais frequentes associados às proteínas reguladas.

Nos extratos analisados a partir de 6 e 12 dias de cultivo, as análises de *Kegg* mostraram para o primeiro dia, 26 vias distintas contendo proteínas reguladas que foram detectadas por *Panther*, *String*, *Blast2GO* e *WbGestalt*, sendo um exemplo representado na Figura 29. Para o segundo dia, foram detectadas sete vias distintas contendo proteínas reguladas.

A análise de termos GO também para os dois dias de cultivo (6 e 12) pelas plataformas *Blast2GO*, *Revigo*, *Panther* e *WebGestalt* mostraram a presença dos termos constantes da Figura 30 A-C (6 dias) e Figuras 32 A-C (12 dias). As análises, por sua vez, revelaram agrupamentos semânticos entre os termos GO mais frequentes associados às proteínas reguladas, nas Figuras 31 A-C para 6 dias e na Figura 33 A-C para o tempo 12 dias.

As análises dos dados apresentados a partir dos termos de *Gene Ontology* (GO), permitiram a divisão dos termos a partir de processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares em ambos os dias de cultivo, com variações de subcategorias entre esses dias, dada a complexidade do substrato de crescimento fúngico. No tempo seis dias de cultivo, a categoria de função molecular apresentou o maior número de anotações de termos GO, sendo 12 no total, dentre as quais se destacam a *ion binding* em maior quantidade (14%), além de outras como: atividades de oxirretudases (11%) e atividades hidrolíticas (8%). A segunda categoria com mais anotações foi a de processos biológicos, com nove, com maior representação para processamento do metabolismo de

substâncias orgânicas (18%), além de outros destaques como processos metabólicos primários (17%), processos metabólicos do nitrogênio (14%), e processos de oxido-redução (7%). A última categoria representada, componentes celulares, tiveram destaque para componentes e partes intracelulares.

Para o tempo seis dias de cultivo, conforme esperado, houve diferenças entre as quantidades de anotações de termos GO, entre as categorias (8 em ambos: processos biológicos e componentes celulares e 12 componentes molecular). As análises da categoria função molecular mostraram destaque, entre outros, para as anotações de termos GO: *ion binding* (14%), seguida de atividades de oxidoredutase (11%), atividades de hidrolases (8%).

No tempo 12 dias de cultivo, curiosamente, não houve diferença entre as quantidades de anotações de termos GO, entre as categorias (12 em cada). As análises da categoria função molecular mostraram destaque para as anotações de termos GO: *ion binding* (19%), seguida de atividades de oxidoredutase (11%), similar ao tempo seis dias. Outro ponto que merece destaque se refere às atividades hidrolases, por apresentar acentuado aumento (9%) e, por fim, novas funções moleculares foram encontradas, como a atividades de liases (7%).

A categoria de processos biológicos foi melhor apresentada pelas anotações de termos GO para processamento do metabolismo de substâncias orgânicas (16%), além de outros destaques como processos metabólicos primários, processos metabólicos do nitrogênio, processos de oxido-redução, além de respostas a estresse (não presente em seis dias). A última categoria, assim como no tempo seis dias, também mostrou destaque para anotações de componentes celulares.

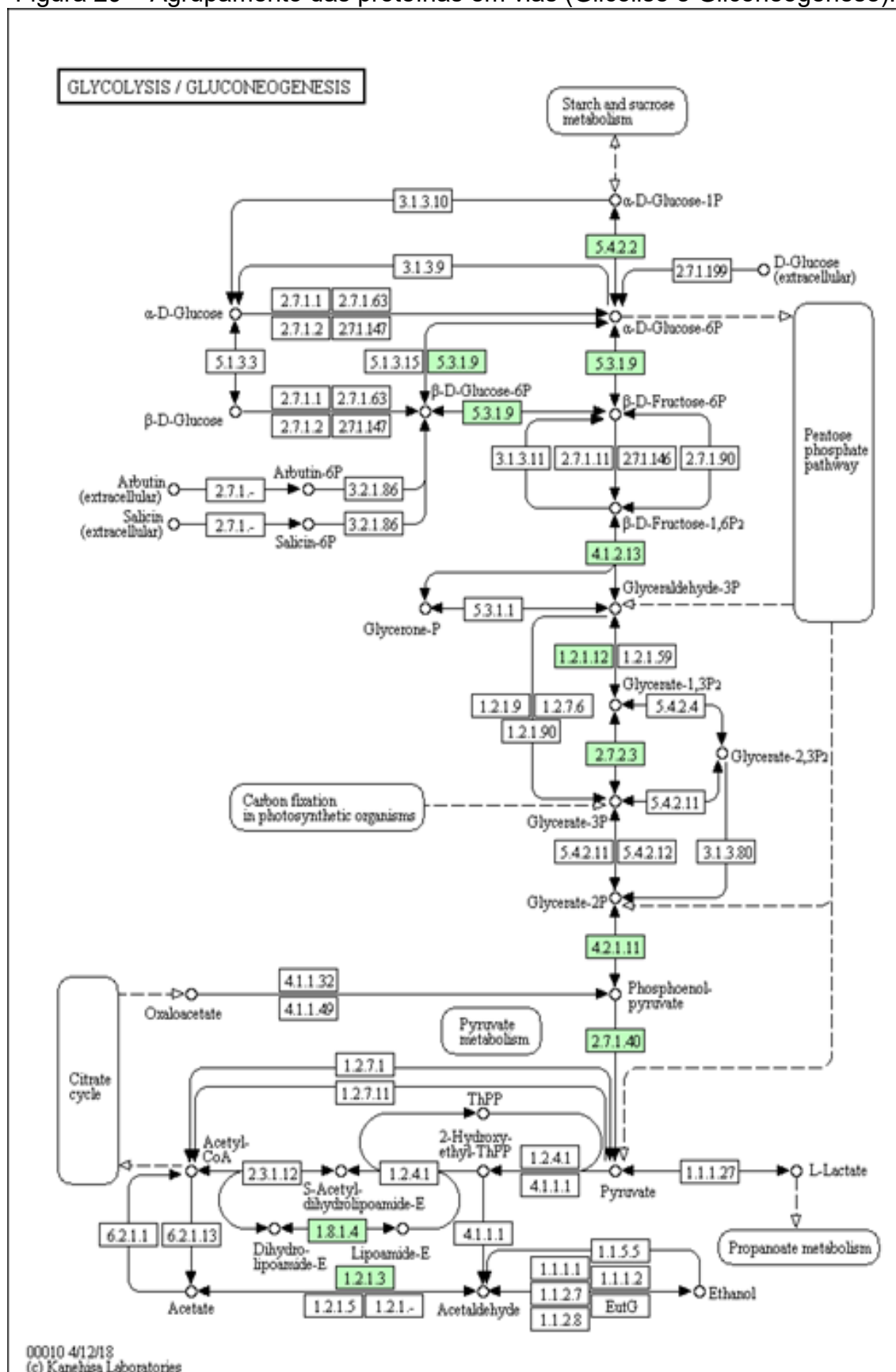
Os agrupamentos semânticos de proteínas (FIGURAS 31 A-C e 33 A-C), mostraram claramente que, para os processos biológicos, o tempo seis dias apresenta maior quantidade de proteínas reguladas em comparação com o tempo 12 dias, sendo bem visível essa diferença entre os dois tempos. Algo parecido entre os dois tempos avaliados, está nos destaques para as proteínas envolvidas em respostas a estresse oxidativo. Diante disso, é possível inferir que independente do tempo em crescimento, o macrofungo necessita ativar proteínas envolvidas a estresse celular, que podem ser causados, entre outros

motivos, pela presença de substâncias tóxicas, como o gossipol.

Para a categoria componentes celulares, os agrupamentos semânticos mostraram resultados bastante divergentes entre os dias avaliados apresentando, de maneira geral, respostas parecidas quanto à presença de proteínas reguladas que fazem parte do metabolismo de macromoléculas complexas. A presença dessas proteínas é importante por possibilitar – além da degradação de lignocelulose presente no caroço de algodão – a destoxificação de moléculas tóxicas, como o gossipol.

As análises de agrupamento semântico das funções moleculares mostraram, assim como as outras categorias avaliadas, diferenças entre os dois tempos avaliados. No entanto, vale destacar que a função atividade de hidrolases está abundante representada em ambos os tempos. Esses dados, dão suporte para as hipóteses levantadas até esse momento. Uma vez que, para o fungo conseguir se manter no meio de cultivo complexo, deve ser capaz de produzir diversas enzimas, que agem por meio de reações de hidrólise, destituindo por tanto a ligenocelulose e degradando gossipol livre.

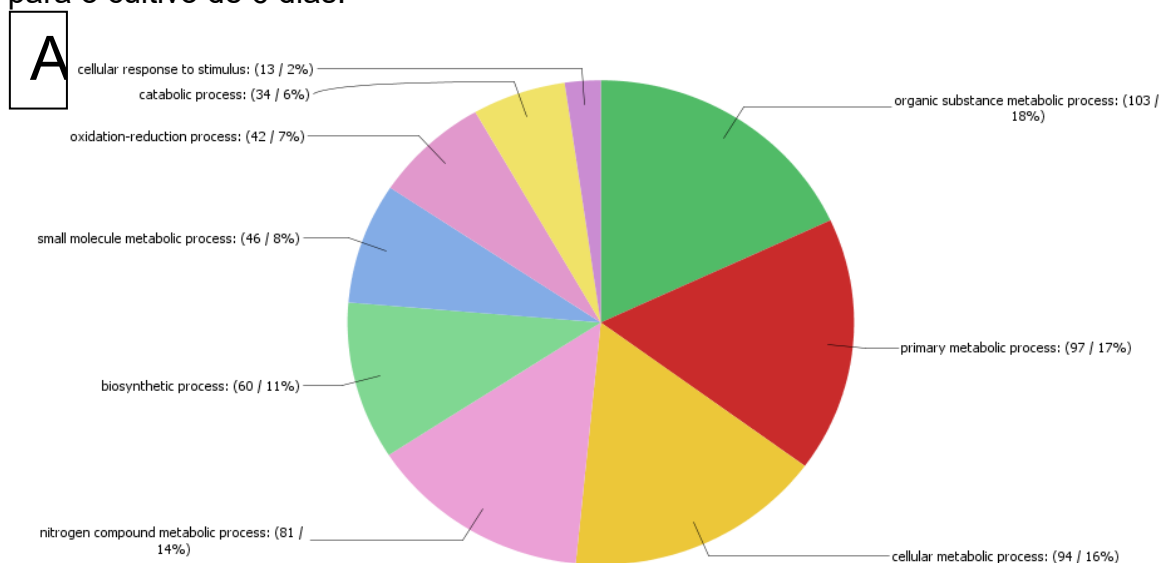
Figura 29 – Agrupamento das proteínas em vias (Glicólise e Gliconeogênese).



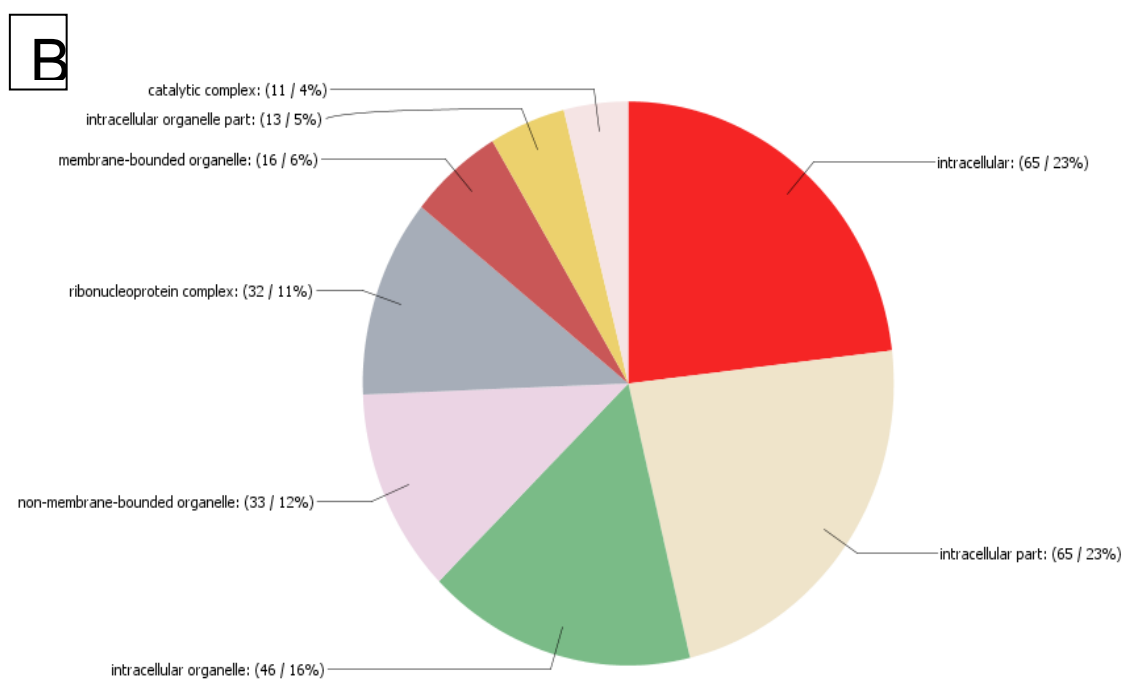
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Nota: Exemplo de uma das 26 vias contendo proteínas reguladas detectadas pelas plataformas Blast2GO, Revigo, Panther e WebGestalt.

Figura 30-A-C – Análises de termos GO agrupados segundo diferentes funções para o cultivo de 6 dias.

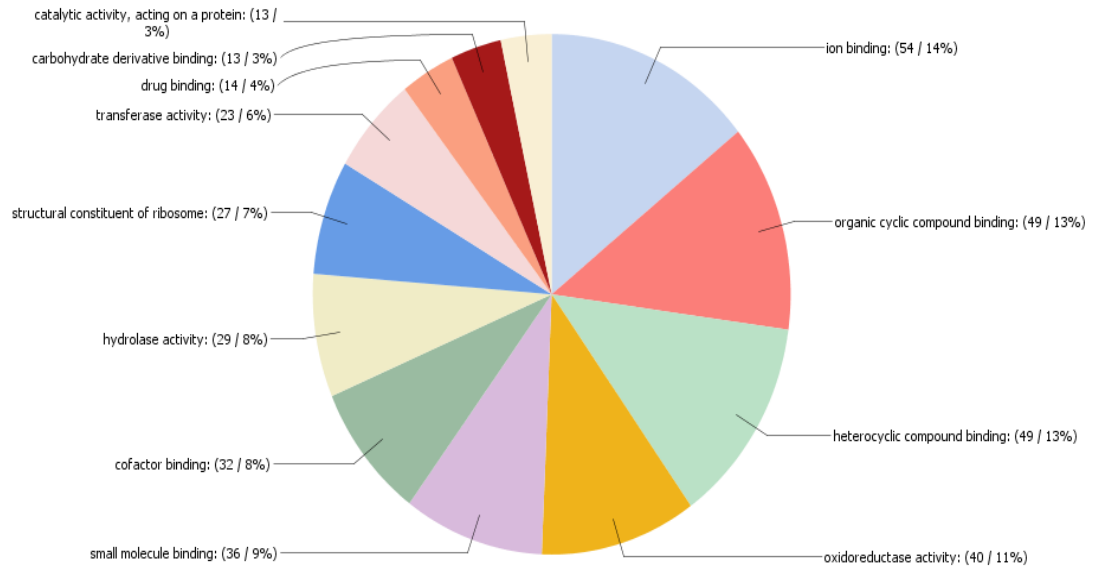


Fonte: Dados da pesquisa, 2019. A: Processos Biológicos.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019. B: Componentes Celulares.

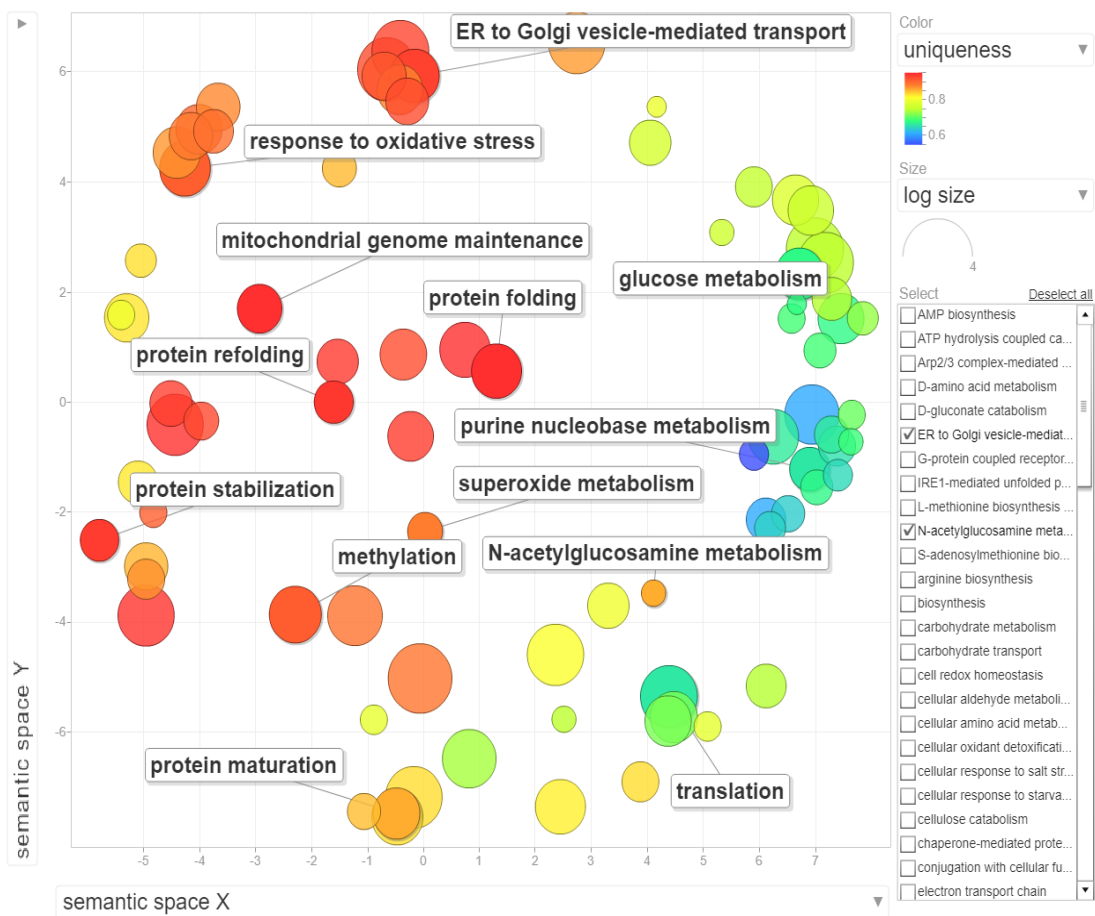
C

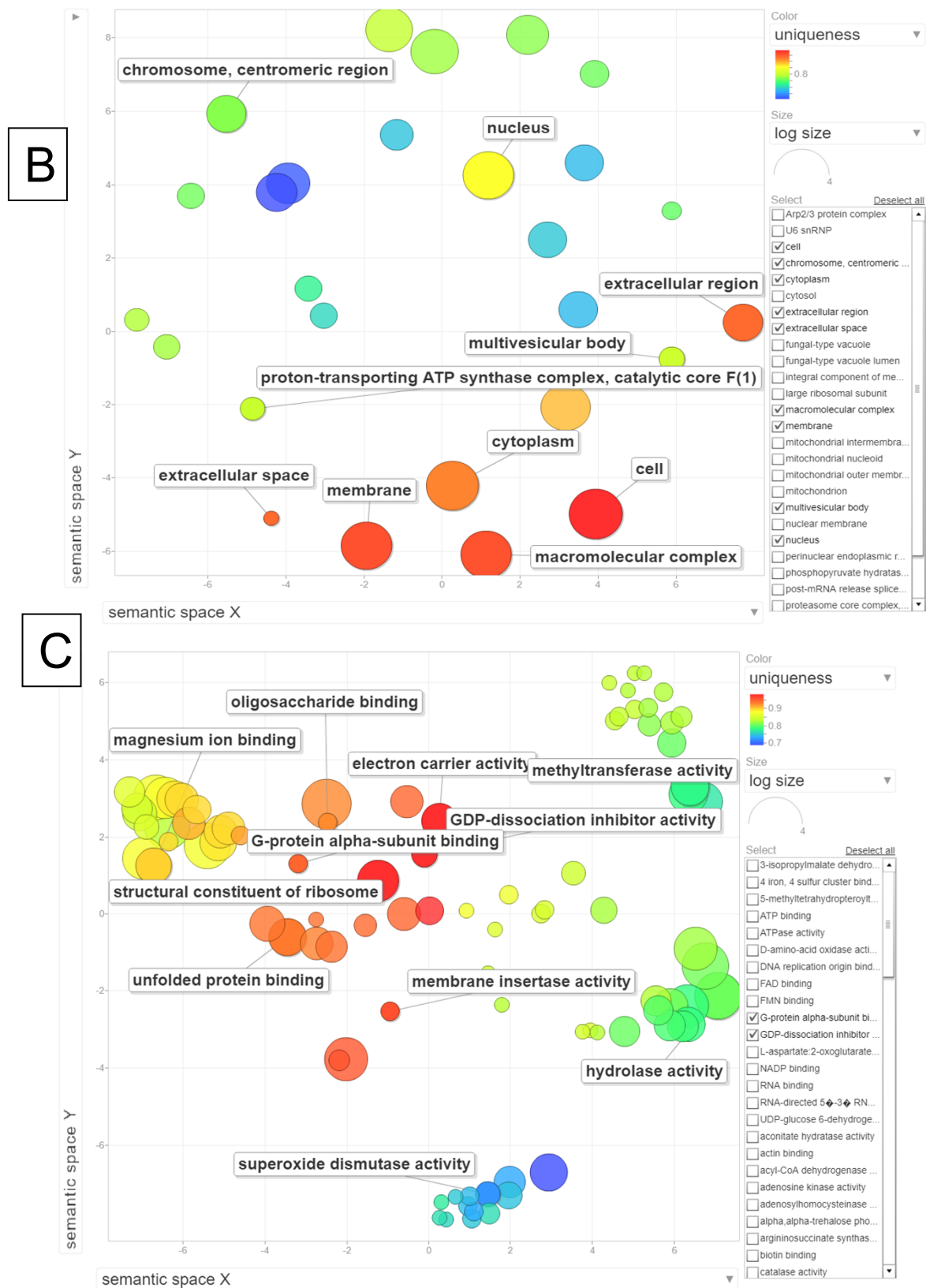


Fonte: Dados da pesquisa, 2019. C: Componentes Moleculares.

Figura 31-A-C – Agrupamento semântico de proteínas reguladas em cultivo de 6 dias.

A

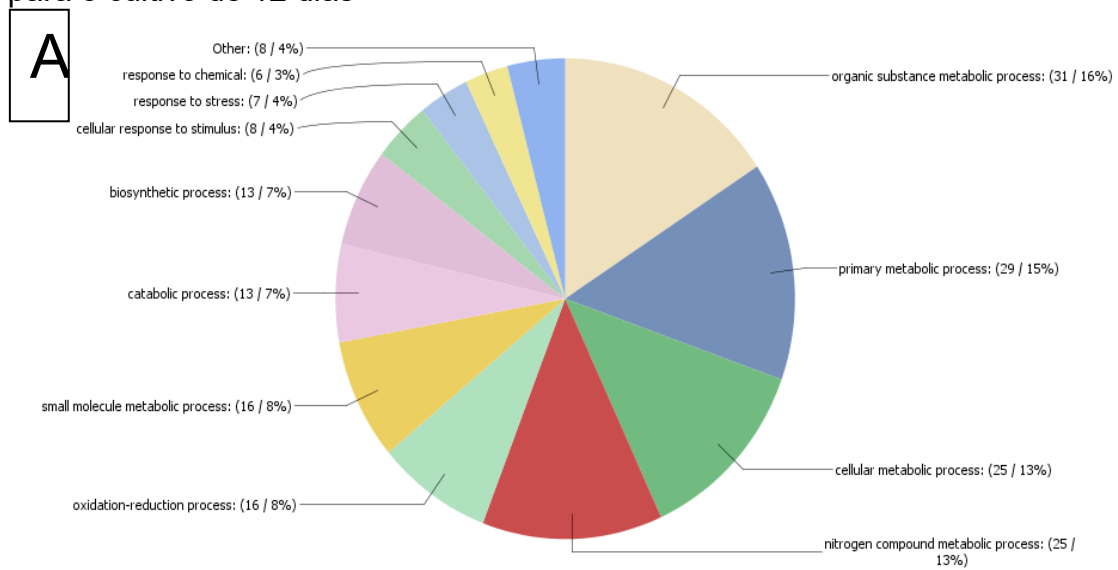




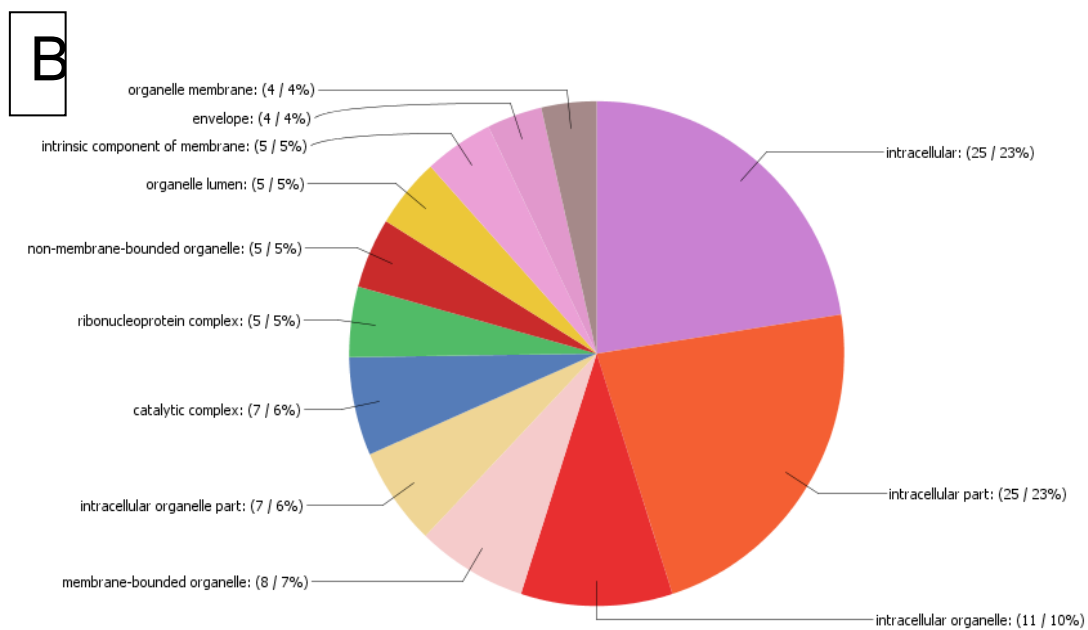
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Correlação com frequência absoluta no conjunto de proteínas (tamanho dos círculos) e similaridade com outros termos (escala de cores). A: Processos biológicos; B: Componentes celulares; C: Funções moleculares.

Figura 32-A-C – Análises de termos GO agrupados segundo diferentes funções para o cultivo de 12 dias

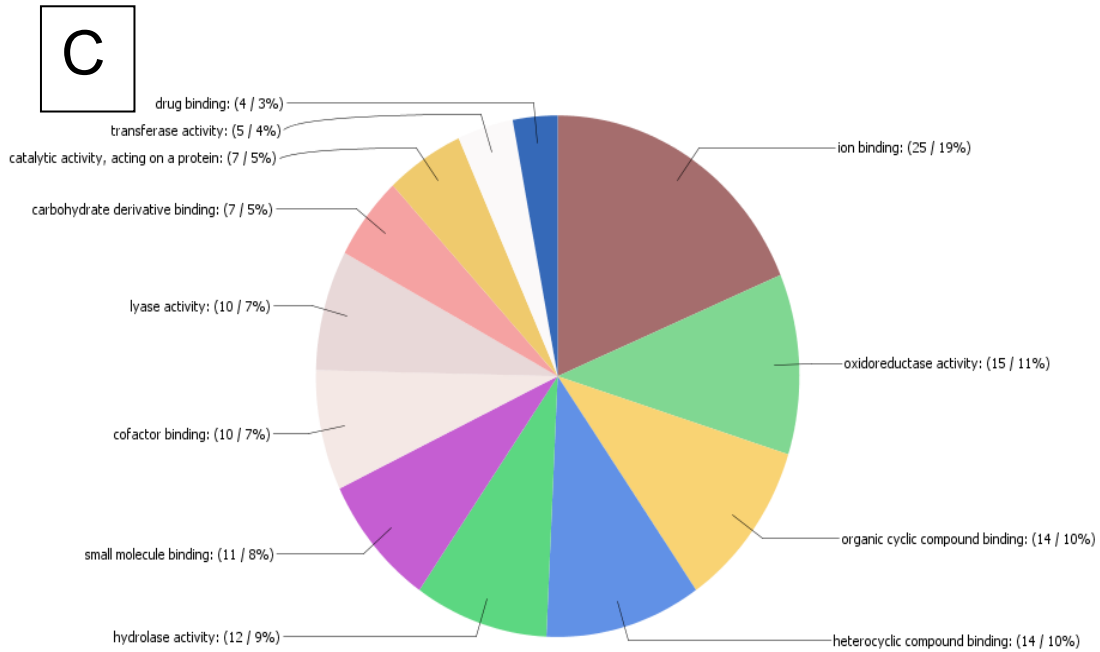


Fonte: Dados da pesquisa, 2019. A: Processos Biológicos.



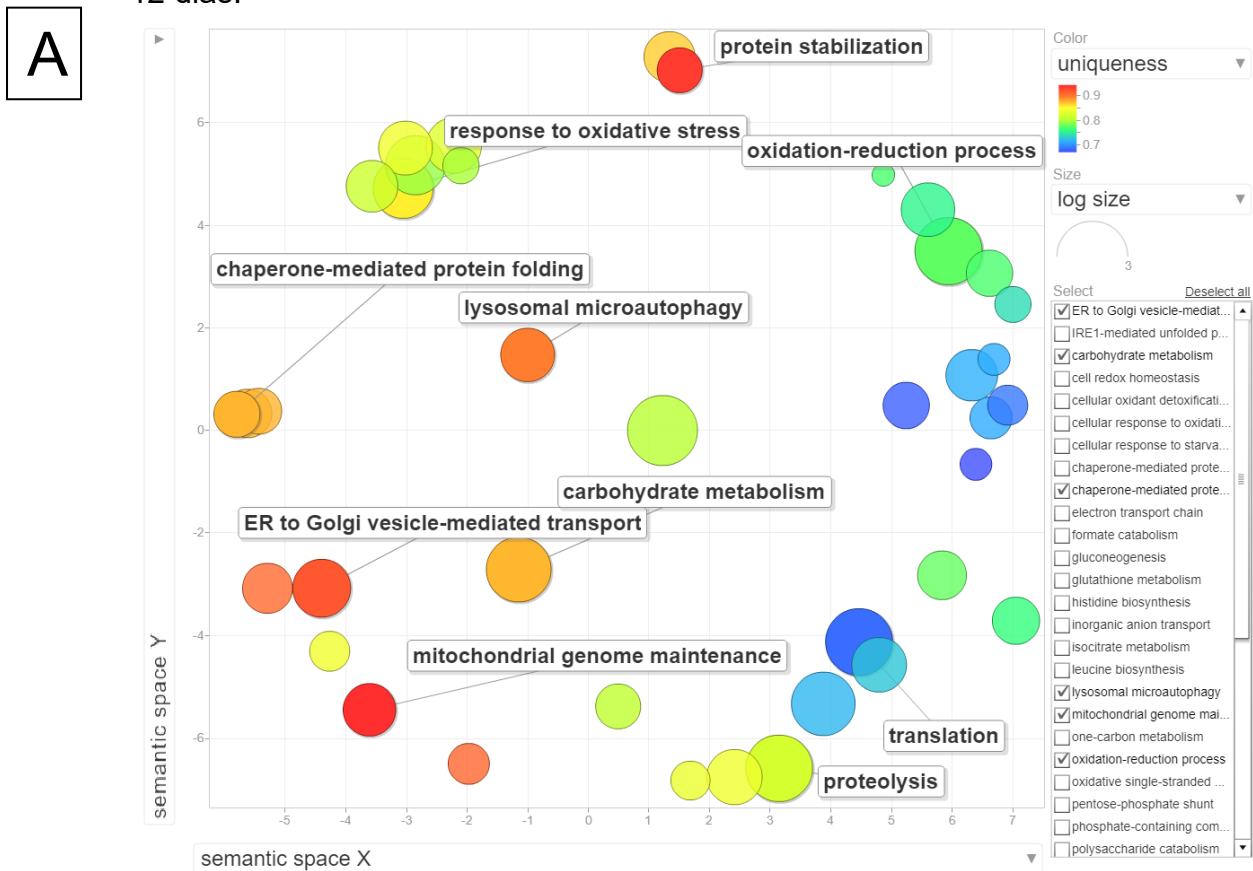
Fonte: Dados da pesquisa, 2019. B: Componentes Celulares.



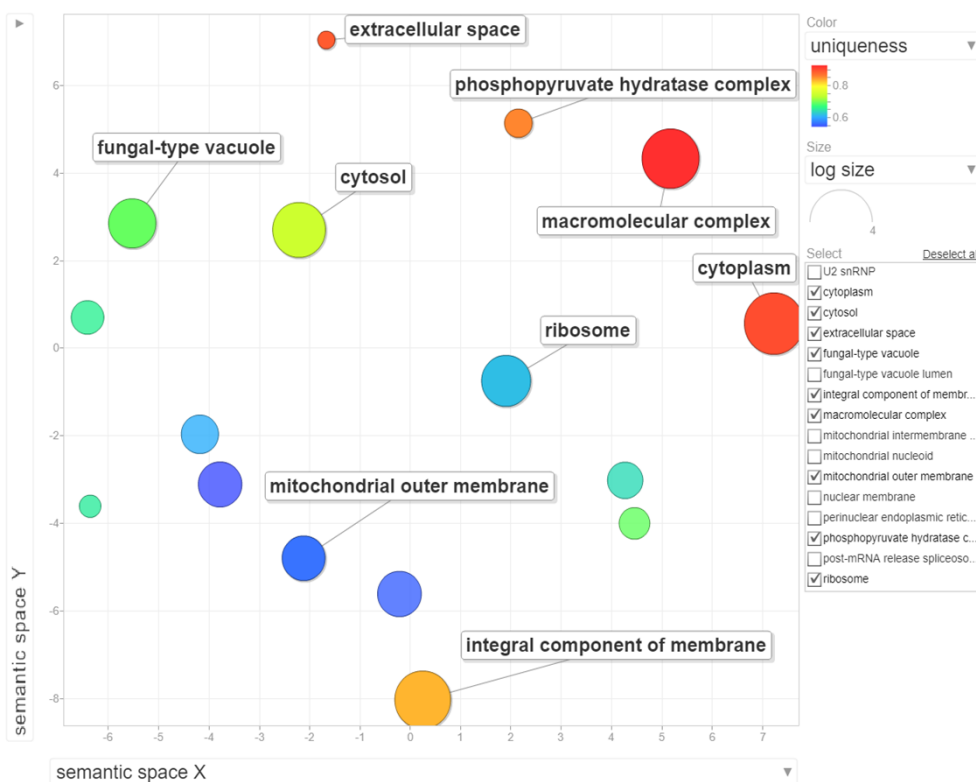


Fonte: Dados da pesquisa, 2019. C: Componentes Moleculares.

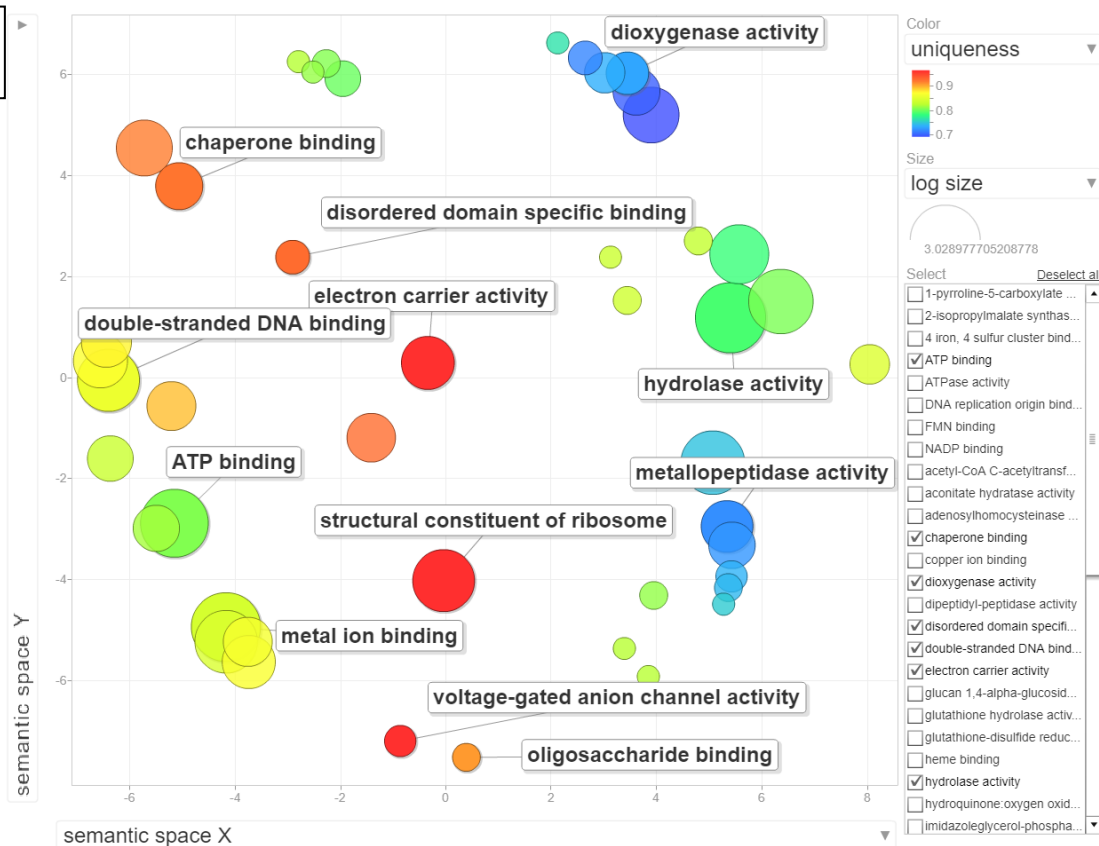
Figura 33-A-C – Agrupamento semântico de proteínas reguladas em cultivo de 12 dias.



B



C



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Correlação com frequência absoluta no conjunto de proteínas (tamanho dos círculos) e similaridade com outros termos (escala de cores). A: Processos biológicos; B: Componentes celulares; C: Funções moleculares.

## CONCLUSÕES

O macrobasidiomiceto *P. lecomtei* apresentou resultados significativos na degradação de gossipol livre (GL) presente em caroço de algodão *in natura* por meio de fermentação em estado sólido ou extratos brutos enzimáticos. Foram observadas degradações de forma proporcional ao crescimento fúngico com valores máximos alcançados no tempo 15º dia, último tempo avaliado, correspondente a 70, 27%.

Os substratos baseados em caroço de algodão, contendo ou não gossipol livre atuaram como bons indutores para produção de enzimas pelo macrofungo *Panus lecomtei* CC40. As análises da curva de produção de enzimas mostraram atividades significativas de lacases, manganês peroxidase e protease durante os 15 dias de cultivo. Os extratos brutos mostraram potencial para degradação de compostos antinutricionais para nutrição animal, tal como o gossipol.

As enzimas detectadas possuem características interessantes em termos quantitativos de produção, para serem estudadas visando aplicações industriais.

Extratos brutos provenientes do crescimento do macrofungo em substratos contendo ou não gossipol livre (CAT e CAT-TR), apresentaram resultados significativos na degradação de inibidores enzimáticos. O extrato CAT-TR foi mais eficiente na degradação dos inibidores em comparação com CAT.

Além de serem capazes de degradar gossipol livre presentes em biomassas *in natura*, os extratos brutos apresentaram potencial degradação de gossipol sintético, com eficiência de redução em 100% ao final de apenas apenas 60 minutos de incubação. Esses mesmos extratos, quando ultrafiltrados e parcialmente purificados por meio de cromatografia de exclusão molecular, mantiveram os mesmos níveis de degradação (também usando gossipol sintético). Portanto, confirmam a capacidade de degradação de gossipol por ação do macrofungo ou respectivos extratos enzimáticos.

As análises de secretoma global/proteoma de *P. lecomtei* CC40 foram realizadas por meio dos pontos escolhidos a partir da curva de degradação de gossipol e produção de enzimas. Os dados do secretoma do macrofungo mostraram respostas fisiológicas distintas, tanto em relação à biomassa CAT e CAT-TR quanto os tempos 6 e 12 dias.

As análises de expressão diferencial de proteínas mostraram proteínas candidatas à degradação de gossipol como, *lacases*, *oxidoredutases*, *shock protein* e *metaloproteases*. Além disso, durante o crescimento do macrofungo no substrato contendo gossipol livre, o metabolismo de proteínas bem como no metabolismo de síntese de energia, estão ativados de forma mais intensa quando na ausência desse fator, em ambos os dias de cultivo.

Este é o primeiro estudo secretômico para o macrofungo *Panus lecomtei* CC40, trazendo comparações de dados de secretoma quando crescido em resíduo lignocelulósico, na presença e ausência de gossipol livre. Além disso, a quase totalidade de proteínas identificadas como não nomeadas/hipotéticas estão presentes quando gossipol livre está presente (CAT) nos dois dias avaliados, portanto, decifrar os papéis dessas proteínas parece ser uma tarefa crucial para o entendimento da degradação microbiana de gossipol livre.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

O método desenvolvido baseado em UHPLC possui maiores sensibilidade para detecção de baixos níveis de gossipol livre em diferentes biomassas de algodão e servirão de base para quantificação de gossipol em estudos diversos que visem o entedimento de degradação desse fator antinutricional por vários métodos, incluindo cultivo microbiano.

Diferentes métodos podem ser usados para degradação de gossipol livre, como: físico (autoclavagem), químico ( $\text{Ca (OH)}_2$ ), biológico através decompostagem e biológico combinado (autoclavagem + fermentação em estado sólido de macrofungos) está entre os mais promissores conforme apontados pelos nossos dados.

Os macrofungos são capazes no método combinado: fermentação em estado sólido + físico (autoclavagem) de degradar completamente o gossipol livre, possibilitando melhoras nutricionais nessa biomassa, como o incremento protéico.

Extratos enzimáticos obtidos a partir do cultivo de macrofungos são eficientes na degradação de gossipol livre presente em caroço de algodão. Extrato enzimático do macrofungo *Panus lecomtei* degrada gossipol livre e gossipol sintético, em apenas 60 minutos em incubação, além de inibidores enzimáticos. Esses resultados podem ser explorados como forma de tratamento enzimático em diferentes biomassas. No entanto, são necessários estudos sobre otimizações de cultivo bem como escalonamento.

Neste estudo adotou-se abordagens enzimáticas e proteômicas no entendimento do processo de degradação de gossipol livre por ação de macrofungos, fornecendo dados inéditos relacionados ao comportamento de macrofungos cultivado na biomassa caroço de algodão *in natura*.

Os resultados do secretoma do basidiomiceto *P. lecomtei* mostraram diferenças fisiológicas do macrofungo quando cultivados em biomassa contendo ou não gossipol livre em diferentes tempos de incubação.

Os dados apontados nessa tese também foram capazes de identificar proteínas envolvidas na sobrevivência do fungo e que podem estar envolvidas na degradação de gossipol livre, entre as candidatas se destacaram lacases,

oxidoreduases, *shock protein* e metaloproteases.

Apesar de este trabalho oferecer o primeiro *insight* sobre degradação de gossipol livre presente em algodão *in natura*, para o completo entendimento da degradação microbiana desse fator antinutricional é importante, além do emprego de ferramentas proteômicas, também, ferramentas metabolômicas, haja vista as análises dos produtos formados a partir dessa degradação.

## REFERÊNCIAS

ABDURAKHIMOV, R. Sh *et al.* Effect of cotton-seed biocidal peptides and gossypol on resistance to biotic factors. **Chemistry of natural compounds**, v. 45, n. 2, p. 213-216, 2009.

ANP. **Agência nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 18 ago. 2018.

AITKEN, M. D.; IRVINE, R. L. Characterization of reactions catalyzed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 276, n. 2, p. 405-414, 1990.

ALEXANDER, J. *et al.* Gossypol as undesirable substance in animal feed: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. **Efsa Journal**, n.908, 2008.

ALFARO, M. *et al.* Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. **Journal of Proteomics**, v. 102, p. 28-43, 2014.

ALVES, L. R. A.; BARROS, G. S. C.; BACCHI, Mirian Rumenos Piedade. Produção e exportação de algodão: efeitos de choques de oferta e de demanda. **Revista Brasileira de Economia**, v. 62, n. 4, p. 381-405, 2008.

AMIGO-BENAVENT, M.; VILLAMIEL, M.; DEL CASTILLO, M. D. Glicoproteínas: propiedades, funciones y aplicaciones. **Alimentacion Nutricion Y Salud**, v. 14, n. 1, p. 1, 2007.

AMPA. **Associação matrogrossense de produção de algodão**, 2019.  
Disponível em: [tp://www.ampa.com.br/site/qs\\_historia.php](http://www.ampa.com.br/site/qs_historia.php). Acesso em: 15 abr. 2019.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of radiation research and applied sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.

ARAÚJO, A. E. de *et al.* **Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003.

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

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**, v. 51, n. 3, p. 201-207, 1996.

ARNOLDS, E. The role of macrofungi in environmental conservation. **Plant Biosystem**, v. 126, n. 6, p. 779-795, 1992.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

ARORA, D. **Mushrooms Demystified: A Comprehensive Guide to the Fleshly Fungi**. Berkeley: Ten Speed Press., 1986.

ARSHID, S. *et al.* High performance mass spectrometry based proteomics reveals enzyme and signaling pathway regulation in neutrophils during the early stage of surgical trauma. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, v. 11, n. 1-2, p. 1600001, 2017.

ABRAPA. **Associação Brasileira de Produtores de Algodão**, 2019. Disponível em: <https://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx>. Acesso em: 14 abr. 2019.

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

ATALLA, R. H. The structures of cellulose. **MRS Online Proceedings Library Archive**, v. 197, 1990.

ATIA, A. I.; RAHIM, G. A. A. Detoxification treatments of free gossypol in cottonseed meal by microbial treatment of mixed cultures and biochemical evaluation on rabbits. **J. Rad. Res. Appl. Sci**, v. 2, n. 2, p. 397-415, 2009.

ATKINS, S. D.; CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **J Appl Genet**, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied energy**, v. 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009.

BARBOSA, E. B. *et al.* Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

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

BARR, D. P.; AUST, S. D. **Pollutant degradation by white rot fungi**. In: Reviews of environmental contamination and toxicology. Springer, New York, NY, p. 49-72, 1994a.

BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental science & technology**, v. 28, n. 2, p. 78A-87A, 1994b.

BELTRÃO, N. E. de M.; DE ARAUJO, A. E. **Algodão: o produtor pergunta, a**



Embrapa responde. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004.

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.

BENEDICT, C. R.; LIU, J.; STIPANOVIC, R. D. Theperoxidative coupling of hemigossypol to (+)-and (-)-gossypol in cottonseed extracts. **Phytochemistry**, v. 67, n. 4, p. 356-361, 2006.

BERENDS, E. *et al.* **Production of therapeutic glycoproteins in mushrooms**. In: Mushroom biology and mushroom products. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Arcachon, France, 4-7 October, 2011. v. 1. Oral presentations. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 2011. p. 312-313.

BEROVIC, M. Cultivation of Medicinal Mushroom Biomass by Solid-State Bioprocessing in Bioreactors. *In*: Steudler S., Werner A., Cheng J. (eds) Solid State Fermentation. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v. 169. Springer: Cham, 2019.

BISHOP, K. S. *et al.* From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. **Phytochemistry**, v. 114, p. 56-65, 2015.

BOMFIM, M. A. D.; SILVA, M. M. C.; DOS SANTOS, Sueli Freitas. Potencialidades da utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de caprinos e ovinos. In: Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 3; FEIRA NACIONAL DO AGRONEGÓCIO DA CAPRINO-OVINOCULTURA DE CORTE, 2007, João Pessoa. **Anais eletrônico...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2007. 21 f. 1 CD-ROM., 2007.

BON, E. P. S.; PEREIRA JUNIOR, N. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro, 1999.

BON, *et al.* **Bioprocessos para a produção de enzimas**. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 95-122.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes—nature's toolbox for white biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 381, 2008.

BRAHMKSHATRIYA, P. P.; BRAHMKSHATRIYA, P. S. Terpenes: Chemistry, biological role, and therapeutic applications. **Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes**, p. 2665-2691, 2013.

BRESSANI, R. *et al.* All-vegetable protein mixtures for human feeding. 13. Effect of cooking mixtures containing cottonseed flour on free gossypol content. **Food Technology**, v. 18, n. 10, p. 1599-&, 1964.

CAMERON, M. D.; AUST, Steven D. Cellobiose dehydrogenase—an extracellular fungal flavocytochrome. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 2-3, p. 129-138, 2001.

CANFORA, L. *et al.* Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1398-1407, 2008.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. EUA, Academic Press, 2001.

CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, Brasil, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHALUPOVÁ, J. *et al.* Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 230-241, 2014.

CHAN-CUPUL, W. *et al.* Response of ligninolytic macrofungi to the herbicide atrazine: dose-response bioassays. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 4, p. 348–357, out. 2014.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, Rudolph M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J. biol. Chem**, v. 171, n. 2, p. 501-505, 1947.

CHIARADIA, M. C. *et al.* O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, 2008.

CHOINOWSKI, T. *et al.* The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70Å resolution reveals a hydroxy group on the C $\beta$  of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle<sup>1</sup>. **Journal of molecular biology**, v. 286, n. 3, p. 809-827, 1999.

CHONG, J. *et al.* MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W486-W494, 2018.

CLAUS, H.; FILIP, Z. Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, v. 26, n. 3, p. 180- 185, 1998.

CORREA, E. *et al.* Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 6, p. 497–499, jun. 2006.

COSGROVE, D. J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. **Plant physiology**, v. 125, n. 1, p. 131-134, 2001.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

CROWELL, A. M. J.; WALL, M. J.; DOUCETTE, A. A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica chimica acta**, v. 796, p. 48-54, 2013.

CULLEN, D.; KERSTEN, P. Fungal enzymes for lignocellulose degradation. Applied molecular genetics of filamentous fungi, p. 100-131, 1992.

DA COSTA SOUSA, L. *et al.* 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 339-347, 2009.

DAHMEN, N. *et al.* Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. **GCB Bioenergy**, v. 11, n. 1, p. 107-117, 2019.

DASHTBAN, M. *et al.* Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 1, n. 1, p. 36, 2010.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International journal of biological sciences**, v. 5, n. 6, p. 578, 2009.

DATTA, R. *et al.* Enzymatic degradation of lignin in soil: a review. **Sustainability**, v. 9, n. 7, p. 1163, 2017.

DE CASTRO, A. M. *et al.* *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant  $\beta$ -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 2111-2122, 2010.

DE MATTOS-SHIPLEY, K. M. J. *et al.* The good, the bad and the tasty: the many roles of mushrooms. **Studies in mycology**, v. 85, p. 125-157, 2016.

DE PAULA NAVES, L. *et al.* Componentes antinutricionais e digestibilidade proteica em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) submetidas a diferentes processamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 180-184, 2010.

DE SIQUEIRA, F. G.; FERREIRA FILHO; XIMENES, E. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 54-60, 2010.

DE SIQUEIRA, F. G. *et al.* Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. **Biodegradation**, v. 21, n. 5, p. 815-824, 2010.

DE SIQUEIRA, F. G. *et al.* The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20-26, 2010.

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

DÍAZ-GODÍNEZ, G. Fungal bioactive compounds: An overview. **Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications**, p. 195-224, 2015.

DONALD, V.; JUDITH, G. V. Farm animal metabolism and nutrition. D'MELLO, JP Felix. Ed. Biochemistry. Second 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1995.

DOSORETZ, C. G.; ŠAŠEK, V. **Screening of white rot fungi for bioremediation of contaminated soil**. Office of the Science Advisor US Agency of International Development, 2000.

DRITSA, V. *et al.* Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. **Bioresource technology**, v. 98, n. 9, p. 1741-1747, 2007.

DUARTE, G. C. *et al.* Biomass-derived inhibitors of holocellulases. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 3, p. 768-777, 2012.

DUARTE, G. C. Holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae*: Purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica. 2016.

DURU, M. E.; ÇAYAN, G. T. Biologically active terpenoids from mushroom origin: a review. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 4, p. 456, 2015.

EGBUTA, M. *et al.* Biological importance of cotton by-products relative to chemical constituents of the cotton plant. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 93, 2017.

EICHHORN, S. J. *et al.* Current international research into cellulosic fibres and composites. **Journal of materials Science**, v. 36, n. 9, p. 2107-2131, 2001.

ELKIN, R. G. Influence of Plant Toxins on Laying Hen Performance and Egg Quality. **Egg Innovations and Strategies for Improvements**. 2017. p. 499-512.

ETZLER, M. E. Plant lectins: molecular and biological aspects. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.209-234, 1985.

FACKLER, K. *et al.* Lignin degradation by white rot fungi on spruce wood shavings during short-time solid-state fermentations monitored by near infrared spectroscopy. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1476-1483, 2006.

FAN, L. *et al.* Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. **Acta Biotechnologica**, v. 20, n. 1, p. 41-52, 2000.

FAO. **Unified Bioenergy Terminology (UBET)**, Available at: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/j4504e/j4504e00.pdf>. 2004.

FERNANDO, T.; AUST, S. D. **Biodegradation of toxic chemicals by white-rot fungi**. In: GR Chaudhry GR (ed), *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. 1994.

FIGUEIRÓ, G. G. **Influência do substrato no cultivo e na composição química do cogumelo *Pleurotus florida***. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Brasil, 2009.

FERREIRA FILHO, E. X. F., **Pectinases**. In: *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 1ª ed. ed.; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., Eds. Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004a.

FERREIRA FILHO, E. X. F., **Xilanases**. In *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 1. ed. Edit. Said, S.; Pietro, R. C. L. R.. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2004b. p. 137-148.

FLOUDAS, D. *et al.* The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1715-1719, 2012.

FREIRE, E. C. *et al.* Fluxo gênico: Análise do caso de algodão no Brasil. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília-DF, ano, v. 5, p. 105-113, 2002.

FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium***. In: *Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification*. Springer, Boston, MA, p. 373-38, 1990.

FUJITA, R. *et al.* Anti-androgenic activities of *Ganoderma lucidum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 107–112, 2005.

GADELHA, I. C. N. *et al.* Gossypol toxicity from cottonseed products. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

GAMBATO, G. *et al.* Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 46–51, 2016.

GARRETT, R. H.; GRISHMAN, C. M. **Biochemistry**. Second edition ed. San Diego: Saunders College Publishing, 1999.

GEMEDE, H. F.; RATTA, N. Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 3, n. 4, p. 284-289, 2014.

GEORGE, J.; SABAPATHI, S. N. Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications. **Nanotechnology, science and applications**, v. 8, p. 45, 2015.

GHERBAWY, Y. *et al.* (Ed.). **Molecular identification of fungi**. Berlin: Springer, 2010.

GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 162-173, 2014.

GIMENES, J. **Fungos basidiomicetos**: Técnicas de coleta, isolamento e subsídios para processos biotecnológicos. São Paulo: editora, 2010.

GOMES, H. A. R. **Revelando o potencial de *Clonostachys byssicola* em produzir enzimas holocelulolíticas**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

GOMES, T. G. *et al.* Current strategies for the detoxification of *Jatropha curcas* seed cake: a review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2510-2522, 2018.

GOMES, T. G. *et al.* Current strategies for the detoxification of *Jatropha curcas* seed cake: a review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2510-2522, 2018.

GOMES, T. G. **Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por basidiomicetos e seu potencial como substrato para produção de enzimas de interesse industrial**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2015.

GOMES, T. G. **Expressão diferencial de genes associados à degradação enzimática e destoxificação da torta de pinhão-manso em *Pleurotus pulmonarius***. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

GÓMEZ MENDOZA, D. P. **Proteômica aplicada à caracterização do secretoma de *Trichoderma harzianum***. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

GÓMEZ MENDOZA, D. P. **Variações do secretoma de *trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

GONINDARD, C. *et al.* Synthetic hispidin, a PKC inhibitor, is more cytotoxic

toward cancer cells than normal cells in vitro. **Cell biology and toxicology**, v. 13, n. 3, p. 141-153, 1997.

GREENBAUM, D. *et al.* Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: coming in on function. **Genome research**, v. 11, n. 9, p. 1463-1468, 2001.

GRIGORIEV, I. V. *et al.* The genome portal of the department of energy joint genome institute. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D26-D32, 2011.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUGLIOTTA, A. M.; ABRAHÃO, M. C.; GIBERTONI, T. B. **Polyporales**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013.

GUPTA, V. K.; SREENIVASAPRASAD, S.; MACH, R. L. (Ed.). Fungal bio-molecules: sources, applications and recent developments. John Wiley & Sons, 2015.

GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 281, p.143-154, 1996.

HANSON, J. R. **Natural products: the secondary metabolites**, v. 17. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003. 147 p.

HASSAN, M. *et al.* Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 4, p. 7802-7838, 2015.

HATAKKA, A. **Biodegradation of lignin**. In: Hofrichter M, Steinbüchel A, editors. Biopolymers. v. 1, Lignin, humic substances and coal. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2001. p. 129-80.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. **FEMS microbiology reviews**, v. 13, n. 2-3, p. 125-135, 1994.

HAWKRIDGE, A. M. Practical considerations and current limitations in quantitative mass spectrometry-based proteomics. **Quantitative proteomics**, p. 1-25, 2014.

HE, Peixin *et al.* Chemical characterization and antioxidant activity of polysaccharide extract from spent mushroom substrate of *Pleurotus eryngii*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 69, p. 48-53, 2016.

HENNICKE, F. *et al.* Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of

morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. **Phytochemistry**, v. 127, p. 29-37, 2016.

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

HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HOFRICHTER, M. Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial technology**, v. 30, n. 4, p. 454-466, 2002.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages?. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

HOLTZAPPLE, M. T. **Hemicellulose**. In: Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J. (Eds.). *Encyclopedia of Food Science Food Technology and Nutrition*, v. 2. London: Academic Press, 1993. pp. 2324–2334.

ICHINOSE, H. Cytochrome P450 of wood-rotting basidiomycetes and biotechnological applications. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 71-81, 2013.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497-4559, 2015.

JAMES, T. Y. *et al.* A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 860-871, 2006a

JAMES, T. Y. *et al.* Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818, 2006b.

JIA, J. *et al.* Evaluation of in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 32–36, 2009.

JGI. JOINT GENOME INSTITUTE. Disponível em: <http://jgi.doe.gov/fungi>. Acesso em: 13 dez. 2018.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

JOSHI, C.; K KHARE, S.; N GUPTA, M. Applications of solid-state fermentation



process in biological detoxification of industrial wastes. **Current Biochemical Engineering**, v. 1, n. 1, p. 35-49, 2014.

KALLI, Anastasia *et al.* Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 7, p. 3071-3086, 2013.

KAPOOR, R. K.; RAJAN, K.; CARRIER, D. J. Applications of *Trametes versicolor* crude culture filtrates in detoxification of biomass pretreatment hydrolyzates. **Bioresource technology**, v. 189, p. 99-106, 2015.

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Biotransformation of tannic acid to gallic acid by solid state fermentation. **Advances in biotechnology**, v. 2, p. 67-74, 1998.

KEEGSTRA, K. Plant cell walls. **Plant physiology**, v. 154, n. 2, p. 483-486, 2010.

KEELING, C. I.; BOHLMANN, J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. **New Phytologist**, v. 170, n. 4, p. 657-675, 2006.

KHINDARIA, A.; YAMAZAKI, I.; AUST, S. D. Stabilization of the veratryl alcohol cation radical by lignin peroxidase. **Biochemistry**, v. 35, n. 20, p. 6418-6424, 1996.

KIM, S; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource technology**, v. 96, n. 18, p. 1994-2006, 2005.

KIRK, P. M. *et al.* **Ainsworth & Bisby's Dictionary of The Fungi**. 10. ed. Wallingford: CABI Europe, 2008.

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 protection**, v. 29, n. 8, p. 813-819, 2010.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

KUBICEK, C. P. (Ed.). *Fungi and lignocellulosic biomass*. John Wiley & Sons, 2012.

KULSHRESHTHA, S.; SHARMA, K. Perspectives of bioremediation through mushroom cultivation. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, India, v. 5, n. 5, p. 1-2, 2014.

KUMAR, R. Anti-nutritional factors, the potential risks of toxicity and methods to alleviate them. Legume trees and other fodder trees as protein source for livestock. **FAO Animal Production and Health Paper**, v. 102, p. 145-160, 1992.

KUO, M. C. *et al.* *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF- $\kappa$ B. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 217-222, 2006.

KUWAHARA, M. *et al.* Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS letters**, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LÊ CAO, K. A.; BOITARD, S.; BESSE, P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 253, 2011.

LEONOWICZ, A. *et al.* Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, v. 41, n. 3-4, p. 185-227, 2001.

LETTI JUNIOR, L. A. *et al.* Solid-State Fermentation for the Production of Mushrooms. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, p. 285-318, 2018.

LEVASSEUR, A. *et al.* The genome of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 486, 2014.

LIADAKIS, G. N. *et al.* Protein isolates with reduced gossypol content from screw-pressed cottonseed meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 918-922, 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*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 4, p. 494-503, 2011.

LIMA, M. L. F.; MENEZES, M. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola* através da análise eletroforética de padrões protéicos e isoenzimáticos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, 2002.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 3, p. 285-299, 2005.

LIU, J. *et al.* Stereoselective coupling of hemigossypol to form (+) gossypol in moco cotton is mediated by a dirigent protein. **Phytochemistry**, v. 69, n. 18, p. 3038-3042, 2008.

- 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*, v. 5, p. 200, 1886.
- LUM, G.; MIN, X. J. FunSecKB: the fungal secretome knowledgebase. *Database*, v. 2011, 2011.
- LUNARDON, T. M. **Análise da conjuntura agropecuária**. Safra 2007/08 ALGODÃO. 2007. Disponível em: [www.seab.pr.gov.br](http://www.seab.pr.gov.br). Acesso em: 20 abr. 2018.
- LUSAS, E. W.; JIVIDEN, G. M. Glandless cottonseed: A review of the first 25 years of processing and utilization research. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 64, n. 6, p. 839-854, 1987.
- MA, H. T.; HSIEH, J. F.; CHEN, S. T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, v. 114, p. 109-113, 2015.
- MACHADO, K. G. M. *et al.* Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. *Brazilian journal of Microbiology*. v.37, p. 481-487, 2006.
- MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. *BioResources*, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, 2009.
- MAGAN, N.; FRAGOEIRO, S.; BASTOS, C. Environmental factors and bioremediation of xenobiotics using white rot fungi. *Mycobiology*, v. 38, n. 4, p. 238-248, 2010.
- MAGESHWARAN, V.; MAJEE, S. B.; PANDIYAN, K. Isolation and Identification of Potential Gossypol Degrading Fungal Strains from Cotton Growing Soil. *Microbiology Research Journal International*, p. 1-6, 2017.
- MAJOLO, F. *et al.* Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters*, v. 31, p. 196-207, 2019.
- MARTIN, K. J.; RYGIEWICZ, P. T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology*, v. 5, n. 1, p. 28, 2005.
- MARTÍNEZ, A. T. *et al.* Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. v. 8, p 192-204, 2005.
- MATSUBARA, M. *et al.* Characterization of manganese peroxidases from the hyperlignolytic fungus IZU-154. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 11, p. 4066-4072, 1996.
- MAY, Caroline *et al.* **Instruments and methods in proteomics**. In: Data Mining in Proteomics. Humana Press, 2011. p. 3-26.

MCCAUGHEY, K. M. *et al.* Impact of feeding whole Upland cottonseed, with or without cracked Pima cottonseed with increasing addition of iron sulfate, on productivity and plasma gossypol of lactating dairy cattle. **Animal feed science and technology**, v. 122, n. 3-4, p. 241-256, 2005.

MEDINA, M. L.; KIERNAN, U. A.; FRANCISCO, W. A. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 3, p. 327-335, 2004.

MILLATI, R. *et al.* Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. *BioResources*, v. 6, n. 4, p. 5224-5259, 2011.

MITCHELL, J. I.; ZUCCARO, A. Sequences, the environment and fungi. **Mycologist**, v. 20, n. 2, p. 62-74, 2006.

MONCALVO, J. M.; WANG, H. F.; HSEU, R. S. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. **Mycological Research**, v. 99, n. 12, p. 1489-1499, 1995.

MONCALVO, J. M. **Systematics of *Ganoderma***. In: Flood. J. Bridge. PD. Holderness.M. (eds.) *Ganoderma diseases of perennial crops*. CAB International. Wallingford.UK. pp. 23-45, 2000.

MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em resíduos têxteis**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MONEY, N. P. **Fungal diversity**. In: *The Fungi*. Academic Press, 2016. p. 1-36.

MONTOYA, S.; SÁNCHEZ, O. J.; LEVIN, L. Polysaccharide production by submerged and solid-state cultures from several medicinal higher Basidiomycetes. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 15, n. 1, 2013.

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.

MUELLER, G. M. *et al.* Global diversity and distribution of macrofungi. **Biodiversity and conservation**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 2007.

MUKHERJEE, P.; MANI, S. Methodologies to decipher the cell secretome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 11, p. 2226-2232, 2013.

NAGALAKSHMI, D.; SASTRY, V. R. B.; AGRAWAL, D. K. Detoxification of undecorticated cottonseed meal by various physical and chemical methods. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 2, n. 2, p. 117-126, 2002.

NAGALAKSHMI, D.; SASTRY, V. R. B.; PAWDE, A. Rumen fermentation patterns and nutrient digestion in lambs fed cottonseed meal supplemental diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 103, n. 1-4, p. 1-14, 2003.

NESTERENKO, M. V.; TILLEY, M.; UPTON, S. J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 28, n. 3, p. 239-242, 1994.

NISHIYAMA, Y. Structure and properties of the cellulose microfibril. **Journal of Wood Science**, v. 55, n. 4, p. 241-249, 2009.

NOVOTNÝ, Č. *et al.* Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid cultures. **Folia microbiologica**, v. 42, n. 2, p. 136-140, 1997.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Consensus document on compositional considerations for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): key food and feed nutrients and anti-nutrients**. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, n. 11, 2009.

PAIM, T. P. *et al.* Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 13, p. 24-37, 2010.

PALAGI, P. M. *et al.* Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5435-5444, 2006.

PALHARES, L. O. **Utilização da torta de algodão com ou sem enzimas para suínos em crescimento**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil, 2014.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837, 2000.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 6, p. 486-488, 1992.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, V. V. *et al.* Mushroom cultivation: Substantial key to food security.

**Journal of Applied and Natural Science**, v. 10, n. 4, p. 1325-1331, 2018.

PAPAGIANNI, M. Characterization of fungal morphology using digital image analysis techniques. **J Microb Biochem Technol**, v. 6, n. 4, p. 189, 2014.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PINTO, G. A. S. *et al.* **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2005.

PLÁCIDO, J.; CAPAREDA, S. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 23, 2015.

POORE, M.; ROGERS, G. M. **Potential for gossypol toxicity when feeding whole cottonseed**. Animal Husbandry Newsletter June/July, 1995.

POTIN, O.; VEIGNIE, E.; RAFIN, C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 1, p. 71-78, 2004.

PROCOP, G. W. **Medically Important Fungi: A Guide to Identification**. 5. ed. Edition, 2014.

QUIN, M. B. *et al.* Mushroom hunting by using bioinformatics: application of a predictive framework facilitates the selective identification of sesquiterpene synthases in basidiomycota. **ChemBiochem**, v. 14, n. 18, p. 2480-2491, 2013.

RAI, M.; TIDKE, G.; WASSER, S. P. Therapeutic potential of mushrooms. 2005.

RAJA, H. A. *et al.* Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of natural products**, v. 80, n. 3, p. 756-770, 2017.

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

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BOERJAN, W. Lignin structure and its engineering. **Current opinion in biotechnology**, v. 56, p. 240-249, 2019.

RAPPSILBER, J.; MANN, M. Analysis of the topology of protein complexes using cross-linking and mass spectrometry. Cold Spring Harbor **Protocols**, v. 2007, n. 2, p. pdb. prot4594, 2007.

REDDY, C.; ADINARAYANA; MATHEW, Z. **Bioremediation potential of white**

**rot fungi.** In: British Mycological Society Symposium Series. p. 52-78, 2001.

REDDY, G. V. *et al.* Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 1457-1462, 2003.

RILEY, R. *et al.* Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. 9923-9928, 2014.

ROBLES-HERNÁNDEZ, L. *et al.* Review of agricultural and medicinal applications of basidiomycete mushrooms. **Tecnociencia Chihuahua**, v. 2, n. 2, p. 95-107, 2008.

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. de C. **Resíduos da produção de biodiesel:** Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil, 2013.

SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1321-1337, 2010.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SÁNCHEZ, J. *et al.* **Biomass Resources.** In: The Role of Bioenergy in the Bioeconomy. Academic Press, p. 25-11, 2019.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SARRETTE, M. *et al.* Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420-425, 1992.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, 2010.

SCHIRMER, E. C. *et al.* MudPIT: A powerful proteomics tool for discovery. **Discovery medicine**, v. 3, n. 18, p. 38-39, 2003.

SCHMIDT-DANNERT, C. Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. **Current opinion in chemical biology**, v. 31, p. 40-49, 2016.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SHAH, Punit *et al.* Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 3, p. 1123-1130, 2009.

SHEENA, N. *et al.* Antibacterial Activity of Three Macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* Occurring in South India. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 8, p. 564–567, 2003.

SHI, Min *et al.* Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue. **Food chemistry**, v. 155, p. 50-56, 2014.

SHI, Yang *et al.* The role of liquid chromatography in proteomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1053, n. 1-2, p. 27-36, 2004.

SHRIVASTAVA, B. *et al.* White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. **Biodegradation**, v. 22, n. 4, p. 823-831, 2011.

SILBERBORTH, Sven *et al.* Gerronemins A–F, cytotoxic biscatechols from a *Gerronema* species. **Phytochemistry**, v. 59, n. 6, p. 643-648, 2002.

SINGH, S. *et al.* Lectins from edible mushrooms. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 446-469, 2015.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SIQUEIRA, F. G. D. **Resíduos agroindustriais com potencial para a produção de holocelulasas de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases**. Tese. (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

SOCCOL, C. R. *et al.* Cogumelos: uma fonte promissora de compostos ativos para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e nutracêuticos. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. v. 4, 2017. p. 315-360

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 121-139, 2009.

STEELE, N. M.; MCCANN, M. C.; ROBERTS, K. Pectin modification in cell walls of ripening tomatoes occurs in distinct domains. **Plant Physiology**, v. 114, n. 1, p. 373-381, 1997.

STIPANOVIC, R. D. *et al.* Effects of cotton terpenoid aldehydes on resistance to



Heliopsis. International Union of Pure and Applied Chemistry. Sixth Int. Congr. Pest. Chem. Ottawa, Canada, Abstract, v. 2, 1986.

STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.41, n. 4, p. 373-434, 2011.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **Int J Sci Nat**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases – Production, Applications and Challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**. v. 64, p. 832-44, 2005.

SUN, J. *et al.* Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 4, p. 482-493, 2012.

SUN, Z. T.; LIU, C.; DU, J. H. Optimisation of fermentation medium for the detoxification of free gossypol in cottonseed powder by *Geotrichum candidum* G07 in solid-state fermentation with response surface methodology. **Annals of microbiology**, v. 58, n. 4, p. 683, 2008.

ŚWIĄTKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WŁOSEK, A.; JOZEFIAK, D. The use of cottonseed meal as a protein source for poultry: an updated review. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, n. 3, p. 473-484, 2016.

SYED, K.; YADAV, J. S. P450 monooxygenases (P450<sub>ome</sub>) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Critical reviews in microbiology**, v. 38, n. 4, p. 339-363, 2012.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Cidade: Artmed Editora, 2017.

TANG, X. *et al.* Diversity, population genetics, and evolution of macrofungi associated with animals. **Mycology**, v. 6, n. 2, p. 94-109, 2015.

TANKSLEY JUNIOR., T. D. **Cottonseed meal**. *In*: THACKER, P.A.; KIRKWOOD, R.N.(Eds.) Nontraditional feed sources for use in swine production. Washington, D.C.: p.139-151, 1992.

THOMSON, R. H. R. H. **Naturally occurring quinones**. Elsevier, 2012.

THORNTON, C. R. *et al.* Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested composts. **Microbiology**, v. 148, n. 5, p. 1263-1279, 2002.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete*

*chryso sporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 8, p. 2280-2284, 1984.

TIFFANY, S. M. *et al.* Investigation of structure-function relationships of cytotoxic quinones of natural and synthetic origin. **Cancer research**, v. 38, n. 10, p. 3230-3235, 1978.

UENOJO, M.; PASTORE. **Pectinases**: aplicações industriais e perspectivas. Cidade: Química Nova, 2007.

URABE, D.; ASABA, T.; INOUE, M. Convergent strategies in total syntheses of complex terpenoids. **Chemical reviews**, v. 115, n. 17, p. 9207-9231, 2015.

VAN KUIJK, S. *et al.* Fungal treatment of lignocellulosic biomass: importance of fungal species, colonization and time on chemical composition and in vitro rumen degradability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 209, p. 40-50, 2015.

VARGAS-ISLA, R. *et al.* Relationship between *Panus lecomtei* and *P. strigellus* inferred from their morphological, molecular and biological characteristics. **Mycoscience**, v. 56, n. 6, p. 561-571, 2015.

VELÍŠEK, J.; CEJPEK, K. Pigments of higher fungi-a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. 2, p. 87-102, 2011.

VIRMOND, E. *et al.* Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 197-230, 2013.

VOIGT, K.; KIRK, P. M. Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 41-57, 2011.

WALDRON, K. W.; PARKER, M. L.; SMITH, A. C. Plant cell walls and food quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 4, p. 128-146, 2003.

WALTHER, T. C.; MANN, Matthias. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. **The Journal of cell biology**, v. 190, n. 4, p. 491-500, 2010.

WANG, H.; NG, T. B.; OOI, V. E. C. Lectins from mushrooms. **Mycological Research**, v. 102, n. 8, p. 897-906, 1998.

WANG, Q. *et al.* Bioactive mushroom polysaccharides: a review on monosaccharide composition, biosynthesis and regulation. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 955, 2017.

- WANG, Xi *et al.* Gossypol-a polyphenolic compound from cotton plant. **Advances in food and nutrition research**, v. 58, p. 215-263, 2009.
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23688-23695, 1992.
- WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242, 2001.
- WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.
- WASSER, S. P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 12, n. 1, 2010.
- WAWRZYN, G. T. *et al.* Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in Basidiomycota. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 6, p. 772-783, 2012.
- WENG, Xiao-Yan; SUN, Jian-Yi. Biodegradation of free gossypol by a new strain of *Candida tropicalis* under solid state fermentation: Effects of fermentation parameters. **Process biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1663-1668, 2006.
- 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'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions 2, n. 7, p. 805-812, 1982.
- XU, C.; GENG, L.; ZHANG, W. Production of extracellular polysaccharides by the medicinal mushroom *Trametes trogii* (higher Basidiomycetes) in stirred-tank and airlift reactors. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 15, n. 2, 2013.
- YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008.
- YANG, X. *et al.* Identification and proteomic analysis of a novel gossypol-degrading fungal strain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 4, p. 943-951, 2012.
- YANG, X.; GUO, J.; SUN, J. Biodegradation of free-gossypol by a new fungus isolated from cotton planted soil. **African Journal of Microbiology Research**,

v. 5, n. 19, p. 3066-3072, 2011.

YU, F. *et al.* Condensed tannin and gossypol concentrations in cottonseed and in processed cottonseed meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 63, n. 1, p. 7-15, 1993.

YU, F.; MOUGHAN, P. J.; BARRY, T. N. The effect of cottonseed condensed tannins on the ileal digestibility of amino acids in casein and cottonseed kernel. **British Journal of nutrition**, v. 75, n. 5, p. 683-698, 1996.

ZAIDMAN, B. Z. *et al.* Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 453-468, 2005.

ZÁMOCKÝ, M.; OBINGER, C. **Molecular phylogeny of hemeperoxidases**. In: Biocatalysis based on heme peroxidases. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 7-35, 2010.

ZHANG, W. J. *et al.* Effect of selected fungi on the reduction of gossypol levels and nutritional value during solid substrate fermentation of cottonseed meal. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 9, p. 690-695, 2006a.

ZHANG, W. J. *et al.* A study on the reduction of gossypol levels by mixed culture solid substrate fermentation of cottonseed meal. **Asian-australasian journal of animal sciences**, v. 19, n. 9, p. 1314-1321, 2006b.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHANG, W. J. *et al.* Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. **Livestock Science**, v. 111, n. 1-2, p. 1-9, 2007.

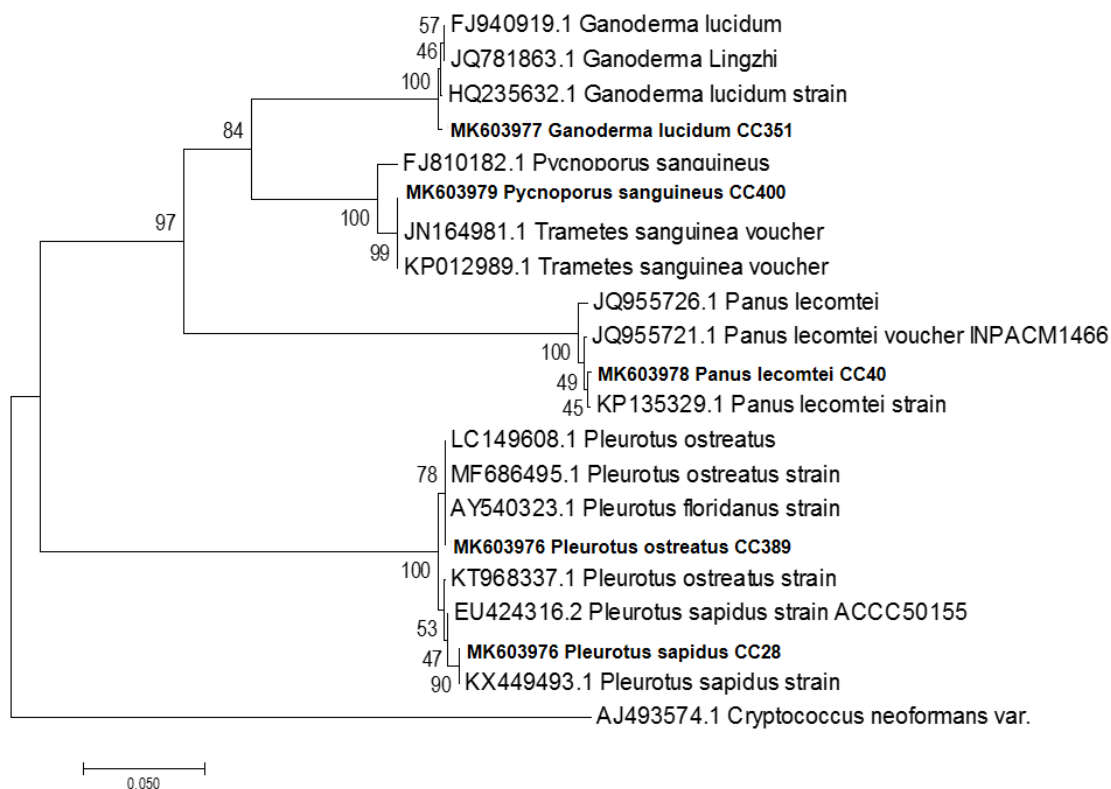
ZHONG, R.; YE, Z. H. Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 2, p. 195-214, 2014.

ZILLY, A. *et al.* Influence of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the kinetics and dye decolorization ability of crude laccase from *Ganoderma lucidum*. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 2, p. 340-344, 2011.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 1, 2008.

## ANEXOS

## ANEXO 1 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA EM rDNA ITS



## Supporting Information

**Supporting Figure 1. Consensus Maximum Likelihood phylogenetic tree resulting from the analysis of rDNA ITS sequence data.**

## ANEXO 2 - PROPRIEDADE INTELECTUAL

### Pôster apresentado no Simpósio de Biologia Molecular 2018



## Simpósio da Pós-Graduação em Biologia Molecular

### Degradação de gossipol via extratos brutos obtidos do cultivo de *Panus lecomtei* CC40

Clemente Batista Soares Neto<sup>1</sup>; Jayanarian Ferreira Martins<sup>1</sup>; Aparecido Conceição de Almeida<sup>3</sup>; Simone Mendonça<sup>4</sup>; José Antônio de Aquino Ribeiro<sup>4</sup>; Félix Gonçalves de Siqueira<sup>4</sup>; Robert Neil Gerard Miller<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília; <sup>2</sup>Universidade Federal do Tocantins; <sup>3</sup>Universidade Federal da Bahia <sup>4</sup>Embrapa Agroenergia  
e-mail: [clementegeo@gmail.com](mailto:clementegeo@gmail.com) / [robertmiller@unb.br](mailto:robertmiller@unb.br)

#### Introdução

O subproduto torta de caroço de algodão (TCA) é obtido nas agroindústrias que processam diferentes fontes de biomassa oleaginosas, sua utilização é limitada, pela presença de gossipol livre (GL), (substância tóxica), inviabilizando a sua aplicação na nutrição de animais monogástricos. Diferentes métodos têm sido utilizados para oportunizar o uso de TCA como insumo na nutrição destes. O tratamento biológico por meio do cultivo de macro-basidiomicetos tem se mostrado eficaz nessa degradação. Neste sentido, há hipóteses de que maquinarias enzimáticas estejam envolvidas nesse processo. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de degradação de GL por meio de extratos brutos obtidos do cultivo de *Panus lecomtei* CC40, bem como determinar atividades de enzimas extracelulares.

■ Encontradas as maiores atividades das enzimas: lacase, e manganês peroxidase, respectivamente, nos tempos: 9 dias (151,03 U.L.mL (CAT)) e 15º dia (898,02 U.L.mL (CAT)). Em ambas o tempo 3º dia foi observado as maiores atividades enzimáticas para o CAT + Ca (OH)2 (Fig. 4.A e B).

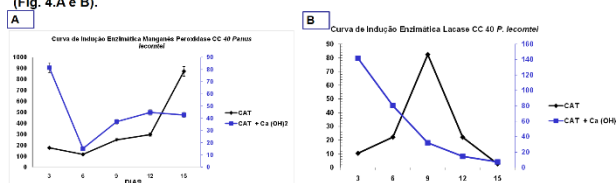


Fig. 4. Determinação de atividades enzimáticas (manganês peroxidase (A) e lacase (B)) durante 15 dias em FES em CAT comum e CAT + Ca (OH)2 de *Panus lecomtei* CC 40.

#### Materiais e Métodos

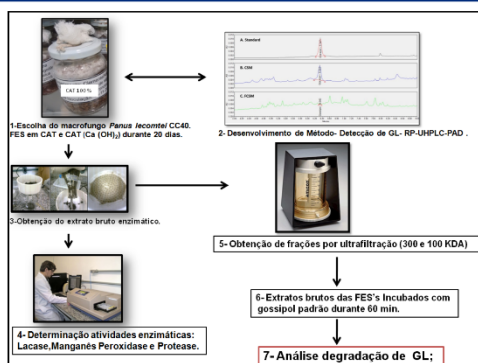


Figura 1. Sumário dos materiais e métodos utilizados/realizados durante a experimentação.

#### Resultados

■ Realizada otimização de um método para determinação da concentração de gossipol livre (GL) em diferentes tipos de tratamentos aplicados aos co-produtos do caroço de algodão (Fig. 2).

Amostras	Gossipol Livre (mg/kg)
CS	488,84 ± 6,85
FCS	15,26 ± 2,23
CSM	56,88 ± 2,98
FCSM	0,847 ± 0,078

Fig. 2. Gossipol livre detectado através de RP-UHPLC-PDA em diferentes amostras de caroço de algodão.

CS (Caroço de Algodão *in natura*); FCS (caroço de algodão tratado com macrofungo); CSM (Torta de Caroço de Algodão *in natura*); FCSM (Torta de Caroço de Algodão tratado com macrofungo).

■ Extratos brutos enzimáticos (EBE) foram obtidos dos cultivos FES-CAT dos seis macrofungos, e, incubados em CAT 100% (18 h). Os EBEs do *Panus lecomtei* CC40 configurou entre os dois melhores resultados observados. (Fig. 3).

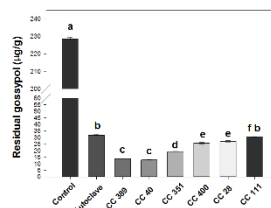
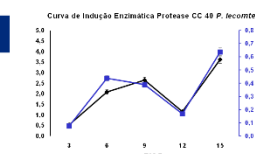


Fig. 3. Determinação de GL em CAT tratados por meio da FES utilizando seis estirpes de macrofungos (15 dias de cultivo).



■ Verificadas maiores atividades para a enzima protease quando o fungo fora cultivado em CAT, com 4,0 U.L.mL (Fig. 5). Os extratos oriundos do cultivo em CAT variaram de 96 a 99% a degradação do GL; enquanto que em CAT (Ca (OH)2), foi de 88 a 98% (Fig. 6 A e B).

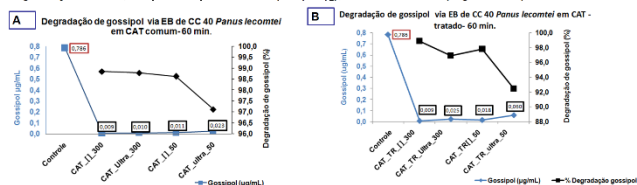


Fig. 6. Determinação de GL em CAT comum (A) e CAT tratado (B) com Ca(OH)2 após 60 minutos a 37 C e 240 rpm após incubação em extratos brutos enzimáticos (EBEs) obtidos a partir da FES de *Panus lecomtei* CC40.

#### Conclusões

- Método desenvolvido utilizando RP-UHPLC-PAD apresentou eficiência para detecção de GL em amostras tratadas e não tratadas com macrofungos na matriz CAT 100%.
- *Panus lecomtei* CC 40 apresentou resultados significativos na degradação de GL quando submetidos a FES.
- Os extratos brutos enzimáticos obtidos do macrofungo *Panus lecomtei* CC40 apresentaram resultados significativos na degradação de GL.
- Encontrados níveis significativos de atividades de lacases, manganês peroxidase e protease da FES *P. lecomtei* CC40 em CAT comum e CAT + Ca (OH)2.

#### Atividades em andamento

- Análises em andamento do perfil de secretores obtido a partir da FES de *Panus lecomtei* CC 40 crescido em CAT comum e CAT + Ca(OH)2 após 7 dias de incubação, visando a identificação das proteínas/enzimas envolvidas na degradação de GL.
- Experimento em andamento-caracterização e purificação de lacase obtida a partir da FES de *Panus lecomtei* CC 40 CAT comum e CAT + Ca(OH)2 após 7 dias de incubação.

#### Cronograma

Atividades	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8
Purificação de Extrato Bruto						X	X	
Degradação de gossipol artificial por Extrato Bruto								X
Análises proteômicas de frações secretoria via LC-MS/MS							X	X
Análise Bioinformáticas							X	X
Caracterizações enzimáticas						X	X	X
Defesa de tese								X
Confeção de manuscritos		X	X	X	X	X	X	X
Publicação de manuscritos						X	X	X

#### Agradecimentos



# Pôster selecionado para apresentação Simpósio de Biologia Molecular 2017



UnB



## Simpósio da Pós-Graduação em Biologia Molecular

### Análises dos mecanismos envolvidos na biodestoxificação de caroço de algodão por ação de macrofungos

Clemente Batista Soares Neto<sup>1</sup>; Taisa Godoy Gomes<sup>1</sup>; Ana Paula Araújo<sup>2</sup>; Aparecido Conceição de Almeida<sup>3</sup>; Simone Mendonça<sup>4</sup>; José Antônio de Aquino Ribeiro<sup>4</sup>; Félix Gonçalves de Siqueira<sup>4</sup>; Robert Neil Gerard Miller<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília; <sup>2</sup>Universidade Federal do Tocantins; <sup>3</sup>Universidade Federal da Bahia <sup>4</sup>Embrapa Agroenergia  
e-mail: [clementekeo@gmail.com](mailto:clementekeo@gmail.com) / \*[robertmiller@unb.br](mailto:robertmiller@unb.br)

#### Introdução

O caroço de algodão (CA) é subproduto da cadeia da cotonicultura. A prensagem do CA gera dois outros subprodutos (óleo e torta/farelo). O óleo pode ser destinado a geração de biodiesel e a torta/farelo para nutrição de ruminantes. A torta farelo é uma biomassa rica em proteínas, lipídeos e carboidratos, por isso utilizado na formulação de dietas de animais. No entanto, a presença de fatores antinutricionais como o gossipol livre (GL) limita utilização. Assim, faz-se necessário detoxificar/degradar o gossipol livre para uso para animais monogástricos (aves e suínos). Alguns macrofungos (basidiomicetos) são conhecidos como agentes degradadores de compostos tóxicos e desconstructores dos componentes da parede celular vegetal, em função do arsenal de enzimas extracelulares que dispõe nos respectivos genomas. Deste modo o objetivo desse trabalho foi analisar a capacidade de alguns macrofungos em crescer em meios de cultivo contendo caroço de algodão triturado (fermentação estado sólido) e reduzir/degradar os teores de GL; como também avaliar o perfil de enzimas ligninolíticas oxidativas envolvidas no processo de detoxificação/desconstrução.

#### Materiais e Métodos

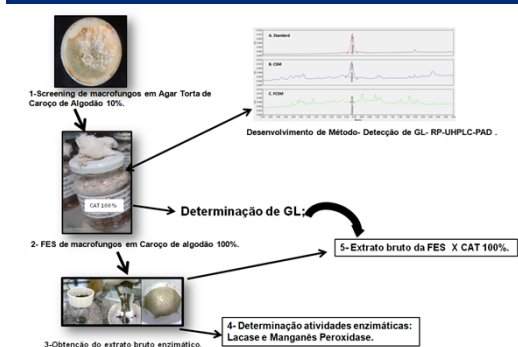


Figura 1. Sumário dos materiais e métodos utilizados/realizados durante a experimentação.

#### Resultados

Trinta e três macrofungos foram avaliados quanto a capacidade de crescimento em meio agar-Caroto de algodão triturado (agar-CAT) 10%. Dos quais 23 apresentaram crescimento (Fig. 2).

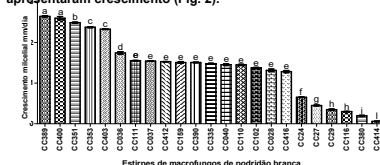


Fig. 2. Screening de macrofungos capazes de se desenvolverem em meio de cultivo contendo agar torta de caroço de algodão 10%.

Outro resultado obtido foi a otimização de um método para determinação da concentração de gossipol livre (GL) em diferentes tipos de tratamentos aplicados aos co-produtos do caroço de algodão (Fig. 3).

Amostras	Gossipol livre (mg/kg)
FCS	4886.84 ± 6.85
CS	15.26 ± 2.23
CSM	56.88 ± 2.98
FCSM	0.847 ± 0.078

Fig. 3. Gossipol livre detectado através de RP-UHPLC-PDA em diferentes amostras de caroço de algodão. CS (Caroço de Algodão *in natura*); FCS (caroço de algodão tratado com macrofungo); CSM (Torta de Caroço de Algodão *in natura*); FCSM (Torta de Caroço de Algodão tratado com macrofungo).

Seis macrofungos foram selecionados a partir do cultivo em agar-CAT para FES em frascos (100% CAT) e incubados por 15 dias. As estirpes *Pleurotus ostreatus* e *CC 389 Panus lecomtei* CC040 se destacaram quanto a degradação do GL em 62,01 e 61,66%, respectivamente (Fig. 4.A).

Extratos brutos enzimáticos (EBE) foram obtidos dos cultivos FES-CAT dos seis macrofungos, e, incubados em CAT 100% (18 h). Os EBEs do CC040 e CC389 apresentaram as maiores reduções de GL (Fig. 4B).

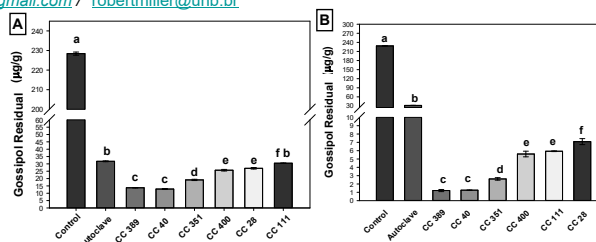


Fig. 4A e B. A) Determinação de GL em CAT tratados por meio da FES utilizando seis estirpes de macrofungos (15 dias de cultivo). B) Determinação de GL em CAT após 18 horas de incubação de extratos brutos enzimáticos (EBEs) obtidos a partir da FES de seis macrofungos.

Determinação de atividades enzimáticas (laccase e manganês peroxidase) e degradação de GL durante a FES (15 dias) dos macrofungos CC389 e CC040 em CAT 100% (Fig. 5A e B).

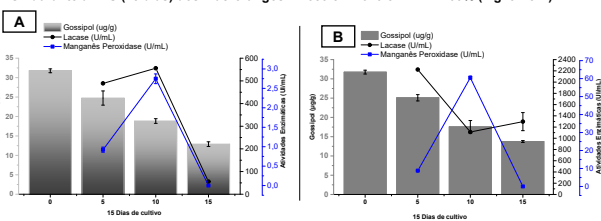


Fig. 5A e B. Degradação de gossipol livre e atividades enzimáticas de laccase e manganês peroxidase pelos macrofungos, *Pleurotus ostreatus* CC389 (A) e *Panus lecomtei* CC040 (B) cultivados em CAT 100% durante 15 dias.

#### Conclusões

- Método desenvolvido utilizando RP-UHPLC-PAD apresentou eficiência para detecção de GL em amostras tratadas e não tratadas com macrofungos na matriz CAT 100%.
- Cinco macrofungos entre os avaliados apresentaram resultados significativos na degradação de GL quando submetidos a FES.
- Os extratos brutos enzimáticos obtidos dos macrofungos *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Panus lecomtei* CC040 apresentaram resultados significativos na degradação de GL.
- As atividades de laccases e manganês peroxidase do EBE do macrofungo *P. lecomtei* CC040 foram superiores ao *P. ostreatus* CC389.

#### Atividades em andamento

- Avaliação da capacidade de degradação do GL por meio do uso de extrato bruto enzimático e frações (ultrafiltração e cromatografia) do macrofungo *Panus lecomtei* CC040.
- Identificação das proteínas/enzimas do EBE/fração *P. lecomtei* CC040 envolvidas na degradação de GL por meio da técnica LC-MS/MS.

Os resultados esperados desse trabalho poderá contribuir na compreensão de mecanismos enzimáticos de macrofungos capazes de degradar GL. As enzimas desses macrofungos poderão compor coquetéis enzimáticos capazes de detoxificar tortas de caroço de algodão; e, assim tais tortas tratadas poderiam ser aplicadas em formulação de dietas para animais monogástricos (aves e suínos).

#### Cronograma

Atividades	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8
Purificação de Extrato Bruto						X	X	
Degradação de gossipol artificial por Extrato bruto.						X	X	
Análise proteômica de frações promissoras via LC-MS/MS.							X	
Análise Bioinformática							X	
Aplicação de q-PCR							X	
Defesa de tese								X
Confecção de manuscritos			X	X	X	X	X	X
Publicação de manuscritos						X	X	X

#### Agradecimentos



## Degradação de gossipol via extratos brutos obtidos do cultivo de *Panus lecomtei* CC40

Clemente Batista Soares Neto<sup>1-3\*</sup>; Jayanarian Ferreira Martins<sup>1-3</sup>; Aparecido Almeida Conceição<sup>2-3</sup>; Taísa Godoy Gomes<sup>1-3</sup>; José Antônio de Aquino Ribeiro<sup>3</sup>; Simone Mendonça<sup>3</sup>Félix Gonçalves de Siqueira<sup>3</sup>; Robert Neil Gerard Miller<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília; <sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia<sup>3</sup>Embrapa Agroenergia  
e-mail: [\\*clementekeo@gmail.com](mailto:*clementekeo@gmail.com) / [\\*\\*robertmiller@unb.br](mailto:**robertmiller@unb.br)

Palavras-Chave: Gossipol, Biotoxificação; Algodão; Basidiomicetos.

O subproduto torta de caroço de algodão (TCA) é obtido nas agroindústrias que processam diferentes fontes de biomassas oleaginosas, sua utilização é limitada, pela presença de gossipol livre (GL), (substância tóxica), inviabilizando a sua aplicação na nutrição de animais monogástricos. Diferentes métodos têm sido utilizados para oportunizar o uso de TCA como insumo na nutrição destes. O tratamento biológico por meio do cultivo de macro-basidiomicetos tem se mostrado eficaz nessa degradação. Neste sentido, há hipóteses de que maquinarias enzimáticas estejam envolvidas nesse processo. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de degradação de GL por meio de extratos brutos obtidos do cultivo de *Panus lecomtei* CC40, como determinar atividades de enzimas extracelulares. A detecção de GL foi aprimorada por meio do uso de RP-UHPLCPDA nessas amostras. Foi avaliado o perfil enzimático para lacase, manganês peroxidase e protease do extrato bruto tanto no cultivo do CC40 por fermentação estado sólido na presença de caroço de algodão triturado – CAT, como também o CAT previamente tratado quimicamente (Ca (OH)<sub>2</sub>). Após 9 dias de cultivo, as atividades de lacase, foram as maiores com 151,03 UI.mL (CAT); diminuindo a partir do 12º dia. Para manganês peroxidase os maiores valores encontrados foram de 898,02 UI.mL (CAT) no 15º dia, e, 82,31 UI.mL (CAT + Ca (OH)<sub>2</sub>) no tempo 3º dia. As atividades de protease foram maiores quando o fungo fora cultivado em CAT, com 4,0 UI. mL. A fim de verificar o potencial de degradação de GL por extrato bruto e respectivas frações obtidas por ultrafiltração (300 a 100 kDA) foram realizados experimentos com gossipol padrão 10 (mg/mL) incubando-o junto ao extrato durante 60 minutos. Os extratos oriundos do cultivo em CAT variaram de 96 a 99% a degradação do GL; enquanto que em CAT (Ca (OH)<sub>2</sub>), foi de 88 a 98%. Há a hipótese de que a degradação de GL seja via ações enzimáticas, a fim de avaliá-la foram propostos planejamentos experimentais voltados a proteoma global (extrato bruto) e ultraconcentrado em membrana de 100 KDA, gerando a expectativa de revelar grupos protéicos indicativos da rota de degradação do GL em TCA por macro-basidiomicetos.