

**MARINA BORGES GUIMARÃES**

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DE EXTRATOS PRODUZIDOS A PARTIR DE  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COLONIZADOS COM BASIDIOMICETOS**

BRASÍLIA

2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DE EXTRATOS PRODUZIDOS A PARTIR DE  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COLONIZADOS COM BASIDIOMICETOS**

**MARINA BORGES GUIMARÃES**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Coorientadora: Dra. Simone Mendonça

BRASÍLIA

2020

MARINA BORGES GUIMARÃES

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DE EXTRATOS PRODUZIDOS A PARTIR DE  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COLONIZADOS COM BASIDIOMICETOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Brasília, 13 de Agosto de 2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista – Presidente da Banca  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

---

Profa. Dra. Dâmaris Silveira – Membro Interno  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

---

Profa. Dra. Marli Camassola – Membro Externo  
Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS)

---

Profa. Dra. Yris Maria Fonseca – Membro Suplente  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, um agradecimento especial às minhas orientadoras Dra. Simone e Profa. Dra. Pérola, as quais tanto admiro, e que sem elas não seria possível este trabalho.

À Embrapa Agroenergia e ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNB, por toda a estrutura e pessoal, por ter a oportunidade de cursar um programa em excelência de ensino e pesquisa.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À FAP-DF, pelo apoio financeiro ao projeto Biocogu.

Agradeço a todo o pessoal da Embrapa que fez parte desta jornada: Dra. Paula Carmona, Hetiene, Dr. Elias; aos analistas: Raquel, José Antônio, Diogo, Agenor, Thaís, Thályta e Felipe.

Agradecimentos especiais: ao Dr. Félix Siqueira pelas contribuições e pela confiança desde o início deste projeto; ao Aparecido pela grande ajuda na produção dos cogumelos e à Joice pela imensa ajuda em várias etapas deste trabalho, além da companhia e amizade.

Ao pessoal do LaproNat que me acolheu, às técnicas Dra. Júlia e Patrícia por toda atenção, às professoras Dra. Yris e Dra. Damaris, a todos os estudantes que sempre me foram solícitos.

À Glaura do Lacen-DF pela gentileza de nos auxiliar na disponibilidade de um ambiente seguro aos experimentos que os necessitavam.

Aos bolsistas que me acompanharam na reta final: Bárbara, Jéssica e Lucas, este trabalho também se deve ao esforço de vocês.

Agradeço meus pais, Marta e Wilmar, por toda a base que me proporcionaram, por todo acolhimento e por sempre apoiarem meus sonhos.

À minha mãe, em especial, por ser uma parte tão boa de mim, sempre estar ao meu lado, ser minha amiga e inspiração de vida.

À minha avó, Maria do Carmo, por me ensinar o significado do amor incondicional que transformou e transforma minha vida todos os dias.

Aos meus queridos amigos-família que tanto amo: Carol Gondim, Carol Bet, Julianna, Isadora, Sofia, Nayla, Raul e Luiza, que me acompanharam nessa trajetória fazendo-a mais leve.

Um especial agradecimento à Carol Bet que me acompanhou desde o primeiro dia nesta jornada e sempre me trouxe conforto até nos piores momentos. Por ser capaz de me ouvir, acolher e aconselhar.

Aos meus amigos do intercâmbio Amanda, Gavião, Mirna, Rodrigo e Simone que mesmo de longe estão sempre por perto em meu coração.

E um agradecimento final a mim mesma por ter chegado até aqui.

## RESUMO

A torta da semente do pinhão-manso (TSPM) e a torta do caroço de algodão (TCA) são dois resíduos da cadeia do biodiesel que possuem alto teor proteico, tendo seu uso limitado na alimentação animal devido à presença de ésteres de forbol em TSPM (composto tóxico promotor de tumor) e gossipol em TCA (composto tóxico capaz de causar infertilidade). A casca de coco verde (CCV) e a torta de macaúba (TM) são resíduos agroindustriais lignocelulósicos de baixo teor proteico. A colonização de fungos basidiomicetos podem ser uma alternativa para o aproveitamento destas biomassas, podendo biodestoxificar as tortas e indicando um novo aproveitamento para resíduos agroindustriais proteicos e lignocelulósicos e produzir substratos gastos (SMS) com finalidade de nutrição animal. Além disto, basidiomicetos são produtores de cogumelos e moléculas bioativas com propriedades farmacêuticas e funcionais. Em face ao exposto, no presente estudo uma triagem, em busca de um fungo para cada uma das biomassas proteicas, entre sete basidiomicetos colonizados em TSPM e TCA adicionados de CCV e TM, foi realizada analisando-se suas capacidades de degradação de compostos tóxicos, atividade antioxidante, teor de proteína bruta e ganho de biomoléculas. *Pleurotus pulmonarius* (EF88) em TSPM e *Panus lecomtei* (CC40) em TCA em diferentes concentrações (20%, 50% e 80%) com CCV foram escolhidos para serem produzidos colonizados e SMS. A partir daí foram produzidos extratos aquosos e metanólicos para serem testadas atividades antioxidantes, antimicrobianas, prebióticas e quantificação de  $\beta$ -glucanas. Além disso, foi realizada a composição centesimal e a dosagem dos compostos tóxicos nos colonizados e SMS. Extratos metanólicos de colonizados de EF88 em TSPM20% e TSPM80% e de *P. lecomtei* (CC40) em TCA80% apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 27154) de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Extratos aquosos de colonizados de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM20% e *P. lecomtei* (CC40) em TCA50% apresentaram teores de  $\beta$ -glucanas de  $6,2 \pm 0,0$  e  $14,8 \pm 2,7$  g/100g de extrato, respectivamente, favorecendo à sua atividade prebiótica. Os achados neste trabalho indicam benefícios na colonização de basidiomicetos em resíduos agroindustriais com a finalidade de alimentação animal. Neste trabalho foi possível identificar biodestoxificação, aumento no teor de proteína, atividade antioxidante, antimicrobiana e prebiótica nos extratos destes colonizados, indicando

sobretudo uma alternativa na alimentação animal ao uso de antibióticos que geram danos ao meio ambiente e à saúde humana.

Palavras-chave: Biodestoxificação; *Pleurotus pulmonarius*; *Panus lecomtei*; Atividade antimicrobiana; Atividade prebiótica.

## ABSTRACT

*Jatropha curcas* seed cake (JCSC) and cottonseed cake (CSC) are agroindustrial residues from biodiesel chain that have high protein content, however their use as animal feed is limited by the presence of phorbol esters in JCSC (a toxic compound tumor promoting) and gossypol in CSC (a toxic compound that causes infertility). Coconut husks (CH) and macauba (*Acronomia aculeata*) cake (MC) are lignocellulosic agroindustrial residues that have low protein content. Colonization of basidiomycete fungi can be an alternative for these proteic and lignocellulosic biomasses utilization and to produce spent mushroom substrate (SMS) for animal feed. Furthermore, basidiomycetes produce mushrooms and bioactive molecules with pharmaceutical and functional properties. In view of this, at the present study a screening of seven basidiomycetes colonized in JCSC and CSC with the addition of CH and MC was performed and their ability of toxic compounds degradation, antioxidant activity, crude protein content and gain of biomolecules, in search of a fungi for each one of the proteic biomasses. *Pleurotus pulmonarius* (EF88) in JCSC and *Panus lecomtei* (CC40) in CSC in different concentrations (20%, 50% and 80%) with CH were chosen for the production of colonizes and SMS. Aqueous and methanolic extracts were obtained from these cultures for dosing antioxidant, antimicrobial and prebiotic activities and quantification of  $\beta$ -glucans. Centesimal composition and toxic compound content was performed in colonizes and SMS. *P. pulmonarius* (EF88) in JCSC20%, JCSC80% and CC50 CSC80% methanolic extracts showed antimicrobial activity against *S. aureus* (ATCC 27154) of 500  $\mu\text{g/mL}$ . *P. pulmonarius* (EF88) in JCSC20% and *P. lecomtei* (CC40) in CSC50% aqueous extracts presented  $\beta$ -glucan content of  $6.2 \pm 0.0$  and  $14.8 \pm 2.7$  g/100g of extract, respectively, promoting prebiotic activity. Findings in this work indicate benefits from basidiomycetes colonization in agroindustrial residues for animal feed. In this work, it was able to identify the ability of basidiomycetes to degrade toxic compounds, increase protein content and antioxidant, antimicrobial and prebiotic activity of colonizes extracts, indicating an alternative in animal feed to the usage of antibiotics that promotes environment and human health damage.

Keywords: Bio-detoxification; *Pleurotus pulmonarius*; *Panus lecomtei*; Antimicrobial activity; Prebiotic activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Basidiomas de <i>Agaricus subrufescens</i> .....	27
Figura 2. Crescimento aéreo de <i>Schizophyllum commune</i> . ....	28
Figura 3. Basidiomas de <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake). ....	29
Figura 4. Basidiomas de <i>P. pulmonarius</i> .....	30
Figura 5. Basidiomas de <i>Fistulina hepatica</i> .....	31
Figura 6. Basidioma de <i>Panus lecomtei</i> .....	32
Figura 7. Basidiomas de <i>G. lucidum</i> .....	33
Figura 8. Estrutura química do éster de forbol (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> ). ....	36
Figura 9. Estrutura química do gossipol (C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub> ). ....	37
Figura 10. Ciclo de produção de cogumelos e utilizações do SMS.....	39
Figura 11. Mecanismo de ação dos prebióticos. ....	44
Figura 12. Crescimento micelial em placas de petri de <i>P. lecomtei</i> (CC40) em agar-TSPM a 6 dias (A). Crescimento de <i>S. commune</i> (FPB117) em agar-TSPM a 12 dias (B). <i>F. hepatica</i> (CC102) em agar-TSPM + CCV a 9 dias (B). CC414 em agar-TSPM + TM a 15 dias (D).....	64
Figura 13. Velocidade de crescimento fúngico (cm/dia) do cultivo em estado sólido em de CC414, FPB128, FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de pinhão-manso (100%), torta de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%). ....	65
Figura 14. Crescimento micelial em placa de petri de CC414 em agar-TCA + CCV em 15 dias (A). Crescimento de <i>G. lucidum</i> (CC351) em agar-TCA + TM em 6 dias (B). Crescimento de <i>F. hepatica</i> (CC102) em agar-TCA + CCV em 6 dias (C). Crescimento de FPB 117 em BDA a 15 dias (D). ....	66
Figura 15. Velocidade de crescimento fúngico (cm/dia) do cultivo em estado sólido em de CC414, FPB128, FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%).....	67
Figura 16. Percentual de degradação de ésteres de forbol por cultivo em estado sólido de FPB117, EF88, CC102 e CC351 em torta de pinhão-manso (100%), torta de pinhão-manso (50%) + coco verde (50%) e torta de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%). ....	69

- Figura 17. Percentual de degradação degossipol por cultivo em estado sólido de FPB117, EF88, CC102 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%). ..... 71
- Figura 18. Teor de ergosterol ( $\mu\text{g/g}$ ) dos cultivos em estado sólido de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351, e do controle, em em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%). ..... 74
- Figura 19. Teor de ergosterol ( $\mu\text{g/g}$ ) dos cultivos em estado sólido de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351, e do controle, em em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%). ..... 75
- Figura 20. Diferença no teor de proteína bruta (%) em base seca dos colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%). ..... 78
- Figura 21. Diferença no teor de proteína bruta (%) em base seca dos colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%). ..... 80
- Figura 22. TEAC ( $\mu\text{g}$  de trolox/mg de extrato) pelo ensaio de DPPH\* de extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas..... 82
- Figura 23. TEAC ( $\mu\text{g}$  de trolox/mg de extrato) pelo ensaio de ABTS\*\* de extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas..... 83
- Figura 24. Mg de EAG por mg de extrato pelo ensaio de fenois totais de extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de

- pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas..... 84
- Figura 25. TEAC ( $\mu\text{g}$  Trolox/mg de extrato) pelo ensaio de DPPH\* extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas..... 85
- Figura 26. TEAC ( $\mu\text{g}$  Trolox/mg de extrato) pelo ensaio de ABTS\* de extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas..... 86
- Figura 27. Mg de EAG por mg de extrato pelo ensaio de fenois totais em extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas..... 87
- Figura 28. Atividade enzimática de proteases (U/mL) (pH 5,5) de extratos enzimáticos dos colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%). ..... 89
- Figura 29. Atividade enzimática de proteases (U/mL) (pH 5,5) de extratos enzimáticos dos colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%). ..... 89
- Figura 30. Esquema das amostras obtidas a partir da colonização de *P. pulmonarius* (EF88) em torta de semente de pinhão-manso (TSPM) e *P. lecomtei* (CC40) em torta de caroço de algodão (TCA), com diferentes proporções de casca de coco verde..... 98
- Figura 31. Atividade antioxidante ( $\mu\text{g}$  Trolox/mg extrato) pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP dos extratos metanólicos das misturas (não colonizadas) e dos

colonizados (30 dias) de <i>P. pulmonarius</i> (EF88) em torta de semente de pinhão-manso (20%) + casca de coco verde (80%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (80%) + casca de coco verde (20%).	108
Figura 32. Atividade antioxidante ( $\mu\text{g}$ Trolox/mg extrato) pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP dos extratos metanólicos das misturas (não colonizadas) e dos colonizados (30 dias) de <i>P. lecomtei</i> (CC40) em torta de caroço de algodão (20%) + casca de coco verde (80%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de caroço de algodão (80%) + casca de coco verde (20%).	109
Figura 33. Curva de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> com o uso de extratos aquosos de fermentados de <i>P. pulmonarius</i> (EF88) como fontes de carbono	117
Figura 34. Log UFC/mL dos extratos AEF20, AEF50 e AEF80 em <i>L. acidophilus</i> nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.	118
Figura 35. Curva de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> com o uso de extratos aquosos de fermentados de <i>P. lecomtei</i> (CC40) como fontes de carbono.	119
Figura 36. Log UFC/mL dos extratos ACC20, ACC50 e ACC80 em <i>Lactobacillus acidophilus</i> nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.	120
Figura 37. Curva de crescimento de <i>Bifidobacterium lactis</i> com o uso de extratos aquosos de fermentados de <i>P. pulmonarius</i> (EF88) como fontes de carbono.	122
Figura 38. Log UFC/mL dos extratos AEF20, AEF50 e AEF80 em <i>Bifidobacterium lactis</i> nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.	123
Figura 39. Curva de crescimento de <i>Bifidobacterium lactis</i> com o uso de extratos aquosos de fermentados de <i>P. lecomtei</i> (CC40) como fontes de carbono.	125
Figura 40. Log UFC/mL dos extratos ACC20, ACC50 e ACC80 em <i>Bifidobacterium lactis</i> nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.	126
Figura 41. Curva de crescimento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> com o uso de extratos aquosos de fermentados de <i>P. pulmonarius</i> (EF88) como fontes de carbono.	127
Figura 42. Log UFC/mL dos extratos AEF20, AEF50 e AEF80 em <i>Lactobacillus rhamnosus</i> nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.	128
Figura 43. Curva de crescimento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> com o uso de extratos aquosos de fermentados de <i>P. lecomtei</i> (CC40) como fontes de carbono.	130
Figura 44. Log UFC/mL dos extratos ACC20, ACC50 e ACC80 em <i>Lactobacillus rhamnosus</i> nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.	131

- Figura 45. Curva de crescimento de *Lactobacillus plantarum* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. pulmonarius* (EF88) como fontes de carbono. 133
- Figura 46. Log UFC/mL dos extratos AEF20, AEF50 e AEF80 em *Lactobacillus plantarum* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h. .... 134
- Figura 47. Curva de crescimento de *Lactobacillus plantarum* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. lecomtei* (CC40) como fontes de carbono. .... 135
- Figura 48. Log UFC/mL dos extratos ACC20, ACC50 e ACC80 em *Lactobacillus plantarum* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h. .... 136

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de ésteres de forbol (mg/g) (média e desvio padrão) em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%). .....	68
Tabela 2. Concentração média de gossipol ( $\mu\text{g/g}$ ) e desvio padrão, em cada tratamento com macrofungos em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%). .....	70
Tabela 3. Concentração média de ergosterol ( $\mu\text{g/g}$ ) e desvio padrão em dos cultivos em estado sólido de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%). .....	73
Tabela 4. Concentração média de ergosterol ( $\mu\text{g/g}$ ) e desvio padrão em dos cultivos em estado sólido de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%). .....	74
Tabela 5. Teor de proteína bruta ( $\text{N} \times 6,25$ ) em g/100g de biomassa seca em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas. ....	77
Tabela 6. Teor de proteína bruta ( $\text{N} \times 6,25$ ) em g/100g de biomassa seca em torta de caroço de algodão (100%), torta caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas. ....	79
Tabela 7. Comparação dos resultados de velocidade de crescimento, degradação de ésteres de forbol, teor de ergosterol e atividade de proteases em TSPM e misturas. ....	91
Tabela 8. Comparação dos resultados de atividade antioxidante, teor de fenólicos totais e a diferença de proteína em TSPM e misturas. ....	92

Tabela 9. Comparação dos resultados de velocidade de crescimento, degradação de ésteres de forbol, teor de ergosterol e atividade de proteases em TCA e misturas. ....	94
Tabela 10. Comparação dos resultados de atividade antioxidante, teor de fenólicos totais e a diferença de proteína em TCA e misturas. ....	95
Tabela 11. Códigos das amostras utilizadas nas análises de teor de compostos tóxicos, composição centesimal e teor de $\beta$ -glucanas. ....	98
Tabela 12. Descrição dos códigos dos extratos .....	99
Tabela 13. Concentração de ésteres de forbol (ppm) nos colonizados e SMS de <i>P. pulmonarius</i> (EF88) em torta de semente de pinhão-manso (TSPM) em diferentes concentrações com coco verde.....	99
Tabela 14. Concentração e gossipol (ppm) nos colonizados e SMS de <i>P. lecomtei</i> (CC40) em torta de caroço de algodão (TCA) em diferentes concentrações com coco verde.....	100
Tabela 15. Matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e teor de proteína bruta (PB) das misturas, colonizados e SMS obtidos a partir da colonização de <i>P. pulmonarius</i> em torta de semente de pinhão-manso (TSPM) em diferentes concentrações com coco verde.....	102
Tabela 16. Matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e teor de proteína bruta (PB) das misturas, colonizados e SMSs obtidos a partir da colonização de <i>P. lecomtei</i> em torta de caroço de algodão (TCA) em diferentes concentrações com coco verde. ....	104
Tabela 17. Teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), celulose (CEL) e hemicelulose (HEM) das misturas, colonizados e SMS obtidos a partir da colonização de <i>P. pulmonarius</i> em torta de semente de pinhão-manso (TSPM) em diferentes concentrações com coco verde. ....	105
Tabela 18. Teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), celulose (CEL) e hemicelulose (HEM) das misturas, colonizados e SMS obtidos a partir da colonização de <i>P. lecomtei</i> em torta de caroço de algodão (TCA) em diferentes concentrações com coco verde.....	106
Tabela 19. Quantificação de de glucanas totais, $\alpha$ -glucanas e $\beta$ -glucanas nos extratos aquosos e teores de $\beta$ -glucanas em base seca de colonizados/SMS de <i>P.</i>	

<i>pulmonarius</i> (EF88) em torta de semente de pinhão-manso com coco verde em diferentes concentrações. ....	110
Tabela 20. Quantificação de glucanas totais, $\alpha$ -glucanas e $\beta$ -glucanas nos extratos aquosos e teores de $\beta$ -glucanas em base seca de colonizado/SMS de <i>P. lecomtei</i> (CC40) em torta de caroço de algodão em diferentes concentrações com coco verde.....	111
Tabela 21. Médias dos halos de inibição dos extratos dos cultivos de 30 dias nas diferentes concentrações por disco contra <i>S. aureus</i> (ATCC 27154), <i>S. enterica</i> Typhi (ATCC 14028) e <i>E. coli</i> (ATCC 25299).....	113
Tabela 22 Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de <i>L. acidophilus</i> com extratos aquosos de <i>P. pulmonarius</i> (EF88) contra bactérias patogênicas. ....	118
Tabela 23. Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de <i>L. acidophilus</i> com extratos aquosos de <i>P. lecomtei</i> (CC40) contra bactérias patogênicas.....	120
Tabela 24. Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de <i>B. lactis</i> com extratos aquosos de <i>P. pulmonarius</i> (EF88) contra bactérias patogênicas. ....	123
Tabela 25. Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de <i>B. lactis</i> com extratos aquosos de <i>P. lecomtei</i> (CC40) contra bactérias patogênicas.....	126
Tabela 26. Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de <i>L. rhamnosus</i> com extratos aquosos de <i>P. pulmonarius</i> (EF88) contra bactérias patogênicas. ....	129
Tabela 27. Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de <i>L. rhamnosus</i> com extratos aquosos de <i>P. lecomtei</i> (CC40) contra bactérias patogênicas.....	131
Tabela 28. Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de <i>L. plantarum</i> com extratos aquosos de <i>P. pulmonarius</i> (EF88) contra bactérias patogênicas. ....	134
Tabela 29. Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de <i>L. plantarum</i> com extratos aquosos de <i>P. lecomtei</i> (CC40) contra bactérias patogênicas.....	136

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABTS:** 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

**ACC20:** Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (20%) + casca de coco verde (80%)

**ACC50:** Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%)

**ACC80:** Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (80%) + + casca de coco verde (20%)

**AEF20:** Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (20%) + casca de coco verde (80%)

**AEF50:** Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%)

**AEF80:** Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (80%) + casca de coco verde (20%)

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BDA:** Batata Ágar Dextrose

**bs:** Base Seca

**CC102:** *Fistulina hepatica*

**CC35:** *Ganoderma lucidum*

**CC40:** *Panus lecomtei*

**CEL:** Celulose

**CES:** Cultivo em Estado Sólido

**CIM:** Concentração Inibitória Mínima

**CC414:** *Agaricus subrufescens*

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

**EE:** Extrato Etéreo

**EF88:** *Pleurotus pulmonarius*

**ERO:** Espécies reativas de oxigênio

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations

**FDA:** Fibra em Detergente Ácido

**FDN:** Fibra em Detergente Neutro

**FOS:** Frutooligossacarídeos

**FPB117:** *Schizophyllum commune*

**FPB128:** *Lentinula edodes*

**FRAP:** Poder de Redução do Íon Ferro

**GF2:** 1-kestose

**GF3:** Nistose

**GF4:** 1-F-frutofunanosil nistose

**HEM:** Hemicelulose

**LIG:** Lignina

**MCC20:** Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (20%) + casca de coco verde (80%)

**MCC50:** Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%)

**MCC80:** Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (80%) + casca de coco verde (20%)

**MEF20:** Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (20%) + casca de coco verde (80%)

**MEF50:** Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%)

**MEF80:** Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (80%) + casca de coco verde (20%)

**MHB:** Mueller Hinton Broth

**MM:** Matéria Mineral

**MRS(-C):** MRS isento de glicose

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PB:** Proteína Bruta

**PMA:** 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

**SMS:** *Spent Mushroom Substrate*

**TCA:** Torta de Caroço de Algodão

**TPTZ:** 2,4,6- tripiridil-s-triazina

**Trolox:** 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico

**TSPM:** Torta de Semente de Pinhão-Manso

**UFC:** Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO .....	21
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	24
1.	Cogumelos comestíveis .....	24
1.1.	<i>Agaricus subrufescens</i> (Cogumelo do Sol) .....	26
1.2.	<i>Schizophyllum commune</i> .....	27
1.3.	<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake).....	28
1.4.	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Cogumelo-Ostra Marrom).....	29
1.5.	<i>Fistulina hepatica</i> .....	30
1.6.	<i>Panus lecomtei</i> .....	32
1.7.	<i>Ganoderma lucidum</i> .....	33
2.	Cultivo de cogumelos em resíduos agroindustriais e o SMS ( <i>Spent Mushroom Substrate</i> ).....	34
3.	Propriedades funcionais de cogumelos comestíveis .....	39
3.1.	Atividade antioxidante .....	40
3.2.	Atividade antimicrobiana .....	41
3.3.	Atividade prebiótica .....	43
III.	OBJETIVOS .....	45
1.	Geral .....	45
2.	Específicos.....	45
IV.	MATERIAL E MÉTODOS .....	46
1.	Origem dos resíduos agroindustriais lignocelulósicos .....	46
2.	Manutenção e conservação dos macrofungos .....	46
3.	Teor de umidade das biomassas.....	46
4.	Triagem dos macrofungos .....	47
	Crescimento em placas .....	47
4.2.	Velocidade de crescimento em frascos (cultivo em estado sólido).....	47
4.3.	Quantificação de ésteres de forbol - torta de semente de pinhão-manso... 48	
4.4.	Quantificação de gossipol - torta de caroço de algodão .....	49
4.5.	Atividade Antioxidante .....	49
4.6.	Fenois Totais .....	51
4.7.	Quantificação do Ergosterol .....	51
4.8.	Proteína Bruta .....	52

4.9. Atividade de proteases .....	52
5. Cultivo de cogumelos: colonizados, cogumelos e SMS .....	54
6. Análise química .....	55
6.1. Análise centesimal.....	55
6.2. Compostos tóxicos, ergosterol, proteína bruta e atividade de proteases....	57
7. Teor de $\beta$ -glucanas, atividade antioxidante, antimicrobiana e prebiótica .....	58
7.1. Extração dos colonizados e SMS.....	58
7.2. Atividade antioxidante e fenólicos totais.....	58
7.3. $\beta$ -glucanas .....	59
7.4. Atividade prebiótica .....	59
7.5. Atividade antimicrobiana .....	60
9. Análise estatística .....	62
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
1. Triagem dos Macrofungos .....	63
1.1. Velocidade de crescimento.....	63
1.2. Degradação de compostos tóxicos.....	68
1.3. Teor de Ergosterol .....	72
1.4. Teor de proteína bruta .....	76
1.5. Atividade antioxidante e fenólicos totais.....	80
1.2. Atividade enzimática de proteases .....	88
1.3. Cultivo de cogumelos: escolha do macrofungo e dos substratos.....	90
2. Produção dos colonizados, SMS e cogumelos e seus extratos .....	97
2.1. Compostos tóxicos .....	99
2.2. Composição centesimal .....	101
2.3. Atividade antioxidante .....	107
2.4. Teor de $\beta$ -glucanas.....	109
2.5. Atividade antimicrobiana .....	112
2.6. Atividade prebiótica .....	115
VI. CONCLUSÃO.....	140
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	142

## I. INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis surgiram como alternativas energéticas de menor impacto ambiental, além disso, a cadeia de produção de biocombustíveis gera resíduos que possuem diversas aplicações como: ração animal, combustíveis para caldeiras, polímeros, condicionadores de solo, forragem para animais, fertilizantes, adubo, além de também servirem como substratos para indústria têxtil e automobilística (COSTA, CAVA, et al., 2014). As utilizações dos resíduos agroindustriais são alternativas para o problema de estocagem que são capazes de gerar poluição ambiental (COSTA, CAVA, et al., 2014).

Estes resíduos geralmente são substratos lignocelulósicos e compostos majoritariamente de três diferentes polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é formada na cadeia da glicose, a hemicelulose é composta por açúcares de cinco a seis carbonos e a lignina está associada à parede vegetal da planta e é responsável pela resistência e rigidez do tecido vegetal (FENGEL e WEGENER, 1984). A quantidade de cada um destes polímeros varia conforme espécie, idade e parte da planta. Em média, biomassas lignocelulósicas consistem em 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina (GLAZER e NIKAIDO, 2007).

Os fungos basidiomicetos são eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses, e podem ser cultivados em palha de arroz, trigo, espigas de milho, bagaço de cana-de-açúcar, bem como nos substratos lignocelulósicos oriundos da indústria do biodiesel (KOHARI, AMAZONAS e CARVALHO, 1997). Estes macrofungos são capazes de sintetizar enzimas, compostos bioativos, além de seus basidiomas serem comestíveis e possuírem propriedades funcionais (ROUPAS, KEOGH, et al., 2012). Dentre as biomassas alternativas que vem sendo estudadas para a produção de óleo para síntese de biodiesel e cujos resíduos poderiam ser utilizados no cultivo de macrofungos, as que apresentam maior potencial na região Centro-Oeste são a macaúba (*Acronomia aculeata* Jacq. Lodd), o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e o algodão (*Gossypium hirsutum*), entretanto as tortas de algodão e pinhão-manso possuem toxicidade, o que pode limitar a utilização da torta para a nutrição humana ou animal.

O pinhão-manso possui alto rendimento de óleo por hectare, porém além de existir pouco conhecimento científico agrônômico sobre a planta, também possui alta toxicidade devido aos ésteres de forbol (LAVIOLA e ALVES, 2011).

O algodoeiro, nativo de climas tropicais da África, Ásia e América, possui importância econômica na indústria têxtil. Seu caroço também é utilizado na extração de óleo vegetal ou para a alimentação animal na forma de caroço íntegro, torta e farelo, e possui moderado nível proteico (20%) e elevado teor de gordura, fibra e carboidratos (EZEQUIEL, 2001; EZEQUIEL, 2002). No entanto, esta inclusão na nutrição animal é limitada devido aos efeitos tóxicos ao fígado, sistema imune e reprodutor, mesmo em baixas concentrações (menos de 0,1% de gossipol livre na ração animal) (GADELHA, FONSECA, et al., 2014). Esta toxicidade desta matéria-prima ocorre devido a presença do gossipol, um composto polifenólico de coloração amarelada, que na planta possui finalidade de protegê-la de ataques de insetos (LANA, 2002; KONG, DAUD e ZHU, 2010).

Pesquisas recentes (CUNHA, 2017; GOMES, 2015; SANTANA, 2016) demonstraram que a utilização de tortas de semente de algodão ou pinhão-mansão como meio de cultivo de macrofungos do gênero *Pleurotus* spp. (Cogumelos-Ostra) levaram à diminuição da toxicidade em 80% a 100%. O material pós-cultivo é denominado SMS (do inglês, *Spent Mushroom Substrate*), contém de 5% a 10% de micélio e é fonte de extração de enzimas e substâncias químicas de interesse. Sabe-se que durante a degradação da lignocelulose, os basidiomicetos são capazes de sintetizar simultaneamente enzimas hidrolíticas e oxidativas, como celulasas,  $\beta$ -glicosidases, xilanases, lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases (QINNGHE, XIAOYU, et al., 2003; PALMIERI, GIARDINA, et al., 2000). Tais enzimas convertem os polímeros em moléculas menores que podem ser utilizadas como nutrientes (DE MENEZES e BARRETO, 2015).

Cogumelos possuem uma série de substâncias bioativas que possibilitam seu uso como alimento funcional. Dentre elas, se destacam as fibras, os polissacarídeos ( $\beta$ -glucanas e quitina), os compostos fenólicos, os terpenoides, os esteróides, as vitaminas, aminoácidos e proteínas. Estes compostos possuem atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-tumorais, antivirais, imunomoduladoras, hipocolesterolemiantes, reguladores de níveis glicêmicos, dentre outras. Além disso, os polissacarídeos dos cogumelos já são utilizados como prebióticos (MATTILA, MARNILA e PIHLANTO, 2017).

Portanto, a colonização de macrofungos em resíduos agroindustriais oferece uma alternativa para seu aproveitamento e enriquecimento, devido suas capacidades de destoxificação nas biomassas tóxicas (torta de pinhão-mansão e torta de caroço de

algodão). Além disso, cogumelos produzem compostos bioativos com possíveis atividades antimicrobiana e prebiótica, que enriquecem o SMS para uso na nutrição de animais monogástricos; existindo a possibilidade de serem utilizados como promotores de crescimento na alimentação animal, substituindo o mau uso de antibióticos que é um dos responsáveis pela resistência antimicrobiana em humanos.

Sendo assim, o cultivo de cogumelos comestíveis em resíduos agroindustriais pode ser promissor do ponto de vista econômico, ambiental, nutritivo e farmacêutico.

Neste trabalho, a biodestoxificação, os teores de  $\beta$ -glucanas, a composição centesimal, as atividades antioxidantes, antimicrobianas e prebióticas de colonizados e SMS com basidiomicetos será avaliada com vista à formulação de aditivos para a nutrição animal.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Cogumelos comestíveis

Cogumelos podem ser definidos como macrofungos, do filo basidiomiceto, com basidiomas vistos a olho nu ou coletados com a mão (MILES e CHANG, 1997). Existem mais de 2 mil espécies de cogumelos encontrados e descritos na natureza, entretanto cerca de apenas 25% são espécies comestíveis e poucas são cultivadas comercialmente (VALVERDE, HERNANDEZ-PEREZ e PAREDES-LOPEZ, 2015). Apesar disso, o valor comercial dos cogumelos comestíveis é bastante significativo devido sua composição nutricional balanceada e por serem considerados uma fonte alternativa de proteína de alta qualidade e de aminoácidos não-essenciais (RASHIDI e YANG, 2016; BACH, HELM, *et al.*, 2017). De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO/ONU, no ano de 2016 houve produção mundial de mais de 10 milhões de toneladas de cogumelos comestíveis, sendo a China o maior produtor, o qual sua produção foi de 7,78 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016).

Tradicionalmente, os cogumelos são consumidos por povos de diversas culturas, tanto por suas características gastronômicas, quanto medicinais. Entretanto, seu consumo e presença na medicina tradicional é notório nas culturas orientais, especialmente na cultura chinesa, tendo registros das suas utilizações de milhares de anos atrás (DA SILVA e JORGE, 2011). O Brasil possui consumo per capita bastante baixo (160 g/ano) comparado com países europeus como França, Itália e Alemanha (2 kg/ano), ou China e Coreia do Sul (8 kg/ano), por não possuir consumo tradicional de cogumelos comestíveis, sendo este introduzido com a chegada dos japoneses em São Paulo na primeira metade do século XX (ANPC, 2018). Entretanto, há estudos dos anos 60 e 70 com relatos de consumo tradicional por grupos indígenas Yanomami, Ticano, Nambiquara, Caibi, Txicão e Txucurramãe, na Amazônia (VARGAS-ISLA, ISHIKAWA e PY-DANIEL, 2013).

Na indústria de cogumelos existem três principais segmentos: cogumelos comestíveis, cogumelos medicinais e cogumelos selvagens (CHANG, 2008). Existem aproximadamente 200 espécies de cogumelos comestíveis espalhados pelo mundo, 35 são cultivadas comercialmente, sendo que 20 espécies são cultivadas em escala industrial. Destas, existem 5 as quais dominam o mercado dos cogumelos destacam-se: *Agaricus bisporus* (conhecido como cogumelo de paris, champignon, Portobello),

*Lentinula edodes* (shiitake), *Pleurotus* spp. (cogumelos ostra, shiimeji) e *Flammulina velutipes* (enokitake, popular na Ásia). Os cogumelos medicinais incluem tanto as espécies selvagens quanto as cultivadas comercialmente (MATTILA, MARNILA e PIHLANTO, 2017).

Apesar dos cogumelos comestíveis serem fontes pobres de energia, eles possuem uma série de nutrientes, possuem considerável quantidade de proteína, polissacarídeos e fibra, além de uma série de micronutrientes e metabólitos secundários com potencial farmacêutico, como  $\beta$ -glucanas, compostos fenólicos, esteróis e triterpenos (MATTILA, MARNILA e PIHLANTO, 2017). Assim, cogumelos comestíveis podem ser caracterizados como alimentos funcionais. Um exemplo é o Cogumelo Do Sol (*Agaricus blazei*) que é comercializado no Brasil em forma de pó. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indica que cogumelos consumidos nas formas dessecadas, inteiras fragmentadas, moídas ou em conserva são considerados alimentos (Resolução ANVS/MS nº 272/2005), enquanto cogumelos comercializados em forma de pó, cápsulas e comprimidos são considerados como suplementos alimentares, conforme a RDC 243/2018. Para ambos os casos, não são permitidas alegações terapêuticas ou medicamentosas, como prevenção, tratamento ou cura de qualquer doença, apenas a manutenção da saúde (ANVISA, 2018).

Como os cogumelos perdem água muito facilmente, diminuem tamanho e peso, em até 90%, quando desidratados. A desidratação a vácuo em baixa temperatura e protegida de luz é a mais eficaz para preservar as substâncias bioativas e manter sua atividade antioxidante (DA SILVA e JORGE, 2011). Além disso, é importante observar que diferenças de substrato, práticas de cultivo, estágio de desenvolvimento, condições de armazenamento e processamento, além de práticas de cozimento, podem influenciar na composição química e no valor nutricional dos cogumelos (VALVERDE, HERNANDEZ-PEREZ e PAREDES-LOPEZ, 2015).

No Brasil, a produção de cogumelos se destaca nos estados de São Paulo e Paraná, além de produções menores nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, sul da Bahia, Pernambuco, Brasília e Rio Grande do Sul. No Brasil, os principais cultivos de cogumelos são das espécies de *A. bisporus* e *L. edodes*, que foram introduzidos no início dos anos 90. Das espécies nacionais, destaca-se o *Agaricus subrufescens* Peck (sinonímia. *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann, = *Agaricus brasiliensis*. Wasser, Diduck, conhecido como Cogumelo Do Sol. O Estado de São

Paulo se destaca na produção, sendo seu cultivo realizado nas épocas de primavera e verão (DA SILVA e JORGE, 2011).

Na FAO não há dados sobre a produção de cogumelos no Brasil, e estes são dados difíceis de serem coletados. Entretanto, em 2016 foi realizado um censo em São Paulo informando que neste Estado há mais de 500 produtores responsáveis por produzir um total de 12745 toneladas de cogumelos/ano (GOMES, AKAMATSU, et al., 2016). Esta produção ainda é muito abaixo que a produção anual na China (cerca de 7,78 milhões de toneladas). E apesar de recentes melhorias tecnológicas terem permitido um ganho de produtividade por parte dos fungicultores nacionais, existe ainda uma parcela significativa dos produtores que sofrem com a concorrência de produtos importados, em especial da China, de cogumelos em conserva. Em função disso, na última década, observou-se uma redução no número de produtores e na produção de cogumelos em conserva, havendo atualmente uma concentração dos produtores do aumento da produção de cogumelos frescos (ANPC, 2018). A disseminação do produto *in natura* vem causando um rápido desenvolvimento na fungicultura nacional devido os cogumelos frescos possuírem alto valor agregado, características funcionais e gastronômicas (GOMES, AKAMATSU, et al., 2016).

### **1.1. *Agaricus subrufescens* (Cogumelo do Sol)**

Também conhecido como “cogumelo amêndoa” devido seu sabor amendoado, *Agaricus subrufescens* Peck (*sinonímia*. *Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinemann, = *Agaricus brasiliensis*. Wasser, Diduck (Figura 1), é um fungo pertencente à família Agaricaceae, da ordem Agaricales, do filo Basidiomycota (FIRENZUOLI, GORI e LOMBARDO, 2008). Existem registros de cultivo e consumo no litoral atlântico dos Estados Unidos a partir de meados do século XIX ao início do século XX (KERRIGAN, 2005). Em 1960 o cogumelo foi novamente descoberto no Brasil, e chamado inicialmente de “cogumelo Piedade”, por ter sido encontrado no município de mesmo nome no Estado de São Paulo. Foi coletado pela primeira vez no Brasil por T. Furumoto que enviou o cogumelo para o Japão a fim de suas propriedades medicinais serem estudadas. O cogumelo foi inicialmente identificado como *Agaricus blazei* pelo botânico belga P. Heinemann em 1967, posteriormente foi identificado como *A. brasiliensis*, *Psalliota subrufescens*, *A. rufotegulis* e *A. subrufescens*, tendo mantido o último nome devido os taxonomistas considerarem as outras nomenclaturas errôneas (WISITRASSANEWONG, KARUNARATHNA, et al., 2012). No Brasil popularizou-se

pelo nome de Cogumelo do Sol e devido suas propriedades medicinais tem sido altamente comercializado (DIAS, ABE e SCHWAN, 2004).



**Figura 1.** Basidiomas de *Agaricus subrufescens*.

Fonte: (WISITRASSANEEWONG, KARUNARATHNA, et al., 2012)

Os basidiomas de *A. subrufescens* contem altos níveis de minerais (potássio, fósforo, cálcio, magnésio e zinco), além de uma série de compostos bioativos com potencial uso no tratamento de algumas de doenças (FIRENZUOLI, GORI e LOMBARDO, 2008). Suas principais propriedades funcionais estão relacionadas a prevenção do câncer, diabetes, arteriosclerose, hepatite crônica, além de suas ações anti-tumor, antioxidantes e como modulador do sistema imunológico (HETLAND, JOHNSON, et al., 2008).

### **1.2. *Schizophyllum commune***

*S. commune* (Figura 2) é um dos fungos mais comumente encontrado na natureza, presente em todos os continentes, exceto na Antártica pertencente à família Agaricaceae, da ordem Agaricales, do filo Basidiomycota (HIBBETT, BINDER, et al., 2007). É normalmente encontrado na natureza em materiais orgânicos em decomposição, especialmente em madeira de árvores apodrecida (CHOWDHARY, RANDHAWA, et al., 2013; OHM, DE JONG, et al., 2010).

Apesar de ser listado como um cogumelo não comestível pelos guias da Europa e dos Estados Unidos, devido sua consistência e textura fibrosa, é amplamente consumido do México e próximo aos trópicos (RUAN-SOTO, GARIBAY-ORIJEL e CIFUENTES, 2006).

Este cogumelo é de grande importância farmacêutica, principalmente devido à produção de seu derivado polissacarídeo, Schizophyllan, que possui considerável atividade anticâncer (QUI e LUI, 2000).



**Figura 2.** Crescimento aéreo de *Schizophyllum commune*.

Fonte: (SMITH, 2018)

### **1.3. *Lentinula edodes* (Shiitake)**

*L. edodes*, conhecido popularmente no Brasil como Shiitake, é nativo do leste da Ásia e é o segundo cogumelo comestível mais popular do mundo. Pode ser encontrado naturalmente em florestas asiáticas, em árvores mortas. É um fungo aeróbio, decompositor de madeira, que degrada celulose e lignina para obter energia (XU e ZHANG, 2015).

O Shiitake (Figura 3) é nutritivo, possuindo cerca de 17,5% de proteínas em relação à matéria seca, com nove aminoácidos essenciais. Além disso, é um cogumelo com importância medicinal, com uma série de propriedades já identificadas como: redução do colesterol, controle da pressão arterial, fortalecimento do sistema imunológico, propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, além de atividades antimicrobianas (BISEN, BAGHEL, et al., 2010).



**Figura 3.** Basidiomas de *Lentinula edodes* (Shiitake).

Fonte: (ISLAM, 2015)

#### **1.4. *Pleurotus pulmonarius* (Cogumelo-Ostra Marrom)**

O gênero *Pleurotus*, pertencente à família Pleurotaceae, que inclui um dos cogumelos mais amplamente consumidos, como o shimeji-preto (Brasil) ou cogumelo-ostra marrom, sendo *P. ostreatus* a espécie mais conhecida e mais consumida. A palavra *Pleurotus* é derivada do grego e significa “orelha de lado” (pleure: lado; otos: orelha), devido ao formato do píleo, que é em forma de orelha ou concha. Ainda são conhecidos como cogumelos ostra, abalone, cogumelo-do-cardo, tamogitake ou cogumelos de árvores, dependendo da espécie. A coloração do basidioma do *Pleurotus* spp. Está relacionada com a intensidade de luz, podendo variar do branco, amarelo, rosa, salmão e marrom, até o azul-escuro e cinza-escuro (CHANG e MILES, 2004).

*P. pulmonarius* (Figura 4) é um fungo saprófita, ou seja, incapaz de sintetizar seu próprio alimento, e parasita de árvores. Podem ser cultivados em vários tipos de resíduos lignocelulósicos como serragem, palha de arroz, bagaço, farinha de milho, resíduos de algodão, talos e folhas de bananas. Os cogumelos são ricos em proteínas e fibras solúveis, além de vitaminas (do complexo B e A) e minerais (potássio e selênio), contém pouca quantidade de carboidratos livres e lipídeos, sendo que sua composição é variável e dependente da região de cultivo e substrato utilizado

(SYNYTSYA, MÍČKOVÁ, et al., 2008). O selênio, em especial, é um nutriente essencial para atividade catalítica de proteínas, aumento de funções do sistema imune e redução do risco de câncer, além de ser o componente essencial da enzima antioxidante glutaciona peroxidase (SILVA, 2009).



**Figura 4.** Basidiomas de *P. pulmonarius*

Fonte: (KUO, 2017)

Além das propriedades alimentícias, os fungos do gênero *Pleurotus* possuem atividades anticâncer, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antimicrobiana, antinociceptiva, antioxidante, antiviral, hipolipidêmico, imunomoduladora, citoprotetiva, neuritogênico, antiangiogênico e anticataratogênico (CARRASCO-GONZALEZ, SERNASALDIVAR e GUTIERREZ-URIBE, 2017). Os principais compostos bioativos relacionados a estas atividades são os polissacarídeos, peptídeos, proteínas, triterpenos, policetídeos e nucleotídeos (DEEPALAKSHMI e MIRUNALINI, 2014).

### **1.5. *Fistulina hepatica***

Popularmente conhecido como língua de boi ou cogumelo bife, *F. hepática* (Figura 5) é um fungo saprófita, ocasionalmente parasita, que vive nas bases de

árvores, especialmente carvalhos e castanheiras, capaz de crescer sozinho em pequenos grupos, sendo seu período de frutificação durante o verão e o outono europeu. Este cogumelo se assemelha à carne crua e já foi utilizado no passado como substituto para a carne. É vendido comumente em feiras e pode ser consumido cru na salada ou cozido (RIBEIRO, VALENTAO, et al., 2007). Sua consistência é rígida e sabor ligeiramente agriamargo, sendo que sua forma lembra os cogumelos orelha-de-pau, sendo de textura áspera e coloração variante entre o vermelho claro e marrom avermelhado, que quando cortado exsuda um líquido vermelho (KNUDSEN e VESTERHOLD, 2008; PALAZZOLO, LETIZIA GARGANO e VENTURELLA, 2012).

Existe pouca informação na literatura sobre o valor nutricional de *F. hepatica*. Estudos antigos com foco na sua atividade antimicrobiana já caracterizaram compostos acetilênicos, os principais compostos voláteis, ácido clorogênico, aminoácidos, arabitol e polissacarídeos com atividade biológica (TSUGE, MORI, et al., 1999; WU, KRINGS, et al., 2005; PARIS, DURAND e BONNET, 1960; CASALICCHIO, PAOLETTI, et al., 1975; FREREJACQUE, 1939; NANO, BINELLO, et al., 2002).



**Figura 5.** Basidiomas de *Fistulina hepatica*

Fonte: (FIRST-NATURE.COM, 2018)

Além disso, estudos recentes têm identificado atividades antimicrobianas e antinematocidas, além de atividade antioxidante relacionada às substâncias fenólicas presentes (ALVES, FERREIRA, et al., 2014; DONG, LI, et al., 2006; LIKTOR-BUSA, KOVÁCS, et al., 2016; RIBEIRO, VALENTAO, et al., 2007).

De acordo com RIBEIRO, VALENTAO, *et al.*, (2007), o teor de substâncias fenólicas encontradas em *F. hepatica* variaram de 367 a 548 mg/kg, sendo o ácido elágico o componente mais abundante, totalizando em média 49% do teor total de fenólicos. Também foi encontrado em porcentagens menores ácido cafeico e ácido p-cumarínico, de 24% e 26% respectivamente.

### 1.6. *Panus lecomtei*

*P. lecomtei* é um macrofungo pertencente à família Polyporaceae, com características morfológicas bastante similares ao fungo *Panus strigellus*. As duas espécies ocorrem naturalmente nas Américas no mesmo habitat, sob vegetação densa e em áreas abertas (PEGLER, 1983). Devido suas similaridades morfológicas, pode-se haver confusão na identificação das espécies *P. lecomtei* e *P. strigellus*, e Pegler (1983) que primeiro identificou as duas espécies como sendo distintas (VARGAS-ISLA, CAPELARI, *et al.*, 2015).

*P. lecomtei* (Figura 6) é consumido tradicionalmente no Brasil, em Roraima, nas aldeias Yanomamis de Uauris e Xitei/Xideia, onde o cogumelo é conhecido como Shio-koni-amo e Kasikoirima. Também é consumido no Japão, com o nome de Aragekawakitak (VARGAS-ISLA, ISHIKAWA e PY-DANIEL, 2013).



**Figura 6.** Basidioma de *Panus lecomtei*

Fonte: (CENBRAM, 2012)

Possui coloração levemente rosa ao roxo, podendo chegar ao marrom, mudando conforme o estágio de maturação. O basidioma é resistente, esbranquiçado e suave, de sabor levemente amargo (ARORA, 2003; KIRK, CANNON, *et al.*, 2008). Existem poucos dados na literatura sobre *P. lecomtei* e suas atividades biológicas, sendo as principais relatadas sendo quimioterápicas e antimicrobianas (VARGAS-ISLA, CAPELARI, *et al.*, 2015; ZMITROVICH e KOVALENKO, 2016)

### 1.7. *Ganoderma lucidum*

*G. lucidum* é um cogumelo pertencente ao filo dos basidiomicetos, da família Ganodermaceae, da ordem dos Aphylophorales. É conhecido no Japão como Reishi e na China como Lingzhi (CÖR, KNEZ e HRNČIČ, 2018). É encontrado na natureza normalmente na madeira de espécies caducifólias vivas ou mortas, em ambientes de facultativa encontrada em regiões subtropicais e temperadas, em florestas da Ásia, Europa e Américas do Sul e do Norte (DINESH BADU e SUBHASREE, 2008; SIWULSKI, SOBIERALSKI, *et al.*, 2015).



**Figura 7.** Basidiomas de *G. lucidum*

Fonte: (MARIMUTHU e MAHENDRAN, 2019)

Na medicina tradicional Chinesa, *G. lucidum* é usado milenarmente na promoção da saúde, longevidade e crescimento espiritual, sendo o nome Reishi reconhecido há mais de 2400 anos, classificada como “erva superior” (YUEN e GOHEL, 2005). Seus principais usos tradicionais são na prevenção e no tratamento de várias doenças como

hepatite, nefrite, hipertensão e bronquite, além de ser um potente estimulante do sistema imune (CÖR, BOTIĆ, et al., 2014).

*G. lucidum* já foi reportado como o “cogumelo da imortalidade”, contendo mais de 400 compostos bioativos incluindo triterpenoides, polissacarídeos, nucleotídeos, esteroides, ácidos graxos e peptídeos/proteínas com uma variedade de propriedades medicinais com atividades antitumoral, antimicrobianas, anti-aterosclerótica, anti-inflamatória, hipolipidêmica, antidiabética, antioxidante, anti-idade, antifúngica e antiviral, além de melhorar o sistema imune (SANODIYA, THAKUR, et al., 2009; KAO, JESUTHASAN, et al., 2013; KARWA e RAI, 2012; LI, VASIL'EV, et al., 1989; CHEN, LUO, et al., 2005; CHERIAN, SUDHEESH, et al., 2011). As principais atividades farmacológicas estão nos triterpenoides e nos polissacarídeos (BOH, BEROVIC, et al., 2007).

## **2. Cultivo de cogumelos em resíduos agroindustriais e o SMS (*Spent Mushroom Substrate*)**

O cultivo de cogumelos é um processo biotecnológico para a reciclagem de resíduos orgânicos. Cogumelos possuem a capacidade de degradar uma variedade de substratos lignocelulósicos e podem ser cultivados em materiais naturais oriundos da agricultura, indústria têxtil, pecuária a indústria manufatureira (SANCHEZ, 2010).

O aporte energético para as reações químicas e estruturais das células fúngicas durante o cultivo em estado sólido (CES) ocorre a partir de fontes de carbono e nitrogênio de tais substratos. Os macrofungos secretam durante o CES uma série de enzimas lignocelulolíticas, que por sua vez desconstroem as macroestruturas (celulose, hemicelulose, lignina, proteína e lipídeos), liberando monômeros ou frações que o fungo possa metabolizar.

O nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas e outras substâncias nitrogenadas e quando dosado corretamente pode aumentar o rendimento da produção de cogumelos, porém, em altas dosagens pode ocorrer o efeito contrário (CHANG e MILES, 2004), ou seja, podendo ocorrer a miceliação sobre o substrato, porém sem frutificação de cogumelos. A faixa ideal de pH para o crescimento e desenvolvimento fúngico varia de 4,0 a 7,0. A temperatura de colonização influencia o metabolismo das células dos organismos vivos, afetando a atividade enzimática. A faixa de temperatura favorável a etapa de frutificação do cogumelo varia de 10 a 28°C, a depender da espécie (ROYSE & SANCHEZ-VAZQUEZ, 2001). O teor de umidade

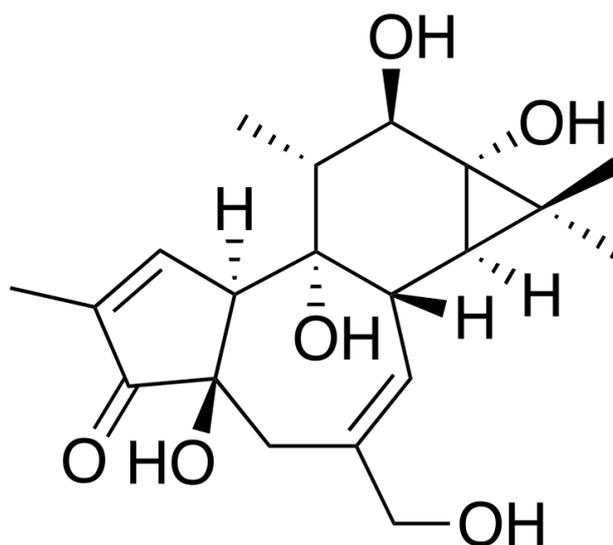
é responsável por afetar a disponibilidade de nutrientes. A umidade relativa do ambiente ideal é de 90% e a umidade ideal do substrato é de 50 a 75%. Substratos com umidades abaixo do recomendado interferem no desenvolvimento do fungo, ao passo que teores elevados de umidade afetam negativamente na disponibilidade de oxigênio, além de favorecer o desenvolvimento de contaminantes (CHANG & MILES, 2004).

A relação C/N é essencial para o sucesso da colonização (colonizado) e frutificação (cogumelos), assim os substratos são preparados com porções maiores de material lignocelulósico e menores de proteína, variando para cada espécie. Os substratos mais utilizados em formulações são: serragem de madeira (eucalipto ou pinus), palha de arroz, bagaço de cana, cacho vazio de dendê, palha de trigo, feno (forrageiras), esterco de galinha, sabugos de milho, farelo de algodão, farelo de trigo, cascas de cacau, e outros resíduos agrícolas (JORDAN, MULLEN e MURPHY, 2008). No Brasil o substrato mais utilizado é a serragem de eucalipto, devido sua alta disponibilidade e baixo custo (SILVEIRA RUEGGER, TORNISIELO, et al., 2001).

O pinhão-manso (*Jatropha curcas*) é uma espécie oleaginosa ainda não domesticada originária das Américas Central. O óleo da semente vem sendo estudado nas últimas décadas no Brasil como potencial produtor de biodiesel (Mendonça, et al., 2019). Esta espécie possui potenciais para uso no biodiesel devido sua alta capacidade produtiva, sua adaptabilidade em áreas não aptas a cultivos alimentares, forte resistência a variações do solo e do clima, fácil cultivo e alta produtividade do óleo (LAVIOLA e DIAS, 2008; ARRUDA, BELTRÃO, et al., 2004).

A torta de pinhão-manso (resíduo após a prensagem do óleo) possui alto teor de proteína, sua composição já foi comparada com a de soja e demonstrou ter bom balanceamento de aminoácidos essenciais, tornando sua utilização como alimentação animal uma alternativa (MAKKAR, ADERIBIGBE e BECKER, 1998). Entretanto, a presença de ésteres de diterpenos do grupo tigiano denominadas ésteres de forbol inviabilizam a utilização da torta de pinhão-manso como alimentação animal (EVANS, 1986; DA LUZ, PAES, et al., 2013). A ingestão de ésteres de forbol em animais já demonstrou causar desidratação, hemorragia retal, nefrotoxicidade, hemorragia pulmonar, ascite, aumento na concentração de uréia e redução na concentração de albumina e proteína total, além de provocar anemia e leucopenia, dentre outros sintomas (ABDELGADIR, ONSA, et al., 2003).

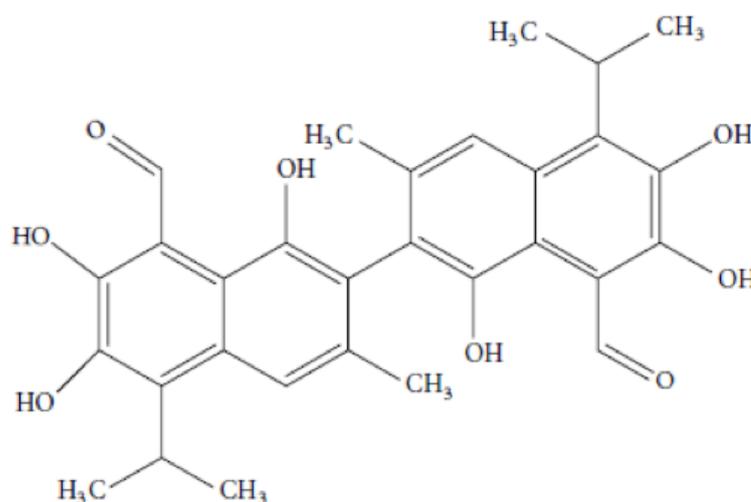
O mecanismo de ação dos ésteres de forbol (Figura 8) está ligada a duas rotas, uma relacionada à inflamação que é a ativação da rota do ácido araquidônico e síntese de prostaglandinas e a outra na mimetização estrutural do diacilglicerol, um ativador da proteína quinase C, que regula uma série de vias metabólicas intracelulares ligadas a ao crescimento e replicação celular (GOEL, MAKKAR, et al., 2007). Por isso os ésteres de forbol são fatores pró-carcinogênicos, além de serem capazes de ativar o ciclo lítico do vírus Epstein-Barr (herpes) quando está em latência (HIROTA, SUTTAJIT, *et al.*, 1988; MACNEIL, SUMBA, *et al.*, 2003). Além dos ésteres de forbol, a presença de ácido fítico, inibidor de tripsina e lectinas também são fatores antinutricionais. O ácido fítico reduz a absorção de proteínas e minerais no trato gastrointestinal dos animais.



**Figura 8.** Estrutura química do éster de forbol ( $C_{20}H_{28}O_6$ ).

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) é bastante cultivado no Brasil, nas regiões centro-oeste e nordeste do Brasil. O caroço de algodão é muito utilizado pelas indústrias para a produção de óleos. O subproduto gerado pela produção de algodão, a torta do caroço de algodão, possui mais de 20% no teor de proteína, podendo ser potencialmente utilizada como alimentação animal (KWAK, JUNG e KIM, 2008). A torta de caroço de algodão possui elevado teor de lipídeos e a presença de gossipol, um pigmento polifenólico antinutricional e tóxico. O gossipol além de ter demonstrado ser hepatotóxico, provocar alteração no transporte de oxigênio sanguíneo, além de

estar relacionado com baixa fertilidade e morte súbita em diferentes espécies animais (MANABE, NUBER e LIN, 1991; ZHANG, XU, *et al.*, 2007; GU, LIN e RIKIHISA, 1990; HOLMBERG, WEAVER, *et al.*, 1988). Apesar das possíveis vantagens econômicas e nutricionais da utilização dos subprodutos do caroço do algodão na alimentação animal, ainda não foram estabelecidos no Brasil os níveis máximos de gossipol permitidos para seu uso seguro. A Diretriz 2002/32 da União Europeia determinou que a maior concentração de gossipol para torta de caroço de algodão como aditivo na nutrição animal é de 20 ppm para frangos e leitões, 60 ppm para porcos, 100 ppm para aves e bezerras e 500 ppm para gado, ovelhas e cabras. Devido tais níveis, foi determinado então que as tortas de caroço de algodão precisam ser processadas/tratadas para promover uma redução nos níveis de gossipol para a utilização da torta na alimentação animal (CONCEICAO, *et al.*, 2018).



**Figura 9.** Estrutura química do gossipol ( $C_{30}H_{30}O_8$ ).

Pesquisas recentes (CUNHA, 2017; GOMES, 2015; SANTANA, 2016) mostraram que a utilização de tortas de semente de algodão ou pinhão-mansinho como meio de cultivo de macrofungos do gênero *Pleurotus* spp. (Shiimeji) levaram à diminuição da toxicidade em 80% a 100%, a depender da espécie. Além disso, esses macrofungos produzem enzimas extracelular que atuam na degradação das tortas e podem reduzir os fatores nutricionais como o ácido fítico, através da fitase que catalisa a hidrólise do ácido fítico, liberando assim o fosfato que é um nutriente aproveitado pelos animais (DA LUZ, PAES, *et al.*, 2013).

A produção de cogumelos gera uma significativa quantidade de material residual. Para cada kg de cogumelos produzidos, são gerados 5-6 kg de resíduo (MA, et al., 2014). O subproduto pós-cultivo de cogumelos, obtido após uma ou algumas colheitas, é denominado SMS (do inglês, *Spent Mushroom Substrate*) e algumas das estratégias de descarte do SMS, por exemplo, incluem incineração, espalhamento em terra, compostagem com esterco animal ou aterramento, e devido à grande quantidade de resíduo gerada pelo cultivo de cogumelos, isso poderia gerar problemas ambientais (PHAN e SABARATNAM, 2012).

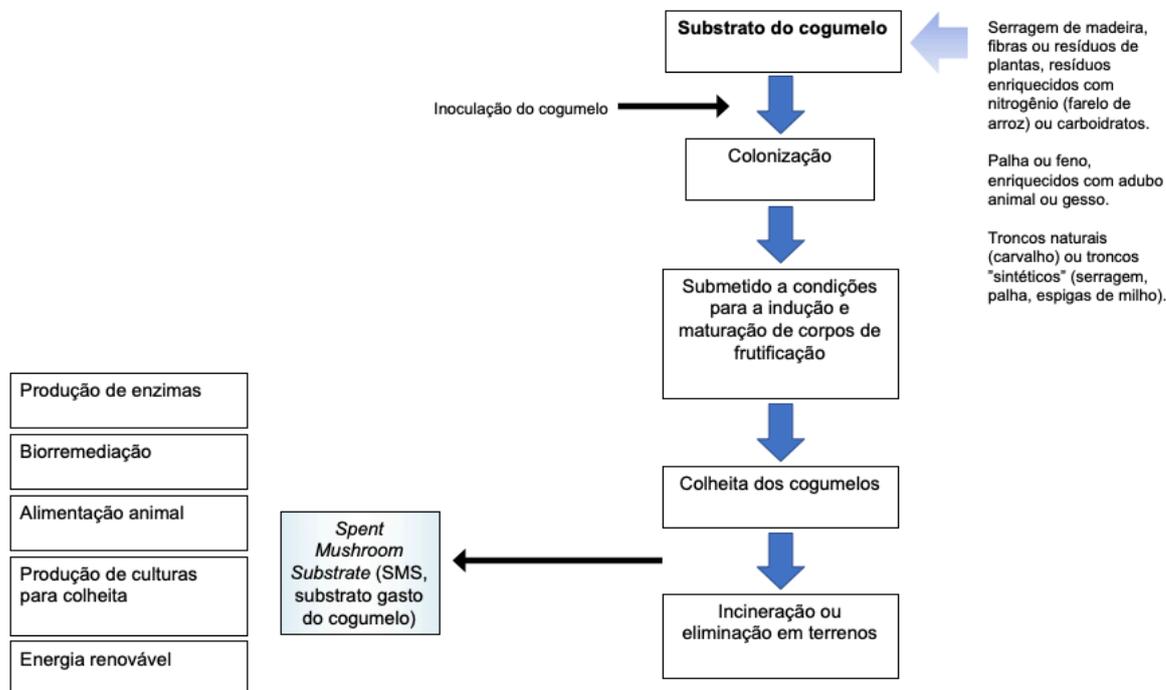
Por outro lado, o SMS ainda contém de 5% a 10% de micélio, além de possuir uma série de enzimas hidrolíticas e oxidativas que são sintetizadas durante a degradação do material lignocelulósico, como celulasas,  $\beta$ -glicosidases, xilanasas, lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases, além de incorporar novos componentes como polissacarídeos, vitaminas e alguns oligoelementos como Fe, Ca, Zn e Mg (QINNGHE, XIAOYU, et al., 2003; PALMIERI, GIARDINA, et al., 2000).

O colonizado (substrato vegetal miceliado) e o SMS (biomassa vegetal miceliada após a colheita dos cogumelos) podem ser considerados produtos de um processo de pré-tratamento biológico junto aos substratos lignocelulósicos, uma vez que os fungos descontrolam e consomem parte das estruturas vegetais, mudando de forma significativa a arquitetura e estruturas de tais substratos. Nos fermentados e SMS podem ocorrer o aumento da concentração de proteína bruta, em função da conversão de biomassa vegetal em biomassa microbiana. Os basidiomicetos não são capazes de fixar nitrogênio, este aumento ocorre devido a uma redução da lignina e na celulose e no teor de lipídeos, induzindo a um aumento proporcional no teor de proteína. Como ocorre a degradação da lignina e celulose e um aumento no teor de proteína bruta, este substrato torna-se mais facilmente digerível por animais (NAYAN, SONNENBERG, et al., 2018).

Devido à presença dessas enzimas lignocelulolíticas presentes no subproduto pós-cultivo, o SMS pode ser utilizado na bioremediação de poluentes, além de ser fonte de isolamento destas enzimas do SMS por recuperação enzimática (PHAN e SABARATNAM, 2012; EGGEN e SASEK, 2002). Outros aproveitamentos do SMS estão demonstrados na Figura 10.

Devido a presença de substâncias e metabólitos bioativos, com diversas propriedades medicinais, SMS tem se tornado alvo para a produção de extratos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, além de poder ser

utilizado como aditivo na alimentação animal (HE, LI, *et al.*, 2016; RIVERO-PEREZ, AYALA-MARTINEZ, *et al.*, 2016; ZHU, SHENG, *et al.*, 2012).



**Figura 10.** Ciclo de produção de cogumelos e utilizações do SMS

Adaptado de PHAN e SABARATNAM, 2012.

### 3. Propriedades funcionais de cogumelos comestíveis

Cogumelos têm sido utilizados há centenas de anos, em diferentes países, como alimento e aditivo medicinal (DU, ZHU e XU, 2018). Como cogumelos adaptam e desenvolvem seu metabolismo num habitat para sobreviver e competir com outros organismos, existem uma série de metabólitos secundários produzidos no seu ciclo de vida que possuem funções antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias (ZJAWIONY, 2004; SHEN, SHAO, *et al.*, 2017).

Os cogumelos são ricos em compostos bioativos como fibras, lectinas, polissacarídeos, compostos fenólicos e polifenólicos, terpenoides, e compostos orgânicos voláteis, além de micro e macronutrientes como minerais, proteínas, vitaminas, aminoácidos, dentre outros (EL ENSHASY e HATTIKAUL, 2013; KALAČ, 2013). Portanto, cogumelos são uma fonte biológica de compostos ativos com potencial medicinal, como por exemplo das  $\beta$ -glucanas (DU, LIN, *et al.*, 2015).

### 3.1. Atividade antioxidante

Radicais livres podem ser caracterizados como moléculas ou fragmentos moleculares que possuem um ou mais elétrons não emparelhados nos orbitais moleculares. Os radicais livres derivados do oxigênio são conhecidos como ERO (espécies reativas de oxigênio) e representam a principal classe de espécies radicais geradas por organismos vivos. As ERO incluem não apenas os radicais livres como também moléculas como peróxido de hidrogênio, singlete de oxigênio e ozônio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A superprodução de ERO resulta no stress oxidativo. Altas concentrações de ERO podem causar danos na estrutura celular, nos ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. A membrana lipídica mitocondrial é facilmente atacada por ERO, resultando na peroxidação lipídica. O dano no DNA induzido por ERO envolve quebras na cadeia do DNA, modificações na purina, pirimidina e desoxirribose e no cross-link. Radicais hidroxil podem causar lesão no DNA pela formação de 8-OH-G, um potencial marcador de carcinogênese. Além disso, ERO são capazes de oxidar cadeias laterais de todos os aminoácidos. Uma série de doenças estão relacionadas à produção não controlada de radicais livres. Aterosclerose, doenças cardiovasculares, câncer, cirrose, diabetes, doenças pulmonares, doenças neurológicas (doença de Alzheimer, doenças de Creutzfeldt-Jacob, meningoencefalite), doença de Parkinson, dentre outras mais de 100 (FERREIRA, BARROS e ABREU, 2009; KHATUA, PAUL e ACHARYA, 2013).

Os principais compostos presentes em cogumelos ou micélios que possuem atividades antioxidantes são os compostos fenólicos, tocoferóis, vitamina E e polissacarídeos.

Os compostos fenólicos são compostos aromáticos hidroxilados que possuem anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila. Os polifenóis podem agir como antioxidantes por reagirem como doadores de elétrons, estabilizando reações de quebra de cadeias. Os principais compostos fenólicos encontrados em cogumelos são o ácido gálico, ácido cafeico, quercetina, rutina e vanilina. Os flavonoides, grupo de compostos fenólicos conhecidos por possuírem atividade antioxidante, são produzidos por poucas espécies de cogumelos (APAK, 2007; RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997; BARROS, BAPTISTA e FERREIRA, 2007).

Os tocorenóis e tocotrienóis são compostos biológicos essenciais presentes na membrana. Existem quatro isômeros dos tocoferóis e tocotrienóis ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -), sendo

$\alpha$ -tocoferol o que possui a maior atividade antioxidante de todos os tocoferóis. Seus mecanismos consistem em quelar fisicamente o singlete de oxigênio (KAGAN, 1989; KAMAL-ELDIN e APPELQVIST, 1996).

A vitamina E é um antioxidante de quebra de cadeia oxidativa. Durante a peroxidação lipídica são formados radicais peroxil a partir dos ácidos graxos poliinsaturados na membrana fosfolipídica. A vitamina E doa um átomo de oxigênio aos radicais peroxil, formando um hidroperóxido e um radical tocoferoxil, que são mais estáveis (LAMPI, 1999).

Na última década, os polissacarídeos obtidos a partir dos cogumelos ou micélios (colonizados) ganharam destaque devido seu amplo espectro de propriedades terapêuticas incluindo imunestimulação, atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antifúngicas e antioxidantes. Os principais polissacarídeos com atividades terapêuticas são as  $\beta$ -glucanas. Seu mecanismo de ação, que já foi demonstrado em modelos animais, demonstra que as glucanas e glicoproteínas de origem fúngica protegem os macrófagos de danos causados pelo acúmulo de lipoperóxidos, principalmente ativando a transcrição de genes relacionados ao sistema antioxidante dos macrófagos (SLAMEŇOVÁ, LÁBAJ, *et al.*, 2003; YUAN, MEI, *et al.*, 1996).

### **3.2. Atividade antimicrobiana**

Como citado previamente, das 2000 espécies de cogumelos conhecidas no mundo, aproximadamente 25% são consideradas seguras para o consumo humano. O total de 148 destas espécies conhecidas possuem efeito antimicrobiano conhecido, de 88 gêneros diferentes (BALAKUMAR, SIVAPRAKASAM, *et al.*, 2011).

Os compostos oriundos de cogumelos com atividades antibacterianas podem ser metabólitos intra ou extracelulares. Extratos obtidos a partir de culturas líquidas e a partir de basidiomas (cogumelos) podem ter diferentes atividades antibacterianas. Normalmente, os extratos a partir dos basidiomas possuem maiores atividades antibacterianas que os extratos miceliais. As propriedades antibacterianas também podem variar conforme a maturação dos basidiomas, a depender da espécie. Além disso, as atividades antimicrobianas dos cogumelos indicam que a maioria das espécies possui atividade contra bactérias gram-positivas, enquanto menos espécies apresentam atividade contra gram-negativas (SHEN, SHAO, *et al.*, 2017; GERASIMENYA, EFREMENKOVA, *et al.*, 2002; YAMAC e BILGILI, 2006).

Os metabólitos presentes em cogumelos responsáveis por atividade antimicrobiana são os compostos fenólicos, as  $\beta$ -glucanas, os terpenoides, sesquiterpenoides e triterpenoides, esteróis, ácidos graxos, proteínas e enzimas (SHEN, SHAO, et al., 2017). Como são compostos de polaridades diferentes, a extração é um ponto crucial na identificação de extratos de cogumelos com potencial atividade antimicrobiana. A escolha do solvente usado para a extração determina não apenas os compostos específicos que serão extraídos, mas também pode interferir na qualidade, quantidade e segurança do extrato.

Os principais solventes utilizados na extração de compostos antimicrobianos em cogumelos são água e metanol (ou etanol) (YAMAC e BILGILI, 2006; VENTURINI, RIVERA, et al., 2008). A água é capaz de extrair os compostos de maior polaridade, como compostos fenólicos de baixo peso molecular, sacarídeos e polissacarídeos. A temperatura da água é um fator importante, pois aumenta a eficiência da extração, mas também pode resultar na degradação de compostos sensíveis a temperaturas altas. Entretanto, a extração de  $\beta$ -glucanas, uma das moléculas alvo deste trabalho, só é possível com altas temperaturas. Em um estudo prévio, extratos de água quente (fervidos durante 4 h) de *Russula vesca* e *Pleurotus squarrosulus* apresentaram maiores atividades antibacterianas do que os extratos das mesmas espécies em água morna (temperatura ambiente, 28°C durante 26 h) (NWACHUKWU e UZOETO, 2010).

O metanol também é um solvente comumente utilizado para a extração dos compostos fenólicos presentes em cogumelos. Em um estudo que avaliou as propriedades antimicrobianas de extratos metanólicos de *Lycoperdon perlatum*, *Clavaria vermicularis*, *Marasmius oreades* e *Pleurotus pulmonarius*, os compostos fenólicos foram indicados como influências diretas nessa atividade (RAMESH e PATTAR, 2010). Outro estudo demonstrou que a porção fenólica e/ou de flavonoides dos extratos metanólicos de *Lactarius deliciosus*, *Sarcodon imbricatus* e *Tricholoma portentosum* foram positivamente associadas com a atividade antimicrobiana (BARROS, CALHELHA, et al., 2007). A temperatura também pode interferir na eficiência da extração dos compostos fenólicos, entretanto, a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos em temperatura ambiente já mostraram ser maior do que se realizada a altas temperaturas (JAGADISH, KRISHNAN, et al., 2009).

### 3.3. Atividade prebiótica

Prebióticos são definidos como “alimentos não-digestíveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou um número limitado de espécies bacterianas que vivem no cólon e consequentemente melhoram a saúde” (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Além disso, os prebióticos inibem o crescimento de microrganismos patogênicos endógenos do trato gastrointestinal aumentando a capacidade do sistema imunológico de resistir a patógenos exógenos (DE SOUSA, DOS SANTOS e SGARBIERI, 2011). Os principais constituintes dos prebióticos são os oligossacarídeos e polissacarídeos.

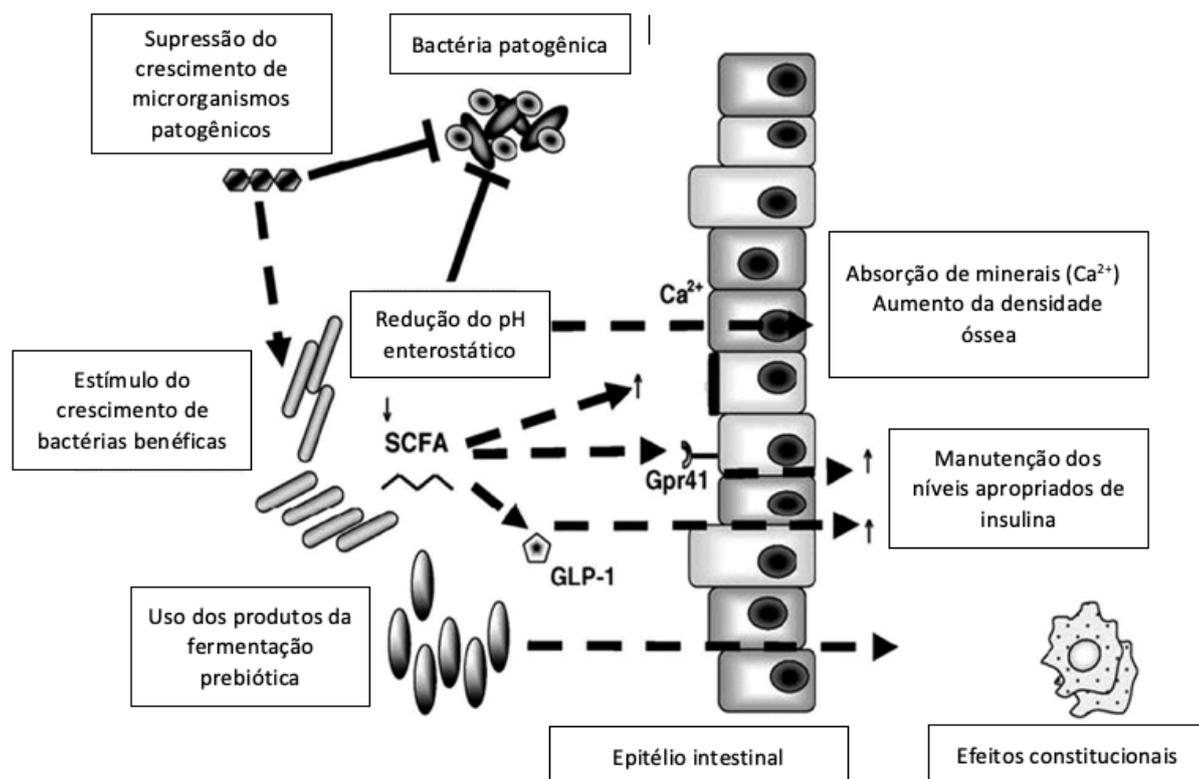
Os estudos recentes do ramo da ciência e tecnologia alimentar tem focado na associação de prebióticos para modular a microbiota intestinal dos seres humanos e atenuar uma série de condições como diabetes, obesidade e câncer (JAYACHANDRAN, XIAO e XU, 2017).

Na alimentação animal, o uso de prebióticos é uma alternativa para o uso de antibióticos como moduladores da microbiota intestinal. Antibióticos são amplamente utilizados na alimentação animal e já foi comprovado que seu uso a longo prazo induz à resistência microbiana, sendo então uma ameaça à saúde dos consumidores e ao meio ambiente (OMS, 2017). Desde 2006, a União Europeia banuiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal. Entretanto, em vários países do mundo, incluindo o Brasil, o uso de antimicrobianos ainda é permitido, mesmo após as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017).

Dentre os compostos bioativos presentes em cogumelos e micélios, os polissacarídeos são os que se destacam na atividade prebiótica. Os principais polissacarídeos encontrados nos cogumelos são quitina,  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucanas. Um atributo necessário dessas moléculas é sua resistência à digestão do trato gastrointestinal superior, chegando ao cólon sem serem digeridas. Uma vez no cólon, as bactérias probióticas, como lactobacilos e bifidobactérias, são capazes de fermentar seletivamente os prebióticos (GIBSON, PROBERT, et al., 2004).

A fermentação das bactérias benéficas leva a um aumento da expressão de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA, do inglês *short-chain fatty acids*), sendo indicado por uma redução amena do pH do lúmen do cólon, aumento do bolo fecal, uma redução de produtos com nitrogênio terminal e enzimas redutivas, um aumento na expressão de proteínas de ligação ou carreadores associados com a absorção

mineral e a modulação do sistema imune, além da supressão de microrganismos patogênicos (Figura 11). (DOUGLAS e SANDERS, 2008).



**Figura 11.** Mecanismo de ação dos prebióticos.

SCFA: ácidos graxos de cadeia curta; GLP-1: peptídeo semelhante a glucagon-1; Gpr41: receptor acoplado à proteína G sensível ao metabolismo microbiano. Adaptado de LIŻEWSKA, KAPUŚNIAK, *et al.*, 2012.

Considerando a variedade de moléculas bioativas e atividades antioxidante, antimicrobiana e prebiótica presentes em basidiomicetos, além da capacidade de biodestoxificação de ésteres de forbol e gossipol, o estudo do cultivo em estado sólido de basidiomicetos em tortas oleaginosas tóxicas com vista à formulação de aditivos para a alimentação animal pode ser uma alternativa para o mau uso de antibióticos na alimentação animal.

### III. OBJETIVOS

#### 1. Geral

- Avaliar a biodestoxificação das tortas de sementes oleaginosas tóxicas utilizando macrofungos, e simultaneamente enriquecê-las de substâncias bioativas e nutritivas provenientes do metabolismo dos macrofungos, com vista à obtenção de aditivos e bioprodutos para nutrição animal.

#### 2. Específicos

- Selecionar dentre sete macrofungos, cultivados em meio sólido contendo torta de pinhão-manso ou torta de caroço de algodão, os que melhor crescem, degradam compostos tóxicos (ésteres de forbol e gossipol), e destacam-se pela atividade antioxidante, teor fenólicos totais, ergosterol, proteína bruta e atividade de proteases;
- Avaliar qual a melhor combinação de torta de pinhão-manso ou torta de caroço de algodão, com outras biomassas lignocelulósicas (torta de macaúba ou casca de coco) que favoreçam o crescimento dos macrofungos, a destoxificação, a atividade antioxidante e a produção de moléculas bioativas;
- Avaliar a capacidade do tratamento selecionado na degradação de compostos tóxicos e alterações na composição centesimal (redução do teor de fibra e aumento no teor de proteína) presentes nos substratos;
- Determinar os ganhos em  $\beta$ -glucanas e alterações na composição (redução do teor de fibra e aumento no teor de proteína) nos substratos pós-cultivo;
- Determinar a atividade antioxidante, atividade prebiótica e antimicrobiana dos extratos dos substratos pós-cultivo selecionados.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Origem dos resíduos agroindustriais lignocelulósicos

O Pinhão-manso: as sementes de pinhão-manso foram fornecidas pela área experimental da Embrapa Agroenergia / Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina-DF. A torta foi produzida por meio da extração de óleo em prensa *Scott Tech* após secagem dos grãos em secadora rotativa a 100 °C por 30 minutos. A torta de caroço de algodão: fornecida pela empresa Farmotec, localizada em Burity – MG.

As biomassas lignocelulósicas (resíduos agroindustriais), pobres em proteína, que comporam as formulações juntamente com tortas descritas acima, foram: a casca de coco verde (obtida no CEASA – DF), triturada em triturador de facas para cocos (TRC 40, TRAPP, Jaraguá do Sul – SC, Brasil) e secas a 60°C durante 72 h; e torta de macaúba (teor de proteína em torno de 8%). Os frutos de macaúba foram fornecidos por empresa Acrotech/Soleá, localizada em João Pinheiro-MG. O despulpamento foi realizado em equipamento desenvolvido especificamente para macaúba localizado na Embrapa Agroenergia, a extração do óleo da polpa foi realizada em prensa *Scott Tech* helicoidal e a secagem foi feita a 60°C durante 72 h.

### 2. Manutenção e conservação dos macrofungos

Os macrofungos utilizados neste trabalho fazem parte da Coleção de Microrganismos e Microalgas aplicados a biorrefinaria da Embrapa Agronegia, Brasília, Distrito Federal. As linhagens de macrofungos pertencentes à coleção da Embrapa Agroenergia foram: *Agaricus subrufescens* (CC414), *Schizophyllum commune* (FPB117), *Lentinula edodes* (FPB128), *Pleurotus pulmonarius* (EF88), *Fistulina hepatica* (CC102), *Panus lecomtei* (CC40), *Ganoderma lucidum* (CC351).

Para a manutenção do inóculo, as linhagens foram mantidas em meio ágar batata a 4 °C e transferidas para novas placas a 28 °C para recuperação do vigor micelial.

### 3. Teor de umidade das biomassas

Para preparar os meios de cultivo, foi determinado o teor de umidade das biomassas. Em cadinhos de porcelanas previamente tarados (estufa a 105°C/2 h), foram pesados 1g de cada biomassa e secos em estufa a 60°C por 24 h e posteriormente em estufa a 105°C por 24 h. Após resfriamento, foi realizada a pesagem e determinada a umidade de acordo com a perda de peso calculada. Os

resultados foram expressos em porcentagem e as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4. Triagem dos macrofungos**

##### **Crescimento em placas**

Foram preparados os meios de cultivo com 10% meio, sendo de 5% de biomassa proteica (torta de pinhão-manso ou torta de caroço de algodão) e 5% de biomassa lignocelulósica (torta de macaúba ou casca de coco verde), 2% de ágar em água destilada e autoclavados a (121°C) por 1 h. As combinações de meio foram: torta de pinhão-manso e torta de polpa de macaúba; torta de pinhão-manso e casca de coco; torta de caroço de algodão e torta de polpa de macaúba; torta de caroço de algodão e casca de coco. Os meios foram vertidos em placas de 90 mm em Capela de Fluxo Laminar (Airstream® Class II Biological Safety Cabinets, AC2-4E3, Esco Global, Singapura). Os fungos foram inoculados a partir de placas em meio Batata Ágar Dextrose (BDA). Para cada um dos 7 macrofungos foi transferido um disco de 8 mm de diâmetro e posicionado no centro de cada placa contendo uma das diferentes composições de meio. Cada fungo foi cultivado em triplicata em cada meio. O controle foi o cultivo dos fungos em placas em meio BDA (Sigma-Aldrich), esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Todas as condições foram preparadas em triplicatas biológicas. As placas foram incubadas em estufa incubadora com circulação de ar forçado de bancada (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., São Paulo, Brasil) a 28°C por 15 dias.

Foram tiradas fotos de cada placa a cada 3 dias e as imagens foram analisadas pelo software ImageJ (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Os resultados foram obtidos em  $\text{cm}^2/\text{dia}$ .

##### **4.2. Velocidade de crescimento em frascos (cultivo em estado sólido)**

O cultivo em meio sólido foi realizado utilizando 30 g de biomassa em frascos de vidro, lacrados com tampa com uma abertura com fita microporosa. As misturas das biomassas lignocelulósicas foram preparadas na proporção de 1:1, em relação às biomassas proteicas. O teor de umidade do meio foi ajustado em 65% e foi autoclavado (121°C) por 1 h. Os meios foram inoculados em Capela de Fluxo Laminar (Airstream® Class II Biological Safety Cabinets, AC2-4E3, Esco Global, Singapura)

utilizando-se quatro discos de 8 mm de diâmetro de cada fungo em cada meio. Foram preparadas triplicatas biológicas de cada fungo, além de terem sido preparados também frascos contendo apenas as biomassas, sem inóculo, que representaram os controles das biomassas. Os frascos foram incubados em estufa incubadora de bancada (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., São Paulo, Brasil) a 28°C por 15 dias. Durante o período de incubação, a cada 3 dias, os frascos de vidro foram demarcados com caneta permanente para se medir o crescimento dos fungos. Os resultados obtidos acerca da velocidade de crescimento foram expressos em cm/dia.

Ao final do tempo de incubação, aproximadamente 1g dos cultivos foram retirados para a produção de extrato enzimático descrito no item 4.7., o restante dos cultivos e dos controles foi seco em estufa a 40°C durante 48 h e triturado em moinho manual (Basic Analytical Mill, IKA®, Staufen, Alemanha), para realização das análises de quantificação de compostos tóxicos, ergosterol, atividade antioxidante, fenois totais e teor de proteína bruta.

#### **4.3. Quantificação de ésteres de forbol - torta de semente de pinhão-manso**

Este método foi adaptado a partir pelo método descrito por MAKKAR, BECKER, *et al.*, 1997. Os ésteres de forbol foram extraídos sob banho de gelo com metanol e com auxílio de banho ultrassônico. Foram pesados em tubo Falcon (50 mL), 3 g dos cultivos e do controle secos e triturados e adicionados 15 mL de metanol. O conteúdo foi triturado com bastão de teflon e ultrassonicado por 3 minutos em banho de gelo. Os tubos foram centrifugados a 4000 g por 8 minutos e o sobrenadante foi transferido para balão de fundo redondo de 10 mL. O procedimento de extração foi realizado 3x. O metanol foi evaporado em rotavapor (Rotavapor R210/215, Büchi Labortechnik, Flawil, Suíça). Foram então adicionados 2,5 mL de metanol e ultrassonicados por 3 minutos e transferidos para balão volumétrico de 5 mL. O procedimento foi repetido mais uma vez e o volume do balão foi completado com metanol. Foram transferidos 1,2 mL do extrato metanólico para microtubo Eppendorf de 1,5 mL e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos a 8°C. Aproximadamente 1 mL do sobrenadante foi transferido para vial de 2mL e injetado no sistema cromatográfico líquido de ultra eficiência (Acquity UPLC H-Class System, Waters, Massachusetts, EUA) com detector de PDA em coluna de fase reversa Waters, modelo Acquity UPLC HSS-T3 (150 x 2,1 mm x 1,8 µm), com pré-coluna modelo VanGuard HSS-T3 (5 x 2,1 mm x

1,8  $\mu\text{m}$ ), mantidas a 45°C. Foi empregado um gradiente de eluição e o detector para aquisição 2D foi ajustado em 280 nm e 3D na faixa de 210 a 400 nm.

Para a quantificação dos ésteres de forbol, foi feita curva de calibração com uma solução estoque (10 mg/mL) de PMA (12-O-tetradecanoiforbol-13-acetato) (CAS nº 16561-29-8, Sigma-Aldrich) e injetando os volumes de 0,2, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0  $\mu\text{L}$ , correspondendo à 0,1, 0,25, 0,75, 1,0 e 1,5  $\mu\text{g}$  de PMA.

#### **4.4. Quantificação de gossipol - torta de caroço de algodão**

A extração e quantificação foi realizada conforme método descrito por CONCEICAO, NETO, *et al.*, 2018. Para a extração do gossipol, foi-se pesado aproximadamente 1g das biomassas secas (cultivos e controles) em tubo Falcon de 15mL. Foi adicionado 3mL de água Mili-Q, agitado o tubo e ultrassonicado por 5 minutos sob banho de gelo. Depois, foi adicionado 7 mL de acetona, agitado novamente e ultrassonicado novamente por 5 minutos sob banho de gelo. Foi então centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos a 8°C e aproximadamente 1 mL do sobrenadante foi transferido para vials de 2 mL para ser injetado no sistema de cromatografia líquido de ultra eficiência (Acquity UPLC H-Class System, Waters, Massachusetts, EUA) com detector de PDA em coluna de fase reversa Kinetex (100 x 2,1 mm x 2,6  $\mu\text{m}$ ), com pré-coluna mantidas a 35°C. O detector PDA para aquisição 2D foi ajustado em 254nm, e o 3D na faixa de 210 a 400 nm. Foi empregado um gradiente de eluição e o tempo total da corrida foi de 14 minutos.

Para a quantificação foi realizada curva de calibração a partir de solução estoque (5 mg/mL) de padrão de gossipol (CAS nº 303-45-7, Sigma-Aldrich) com clorofórmio. Foram injetadas as concentrações do padrão de 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.5. Atividade Antioxidante**

##### **4.5.1. Obtenção dos extratos**

O extrato etanólico 80% foi obtido de acordo com KWAK, MIN, *et al.*, 2015 e FARASATA, KHAVARI-NEJADA, *et al.*, 2014 com modificações. Foi-se pesado 1 g de cada amostra em tubo cônico e adicionado 20 mL da solução alcoólica. Os tubos foram colocados em banho ultrassônico (USC480A, Unique, SP, BRA) por 20 minutos, agitados em shaker (Benchtop Shaking Incubator, 222-DS, LabNet International, Inc) por 10 minutos e centrifugados (Centrífuga, Universal 230, Hettich Lab Technology,

TUT, Alemanha) por 10 minutos a 2000 g. O sobrenadante foi recolhido e armazenado sobre abrigo de luz. Essa extração foi realizada em triplicata. A solução extraída foi filtrada em papel filtro Whatman no. 41, posteriormente excesso de solvente foi retirado por rotaevaporador à vácuo (Rotavapor R210/215, Büchi Labortechnik, Flawil, Suíça) com temperatura do banho de 40°C. O resíduo foi liofilizado (Liofilizador Modelo K120, Liotop, São Carlos, SP, BRA) e as soluções de extratos foram armazenadas com concentração de 1 mg/ml a -20°C sob proteção de luz.

#### **4.5.2. Atividade Antioxidante por atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)**

Para esta análise, os extratos foram solubilizados em metanol, na concentração de 5 mg/mL.

Este ensaio foi realizado em microplaca, conforme metodologia de PIRES e AL., 2017, com modificações. A curva de calibração foi feita com 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox/Sigma-Aldrich) 0,5 mg/mL, nas concentrações de 80, 160, 240, 320, 400 e 480 µg/mL. A reação foi realizada com solução de DPPH (Sigma-Aldrich) a 150 µmol/L. Foram pipetados 22 µL de amostra em cada poço, e adicionados 200 µL da solução de DPPH. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectramax 190, Califórnia, EUA) a 520 nm de comprimento de onda.

#### **4.5.3. Atividade Antioxidante por atividade sequestrante do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS<sup>+</sup>)**

Para esta análise, os extratos foram solubilizados em metanol na concentração de 5 mg/mL.

Este ensaio foi realizado conforme metodologias de SILVA, SOUZA, *et al.*, 2007 e HORSZWALD e ANDLAUER, 2011, com modificações. A curva de calibração foi feita com 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox / Sigma-Aldrich) a 0,5 mg/mL nas concentrações: 20, 100, 170, 250, 320, 400, 470, 550 e 600 µg/mL. Para o preparo da solução do radical ABTS<sup>+</sup>, foi preparada uma solução de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS / Sigma-Aldrich) 7 mmol/L. A solução foi mantida em frasco âmbar em geladeira. A solução foi estocada em frasco âmbar, em temperatura ambiente. Para o preparo do radical ABTS<sup>+</sup>, 5 mL da solução

estoque de ABTS 7 mmol/L foram transferidos para tubo cônico (coberto com papel alumínio) e 88  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio (140 mmol/L) foram adicionados. A solução foi preparada e mantida em ambiente escuro, em temperatura ambiente, por 16 h. Em seguida, 1 mL dessa mistura foi diluída em metanol até obter-se uma absorbância de aproximadamente 0,70 a 724 nm de comprimento de onda. Esta solução foi usada apenas no dia da análise.

A análise foi realizada em microplaca de 96 poços, em triplicata. Foram pipetados 10  $\mu\text{L}$  de amostra em cada poço, e adicionados 290  $\mu\text{L}$  de radical ABTS<sup>•+</sup>. A reação foi feita a 30°C, no escuro, durante 6 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectramax 190, Califórnia, EUA) a 734 nm de comprimento de onda.

#### **4.6. Fenóis Totais**

Este ensaio foi realizado conforme metodologia de (Waterhouse, 2002). Os extratos foram solubilizados em etanol 80% numa concentração de 3 mg/mL. A curva de calibração com Ácido Gálico (Sigma-Aldrich) 0,5 mg/mL foi feita em triplicata, com os pontos com as concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300  $\mu\text{L}$ . Em tubos de ensaio foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de amostra, em seguida 7 mL de água destilada e 500  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu (FC) (Sigma-Aldrich). Os tubos foram agitados em vórtex e incubados de 1 a 8 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% (m/v) o volume para 10 mL com água destilada (900  $\mu\text{L}$ ). Os tubos foram então agitados e incubados por 2 horas sob abrigo de luz. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Agilent, Cary 60, Califórnia, EUA) em cubetas no comprimento de onda de 765 nm.

#### **4.7. Quantificação do Ergosterol**

Esta metodologia foi adaptada de STEUDLER e BLEY, 2015. Aproximadamente 400mg de colonizado seco e triturado foram pesados em tubo cônico e adicionados 2g de KOH (Synth). Posteriormente foram adicionados 10 mL de metanol e 5 mL de etanol. A saponificação foi realizada em banho-maria a 70°C durante 30 minutos. As amostras foram então resfriadas em temperatura ambiente, por aproximadamente 15 minutos. Foram adicionados 5 mL de água destilada e 10 mL de hexano. As amostras foram ultrassonicadas (USC480A, Unique, SP, BRA) durante 1 minuto e o

sobrenadante foi coletado. A extração foi realizada novamente mais duas vezes, adicionando-se 5 mL de hexano por vez, totalizando 20 mL de hexano. O *pool* de extratos foi filtrado para tubo de vidro com sulfato de sódio anidro em funil com lã de vidro. Este procedimento foi realizado em sala escura, pois apesar de ser termoestável é fotossensível.

O *pool* de extratos foi evaporado em rotaevaporador multivapor (Multivapor Büchi, Flawil, Suíça), com a temperatura de banho-maria a 40°C. O extrato foi então ressuscendido em 2 mL de metanol, e ultrassonicado por 1 minuto. 1 mL da mistura foi transferido para tubo Eppendorf de 2 mL e centrifugado durante 5 minutos a 8000 g. O sobrenadante foi transferido para vial âmbar e armazenado em ultrafreezer até o momento da injeção em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (Acquity UPLC H-Class System, Waters, Massachusetts, EUA) com detector de PDA em coluna Kinetex 2,6 µm C18.

Para a quantificação, foi realizada curva de calibração com um padrão de ergosterol (CAS nº 57-87-4, Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,9; 1,8; 2,8; 3,7; 4,6; 9,2; 46,0; 92,0; 367,3 µg/mL. Os resultados finais foram expressos em µg/g após dividir o resultado pelo volume de metanol no qual *pool* de extratos foi ressuscendido, e em seguida dividindo-se o valor pela massa pesada de colonizado seco para a extração (aproximadamente 400mg).

#### **4.8. Proteína Bruta**

Para a análise de teor de nitrogênio, as amostras foram secas previamente em estufa a 105°C durante 24 h. Em seguida, foram pesados entre 2-3 mg de biomassa em ultramicrobalança (AD 6000 Ultramicrobalance, PerkinElmer, Massachusetts, EUA) e calculado com analisador elementar (2400 CHNS/O Series II, PerkinElmer, Massachusetts, EUA). O teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator geral de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25 e o teor de proteína expresso em g/100g de biomassa.

#### **4.9. Atividade de proteases**

Os extratos enzimáticos foram obtidos por meio da pesagem de aproximadamente 2g de colonizado úmido e adicionados 10 mL de água destilada gelada (proporção de 1:5). Os Erlenmeyers foram agitados em shaker com refrigeração (MaxQ 500, Thermo

Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 5°C durante 40 minutos a 180 rpm. Os extratos foram filtrados com gaze e transferidos para tubo Falcon de 15 mL e mantidos em geladeira (4°C) até o momento das análises.

Este ensaio foi realizado utilizando azocaseína como substrato, conforme metodologia de (SHIMOGAKI, et al., 1991) com modificações. Foi preparada uma solução de Azocaseína (Sigma-Aldrich) 0,5% com pH=5. O preparo da amostra, do branco da amostra e do branco do substrato foi realizado em microplaca de PCR de 96 poços. Para o preparo da amostra, foram adicionados 100 µL do extrato enzimático e 100 µL da solução de 0,5% de azocaseína. Depois, as amostras foram incubadas em termociclador (Veriti Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) durante 40 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de TCA (ácido tricloroacético) a 10%. Para o preparo do branco da amostra, foram adicionados 100 µL do extrato enzimático, 100 µL de azocaseína 0,5% e 100 µL de solução de TCA 10%. Posteriormente a placa foi incubada em termociclador durante 40 minutos a 37°C. Para o preparo do branco do substrato, foram adicionados 100 µL de azocaseína 0,5%, 100 µL de tampão acetato de sódio. Posteriormente foi incubado em termociclador durante 40 minutos a 37°C. Ao final, foram adicionados 100 µL de solução de TCA a 10%.

Após estes procedimentos, todas as amostras foram centrifugadas (Megafuge 40R, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) durante 15 minutos a 1000 g. O volume de 150 µL do sobrenadante foi recolhido e transferido para microplaca de Elisa de 96 poços, e 150 µL de solução de KOH a 0,5 mol/L foram adicionados. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectramax 190, Califórnia, EUA) a 430 nm.

O resultado foi obtido conforme equação seguir:

$$U/mL = \frac{\left(\frac{A}{0,001}\right) \times (V.total)}{T.incub \times V.amostra \times V.ens.color.}$$

No qual, A = diferença entre leitura da amostra e do branco da amostra; Volume total = 300 µL; tempo de incubação = 40 minutos; volume da amostra = 100 µL; volume do ensaio colorimétrico = 150 µL.

## 5. Cultivo de cogumelos: colonizados, cogumelos e SMS

A seleção dos macrofungos para cultivo de cogumelos em formulações de substratos a base TSPM e TCA levou-se em consideração: velocidade de crescimento nos meios de cultivo em placas de petri e frascos de vidros, capacidade de degradação dos componentes tóxicos (ésteres de forbol e gossipol), concentração de ergosterol, atividade antioxidante em DPPH e ABTS, fenóis totais, teor de proteína bruta, atividade de proteases. Em caso de empate foi levado em consideração se o macrofungo é utilizado na fungicultira para produção de cogumelos comerciais. A velocidade de crescimento foi um fator eliminatório para a triagem. O segundo fator a ser considerado foi a capacidade de degradação dos componentes tóxicos.

Após a seleção de uma espécie de macrofungo para cada base proteica (torta de pinhão-manso e torta de caroço de algodão), na etapa de triagem, foram realizados os ensaios de cultivo completo em duas fases (colonização e frutificação) destes cogumelos em substratos composto pela torta proteica e material lignocelulósico escolhido, nas proporções 20%, 50% e 80%. Para o cultivo dos cogumelos nas biomassas selecionadas, foram preparadas inicialmente os inóculos (*spawn*) de cada fungo.

Os inóculos foram preparados com aproximadamente 5 kg de trigo foi deixado de molho em água por 24 h, após esse período o trigo foi coado e deixado em estufa em circulação de ar a 60°C por cerca de 6 h para se retirar o excesso de água. Em frascos de vidro, foi pesado aproximadamente 300 g de trigo úmido e autoclavado a 121°C por 2 h. Após 24 h foi autoclavado a 121°C por 1 h novamente. Após o resfriamento dos frascos, em capela de fluxo laminar, foi inoculado o equivalente a uma placa de 90 mm de micélio em BDA em cada frasco. Os fracos foram mantidos em incubadora a 28°C até o crescimento total do frasco, entre 20 – 30 dias, a depender da espécie.

Para o preparo de cada tratamento com as diferentes proporções de biomassas para a colonização com as sementes (*spawn*), foi-se pesado 5kg de cada mistura e adicionado em betoneira para completa mistura. Foi adicionado o equivalente a 1% de cal, com a finalidade de ajustar o pH, e a umidade foi ajustada em aproximadamente 50%. Uma alíquota de cada condição foi retirada para calcular o teor de umidade. 500 g de cada mistura foi acondicionada em sacos de polipropileno resistentes a autoclavagem. Todos os sacos foram autoclavados no mesmo dia, durante 2 h a 121°C, resfriados e após 24 h autoclavados novamente a

121°C por 1 h. Após o resfriamento, em capela de fluxo laminar, foi inoculado com o auxílio de um béquer estéril, aproximadamente 30 g de semente em cada saco. Os sacos foram mantidos em ambiente sem controle de temperatura até a colonização total dos sacos (aproximadamente 30 dias). Amostras dos colonizados (sacos) - substratos totalmente colonizados pelos macrofungos - foram separados em dois grupos, onde (i) fermentados – retirados e armazenados para ensaios; e, (ii) cultivo dos cogumelos – por meio da abertura dos sacos para frutificação (cogumelos). A frutificação (ii) foi feita em ambiente sem controle de temperatura, com umidade acima de 80% e circulação de ar (não filtrado), com ciclo de 12 h de iluminação artificial. Os substratos-tratamentos que foram capazes de frutificar, apresentaram cogumelos aproximadamente após 15 dias, repetindo o fluxo pelo menos mais uma vez (nos próximos 15 dias). Os cogumelos gerados em tais substratos-tratamentos foram colhidos e armazenados para ensaios bioquímicos. A biomassa pós-colheita dos cogumelos – aqui denominada por SMS – também foi armazenadas para os ensaios.

As amostras foram secas em estufa a 40°C por 48 h e trituradas em moinho manual (Basic Analytical Mill, IKA®, Staufen, Alemanha) para todas as análises, exceto a composição centesimal. No caso de ter sido selecionado o tratamento após a primeira fase de crescimento, a amostra foi chamada de colonizado. Caso tenha sido selecionado o tratamento após os dois ciclos de tratamento, a amostra foi chamada de SMS.

## **6. Análise química**

### **6.1. Análise centesimal**

#### **6.1.1. Teor de matéria seca, teor de umidade e teor de cinzas**

A determinação do teor de matéria seca é feita a partir de um método gravimétrico baseado na evaporação da água presente na amostra pela ação do calor.

Inicialmente, pesou-se cadinhos de porcelanas previamente secos em estufa a 105°C por no mínimo 2 h e anotando os valores dos cadinhos vazios. Depois, pesa-se aproximadamente 1 g da amostra úmida em cada cadinho. Os cadinhos com as amostras foram então secos em estufa a 105°C durante 24 h. Depois de resfriados em dessecador até temperatura ambiente, foram pesados novamente e o resultado é obtido pela diferença entre a massa final dos cadinhos com a amostra após a secagem, menos o peso do cadinho, dividido pela massa da amostra. Multiplicou-se

o resultado por 100 e, obtendo-se a porcentagem de matéria seca. Para a obtenção do teor de umidade, subtraiu-se 100 do valor de matéria seca.

Para a obtenção do teor de cinzas foi utilizada as amostras obtidas pós-secagem à 105°C durante 24 h. As amostras nos cadinhos foram calcinadas em mufla usando uma programação de rampa de aquecimento, conforme descrito:

- Elevar a temperatura a 105 °C e mantê-la por 15 minutos;
- Elevar para 300 °C a 10°C/min;
- Manter a 300°C por 60 minutos;
- Elevar para 600°C a 5°C/min;
- Manter a 600°C por 240 minutos (4 horas);
- Permitir que a temperatura desça para 105°C;
- Manter a 105°C até que as amostras sejam retiradas.

Após este período, os cadinhos foram resfriados em dessecador até atingirem temperatura ambiente, pesados e seus pesos anotados. O teor de cinzas é calculado conforme equação a seguir:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{(\text{Cadinho}_{\text{cinzas}} - \text{Cadinho}_{\text{inicial}}) \times 100}{\text{Massa}_{\text{amostra}}}$$

Os resultados foram expressos em base seca ( $X_{bs}$ ), tendo como base de correção o valor de matéria seca, determinado previamente. Foi multiplicado o resultado por 100 e dividido pelo resultado de matéria seca.

### 6.1.2. Teor de extrato etéreo

Foi utilizado o método para determinar o teor de gordura bruta por extração com solvente em extrator de óleo ANKOM (ANKOM XT15 Extractor, ANKOM Technology, Macedon, EUA), descrito método oficial AOCS AM 5-04 (AOCS, 1998).

Em saquinhos quimicamente inertes e resistentes a calor (XT4 Filter Bags, ANKOM Technology, Macedon, EUA), pesou-se aproximadamente 1g da amostra e anotou-se o peso (M1). Cada saquinho foi fechado em seladora (Sealing Filter Bags #1915, ANKOM Technology, Macedon, EUA). Os saquinhos foram colocados em estufa a 105°C por 3 h, após esse período as amostras secas foram resfriadas em saco dessecador com sílica até atingir temperatura ambiente e anotar o peso das amostras (M2). Então, as amostras foram inseridas no extrator de óleo. O solvente utilizado foi éter de petróleo, o tempo de extração foi de 60 minutos e a temperatura

de 90°C. Após o término da extração, os saquinhos foram postos em estufa a 105°C por 30 minutos, para a evaporação do solvente residual. As amostras foram resfriadas em saco dessecador até temperatura ambiente, foram pesadas e anotadas o peso das amostras (M3). O teor de extrato etéreo é calculado conforme equação a seguir:

$$\% \text{ de Extrato Etéreo} = \frac{(M2 - M3) \times 100}{M1}$$

### **6.1.3. Fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e lignina em detergente ácido**

A partir do método proposto por VAN SOEST, 1963, a determinação das fibras em detergente neutro (FDN), ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) propicia determinar a celulose (CEL), hemicelulose (HEM), celulose (CEL).

Por meio de uma digestão em detergente neutro, o conteúdo celular (compostos solúveis em detergente neutro) constituído, principalmente de proteínas, gorduras, carboidratos solúveis, pectina e outros constituintes solúveis em água, é separado da parede celular (compostos insolúveis em detergente neutro). Essa fração, insolúvel em detergente neutro (FDN), é constituída, basicamente, de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada. Esta fração é extraída a quente, com solução de detergente ácido, restando principalmente a lignina insolúvel, a celulose, o nitrogênio lignificado e a sílica, que constituem a fibra em detergente ácido (FDA). As extrações de FDN e FDA foram realizadas em analisador de fibras ANKON (ANKOM 200 Fiber Analyzer, ANKOM Technology, Macedon, EUA). O tratamento do resíduo de fibra em detergente ácido com solução de ácido sulfúrico 72% resulta na hidrólise e solubilização da celulose e lignina solúvel, tendo como resíduo a lignina e cinzas insolúveis em ácido. A lignina é posteriormente foi determinada por meio da calcinação da amostra, tendo como resíduo as cinzas insolúveis. O valor de hemicelulose (HEM) foi calculado subtraindo-se FDA-FDN, e de celulose (CEL) subtraindo-se Lignina – FDA (NOGUEIRA, 2005) (ANKOM TECHNOLOGY, 2006) (ANKOM TECHNOLOGY, 2006).

### **6.2. Compostos tóxicos, ergosterol, proteína bruta e atividade de proteases**

A quantificação de ésteres de forbol em colonizados em torta de semente de pinhão-manso e de gossipol em colonizados em torta de caroço de algodão foi

realizada conforme descrito anteriormente, nos itens 4.3 e 4.4. Assim como a quantificação do teor de ergosterol (item 4.7), proteína bruta (item 4.8) e a atividade de proteases (item 4.9).

## **7. Teor de $\beta$ -glucanas, atividade antioxidante, antimicrobiana e prebiótica**

### **7.1. Extração dos colonizados e SMS**

Foram realizadas duas extrações distintas dos colonizados e SMS's, a fim de se extrair compostos de diferentes polaridades. A extração metanólica, com finalidade de extrair compostos apolares e a extração aquosa (em água quente), a fim de se extrair compostos polares.

A extração metanólica foi realizada pesando-se 10 g de biomassa previamente seca e moída e adicionado 200 mL de metanol em Erlenmeyer (LIU, ZHAO, et al., 2008). A extração foi realizada protegida de luz, em shaker a 180 rpm durante 24 h. Os extratos foram filtrados em papel Whatman #41 e o excesso de solvente foi evaporado em rotaevaporador, com a temperatura do banho de 40°C. Os extratos foram transferidos para tubo Falcon de 15 mL e o resíduo final de metanol foi concentrado em CentriVap (Centrivap, Labconco, Kansas City, MO, EUA) a 40°C, sob pressão reduzida por 24 h. Após, os extratos foram congelados em freezer -80°C, e posteriormente liofilizados. Os extratos foram armazenados em freezer -20°C, protegido de luz até o momento das análises. Estes extratos foram utilizados tanto para a atividade antioxidante, antimicrobiana e atividade prebiótica.

A extração aquosa foi realizada conforme metodologia descrita por PALANISAMY, ALDARS-GARCÍA, *et al.*, (2014), em Extrator de Solvente Acelerado (Dionex Corporation, ASE 350, Sunyvale, CA) na condição ótima de 200°C, 5 ciclos de 5 minutos e 150% de *rinse* volume. Os extratos foram transferidos para tubo Falcon de 50 mL, congelados a -80°C e liofilizados. Os extratos foram armazenados em freezer a -20°C até o momento das análises. Estes extratos foram utilizados para atividade antimicrobiana, atividade prebiótica e dosagem do teor de  $\beta$ -glucanas.

### **7.2. Atividade antioxidante e fenólicos totais**

As atividades antioxidantes em DPPH e ABTS, e o teor de fenólicos totais foram realizadas conforme descrito nas sessões 4.5 e 4.6.

### 7.2.1. FRAP

O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP) consiste na redução do íon  $\text{Fe}^{3+}$  encontrado no complexo 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ) resultando em íons de  $\text{Fe}^{2+}$ . No momento em que a redução acontece, a tonalidade do complexo TPTZ se altera, mudando de azul claro para intenso. Em adição, quanto maior a absorbância, maior será o potencial antioxidante.

Este método foi adaptado a partir do método de (BENZIE e STRAIN, 1996) visando reduzir a quantidade de solventes utilizados. A curva é preparada a partir de uma solução de Trolox nas concentrações de 400, 200, 100, 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$  reagindo com o FRAP. O tempo de incubação da reação foi de 30 minutos e a leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 496 nm.

### 7.3. $\beta$ -glucanas

O método utilizado para quantificar as  $\beta$ -glucanas foi o método de McCleary (MCCLEARY e CODD, 1991) que se baseia na hidrólise enzimática e quantificação dos açúcares livres liberados. A determinação foi realizada conforme instruções do Beta-Glucan Assay Kit (Megazyme, Bray, County Wicklow, Irlanda), quantificando-se as glucanas totais e as  $\alpha$ -glucanas, com adaptações para realização de análises em microplacas. O resultado de  $\beta$ -glucanas se dá pela diferença entre as glucanas totais e as  $\alpha$ -glucanas. As análises foram realizadas nos extratos aquosos em duplicata.

### 7.4. Atividade prebiótica

#### 7.4.1. Microrganismos probióticos selecionados

Foram selecionados os microrganismos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis*. Os microrganismos foram doados pela Farmacotécnica (Brasília – DF), mantidos em glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  e reativados em meio de cultivo anaeróbio em caldo Lactobacilli MRS (MRS Broth, Acumedia, Lansing, MI, USA), com adição de 0,05% de L-cisteína, como agente redutor de oxigênio.

#### 7.4.2 Teste de atividade prebiótica

Os microrganismos foram cultivados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h em caldo MRS, com agitação e transferidos para ágar MRS com glicose (com adição de 0,05% cisteína).

Após 24 h, aproximadamente 3 colônias foram transferidas para 3 mL de solução salina a 0,085% e este inóculo foi ajustado para o nível 0,5 da escala de McFarland, equivalente a  $10^8$  UFC/mL.

Em tubo Eppendorf, foram transferidos 1 mL de caldo MRS isento de glicose (MRS(-C)), 1 mL de extrato (a 20 mg/mL, previamente filtrados em filtro hidrofílico 0,22  $\mu$ M) e 5  $\mu$ L de inóculo, totalizando  $10^6$  UFC/mL por tubo. Após agitação, foram transferidos 200  $\mu$ L de cada cultura para um poço em placa de 96 poços, em triplicata. A placa foi selada com membrana (PCR-TS, Axygen, Corning INC, NY, EUA), incubada a 37°C e mantida em agitação a 180 rpm. Foram realizadas leituras a cada hora, nas primeiras 12 h, e em seguida foram realizadas leituras a cada 3 h. Nos pontos 12 h, 24 h e 48 h foram retiradas alíquotas das culturas para realização de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por diluição, assim como a contagem do inóculo inicial. Como controle negativo, foi usada H<sub>2</sub>O estéril em caldo MRS(-C). Como controles positivos foram utilizados glicose (Sigma-Aldrich), FOS (frutooligossacarídeos, com 90% de pureza) (Newnutrition, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e inulina de chicória (FiberBem, Holanda) comerciais, este último é composto de 92% de inulina e 8% de (glicose, frutose e sacarose).

Além das leituras de densidade óptica, foram calculadas as UFC/mL das culturas por diluição, nos tempos 12 h, 24 h e 48 h.

Após as leituras, as culturas foram centrifugadas a 8000 g durante 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados para serem realizadas posteriormente ensaios de atividade antimicrobiana (metodologia descrita no item 7.5) dos extratos que apresentaram maiores atividades prebióticas (SAWANGWAN, WANSANIT, et al., 2018).

## **7.5. Atividade antimicrobiana**

### **7.5.1. Microrganismos patogênicos selecionados**

Os microrganismos enteropatogênicos selecionados foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 27154, cepa produtora de enterotoxina). Os microrganismos foram armazenados em glicerol a -20°C e semeados em Ágar Mueller Hinton (MHA, Acumedia, Neogen, Lansing, MI, USA) e posteriormente submetidos aos ensaios.

### 7.3.2. Teste de difusão de disco

Para a realização da atividade antimicrobiana, os extratos metanólicos foram suspensos em DMSO 20% em água destilada na concentração padrão de 100 mg/mL. Os extratos aquosos foram solubilizados em água destilada estéril. Foram feitas diluições nas concentrações 10 mg/mL, 1 mg/mL e 0,1 mg/mL. Para os sobrenadantes das culturas com os probióticos não foi realizada nenhuma diluição.

Para o teste de difusão de disco, 20 µL de cada diluição e da solução padrão foram impregnados em discos de papel filtro de 6,0 mm de diâmetro, previamente esterilizados. Portanto, a quantidade de extrato em cada disco foi respectivamente de: 2000 µg/disco; 200 µg/disco; 20 µg/disco e 2 µg/disco. A secagem dos discos foi feita em placa petri de 90 mm esterilizada, em capela de fluxo laminar durante 2 h. Discos contendo DMSO 20% foram utilizados como controle negativo para os extratos metanólicos, discos com água foram utilizados como controle negativo para os extratos aquosos e discos de amoxicilina (10 µg) (Laborclin, Interlab, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados como controle positivo.

Para a padronização do inóculo bacteriano, as bactérias foram reativadas em caldo Mueller Hinton (MHB – Mueller Hinton Broth) durante 24 h a 35°C e transferidas posteriormente para placas contendo MHA, incubando-se novamente por 24 h a 35°C. Em seguida, foi feita uma suspensão de colônias transferindo entre 3 a 4 colônias em 4 mL de solução salina 0,85% estéril, seguida da padronização em espectrofotômetro a 600 nm até alcançar a turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland, correspondendo aproximadamente a  $10^8$  UFC/mL. Essa suspensão foi diluída em 1:100 para atingir a concentração desejada de  $10^6$  UFC/mL. A suspensão foi transferida para placas de MHA por *swab* e os discos previamente secos foram depositados nas placas. As placas foram então incubadas a 32°C durante 24 h. Decorrido o tempo de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos. Este ensaio foi realizado em triplicada.

### 7.3.3. Teste de microdiluição de caldo

O método de microdiluição de caldo procedeu-se conforme metodologia descrita nos documentos M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, M100-S15 e M100-S17 (NCCLS, 2003), em que cada orifício da placa de 96 poços recebeu 90 µL de MHB (Mueller Hinton Broth), 20 µL dos extratos ou suas diluições e

10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana testada a aproximadamente  $10^6$  UFC/mL. Este ensaio foi realizado apenas nos extratos que apresentaram halos de inibição maiores que 10 mm no antibiograma.

As diluições dos extratos foram feitas a partir de soluções de extrato a 10 mg/mL e 1 mg/mL, de modos que foram testadas as diluições nas concentrações de 8, 16, 32, 64, 128, 250, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Para controle positivo foi feita uma solução de ampicilina a 512  $\mu\text{g/mL}$ , pesando-se 5120  $\mu\text{g}$  de ampicilina (Sigma-Aldrich), o qual foi homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato pH 8 (0,1 mol/L), e em seguida diluído com 9 mL do diluente tampão fosfato pH 6 (0,1 mol/L), conforme documento M100-17 (CLSI, 2007). DMSO 20% foi usado como controle negativo. Além disso, foram incluídos controles de esterilidade (120  $\mu\text{L}$  de MHB) e de crescimento (110  $\mu\text{L}$  de MHB e 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana).

As placas foram incubadas a 35°C durante 24 h. Cumprido o tempo de incubação, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% e após 4 h de reincubação, foi realizada a leitura visualmente. A presença ou ausência de crescimento microbiano foi revelada por meio da técnica de coloração com resazurina, sendo a coloração azul indicativo de resposta positiva de atividade antimicrobiana, pois indica a ausência de células viáveis. A resposta negativa de atividade antimicrobiana foi observada por meio da coloração rosa, que indica a presença de células viáveis. Desta forma, conforme ALVES, VINHOLIS e CASEMIRO, 2008, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração de extrato de colonizado ou de SMS capaz de inibir o crescimento de microrganismos no caldo. Cada teste foi realizado em triplicata.

## **9. Análise estatística**

Como todos os ensaios foram realizados em triplicata, as médias foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Willk, e as médias apresentaram distribuição normal. No caso de comparação entre duas médias, foi realizado o teste t, e para comparação entre mais de duas médias foi realizada análise de variância (ANOVA). Em caso de  $p < 0,05$ , os dados foram submetidos a pós-teste de Tukey. As análises de estatística foram realizadas com software Rstudio (R CORE TEAM, 2018) e os gráficos foram realizados com o software GraphPrism 7 (GraphPad Software, La Jolla, California, EUA).

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Triagem dos Macrofungos

#### 1.1. Velocidade de crescimento

##### 1.1.1. Em torta de pinhão-manso e misturas

As velocidades de crescimento dos fungos em estudo foram avaliadas conforme descrito na metodologia e nesta avaliação a espécie *P. lecomtei* (CC40) teve seu crescimento micelial capaz de recobrir toda a área da placa em menos tempo, 6 dias, em agar-TSPM (Figura 12A). Em 9 dias, seu crescimento foi completo em todos os meios, incluindo o controle (BDA).

O fungo *G. lucidum* (CC351) em BDA também foi capaz de ter seu crescimento micelial total na placa em 6 dias, entretanto nos meios de agar-TSPM, agar-TSPM + CCV (torta de semente de pinhão-manso + casca de coco verde 1:1) e agar-TSPM + TM (torta de semente de pinhão-manso + torta de macaúba 1:1) seu crescimento total foi em 9 dias.

O *S. commune* (FPB117) teve seu crescimento em BDA mais lento do que nos outros meios. No nono houve crescimento total em agar-TSPM + CCV, porém nos outros meios não houve diferença estatística entre si. Seu crescimento em BDA permaneceu menor em todos os tempos.

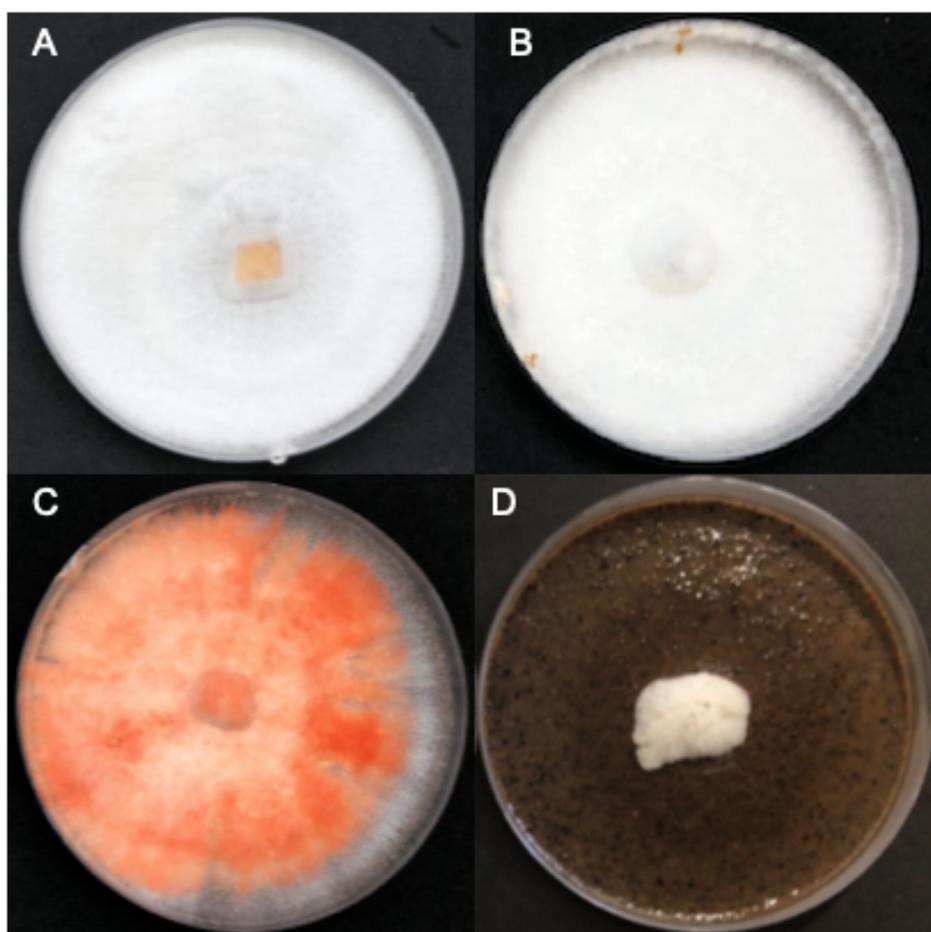
O crescimento do *P. pulmonarius* (EF88) teve comportamento semelhante do *S. commune* (FPB117). Este fungo apresentou maior afinidade para crescimento nos meios contendo TSPM e suas misturas, em relação ao meio de BDA. O crescimento total da área da placa foi observado no dia 12 (Figura 12B). No dia 15 todos os meios, incluindo o de BDA estavam com seu crescimento total.

O crescimento do *F. hepatica* (CC102) demonstrou ser mais rápido em TSPM com misturas do que em agar-TSPM puro e em BDA. Em agar-TSPM + CCV o crescimento total foi no dia 9 (Figura 12C), em agar-TSPM foi no dia 12, em agar-TSPM + TM foi no dia 15, e em BDA não houve crescimento total na placa até o último dia de avaliação.

O crescimento de *L. edodes* (FPB128) demonstrou ser lento em todos os meios, comparado com o crescimento dos fungos descritos anteriormente. Com exceção do dia 3, em que o crescimento em BDA havia sido maior, nos outros dias não houve

diferença de crescimento entre os diferentes meios, e em nenhum meio houve crescimento micelial total na placa.

O crescimento do *A. subrufescens* (CC414) também foi lento, comparando-se com os outros fungos, e até 15 dias não houve seu crescimento total na placa em nenhuma condição. A partir do dia 9 em agar-TSPM + TM o crescimento foi maior que nos outros meios, seguido em BDA e agar-TSPM + CCV. Até o último dia o meio com maior crescimento foi em agar-TSPM + TM. Não houve crescimento total na placa em nenhum dia observado (Figura 12D).

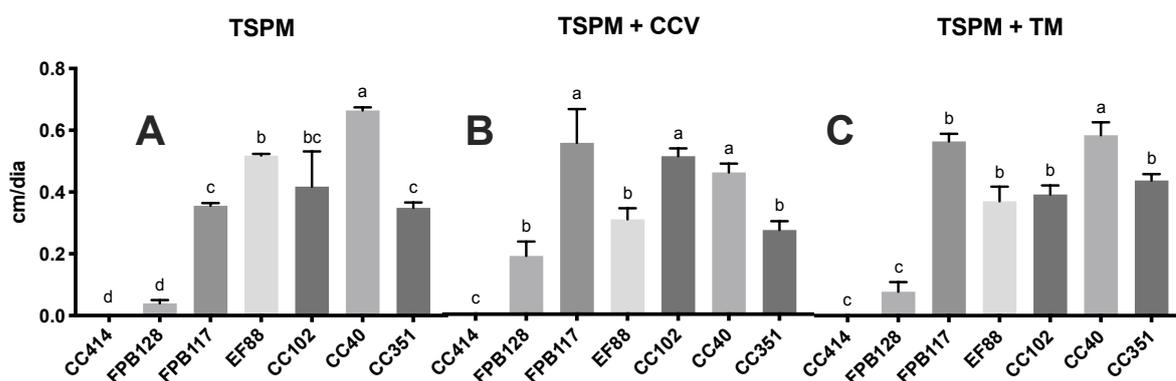


**Figura 12.** Crescimento micelial em placas de petri de *P. lecomtei* (CC40) em agar-TSPM a 6 dias (A). Crescimento de *S. commune* (FPB117) em agar-TSPM a 12 dias (B). *F. hepatica* (CC102) em agar-TSPM + CCV a 9 dias (B). CC414 em agar-TSPM + TM a 15 dias (D).

No cultivo em estado sólido, os resultados sobre o crescimento foram semelhantes (Figura 13). *A. subrufescens* (CC414) e *L. edodes* (FPB128) tiveram as menores velocidades de crescimento em todas as misturas, sendo os únicos a não

alcançarem o crescimento total do frasco. *A. subrufescens* (CC414) não apresentou crescimento em nenhuma condição, e *L. edodes* (FPB128) teve a menor velocidade de crescimento nas condições, e não teve seu crescimento completo no frasco. *P. lecomtei* (CC40) foi a espécie que apresentou a maior velocidade. Em TSPM + CCV (Figura 13B), *L. edodes* (FPB128), *P. pulmonarius* (EF88) e *G. lucidum* (CC351) tiveram as menores velocidades de crescimento. Em TSPM + TM (Figura 13C) e *P. lecomtei* (CC40) apresentou a maior velocidade de crescimento.

Comparando-se os meios entre o mesmo fungo, *S. commune* (FPB117) teve crescimento mais lento em TSPM (Figura 13A); *P. pulmonarius* (EF88) teve crescimento mais rápido em TSPM; *F. hepatica* (CC102) não diferiu a velocidade de crescimento entre as misturas; *P. lecomtei* (CC40) teve crescimento mais lento em TSPM + CCV; e *G. lucidum* (CC351) teve crescimento mais rápido em TSPM + TM, seguido de TSPM.



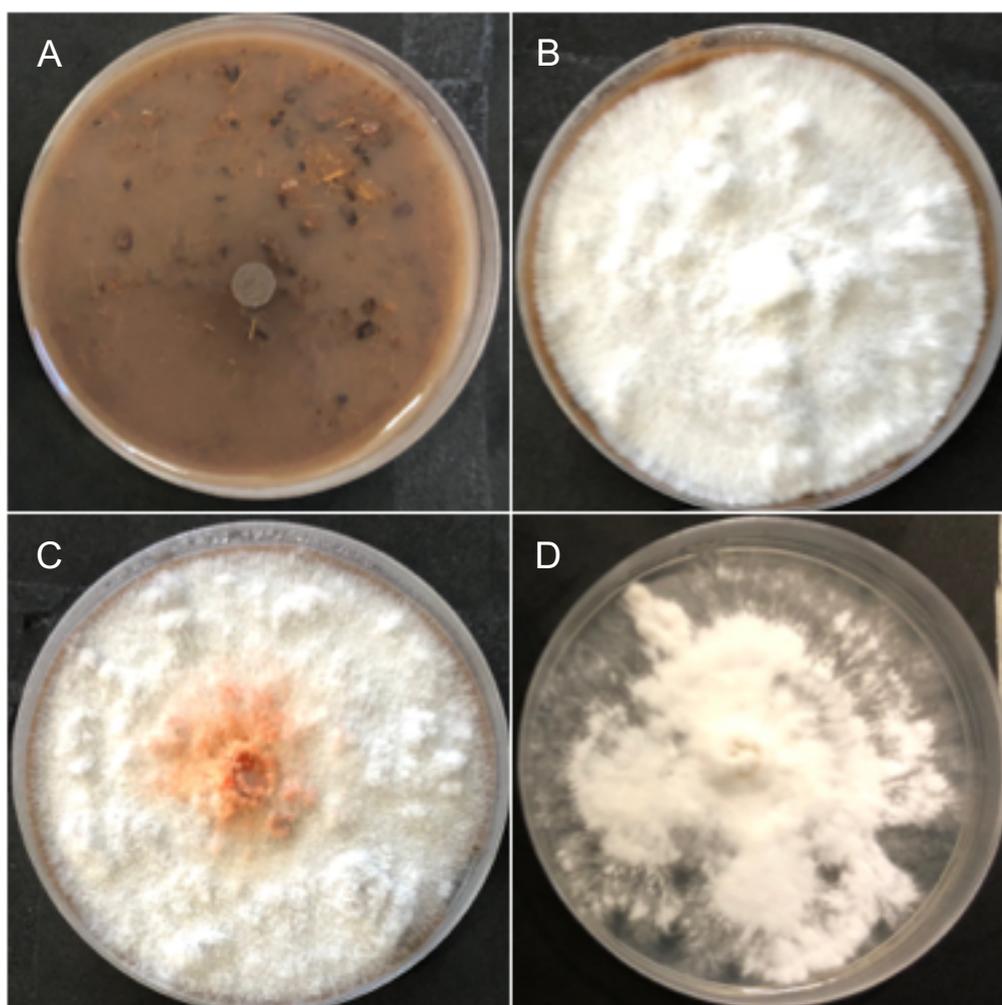
**Figura 13.** Velocidade de crescimento fúngico (cm/dia) do cultivo em estado sólido em de CC414, FPB128, FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de pinhão-manso (100%), torta de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). TSPM: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; CC414: *A. subrufescens*; FPB128: *L. edodes*; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

### 1.1.2. Em torta de caroço de algodão e misturas

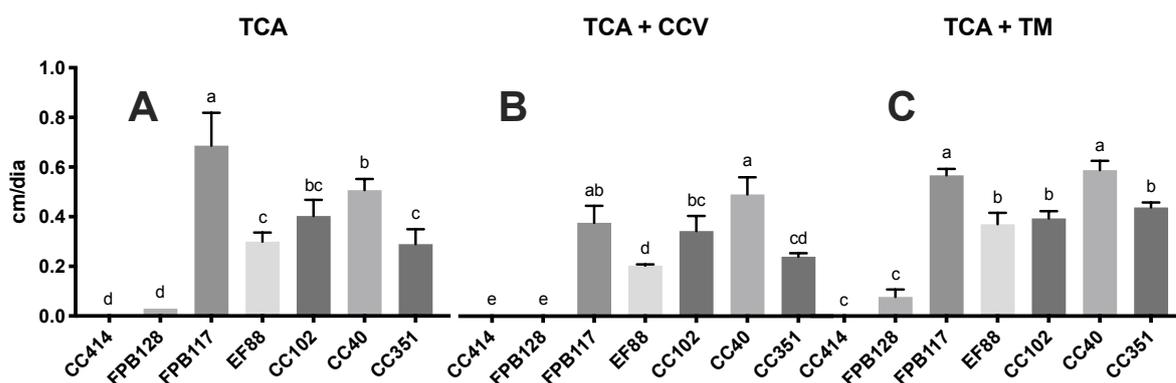
Assim como ocorrido em torta de semente de pinhão-manso, *L. edodes* (FPB128) obteve os crescimentos miceliais mais lentos nas placas de petri. *A. subrufescens* (CC414) não apresentou nenhum crescimento em agar-TCA e misturas,

ao longo dos 15 dias (Figura 14A). *P. lecomtei* (CC40) e *G. lucidum* (CC351) apresentaram crescimentos completos da placa em todos os meios em apenas 6 dias, sendo os que possuíram maior velocidade de crescimento (Figura 14B). *F. hepatica* (CC102) apresentou maior velocidade de crescimento nas misturas do que em agar-TCA pura, sendo que nesta condição, em 9 dias foi alcançado o crescimento total da placa, enquanto nas misturas foi em 6 dias, todas sendo superiores do que o crescimento em BDA (controle) (Figura 14C). *S. commune* (FPB117) apresentou o crescimento micelial total nas placas em até 9 dias em agar-TCA e misturas, enquanto em BDA não houve crescimento total na placa em 15 dias (Figura 14D). O meio que favoreceu o crescimento de *P. pulmonarius* (EF88) foi agar-TCA + CCV.



**Figura 14.** Crescimento micelial em placa de petri de CC414 em agar-TCA + CCV em 15 dias (A). Crescimento de *G. lucidum* (CC351) em agar-TCA + TM em 6 dias (B). Crescimento de *F. hepatica* (CC102) em agar-TCA + CCV em 6 dias (C). Crescimento de FPB 117 em BDA a 15 dias (D).

Em relação ao crescimento micelial em cultivo em estado sólido, assim como ocorrido em TSPM, *A. subrufescens* (CC414) não apresentou nenhum crescimento. FPB128 em TCA + CCV também não apresentou nenhum crescimento, e nos outros substratos apresentou crescimento bastante inferior aos crescimentos dos outros fungos. Em TCA, *S. commune* (FPB117) se destacou em relação ao seu crescimento, sendo em média de 0,68 cm/dia, velocidade que não foi atingida por nenhum outro fungo em TCA e mistura (Figura 15A). O crescimento deste fungo foi total no frasco em 7 dias, em TCA e TCA + TM. Em TCA + CCV foi em 9 dias. Todos os tratamentos foram capazes de crescer em todo o frasco em até 15 dias, excetuando *P. pulmonarius* (EF88) em TCA + CCV e *G. lucidum* (CC351) em TCA + TM. *P. lecomtei* (CC40) teve a maior velocidade de crescimento em TCA + CCV e TCA + TM, tendo seu crescimento total no frasco em 9 dias (Figura 15B e C).



**Figura 15.** Velocidade de crescimento fúngico (cm/dia) do cultivo em estado sólido em de CC414, FPB128, FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; CC414: *A. subrufescens*; FPB128: *L. edodes*; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Frente a estes resultados, *A. subrufescens* (CC414) e *L. edodes* (FPB128) foram retirados das próximas análises devido seu lento ou nenhum crescimento nas biomassas de TCA e TSPM, e respectivas misturas. A respeito do crescimento micelial, os resultados de teores de ergosterol são um melhor indicativo (descrito no item 1.3). Portanto, a velocidade de crescimento foi o primeiro critério a ser avaliado

na triagem, eliminando os fungos que não foram capazes de crescer nas biomassas ou tiveram um crescimento muito lento comparado aos outros.

## 1.2. Degradação de compostos tóxicos

A presença de compostos tóxicos nas tortas foi um fator eliminatório na triagem dos macrofungos. Foram considerados bons degradadores de compostos tóxicos aqueles tratamentos com macrofungos que possuíram teor de degradação acima de 90%, tanto para ésteres de forbol em torta de semente de pinhão-manso quanto para gossipol em torta de caroço de algodão. Os testes foram realizados na biomassa após 15 dias de cultivo em frasco.

### 1.2.1. Ésteres de forbol em torta da semente do pinhão-manso

Os ésteres de forbol foram quantificados em mg de ésteres por g de biomassa seca. As concentrações dos ésteres de forbol nos controles foram  $1,159 \pm 0,05$  mg/g em TSPM;  $0,418 \pm 0,04$  mg/g em TSPM + CCV e  $0,469 \pm 0,08$  mg/g em TSPM + TM (Tabela 1). As concentrações de ésteres de forbol nas misturas foram naturalmente menores, devido a proporção das misturas (casca de coco verde e torta de macaúba) presentes serem de 1:1, e as misturas não possuem ésteres de forbol. Em um estudo prévio, foi quantificado  $1,072$  mg/g de éster de forbol em torta de semente de pinhão-manso (BOSE e KEHARIA, 2014).

**Tabela 1.** Concentração de ésteres de forbol (mg/g) (média e desvio padrão) em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%).

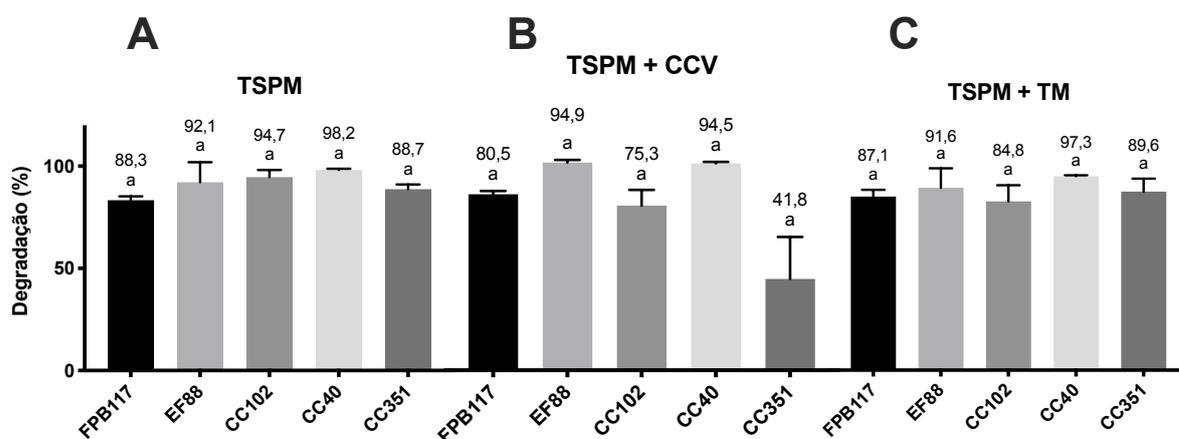
Tratamento	TSPM (mg/g)	TSPM + CCV (mg/g)	TSPM + TM (mg/g)
<b>Controle</b>	$1,159 \pm 0,052^a$	$0,418 \pm 0,039^a$	$0,469 \pm 0,082^a$
<b>FPB117</b>	$0,193 \pm 0,022^b$	$0,082 \pm 0,006^c$	$0,064 \pm 0,012^b$
<b>EF88</b>	$0,091 \pm 0,027^b$	$0,021 \pm 0,005^c$	$0,010 \pm 0,002^b$
<b>CC102</b>	$0,062 \pm 0,040^b$	$0,103 \pm 0,029^c$	$0,061 \pm 0,032^b$
<b>CC40</b>	$0,021 \pm 0,005^b$	$0,023 \pm 0,003^c$	$0,013 \pm 0,002^b$
<b>CC351</b>	$0,131 \pm 0,026^b$	$0,243 \pm 0,080^b$	$0,049 \pm 0,030^b$

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si dentro o mesmo meio pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TSPM: torta de

semente de pinhão-mansão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Considerando que as concentrações de ésteres de forbol dos controles representam 100% de ésteres para cada biomassa, foi calculado o percentual de degradação de cada tratamento (Figura 16). Todos os tratamentos reduziram de forma significativa o teor de ésteres de forbol em relação a concentração encontrada no controle. Houve diferença estatística apenas em *G. lucidum* (CC351) em TSPM + CCV. Em TSPM, a porcentagem de degradação de ésteres de forbol variou entre 98,4 – 83,4%, sendo valores de *P. lecomtei* (CC40) e *S. commune* (FPB117) respectivamente. Em TSPM + CCV, a degradação variou entre 95,6 – 41,9%, sendo de *P. pulmonarius* (EF88) e *P. lecomtei* (CC40) proporcionaram os maiores valores de degradação enquanto que o *G. lucidum* (CC351) representou a menor degradação. Em TSPM + TM, variou entre 98,2 – 88,4%, sendo de *P. pulmonarius* (EF88) e *S. commune* (FPB117), respectivamente.

Na literatura, é conhecido que basidiomicetos são capazes de degradar ésteres de forbol (GOMES, et al., 2018). Um estudo demonstrou que após o cultivo de 20 dias de *G. lucidum* em torta de pinhão-mansão levou a níveis indetectáveis de ésteres de forbol. Uma série de estudos já demonstrou a capacidade de degradação dos ésteres de forbol com fungos do gênero *Pleurotus* de até 99% (DA LUZ, PAES, et al., 2013; GOMES, 2019; KASUYA, DA LUZ, et al., 2012; BOSE e KEHARIA, 2014).



**Figura 16.** Percentual de degradação de ésteres de forbol por cultivo em estado sólido de FPB117, EF88, CC102 e CC351 em torta de pinhão-mansão (100%), torta de

pinhão-manso (50%) + coco verde (50%) e torta de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). TSPM: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Conforme Figura 16, *P. pulmonarius* (EF88) foi capaz de degradar 92,1% em TSPM, 94,9% em TSPM + CCV e 93,6% em TSPM + TM. *G. lucidum* (CC351) foi capaz de degradar 94,7% em TSPM, 57,1% em TSPM + CCV e 89,6% em TSPM + TM. Dados na literatura sobre degradação de ésteres de forbol pelas espécies *S. commune*, *F. hepatica* e *P. lecomtei* são escassos. Neste trabalho, *S. commune* (FPB117) demonstrou ser capaz de degradar entre 80,5 – 89,6% dos ésteres de forbol presentes na biomassa, o *F. hepatica* (CC102) entre 75,3 – 94,7% e *P. lecomtei* (CC40) entre 94,5 – 98,2 %, sendo o tratamento que se destacou, tanto pela alta degradação de ésteres de forbol quanto pela velocidade de crescimento em TSPM e misturas.

### 1.2.2. Gossipol em torta de caroço de algodão e misturas

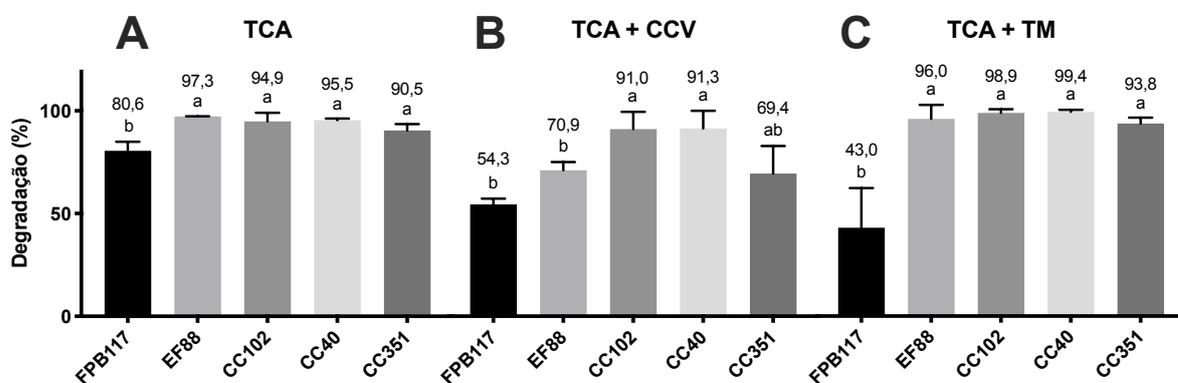
O gossipol foi quantificado em  $\mu\text{g}$  por g de biomassa seca. As concentrações de gossipol nos controles foi de 2,171  $\mu\text{g/g}$  em TCA, 0,789  $\mu\text{g/g}$  em TCA + CCV e 0,352  $\mu\text{g/g}$  em TCA + TM (Tabela 2). *S. commune* (FPB117) apresentou as maiores concentrações de gossipol em todos os meios, indicando que é possivelmente um mau degradador de gossipol.

**Tabela 2.** Concentração média de gossipol ( $\mu\text{g/g}$ ) e desvio padrão, em cada tratamento com macrofungos em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%).

Tratamento	TCA ( $\mu\text{g/g}$ )	TCA + CCV ( $\mu\text{g/g}$ )	TCA + TM ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Controle</b>	2,171 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	0,789 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	0,607 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>
<b>FPB117</b>	0,423 $\pm$ 0,094 <sup>b</sup>	0,352 $\pm$ 0,022 <sup>b</sup>	0,421 $\pm$ 0,160 <sup>a</sup>
<b>EF88</b>	0,059 $\pm$ 0,001 <sup>d</sup>	0,345 $\pm$ 0,102 <sup>b</sup>	0,024 $\pm$ 0,041 <sup>b</sup>
<b>CC102</b>	0,111 $\pm$ 0,090 <sup>c</sup>	0,071 $\pm$ 0,065 <sup>c</sup>	0,007 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup>
<b>CC40</b>	0,099 $\pm$ 0,016 <sup>c</sup>	0,102 $\pm$ 0,045 <sup>c</sup>	0,010 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>
<b>CC351</b>	0,207 $\pm$ 0,066 <sup>c</sup>	0,239 $\pm$ 0,041 <sup>b</sup>	0,037 $\pm$ 0,017 <sup>b</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, dentre o mesmo meio, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Calculando-se a capacidade de degradação de gossipol de cada tratamento (Figura 17), *S. commune* (FPB117) foi o que produziu menor degradação em todos os meios, sendo de 80,6% em TCA, 54,3% em TCA + CCV e 43,0% em TCA + TM. Em TCA, todos os outros tratamentos ficaram acima de 90% de degradação, sendo o *P. pulmonarius* (EF88) o que possuiu maior capacidade de degradação (97,3%). Em TCA + CCV, apenas *F. hepatica* (CC102) e *P. lecomtei* (CC40) que foram capazes de degradar mais de 90% do gossipol, sendo 91,0% e 91,3% suas capacidades de degradação, respectivamente. Em TCA + TM, apenas *S. commune* (FPB117) teve degradação menor que 90%. *P. lecomtei* (CC40), o com maior degradação, foi capaz de degradar 99,4% e *F. hepatica* (CC102), o com a segunda menor degradação, foi capaz de degradar 93,8% (Figura 17).



**Figura 17.** Percentual de degradação degossipol por cultivo em estado sólido de FPB117, EF88, CC102 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

RAJARATHNAM, SHASHIREKHA e BANO (2001) demonstraram que basidiomicetos foram capazes de destoxificar até 100% de gossipol, quando

adicionados no meio. Além disso, o tratamento com basidiomicetos para a degradação de gossipol em tortas de caroço de algodão também indicam um aumento no ganho do substrato, com aumento nas proteínas e aminoácidos (ZHANG, XU, et al., 2006).

Excetuando *S. commune* (FPB117), todos os outros tratamentos apresentaram redução de 90%, sendo indicativos de alta destoxificação nas tortas de gossipol e suas misturas.

### **1.3. Teor de Ergosterol**

O ergosterol (precursor da vitamina D<sub>2</sub>) é encontrado em inúmeras espécies de cogumelos. Em humanos sua deficiência está relacionada com o desenvolvimento de síndrome metabólica, diabetes, hipertensão, inflamação intestinal e alguns tipos de câncer (CORRÊA, PERALTA, et al., 2017). Além disso, o ergosterol é um esterol presente na membrana celular fúngica, usado também como um marcador e um indicativo de crescimento fúngico, por este motivo é importante ressaltar que cada espécie apresenta um teor de ergosterol característico, independente do meio e do tempo de cultivo (KLAMER e BÄÄTH, 2004). Os resultados da quantificação do teor de ergosterol nas biomassas secas foram expressos em µg de ergosterol por g de biomassa colonizada.

#### **1.3.1. Em torta de pinhão-manso e misturas**

Conforme disposto Tabela 3, em TSPM os resultados variaram entre 52,5 µg/g e 476,2 µg/g, correspondendo aos teores de ergosterol do controle e de *P. pulmonarius* (EF88) respectivamente. Em TSPM + CCV, os resultados variaram entre 40,9 µg/g e 1261,4 µg/g, correspondendo ao controle e a *S. commune* (FPB117) respectivamente. Em TSPM + TM, os resultados variaram entre 35,3 µg/g e 1268,7 µg/g, correspondendo ao controle e a *S. commune* (FPB117) respectivamente.

Comparando-se os resultados dos teores de ergosterol de cada tratamento entre os diferentes meios (Tabela 3), é possível verificar que meio contendo misturas lignocelulósicas foram superiores em teor de ergosterol que aqueles que tinham a TSPM pura, com aumento do TSPM + CCV em relação ao TSPM+TM em *F. hepatica* (CC102), *P. lecomtei* (CC40) e *G. lucidum* (CC351). Sendo estes os maiores teores de ergosterol entre os tratamentos, podendo indicar que este substrato lignocelulósicos auxilia no crescimento micelial dos tratamentos fúngicos.

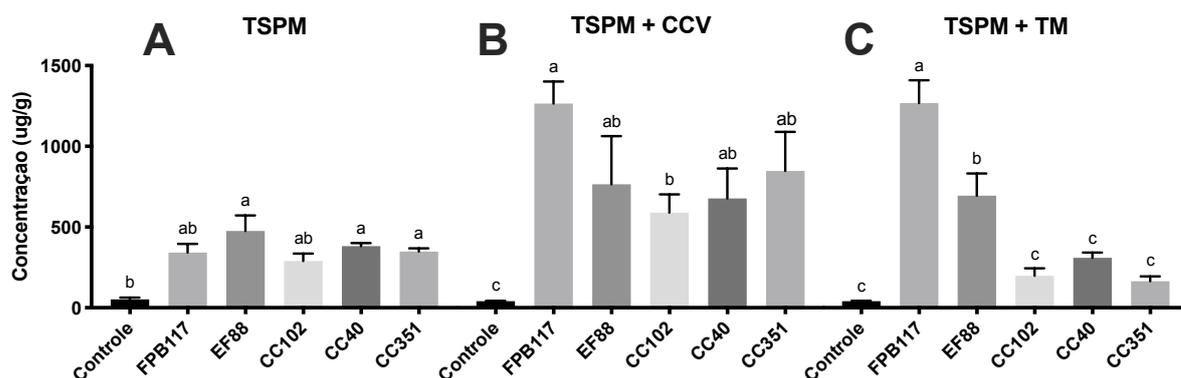
**Tabela 3.** Concentração média de ergosterol ( $\mu\text{g/g}$ ) e desvio padrão em dos cultivos em estado sólido de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%).

Tratamento	TSPM ( $\mu\text{g/g}$ )	TSPM + CCV ( $\mu\text{g/g}$ )	TSPM + TM ( $\mu\text{g/g}$ )
Controle	52,5 $\pm$ 10,9 <sup>a</sup>	40,9 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	35,3 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
FPB117	341,9 $\pm$ 54,2 <sup>b</sup>	1261,4 $\pm$ 136,7 <sup>a</sup>	1268,7 $\pm$ 140,0 <sup>a</sup>
EF88	476,2 $\pm$ 96,2 <sup>a</sup>	763,1 $\pm$ 297,2 <sup>a</sup>	694,1 $\pm$ 137,6 <sup>a</sup>
CC102	289,9 $\pm$ 45,4 <sup>b</sup>	588,2 $\pm$ 112,1 <sup>a</sup>	198,2 $\pm$ 46,4 <sup>b</sup>
CC40	382,0 $\pm$ 19,1 <sup>ab</sup>	675,8 $\pm$ 184,3 <sup>a</sup>	309,5 $\pm$ 32,4 <sup>b</sup>
CC351	348,6 $\pm$ 19,8 <sup>b</sup>	845,1 $\pm$ 243,4 <sup>a</sup>	163,9 $\pm$ 30,6 <sup>b</sup>

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si, dentro do mesmo tratamento, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TSPM: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Os substratos autoclavados são preparados para eliminar os fungos e bactérias que podem contaminar (concorrer pelo substratos com os macrofungos). Porém, a biomassa microbiana (fungos, leveduras) que foram esterilizados no meios de cultura, permanece junto as substratos, enriquecendo os meios. A presença de ergosterol nos controles comprova que havia uma comunidade fúngica no substratos no momento inicial (inoculação), podendo ou não ter algum crescimento (por vezes não perceptível – contaminação), durante o período de incubação dos controles em conjunto os substratos inoculados com os macrofungos, aqui chamados de fermentados.

Os colonizados de *S. commune* (FPB117) apresentaram as maiores concentrações de ergosterol em todos os meios (Figura 18B e Figura 18C), enquanto *P. pulmonarius* (EF88) levou à maior concentração de ergosterol em torta de pinhão-manso pura, em comparação com os outros fungos (Figura 18A). Em TSPM, apenas *P. pulmonarius* (EF88) e *P. lecomtei* (CC40) apresentaram concentrações de ergosterol superiores às do controle. Em TSPM + CCV todas os tratamentos apresentaram concentrações maiores que dos controles, e em TSPM + TM, *S. commune* (FPB117) e *P. pulmonarius* (EF88) foram os tratamentos que apresentaram os maiores teores de ergosterol.



**Figura 18.** Teor de ergosterol ( $\mu\text{g/g}$ ) dos cultivos em estado s31ido de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351, e do controle, em em torta de semente de pinh31o-manso (100%), torta de semente de pinh31o-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinh31o-manso (50%) + torta de maca31uba (50%).

M31dias seguidas pela mesma letra n31o diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos n31o colonizados; TSPM: torta de semente de pinh31o-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de maca31uba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

### 1.3.2. Em torta de caro31o de algod31o e misturas

As concentra313es de ergosterol nos tratamentos com basidiomicetos em TCA pura variaram entre  $621,7 \mu\text{g/g}$  e  $1665,6 \mu\text{g/g}$ , correspondendo a *F. hepatica* (CC102) e a *S. commune* (FPB117), respectivamente. As concentra313es de ergosterol em TCA + CCV variaram entre  $676,7 \mu\text{g/g}$  e  $1291,0 \mu\text{g/g}$ , correspondendo a *F. hepatica* (CC102) e *P. lecomtei* (CC40), respectivamente; e as concentra313es em TCA + TM variaram entre  $769,6 \mu\text{g/g}$  e  $2321,0 \mu\text{g/g}$ , correspondendo a *P. lecomtei* (CC40) e *S. commune* (FPB117), respectivamente (Tabela 4). A concentra313o de ergosterol em TCA + TM tratado com *S. commune* (FPB117) foi a maior concentra313o encontrada de ergosterol, comparando-se com os valores encontrados em torta de pinh31o-manso e misturas.

**Tabela 4.** Concentra313o m31dia de ergosterol ( $\mu\text{g/g}$ ) e desvio padr31o em dos cultivos em estado s31ido de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caro31o de algod31o (100%), torta de caro31o de algod31o (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caro31o de algod31o (50%) + torta de maca31uba (50%).

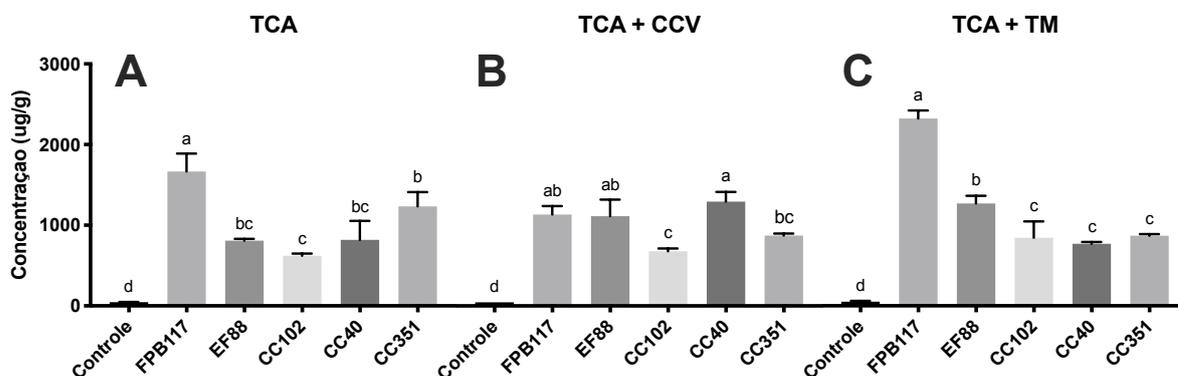
Tratamento	TCA ( $\mu\text{g/g}$ )	TCA + CCV ( $\mu\text{g/g}$ )	TCA + TM ( $\mu\text{g/g}$ )
Controle	$47,3 \pm 1,6^a$	$37,7 \pm 0,0^a$	$51,7 \pm 10,7^a$
FPB117	$1665,6 \pm 222,3^b$	$1132,0 \pm 103,5^c$	$2321,0 \pm 99,0^a$

<b>EF88</b>	808,2 ± 23,7 <sup>b</sup>	1111,9 ± 203,5 <sup>a</sup>	1267,5 ± 95,9 <sup>a</sup>
<b>CC102</b>	621,7 ± 25,8 <sup>a</sup>	676,7 ± 33,7 <sup>a</sup>	844,7 ± 200,6 <sup>a</sup>
<b>CC40</b>	819,7 ± 234,8 <sup>a</sup>	1291,0 ± 120,1 <sup>a</sup>	769,6 ± 21,5 <sup>a</sup>
<b>CC351</b>	1234,6 ± 176,3 <sup>a</sup>	871,9 ± 25,5 <sup>a</sup>	869,3 ± 20,5 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si, dentro do mesmo tratamento, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

A adição de torta de macaúba (substrato lignocelulósico) proporcionou maior crescimento fúngico da mistura contendo FPB 117. No tratamento com outros fungos observa-se a mesma tendência de aumento (embora não estatisticamente diferente) quando em presença de outro material lignocelulósico, com exceção do tratamento com *G. lucidum* (CC351) (Tabela 4).

*S. commune* (FPB117) foi o tratamento com a maior concentração de ergosterol em TCA e TCA + TM; e em TCA + CCV, *P. lecomtei* (CC40) foi o maior (Figura 19). *F. hepatica* (CC102) foi o tratamento com as menores concentrações de ergosterol em todos os meios de TCA.



**Figura 19.** Teor de ergosterol ( $\mu\text{g/g}$ ) dos cultivos em estado sólido de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351, e do controle, em em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

#### 1.4. Teor de proteína bruta

É sabido que fungos não são capazes de fixar nitrogênio, entretanto sua adição em substratos já foi capaz de demonstrar que há um ganho no teor de proteínas e de aminoácidos (ZHANG, XU, et al., 2006). Este aumento no teor da proteína bruta ocorre devido ao consumo de outros nutrientes do substrato durante o metabolismo fúngico. O nitrogênio da biomassa lignocelulósica é incorporada às proteínas e os carboidratos são degradados e convertidos em biomassa fúngica e CO<sub>2</sub>, levando à proteína bruta a se concentrar nesta biomassa. Portanto, o aumento no teor de proteína bruta é um efeito de concentração (VAN KUIJK, SONNENBERG, et al., 2015; NAYAN, SONNENBERG, et al., 2018). Isso pode ser melhor acompanhado pesando a massa seca do substrato antes e depois do processo de colonização, anotando a perda de massa.

Apesar de ser um aumento aparente, calcular o aumento de concentração de proteína bruta também é uma forma de avaliar a bioconversão promovida por esses macrofungos nas tortas lignocelulósicas. Para nutrição animal, este efeito de concentração de proteína é positivo. Portanto, nestes resultados foram considerados os ganhos ou perdas de proteína em relação ao controle da biomassa.

##### 1.4.1. Em torta de pinhão-manso e suas misturas

Conforme Tabela 5, é possível visualizar que o teor de proteína bruta foi em geral maior em TSPM pura. O teor da torta não tratada foi de 27,9 g/100g, na literatura normalmente os valores encontrados variam entre 28,87 – 37,82% (OMOJASOLA e BENU, 2016). Os valores de proteína bruta foram maiores na torta pura devido ao alto teor proteico da torta de semente de pinhão-manso, e pelos baixos teores de proteína encontrados na casca de coco verde (3,72%) e na torta de macaúba (5,57%) (FROTA e ALVES, 2015; PEREIRA, 2013).

Em TSPM os teores de proteína bruta nos tratamentos variaram entre 20,8 g/100g (*P. pulmonarius* EF88) e 30,1 g/100g (*G. lucidum* CC351). Em TSPM + CCV os teores variaram entre 16,9 g/100g (*P. lecomtei* CC40) e 19,7 g/100g (*F. hepatica* CC102). Em TSPM + TM, variaram entre 18,7 g/100g (*P. pulmonarius* EF88) e 22,5 g/100g (*F. hepatica* CC102).

Tortas de semente de pinhão-manso, com teores de proteína bruta de 45,95 g/100g, foram tratadas com diferentes ascomicetos (*Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzanium* e *Aspergillus niger*) durante 10 dias de cultivo obtiveram

teores de proteína bruta de 36,46 a 36,75 g/100g (BELEWU, AHMED e IBRAHIM, 2011). Em outro estudo com o cultivo em estado sólido de *A. niger* em tortas de semente de pinhão-mansão durante 72 h, o teor de proteína bruta variou entre 32,75 g/100g e 39,45 g/100g, partindo de tortas com teores entre 30,0-35,0 g/100g (OJEDIRAN, OGUNMOLA, et al., 2016).

**Tabela 5.** Teor de proteína bruta (N × 6,25) em g/100g de biomassa seca em torta de semente de pinhão-mansão (100%), torta de semente de pinhão-mansão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-mansão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas.

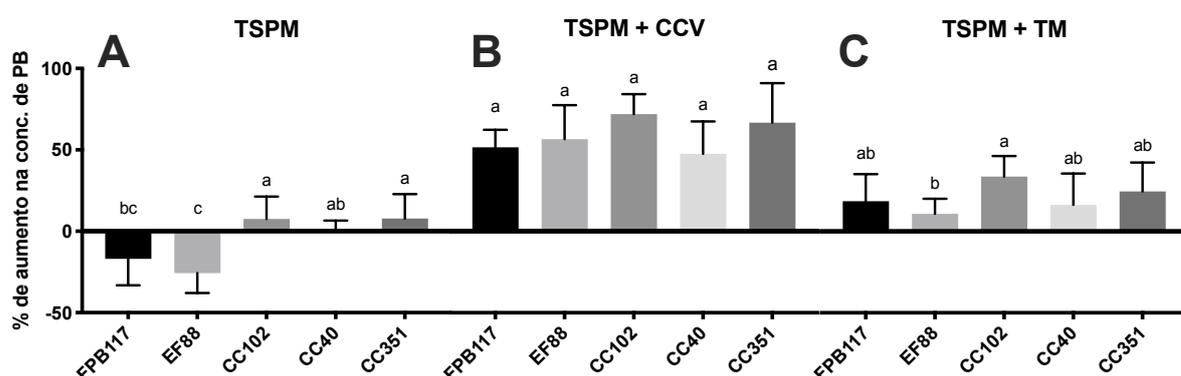
Tratamento	TSPM (g/100g)	TSPM + CCV (g/100g)	TSPM + TM (g/100g)
<b>Controle</b>	27,9 ± 1,2 <sup>ab</sup>	11,4 ± 0,4 <sup>b</sup>	16,9 ± 1,6 <sup>c</sup>
<b>FPB117</b>	23,3 ± 4,5 <sup>bc</sup>	17,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	20,0 ± 2,8 <sup>abc</sup>
<b>EF88</b>	20,8 ± 3,4 <sup>c</sup>	17,9 ± 2,4 <sup>a</sup>	18,7 ± 1,6 <sup>bc</sup>
<b>CC102</b>	30,0 ± 3,9 <sup>a</sup>	19,7 ± 1,4 <sup>a</sup>	22,5 ± 2,1 <sup>a</sup>
<b>CC40</b>	28,3 ± 1,5 <sup>ab</sup>	16,9 ± 2,3 <sup>a</sup>	19,6 ± 3,2 <sup>abc</sup>
<b>CC351</b>	30,1 ± 4,2 <sup>a</sup>	19,1 ± 2,8 <sup>a</sup>	20,3 ± 2,2 <sup>ab</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, dentro do mesmo meio, pelo teste de Tukey (p<0,05). Controle: substratos não colonizados; TSPM: torta de semente de pinhão-mansão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Na Figura 20, fica evidente que houve aumento no teor de proteína bruta em todos os tratamentos de TSPM com misturas. Em TSPM + CCV, o tratamento com *S. commune* (FPB117) houve aumento de 51,5% no teor de proteína, em relação ao controle. Com *P. pulmonarius* (EF88) o aumento foi de 56,6%, com *F. hepatica* (CC102) foi de 72,0%, com *P. lecomtei* (CC40) foi de 47,5% e com *G. lucidum* (CC351) foi de 66,5%. Embora isto poderia aparentar uma diferença no aumento na concentração de proteína entre os tratamentos, devido à grande variabilidade entre as repetições, as diferenças não se mostraram estatisticamente significativas. Em TSPM, *F. hepatica* (CC102) e *G. lucidum* (CC351) apresentaram aumento significativo em relação ao controle, de 7,6% e de 7,8% respectivamente. Neste mesmo tratamento, *S. commune* (FPB117) e *P. pulmonarius* (EF88) apresentaram reduções no teor de proteína bruta em relação ao controle, sendo de -16,9% e -25,7%, respectivamente. Em TSPM + TM, o aumento mais notável (33,7%) em relação ao

controle foi no tratamento com *F. hepatica* (CC102), enquanto que o tratamento com *P. pulmonarius* (EF88) teve o pior desempenho. Em um estudo prévio, tortas de semente de pinhão-manso tratadas com os fungos *Absidia spinosa* e *Mucor rouxii* apresentaram aumentos de até 8% no teor de proteína bruta (SANUSI, BELEWU, et al., 2013).

A adição de material lignocelulósico propicia melhor equilíbrio na relação carbono e nitrogênio ideal para o crescimento fúngico. No entanto, em termos de nutrição animal, tem-se um substrato menos rico em proteínas. A adição de CCV e TM reduziu em 59,1% e 39,4% respectivamente o teor de proteína na biomassa pós-cultivo, por efeito de diluição. Após o crescimento fúngico, parte desta concentração de proteína pode ser recuperada. O tratamento que atingiu melhor esta recuperação, foi o tratamento com *F. hepatica* (CC102) na mistura TSPM+TM, que com o efeito de concentração pode atingir 80% do teor de proteína presente da torta pura.



**Figura 20.** Diferença no teor de proteína bruta (%) em base seca dos colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). TSPM: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomteji*; CC351: *G. lucidum*

Como mencionado anteriormente a respeito do aumento aparente do teor de proteínas brutas, devido ao efeito da bioconversão promovida pelo tratamento biológico com macrofungos, foi possível observar que *P. pulmonarius* (EF88) e *S. commune* (FPB117) em TSPM não foram capazes de concentrar de proteínas, apesar

de terem relativamente altos teores de ergosterol (Figura 18), indicativo de bom crescimento micelial, podendo tê-las utilizado em seu metabolismo quando estão em excesso na biomassa.

#### 1.4.2. Em torta de caroço de algodão e misturas

Os teores de proteína bruta em TCA puro também foram maiores, como ocorreu com TSPM puro (Tabela 6). Os valores de TCA puro foram semelhantes aos de TSPM puro, indicando teores proteicos similares. Os teores de proteína bruta nos tratamentos com fungo em TCA, variaram entre 30,4 g/100g (*P. pulmonarius* EF88) e 32,4 g/100g (*F. hepatica* CC102). Em TCA + CCV, variaram entre 14,0 g/100g (*G. lucidum* CC351) e 16,8 g/100g (*S. commune* FPB117). Em TCA + TM, variaram entre 18,8 g/100g (*P. pulmonarius* EF88) e 21,9 g/100g (*F. hepatica* CC102).

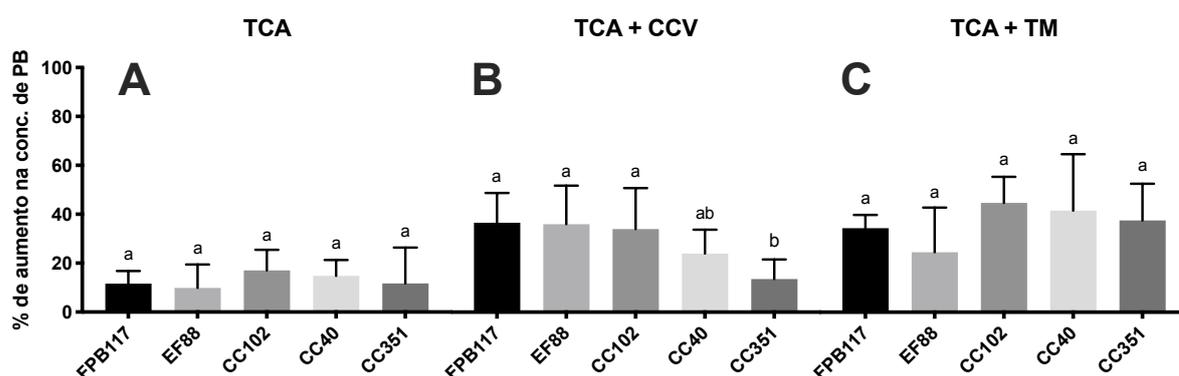
**Tabela 6.** Teor de proteína bruta (N × 6,25) em g/100g de biomassa seca em torta de caroço de algodão (100%), torta caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas.

Tratamento	TCA (g/100g)	TCA + CCV (g/100g)	TCA + TM (g/100g)
Controle	27,6 ± 2,4 <sup>b</sup>	12,3 ± 1,1 <sup>c</sup>	15,1 ± 2,5 <sup>b</sup>
FPB117	30,9 ± 1,4 <sup>ab</sup>	16,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	20,3 ± 0,8 <sup>a</sup>
EF88	30,4 ± 2,6 <sup>ab</sup>	16,7 ± 1,9 <sup>a</sup>	18,8 ± 2,8 <sup>a</sup>
CC102	32,4 ± 2,3 <sup>a</sup>	16,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	21,9 ± 1,6 <sup>a</sup>
CC40	31,7 ± 1,8 <sup>a</sup>	15,3 ± 1,2 <sup>ab</sup>	21,4 ± 3,5 <sup>a</sup>
CC351	30,9 ± 4,1 <sup>ab</sup>	14,0 ± 1,0 <sup>bc</sup>	20,8 ± 2,3 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, dentro do mesmo meio, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Em relação ao aumento de concentração de proteína bruta, em todos os tratamentos com fungo e em todos os meios houve aumento no teor (Figura 21), mesmo em meios mais ricos em proteína como no TCA puro, em que os valores variaram de 9,9% (*P. pulmonarius* EF88) e 17,0% (*F. hepatica* CC102). Em TCA + CCV, os aumentos variaram entre 13,5% (*G. lucidum* CC351) e 36,5% (*S. commune* FPB117). Em TCA + TM, os aumentos ficaram entre 24,5% (*P. pulmonarius* EF88) e 37,6% (*G. lucidum* CC351). As misturas com casca de coco verde e torta de macaúba

propiciaram um aumento no teor de proteína, em relação à torta de caroço de algodão pura, pois partiram de um meio mais diluído em proteína, tendo assim, os basidiomicetos, maior preferência à degradação de materiais lignocelulósicos. Assim como ocorreu com a torta de semente de pinhão-manso. Assim, ao consumir o material lignocelulósico, existe uma concentração da proteína que não foi consumida no crescimento fúngico.



**Figura 21.** Diferença no teor de proteína bruta (%) em base seca dos colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*

ZHANG, XU e colaboradores (2006) demonstraram em um trabalho que a colonização de fungos (*Candida capsuligena*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*) em torta de caroço de algodão promoveu um aumento aparente no teor de proteína bruta variando de 8,95% (*C. capsuligena*) até 22,24% (*A. niger*).

### 1.5. Atividade antioxidante e fenólicos totais

A atividade antioxidante foi medida pela atividade sequestrante dos radicais livres DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> em capacidade equivalente de trolox (TEAC, *trolox equivalente antioxidant capacity*, do inglês). Os dois métodos são rápidos e econômicos. DPPH é conhecido como sendo um radical livre de cor púrpura, é estável, porém sensível à luz, oxigênio, pH e o tipo de solvente utilizado. Após este radical receber um átomo

de hidrogênio dos compostos oxidantes é reduzido e adquire coloração amarela (BRAND-WILLIAMS, et al., 1995)

O método baseado na no radical ABTS<sup>•+</sup>, gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio, ocorre a captura do hidrogênio, doador de elétrons da substância antioxidante, pelo radical, promovendo a descoloração da solução. O grau de descoloração é utilizado para avaliar a atividade antioxidante. O ensaio realizado com o radical ABTS<sup>•+</sup> apresenta vantagens sobre o ensaio com radical de DPPH<sup>•</sup>, como o fato dar cor dos extratos não interferir na análise além de que este o reagente ABTS é solúvel em solventes polares e apolares (Alam, et al., 2013).

Os compostos fenólicos são um dos principais componentes em extratos de espécies de cogumelos responsáveis por atividade antioxidante. Para a quantificação de compostos fenólicos, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu em equivalentes de ácido gálico (AG). Este método não é seletivo, pelo fato do reagente interagir com outros compostos não fenólicos como o ácido ascórbico, açúcares, aminoácidos e Cu (I), entretanto, é utilizado como um indicativo no teor de compostos fenólicos presentes numa amostra, como uma triagem para análises superiores acerca da atividade antioxidante. O método é baseado numa reação colorimétrica a qual o número de grupos hidroxila ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada (GEORGE, BRAT, *et al.*, 2005; SHAHIDI e NACZK, 1995; CHYE, WONG e LEE, 2008).

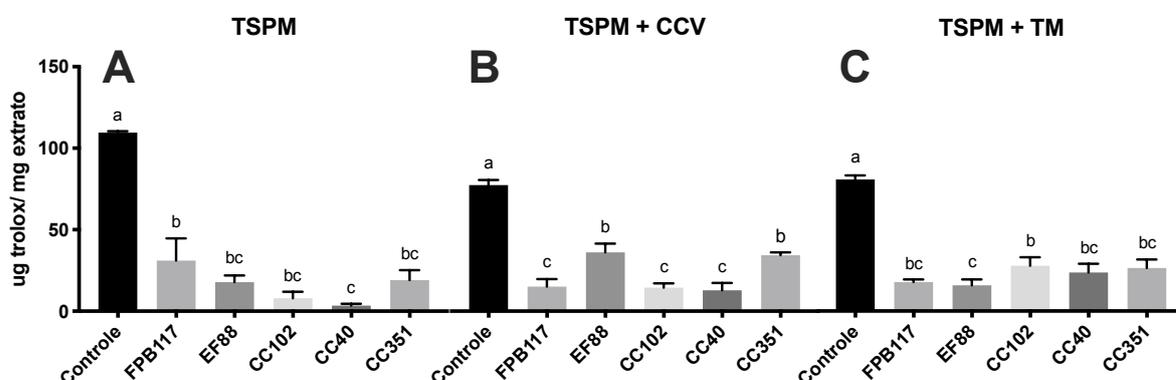
Foi observado, em todos os tratamentos, redução na atividade antioxidante. Isso ocorre provavelmente, devido a produção de enzimas oxidativas pelos basidiomicetos. As enzimas oxidativas extracelulares estão relacionadas ao processo de despolimerização da lignina, causada principalmente por oxidases e peroxidases. Estas enzimas são responsáveis por gerar radicais livres que afetam a degradação da lignina (KERSTEN & CULLEN, 2007).

#### **1.5.1. Em torta de semente de pinhão-mansó**

Como esperado, houve redução na atividade antioxidante de todos os tratamentos em relação ao controle, em todos as misturas e nas duas metodologias de atividade sequestrante dos radicais livres. Além disso, a torta de pinhão-mansó por si só possui alta atividade antioxidante (NITHIYANANTHAM, et al., 2012), fato comprovado em ambos os ensaios (Figura 22A). Portanto, nesta etapa foi avaliado qual tratamento apresentou a menor perda na capacidade de reagir com os radicais

livres DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>. No ensaio de DPPH<sup>•</sup> (Figura 22), os valores de TEAC em TSPM variaram entre 3,4 µg (*P. lecomtei* CC40) e 109,4 µg (Controle). Em TSPM + CCV, entre 12,8 µg (*P. lecomtei* CC40) e 77,3 µg (Controle). Em TSPM + TM, entre 16,6 µg (*P. pulmonarius* EF88) e 80,8 µg (Controle).

*P. pulmonarius* (EF88) e *G. lucidum* (CC351) em TSPM + CCV apresentaram os maiores valores de TEAC no extrato, comparando-se aos outros tratamentos. *P. lecomtei* (CC40) apresentou os menores valores de TEAC por extrato em TSPM e em TSPM + CCV, e em TSPM + TM, o tratamento com *P. pulmonarius* (EF88) apresentou o menor. Os outros tratamentos foram todos iguais.

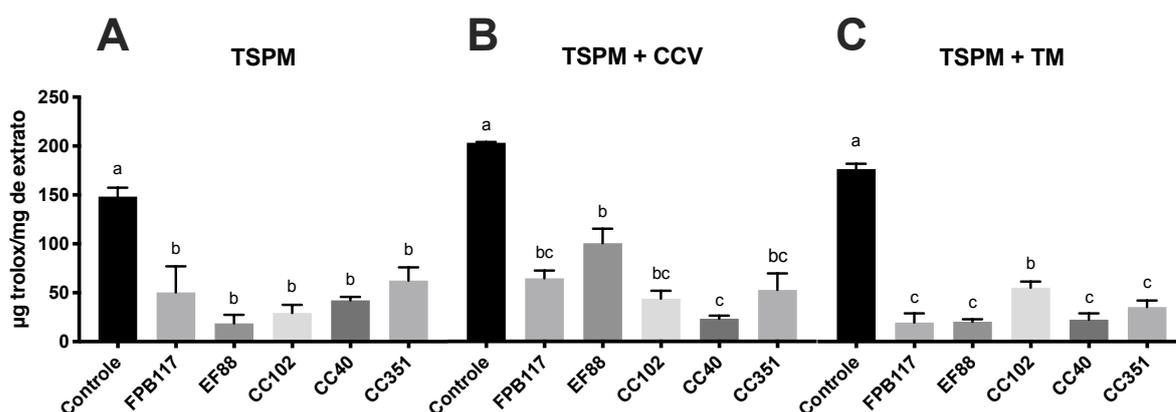


**Figura 22.** TEAC (µg de trolox/mg de extrato) pelo ensaio de DPPH<sup>•</sup> de extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-mansão (100%), torta de semente de pinhão-mansão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-mansão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TSPM: torta de semente de pinhão-mansão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Pelo ensaio de ABTS<sup>•+</sup> (Figura 23), em TSPM, *G. lucidum* (CC351) aparentou os maiores valores de atividade antioxidante o *P. pulmonarius* (EF88) os menores valores, entretanto não houve diferença estatística entre nenhum tratamento, exceto em relação ao controle, pois houve uma grande variabilidade entre replicatas biológica. *P. lecomtei* (CC40) apresentou os menores valores de atividade antioxidante nas misturas. Os valores de TEAC em TSPM variaram entre 18,4 µg (*P. pulmonarius* EF88) e 147,9 µg (Controle). Em TSPM + CCV, entre 23,2 µg (*P. lecomtei*

CC40) e 202,9  $\mu\text{g}$  (Controle). Em TSPM + TM, entre 6,4  $\mu\text{g}$  (*P. lecomtei* CC40) e 117,6  $\mu\text{g}$  (Controle). Em TSPM + CCV, *P. pulmonarius* (EF88) se destacou quanto ao valor de TEAC, mas não diferiu dos outros tratamentos, exceto o *P. lecomtei* (CC40) que foi menor. Em TSPM + TM, *F. hepatica* (CC102) apresentou maior valor de TEAC. No ensaio do radical de ABTS<sup>+</sup>, os controles das misturas com CCV e TM apresentaram maiores valores que o extrato do controle de TSPM pura, o mesmo não ocorreu no ensaio de DPPH<sup>\*</sup>. Diferenças nos resultados entre os testes TEAC e DPPH<sup>\*</sup> podem ocorrer, pois alguns antioxidantes reagem rapidamente com o radical peroxil (método ABTS) enquanto que reagem muito lentamente ou até são inertes ao DPPH<sup>\*</sup>, além de que sua perda de colorização pode ocorrer também por agentes redutores, contribuindo assim a resultados imprecisos (PRIOR, WU e SCHAICH, 2005).



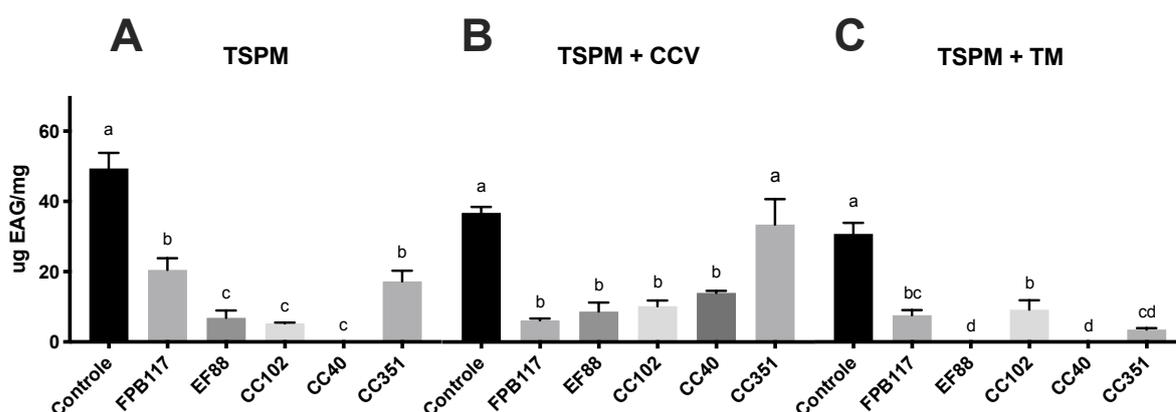
**Figura 23.** TEAC ( $\mu\text{g}$  de trolox/mg de extrato) pelo ensaio de ABTS<sup>+</sup> de extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TSPM: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Assim como nos ensaios de atividade antioxidante, o teor de fenólicos totais dos tratamentos também apresentou valores menores do que no controle. Isto ocorre possivelmente devido a presença de polifenol oxidases presentes em basidiomicetos, que utilizam compostos fenólicos e flavonoides como substrato (KIM, KIM, et al., 2019).

*P. lecomtei* (CC40) em TSPM e em TSPM + TM não obteve nenhum resultado de concentração de ácido gálico, bem como *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM + TM. Em TSPM, excetuando o teor de *P. lecomtei* (CC40) que não apresentou fenois totais, os valores dos tratamentos variaram entre 4,0 µg de EAG (*F. hepatica* CC102) e 49,4 µg de EAG (Controle), e FPB 117 e *G. lucidum* (CC351) foram os melhores tratamentos (Figura 24). Em TSPM + CCV, os valores de EAG (equivalentes de ácido gálico) variaram entre 6,2 µg (*S. commune* FPB117) e 36,7 µg (Controle). Nesta condição, *G. lucidum* (CC351) apresentou resultado de 33,4 µg de EAG, sendo o único valor de compostos fenólicos superior aos outros tratamentos com fungo. Em TSPM + TM, os valores de EAG variaram entre 4,0 µg (*G. lucidum* CC351) e 30,8 µg (Controle), excetuando *P. pulmonarius* (EF88) e *P. lecomtei* (CC40) que não apresentaram valores. *F. hepatica* (CC102) apresentou concentração de 5,5 µg de EAG e foi o tratamento com fungo com maior teor de fenois totais nesta condição. *G. lucidum* (CC351) é conhecido pela sua alta produção de compostos fenólicos, que pode ser observado em TSPM + CCV (BOH, BEROVIC, et al., 2007).

Em conclusão, a mistura TSPM + CCV é a que apresenta maior disponibilidade de atividade antioxidante, e todos os materiais tratados com fungos reduziram drasticamente esta propriedade. Este fato pode ser explicado pela queda no teor de fenólicos totais, com exceção do tratamento TSPM + CCV tratado com *G. lucidum* (CC351).

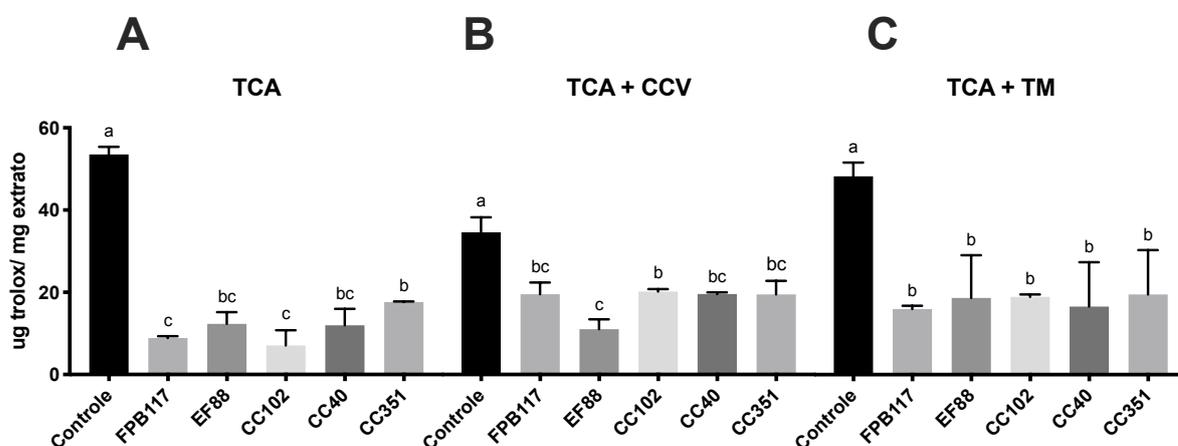


**Figura 24.** Mg de EAG por mg de extrato pelo ensaio de fenois totais de extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-mansó (100%), torta de semente de pinhão-mansó (50%) + casca de coco

verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TSPM: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomteji*; CC351: *G. lucidum*.

### 1.1.1. Em torta de caroço de algodão e misturas

Assim como ocorreu nos extratos torta de semente de pinhão-manso, os controles obtiveram valores de TEAC superiores aos tratamentos nos dois ensaios (Figura 25 e Figura 26). Também foi possível observar que nos dois ensaios os extratos dos controles de TSPM foram superiores aos de TCA. Como foi explicado anteriormente, a torta de semente de pinhão-manso possui alta atividade antioxidante. Apesar disso, já foi demonstrado que peptídeos extraídos da torta de caroço de algodão possuem atividade antioxidante, capazes de reduzir a oxidação da catequina (KHASANOV, DAVRANOV e HASANOV, 2017).



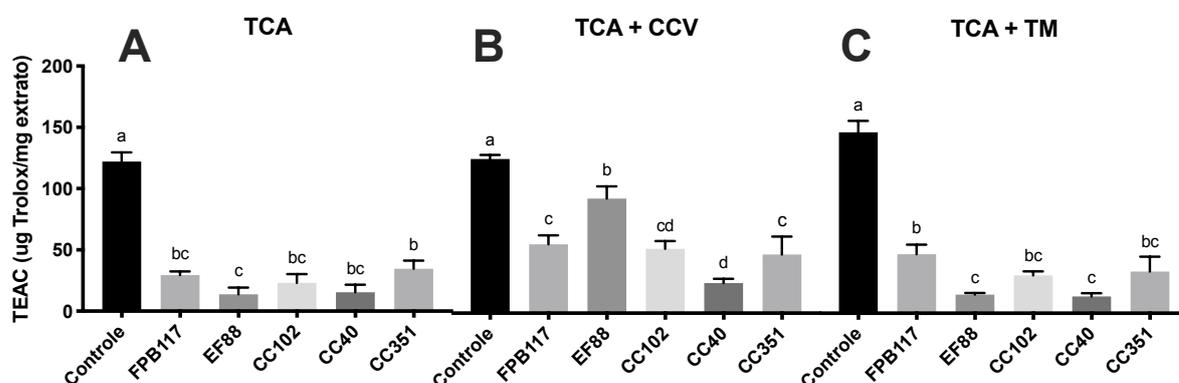
**Figura 25.** TEAC ( $\mu\text{g}$  Trolox/mg de extrato) pelo ensaio de DPPH<sup>\*</sup> extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomteji*; CC351: *G. lucidum*.

Pelo ensaio da captura do radical de DPPH<sup>\*</sup>, em TCA, os valores de TEAC variaram entre 4,2 – 53,5 µg, correspondendo a *P. lecomtei* (CC40) e ao controle, respectivamente. Em TCA + CCV, os teores variaram entre 11,0 – 34,6 µg, correspondendo a *P. pulmonarius* (EF88) e ao controle, respectivamente. Em TCA + TM variaram entre 15,9 – 48,3 µg correspondendo ao *S. commune* (FPB117) e ao controle, respectivamente. Dentre os tratamentos em TCA, *G. lucidum* (CC351) apresentou a maior atividade antioxidante, em TCA + CCV apenas *P. pulmonarius* (EF88) teve uma atividade antioxidante inferior à dos outros tratamentos, e em TCA + TM, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

No ensaio pelo radical de ABTS<sup>+</sup>, os valores de TEAC variaram em TCA entre 15,3– 122,1 µg, correspondendo a *P. lecomtei* (CC40) e ao controle, respectivamente. Em TCA + CCV TEAC variou entre 24,6 – 125,9 µg, correspondendo a *P. lecomtei* (CC40) e ao controle, respectivamente. E em TCA + TM, TEAC variou entre 13,8 – 147,9 µg, correspondendo a *P. lecomtei* (CC40) e ao controle, respectivamente (Figura 26). Assim como ocorreu na torta de semente de pinhão-manso, os extratos apresentaram maiores valores de TEAC pelo ensaio do radical ABTS<sup>+</sup> do que pelo ensaio de captura do radical de DPPH<sup>\*</sup>, isso ocorre pelos mesmos motivos relatados sobre os resultados em TSPM.

Foi possível observar que as atividades antioxidantes dos extratos dos cultivos em caroço de algodão foram menores que as atividades dos extratos de torta de semente de pinhão-manso. O controle de TCA + TM pelo ensaio de ABTS possuiu a maior atividade antioxidante, e pelo ensaio de DPPH foi o controle de TCA, com um poder antioxidante menor, no entanto, em termos absolutos.

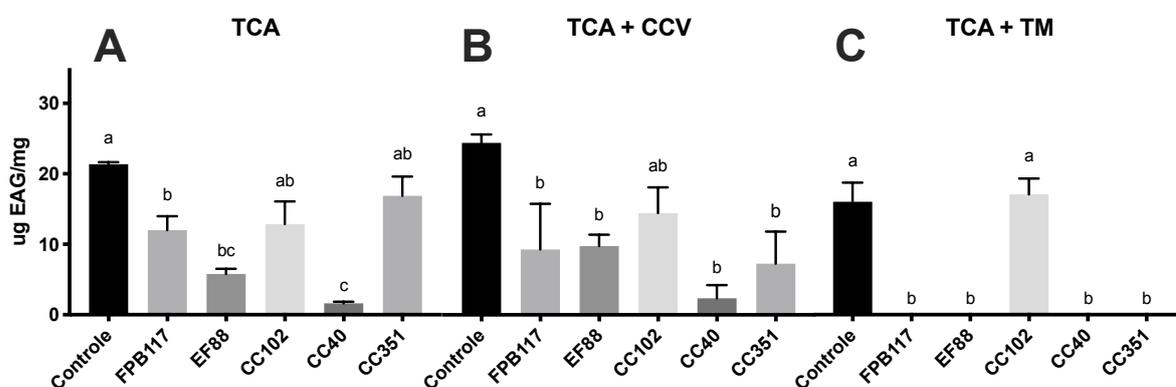


**Figura 26.** TEAC (µg Trolox/mg de extrato) pelo ensaio de ABTS<sup>+</sup> de extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de

caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Os resultados de EAG em TCA variaram entre 1,7 – 21,4  $\mu\text{g}$ , correspondendo a *P. lecomtei* (CC40) e ao controle, respectivamente. Em TCA + CCV variaram entre 2,3 – 24,4  $\mu\text{g}$ , correspondendo a *P. lecomtei* (CC40) ao controle, respectivamente, e em TCA + TM, *G. lucidum* (CC351), *P. lecomtei* (CC40), *P. pulmonarius* (EF88) e *S. commune* (FPB117) não apresentaram nenhuma concentração de EAG, *F. hepatica* (CC102) foi de 17,0  $\mu\text{g}$  e o controle foi de 16,0  $\mu\text{g}$  (Figura 27). Assim como ocorreu em torta de semente de pinhão-manso, os equivalentes de ácido gálico foram menores nas misturas com torta de macaúba. Ainda comparando com os resultados dos extratos de torta de pinhão-manso, os valores de EAG dos controles foram menores dos extratos de torta de caroço de algodão.



**Figura 27.** Mg de EAG por mg de extrato pelo ensaio de fenóis totais em extratos de colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%) colonizadas com FPB117, EF88, CC102, CC40, CC351 e das tortas não colonizadas.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle: substratos não colonizados; TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

A presença de compostos fenólicos, como o ácido gálico, é apenas um dos compostos que possuem atividade antioxidante. Foi observado que possivelmente existam outros compostos presentes nos extratos capazes de influenciar na atividade antioxidante, devido a presença de atividade antioxidante em extratos que não apresentam equivalentes de ácido gálico, carotenoides e vitaminas C e E, que já foram encontrados previamente em basidiomicetos (ZHAI, WANG e HAN, 2015).

Todos os fungos reduziram a atividade antioxidante; quanto ao teor de fenólicos totais nos materiais tratados, o tratamento TCA + TM com *F. hepatica* (CC102) foi o que permaneceu manteve o teor mais semelhante ao seu controle.

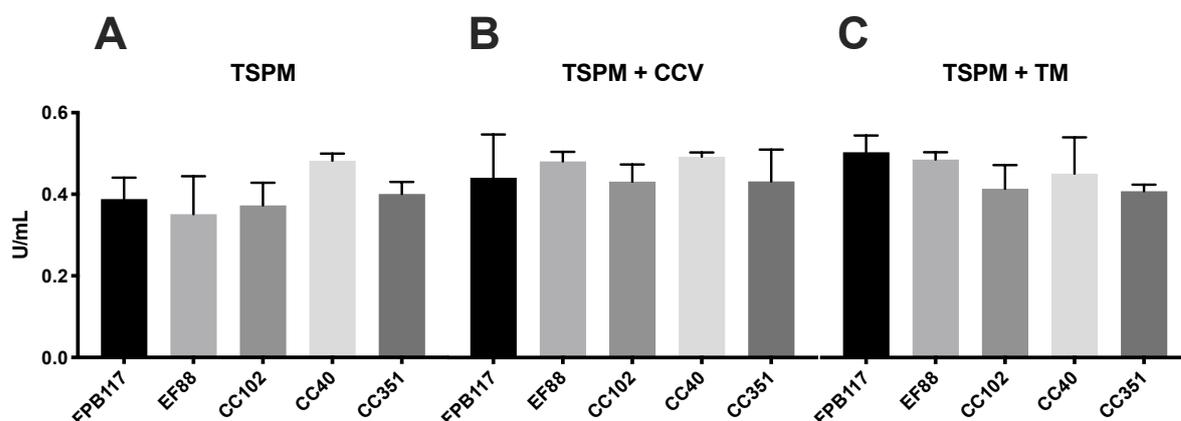
## **1.2. Atividade enzimática de proteases**

Proteases são enzimas que catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas, liberando aminoácidos livres ou peptídeos (LÓPEZ-OTÍN & OVERALL, 2002). Na nomenclatura internacional de classificação de enzimas (EC), as proteases pertencem à classe 3 (hidrolases) e subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As proteases podem ser classificadas quanto à natureza química do sítio catalítico/mecanismo de ação, sendo elas: serina proteases, cisteína proteases, aspartático proteases, treonina proteases e metaloproteases.

As proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos. Podem ser intra ou extracelulares, ligadas ou não à membrana. As proteases de origem microbiana representam aproximadamente 40% das enzimas comercializadas. Proteases de origem microbiana são preferidas às de origem animal e vegetal por possuírem maior quantidade de características desejáveis para sua aplicação biotecnológica, além de seu custo de produção ser menor do que das enzimas de origem animal e vegetal (Fedatto, 2004).

As proteases em humanos, apresentam papéis importantes em doenças como câncer e distúrbios inflamatórios e trombóticos (Cheronis & Repine, 1993). Sabendo isto, as proteases estão envolvidas na patogênese de várias doenças e podem ser alvos terapêuticos juntamente com seus inibidores (Safavi & Rostami, 2012).

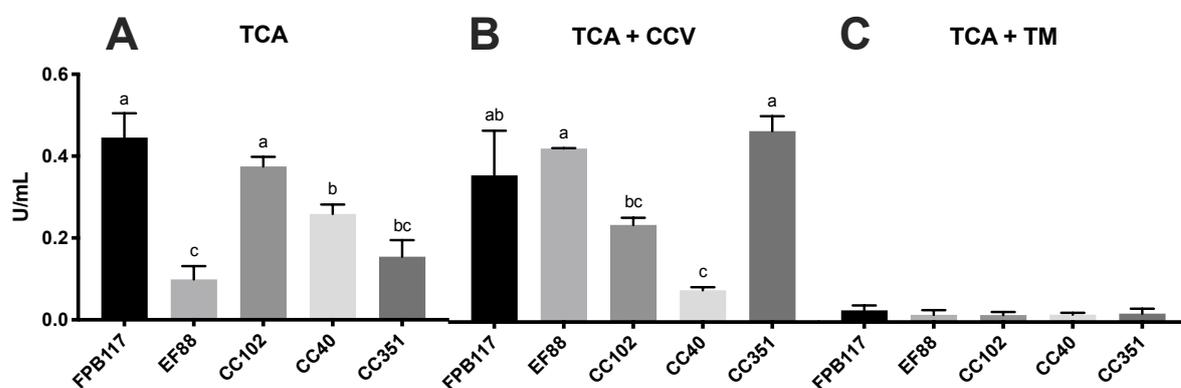
Em TSPM (Figura 28), não houve diferença estatística entre nenhum tratamento dentro da mesma biomassa de cultivo, tendo os valores em média em torno de 0,4 U/mL de extrato.



**Figura 28.** Atividade enzimática de proteases (U/mL) (pH 5,5) de extratos enzimáticos dos colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de semente de pinhão-manso (100%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (50%) + torta de macaúba (50%).

TSPM: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomteji*; CC351: *G. lucidum*.

Nos extratos enzimáticos de TCA, foi possível observar que em TCA + TM houve quantidades muito baixas de proteases (Figura 29). Em TCA e TCA + TCCV, houve diferença na presença de enzima nos extratos dos diferentes tratamentos. Em TCA *S. commune* (FPB117) e *F. hepatica* (CC102) apresentaram os maiores valores, de 0,44 e 0,37 U/mL, respectivamente. Em TCA + TCCV os maiores valores encontrados foram em *G. lucidum* (CC351) (0,46 U/mL), seguido de *P. pulmonarius* (EF88) (0,42 U/mL).



**Figura 29.** Atividade enzimática de proteases (U/mL) (pH 5,5) de extratos enzimáticos dos colonizados de FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351 em torta de

caroço de algodão (100%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de caroço de algodão (50%) + torta de macaúba (50%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). TCA: torta de caroço de algodão; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba; FPB117: *S. commune*; EF88: *P. pulmonarius*; CC102: *F. hepatica*; CC40: *P. lecomtei*; CC351: *G. lucidum*.

Ensaio de atividade enzimática de protease de extratos brutos de basidiomicetos (*P. pulmonarius*, *G. lucidum* e *Trametes* sp.) apresentaram valores acima de 160 U/mL, portanto, os valores encontrados nos extratos dos colonizados são valores ainda bastante baixos comparados dos encontrados em extratos de cogumelos (Inácio, et al., 2013). Entretanto, fatores como pH, concentração de contaminantes ou substrato, meio de cultivo, agitação e temperatura podem alterar a produtividade enzimática por microrganismos (KAUSHIK & MALIK, 2009). Sendo assim, é possível afirmar que microrganismos produtores de baixas quantidades de enzimas podem aumentar seu rendimento enzimático através de alterações nos parâmetros acima citados (KUMAR & TAKAGI, 1999).

### **1.3. Cultivo de cogumelos: escolha do macrofungo e dos substratos**

A escolha de duas espécies de macrofungo para ir adiante, fase de cultivo dos cogumelos, ensaios de atividade antimicrobiana e prebiótica foram feitos por meio das análises dos ensaios feitos até então com os fermentados dos macrofungos nas diferentes formulações de substrato com TSPM ou TCA.

O primeiro critério utilizado na triagem dos macrofungos foi o crescimento nos substratos. *A. subrufescens* (CC414) e FPB128 foram eliminados da triagem nesta primeira etapa pois apresentaram nenhum ou baixo crescimento no cultivo das placas e no cultivo em estado sólido durante 15 dias. As velocidades de crescimento não foram utilizadas como um critério de eliminação, mas apenas para verificar se houve crescimento ou não. Em relação ao crescimento fúngico, o teor de ergosterol foi usado como um indicativo, devido sua presença na membrana celular fúngica. Conforme discutido nos resultados do item 1.3.1., foi observado (Tabela 3) que a adição de casca de coco verde favoreceu o crescimento micelial dos basidiomicetos em TSPM.

O segundo critério, eliminatório, foi a capacidade de destoxificação dos basidiomicetos. Tratamentos com capacidades de degradação menores que 90% foram consideradas baixas, quais foram: *S. commune* (FPB117) em todos os

substratos, *F. hepatica* (CC102) em TSPM + CCV e TSPM + TM e *G. lucidum* (CC351) em todos os substratos (Tabela 7).

**Tabela 7.** Comparação dos resultados de velocidade de crescimento, degradação de ésteres de forbol, teor de ergosterol e atividade de proteases em TSPM e misturas.

Tratamento	Meio	V. de cresc. (cm/dia)	Degradação de ésteres (%)	Ergosterol (ug/g)	Proteases (u/mL)
<b>Controle</b>	TSPM	N. A.	N. A.	52,5 ± 7,7 <sup>Ba</sup>	N. A.
	TSPM+CCV	N. A.	N. A.	40,9 ± 1,4 <sup>Ca</sup>	N. A.
	TSPM+TM	N. A.	N. A.	35,3 ± 0,7 <sup>Ca</sup>	N. A.
<b><i>S. commune</i> (FPB117)</b>	TSPM	0,35 ± 0,0 <sup>Cb</sup>	59,3 ± 29,4 <sup>Ab</sup>	243,7 ± 138,9 <sup>Abb</sup>	0,39 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
	TSPM+CCV	0,56 ± 0,0 <sup>Aa</sup>	83,1 ± 1,4 <sup>Aab</sup>	1261,4 ± 136,7 <sup>Aa</sup>	0,44 ± 0,1 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	0,57 ± 0,0 <sup>Aa</sup>	88,4 ± 6,0 <sup>Aa</sup>	1268,7 ± 140,0 <sup>Aa</sup>	0,50 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
<b><i>P. pulmonarius</i> (EF88)</b>	TSPM	0,52 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	92,8 ± 7,4 <sup>Aa</sup>	476,2 ± 96,2 <sup>Aa</sup>	0,35 ± 0,1 <sup>Aa</sup>
	TSPM+CCV	0,31 ± 0,0 <sup>Bb</sup>	95,5 ± 1,7 <sup>Aa</sup>	763,1 ± 297,2 <sup>ABa</sup>	0,48 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	0,37 ± 0,0 <sup>Bb</sup>	98,18 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	694,1 ± 137,6 <sup>Ba</sup>	0,49 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
<b><i>F. hepatica</i> (CC102)</b>	TSPM	0,31 ± 0,0 <sup>BCa</sup>	91,3 ± 6,3 <sup>Aa</sup>	289,9 ± 45,4 <sup>Abb</sup>	0,37 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
	TSPM+CCV	0,31 ± 0,0 <sup>Aa</sup>	87,8 ± 8,2 <sup>Aa</sup>	588,2 ± 112,1 <sup>Ba</sup>	0,43 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	0,39 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	88,9 ± 7,2 <sup>Aa</sup>	198,2 ± 46,4 <sup>Cb</sup>	0,41 ± 0,1 <sup>Aa</sup>
<b><i>P. lecomtei</i> (CC40)</b>	TSPM	0,66 ± 0,0 <sup>Aa</sup>	98,4 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	382,0 ± 19,1 <sup>Aab</sup>	0,48 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
	TSPM+CCV	0,46 ± 0,0 <sup>Ab</sup>	94,3 ± 0,6 <sup>Ac</sup>	675,8 ± 184,3 <sup>ABa</sup>	0,43 ± 0,1 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	0,59 ± 0,0 <sup>Aa</sup>	97,7 ± 0,3 <sup>Ab</sup>	309,5 ± 32,4 <sup>Cb</sup>	0,42 ± 0,1 <sup>Aa</sup>
<b><i>G. lucidum</i> (CC351)</b>	TSPM	0,35 ± 0,0 <sup>Cb</sup>	89,7 ± 2,0 <sup>Aa</sup>	348,7 ± 19,8 <sup>Ab</sup>	0,41 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
	TSPM+CCV	0,27 ± 0,0 <sup>Bc</sup>	39,4 ± 2,0 <sup>Ab</sup>	845,1 ± 243,4 <sup>ABa</sup>	0,43 ± 0,1 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	0,44 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	89,3 ± 1,8 <sup>Aa</sup>	163,9 ± 30,6 <sup>Cb</sup>	0,40 ± 0,0 <sup>Aa</sup>

N.A. = não se aplica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre tratamentos e as letras minúsculas representam as diferenças entre os substratos. Controle: biomassa não colonizada; TSPM: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba.

Um outro critério foi a atividade antioxidante. Como houve redução na atividade antioxidante e no teor de fenólicos totais em relação aos controles em todos os tratamentos, foi avaliado quais se destacaram dentre os tratamentos com fungo. Pelo ensaio de DPPH\*, em TSPM todos os tratamentos apresentaram redução de TEAC em relação ao controle, de aproximadamente 90%. Pelo ensaio de ABTS\*\*, os tratamentos que tiveram menor queda na atividade antioxidante foram *S. commune* (FPB117) e *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM + CCV e *G. lucidum* (CC351) em TSPM. Dentre estes, apenas o *P. pulmonarius* (EF88) alcançou destoxificação satisfatória.

**Tabela 8.** Comparação dos resultados de atividade antioxidante, teor de fenólicos totais e a diferença de proteína em TSPM e misturas.

Tratamento	Meio	DPPH* (ug Trolox/mg extrato)	ABTS** (ug Trolox/mg extrato)	Fenois Totais (ug AG/mg extrato)	Diferença de proteína (%)
<b>Controle</b>	TSPM	109,4 ± 1,0 <sup>Aa</sup>	147,9 ± 9,3 <sup>Ac</sup>	49,3 ± 4,5 <sup>Aa</sup>	N.A.
	TSPM+CCV	77,3 ± 3,1 <sup>Ab</sup>	202,9 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	36,7 ± 1,7 <sup>Ab</sup>	N.A.
	TSPM+TM	80,8 ± 2,5 <sup>Ab</sup>	176,4 ± 5,5 <sup>Ab</sup>	30,8 ± 3,2 <sup>Ab</sup>	N.A.
<b><i>S. commune</i> (FPB117)</b>	TSPM	31,0 ± 13,7 <sup>Ba</sup>	40,4 ± 12,5 <sup>Ba</sup>	20,5 ± 0,3 <sup>Ba</sup>	-16,9 ± 16,3 <sup>Bcc</sup>
	TSPM+CCV	15,0 ± 4,7 <sup>Ca</sup>	64,5 ± 7,9 <sup>BCa</sup>	6,8 ± 1,2 <sup>Bb</sup>	51,5 ± 10,8 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	17,8 ± 1,6 <sup>BCa</sup>	19,5 ± 9,5 <sup>Ca</sup>	7,7 ± 1,5 <sup>Bcbs</sup>	18,5 ± 16,7 <sup>Abb</sup>
<b><i>P. pulmonarius</i> (EF88)</b>	TSPM	17,9 ± 4,1 <sup>BCa</sup>	18,5 ± 8,8 <sup>Bb</sup>	10,5 ± 1,7 <sup>Ca</sup>	-25,7 ± 12,2 <sup>Cc</sup>
	TSPM+CCV	56,0 ± 5,5 <sup>Ba</sup>	97,2 ± 23,6 <sup>Ba</sup>	8,7 ± 2,5 <sup>Bb</sup>	56,6 ± 20,8 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	15,9 ± 3,6 <sup>Ca</sup>	27,0 ± 13,6 <sup>Cb</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Db</sup>	10,8 ± 9,3 <sup>Bb</sup>
<b><i>F. hepatica</i> (CC102)</b>	TSPM	8,0 ± 3,9 <sup>BCa</sup>	29,3 ± 8,3 <sup>Bb</sup>	4,0 ± 2,3 <sup>Cb</sup>	7,6 ± 13,8 <sup>Ac</sup>
	TSPM+CCV	14,5 ± 2,6 <sup>Ca</sup>	43,7 ± 8,1 <sup>Bcab</sup>	10,2 ± 1,7 <sup>Ba</sup>	72,0 ± 12,2 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	27,8 ± 5,2 <sup>Ba</sup>	55,1 ± 6,3 <sup>Ca</sup>	9,2 ± 2,7 <sup>Bab</sup>	33,7 ± 12,6 <sup>Ab</sup>
<b><i>P. lecomtei</i> (CC40)</b>	TSPM	2,4 ± 0,2 <sup>Cb</sup>	42,1 ± 3,7 <sup>Ba</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Cb</sup>	1,2 ± 5,3 <sup>Abb</sup>
	TSPM+CCV	12,3 ± 4,4 <sup>Cab</sup>	23,2 ± 3,2 <sup>Ca</sup>	14,0 ± 0,7 <sup>Ba</sup>	47,5 ± 19,9 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	23,6 ± 1,1 <sup>BCa</sup>	6,4 ± 0,9 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Db</sup>	16,4 ± 19,2 <sup>Abb</sup>
<b><i>G. lucidum</i> (CC351)</b>	TSPM	19,1 ± 6,2 <sup>BCa</sup>	62,4 ± 13,6 <sup>Ba</sup>	17,3 ± 3,0 <sup>Bab</sup>	7,8 ± 15,1 <sup>Ab</sup>
	TSPM+CCV	54,3 ± 1,7 <sup>Ba</sup>	48,7 ± 8,7 <sup>BCa</sup>	31,8 ± 6,8 <sup>Aa</sup>	66,6 ± 24,3 <sup>Aa</sup>
	TSPM+TM	26,5 ± 5,2 <sup>BCa</sup>	35,3 ± 9,5 <sup>Ca</sup>	4,0 ± 0,3 <sup>Cdb</sup>	20,6 ± 13,3 <sup>Abb</sup>

N.A. = não se aplica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre tratamentos e as letras minúsculas representam as diferenças entre os substratos. Controle: biomassa não colonizada; TSPM: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba.

Outro importante fator, foi o efeito de aumento de concentração de proteína nos substratos, e isto foi percebido em todos os tratamentos que continham a mistura TSPM+ CCV.

Todos estes resultados combinados, conclui-se que a mistura com a casca de coco verde foi considerada a melhor condição a ser utilizada. A partir dos resultados de ergosterol, foi possível verificar que a adição de casca de coco verde na torta de semente de pinhão-manso propiciou o crescimento fúngico em todos os tratamentos (Tabela 7). Em relação à atividade antioxidante e fenois totais, a maioria dos tratamentos apresentaram maiores valores de TEAC quando nas misturas de TSPM + CCV do que no TSPM puro e nas misturas com TM (Tabela 8). E nas diferenças de proteína bruta em relação aos substratos não colonizados, a adição de CCV

proporcionou aumentos no teor de proteína bruta em todos os tratamentos, atingindo um aumento de até 72% (*F. hepatica* CC102).

O tratamento em TSPM + CCV observado que possuiu o maior potencial para estudo, combinando aumento de proteína e atividade antioxidante foi o *P. pulmonarius* (EF88). Este foi o tratamento com as maiores atividades antioxidantes, apesar de não ser o que apresentou as maiores concentrações de fenólicos totais, visto que há outros compostos que podem estar promovendo a atividade antioxidante. Além disso, seu aumento no teor de proteína bruta foi de 56,6%, indicativo de bioconversão de substratos lignocelulósicos.

Cogumelos do gênero *Pleurotus* são conhecidos por possuírem grande potencial de atividades farmacêuticas além de algumas utilizações medicinais. São conhecidos pelas suas atividades antioxidantes, atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e prebióticas (PATEL, 2012; AIDA, SHUHAIMI, *et al.*, 2009). Os *Pleurotus* também já são conhecidos como degradadores de ésteres de forbol, além de seus SMS's já serem estudados como potenciais na nutrição animal (DA LUZ, *et al.*, 2013).

Outro fator de grande importância acerca do fungo escolhido foi que cogumelos do gênero *Pleurotus* são cogumelos comestíveis com mercado crescente no Brasil, especialmente por uma espécie que não exige grandes dificuldades para seu cultivo e frutificação, pois não necessita controle de umidade e resiste a temperaturas de 25 a 30°C (da Silva, *et al.*, 2019).

Em torta de caroço de algodão, *A. subrufescens* (CC414) e FPB128 também não apresentaram crescimento nas placas e nos cultivos em estado sólido durante 15 dias e foram eliminados das análises seguintes. *S. commune* (FPB117) em TCA puro se destacou em relação a seu crescimento em estado sólido. *P. pulmonarius* (EF88) e *G. lucidum* (CC351) em TCA + CCV tiveram crescimentos baixos, comparados às outras condições (Tabela 9). Em relação ao gossipol, foram considerados biodestoxificadores os que apresentaram degradação acima de 90%. Nesta etapa, alguns tratamentos não atingiram a categoria de bons degradadores, quais são: *S. commune* (FPB117) em TCA e TCA+TM, *P. pulmonarius* (EF88) em TCA + CCV e *G. lucidum* (CC351) em TCA + CCV (Tabela 9), sendo assim eliminados na triagem.

Em relação ao crescimento fúngico na biomassa, *S. commune* (FPB117) em TCA + TM obteve a maior concentração de ergosterol. Em TCA, no geral, as misturas com CCV e TM propiciaram um maior crescimento fúngico.

**Tabela 9.** Comparação dos resultados de velocidade de crescimento, degradação de ésteres de forbol, teor de ergosterol e atividade de proteases em TCA e misturas.

Tratamento	Meio	V. de cresc. (cm/dia)	Degradação gossipol (%)	Ergosterol (ug/g)	Proteases (u/mL)
<b>Controle</b>	TCA	N. A.	N. A.	47,3 ± 2,3 <sup>Da</sup>	N. A.
	TCA + CCV	N. A.	N. A.	37,7 ± 0,0 <sup>Da</sup>	N. A.
	TCA + TM	N. A.	N. A.	51,7 ± 10,7 <sup>Da</sup>	N. A.
<b><i>S. commune</i> (FPB117)</b>	TCA	0,69 ± 0,1 <sup>Aa</sup>	78,5 ± 3,4 <sup>a</sup>	1593,3 ± 259,7 <sup>Ab</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>Aa</sup>
	TCA + CCV	0,38 ± 0,1 <sup>Abb</sup>	98,1 ± 2,6 <sup>Ba</sup>	1132,0 ± 103,5 <sup>Ac</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>ABa</sup>
	TCA + TM	0,57 ± 0,0 <sup>Ab</sup>	43,0 ± 19,3 <sup>Bb</sup>	2321,0 ± 99,0 <sup>Aa</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ab</sup>
<b><i>P. pulmonarius</i> (EF88)</b>	TCA	0,30 ± 0,0 <sup>Ca</sup>	97,2 ± 0,0 <sup>Aa</sup>	808,2 ± 23,7 <sup>Bcc</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>Cb</sup>
	TCA + CCV	0,20 ± 0,0 <sup>Db</sup>	70,9 ± 4,0 <sup>Bb</sup>	1111,9 ± 203,5 <sup>Abb</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
	TCA + TM	0,37 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	100 ± 0,0 <sup>Aa</sup>	1267,5 ± 96,0 <sup>Ba</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ab</sup>
<b><i>F. hepatica</i> (CC102)</b>	TCA	0,40 ± 0,1 <sup>BCa</sup>	94,4 ± 4,2 <sup>Aa</sup>	621,7 ± 25,8 <sup>Ca</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
	TCA + CCV	0,34 ± 0,0 <sup>BCa</sup>	95,4 ± 4,8 <sup>Aa</sup>	676,7 ± 33,7 <sup>Ca</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>Bcb</sup>
	TCA + TM	0,39 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	98,9 ± 1,9 <sup>Aa</sup>	844,7 ± 200,6 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ac</sup>
<b><i>P. lecomtei</i> (CC40)</b>	TCA	0,51 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	95,5 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	819,7 ± 234,8 <sup>BCa</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>Ba</sup>
	TCA + CCV	0,49 ± 0,1 <sup>Ab</sup>	91,3 ± 8,6 <sup>Aa</sup>	1291,0 ± 120,1 <sup>Aa</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>Cb</sup>
	TCA + TM	0,59 ± 0,0 <sup>Aa</sup>	99,1 ± 1,2 <sup>Aa</sup>	899,8 ± 208,9 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ac</sup>
<b><i>G. lucidum</i> (CC351)</b>	TCA	0,29 ± 0,0 <sup>Cb</sup>	90,5 ± 3,0 <sup>Aa</sup>	1090,6 ± 278,9 <sup>Ba</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>Bcb</sup>
	TCA + CCV	0,24 ± 0,0 <sup>Cdb</sup>	69,4 ± 13,4 <sup>Abb</sup>	871,9 ± 25,5 <sup>BCa</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>Aa</sup>
	TCA + TM	0,44 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	93,8 ± 2,9 <sup>Aa</sup>	869,35 ± 20,5 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ac</sup>

N.A. = não se aplica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre tratamentos e as letras minúsculas representam as diferenças entre os substratos. Controle: biomassa não colonizada; TCA: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba.

Em relação às substâncias bioativas, as atividades antioxidantes e os fenólicos totais em cada meio foram superiores nos controles, assim como foi observado em torta de semente de pinhão-manso. Isso é explicado pela produção de enzimas oxidativas pelos basidiomicetos para degradar os compostos lignocelulósicos presentes nas biomassas. Pelo ensaio de DPPH, os tratamentos com fungo apresentaram valores de TEAC semelhantes, a maioria variando entre 4,0 – 20,0  $\mu\text{g}$  de Trolox/mg de extrato. Pelo ensaio de ABTS, a maioria dos resultados de TEAC variaram entre 13,0 – 56,0  $\mu\text{g}$  de Trolox/mg de extrato. E pelo ensaio de fenóis totais, os resultados de EAG foram no geral mais baixos que os resultados em TSPM, variando no geral entre 0,0 – 17,0  $\mu\text{g}$  de AG/mg de extrato, indicando que possivelmente existam outros compostos responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos. Além disso, é possível observar que pelo ensaio de ABTS, as misturas

de TCA + CCV tratadas com *P. pulmonarius* (EF88) e *F. hepatica* (CC102) apresentaram os maiores valores (Tabela 10).

Quanto à capacidade de bioconversão a partir dos basidiomicetos, sendo indicada pela diferença do teor de proteína dos cultivos em relação ao controle, nenhum tratamento apresentou queda de teor (Tabela 10). Embora perceba-se uma tendência de aumento na concentração de proteína para alguns tratamentos, especialmente nos materiais tratados com *F. hepatica* (CC102) e *P. lecomtei* (CC40), a grande variabilidade nas repetições não permitiu detectar diferença significativa nos materiais colonizados. O tratamento de *F. hepatica* (CC102) em TCA + TM teve incremento de 44,7% na concentração de proteína em relação ao seu controle.

A partir dos resultados obtidos, as misturas de TCA + CCV e TCA + TM apresentaram algumas vantagens em relação à TCA pura, como maior crescimento fúngico, devido aos maiores teores de ergosterol, maiores atividades antioxidantes, maiores teores de fenois totais e maiores aumentos nos teores de proteína. A casca de coco foi escolhida como mistura para TCA devido aos ligeiramente maiores teores de TEAC observados pelo ensaio de ABTS (Tabela 10) e pela presença de atividade de proteases com esta mistura, fator não observado em nenhum tratamento com torta de macaúba (Tabela 9).

**Tabela 10.** Comparação dos resultados de atividade antioxidante, teor de fenólicos totais e a diferença de proteína em TCA e misturas.

Tratamento	Meio	DPPH* (ug Trolox/mg extrato)	ABTS** (ug Trolox/mg extrato)	Fenois Totais (ug AG/mg extrato)	Diferença de proteína (%)
<b>Controle</b>	TCA	53,5 ± 1,9 <sup>Aa</sup>	122,1 ± 7,6 <sup>Ab</sup>	21,3 ± 1,2 <sup>Aa</sup>	N.A.
	TCA + CCV	34,6 ± 3,7 <sup>Ab</sup>	125,9 ± 3,3 <sup>Ab</sup>	24,3 ± 1,0 <sup>Aa</sup>	N.A.
	TCA + TM	42,3 ± 3,3 <sup>Aa</sup>	147,9 ± 7,0 <sup>Aa</sup>	16,0 ± 2,2 <sup>Ab</sup>	N.A.
<b><i>S. commune</i> (FPB117)</b>	TCA	14,1 ± 9,1 <sup>Cb</sup>	37,2 ± 22,6 <sup>Bcb</sup>	12,0 ± 3,7 <sup>Ba</sup>	11,7 ± 5,1 <sup>Ab</sup>
	TCA + CCV	19,5 ± 2,9 <sup>BCa</sup>	56,2 ± 7,3 <sup>Ca</sup>	9,3 ± 3,3 <sup>Ba</sup>	36,5 ± 12,2 <sup>Aa</sup>
	TCA + TM	16,0 ± 1,2 <sup>Ba</sup>	48,2 ± 7,8 <sup>Ba</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	18,5 ± 16,7 <sup>Ab</sup>
<b><i>P. pulmonarius</i> (EF88)</b>	TCA	12,3 ± 2,9 <sup>BCa</sup>	23,1 ± 7,0 <sup>Cb</sup>	5,8 ± 0,7 <sup>Bcb</sup>	34,3 ± 5,5 <sup>Aa</sup>
	TCA + CCV	11,0 ± 2,4 <sup>Ca</sup>	34,9 ± 6,5 <sup>Ba</sup>	9,2 ± 0,9 <sup>Ba</sup>	36,0 ± 15,7 <sup>Aa</sup>
	TCA + TM	18,7 ± 10,4 <sup>Ba</sup>	15,3 ± 0,9 <sup>Cb</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Bc</sup>	10,8 ± 9,3 <sup>Ab</sup>
<b><i>F. hepatica</i> (CC102)</b>	TCA	4,8 ± 4,6 <sup>Cb</sup>	23,1 ± 7,0 <sup>Bcb</sup>	12,8 ± 2,0 <sup>ABa</sup>	17,0 ± 8,4 <sup>Ab</sup>
	TCA + CCV	20,2 ± 0,6 <sup>Ba</sup>	52,6 ± 6,4 <sup>Cda</sup>	14,5 ± 3,7 <sup>ABa</sup>	34,0 ± 16,7 <sup>Aa</sup>
	TCA + TM	18,9 ± 0,6 <sup>Ba</sup>	30,8 ± 2,4 <sup>Bcb</sup>	17,0 ± 2,3 <sup>Aa</sup>	44,7 ± 10,7 <sup>Aa</sup>
<b><i>P. lecomtei</i></b>	TCA	4,2 ± 3,7 <sup>BCa</sup>	15,3 ± 6,2 <sup>BCa</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>Ca</sup>	14,8 ± 6,5 <sup>Ab</sup>

<b>(CC40)</b>	TCA + CCV	15,4 ± 5,5 <sup>BCa</sup>	24,6 ± 3,5 <sup>Da</sup>	2,3 ± 1,8 <sup>Ba</sup>	24,0 ± 9,8 <sup>Abab</sup>
	TCA + TM	21,3 ± 9,9 <sup>Ba</sup>	13,8 ± 2,6 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	41,6 ± 23,1 <sup>Aa</sup>
<b>G. lucidum (CC351)</b>	TCA	13,1 ± 6,5 <sup>Ba</sup>	34,5 ± 6,8 <sup>B</sup>	14,0 ± 5,3 <sup>ABa</sup>	11,7 ± 14,7 <sup>Ab</sup>
	TCA + CCV	19,5 ± 3,3 <sup>BCa</sup>	56,6 ± 18,2 <sup>C</sup>	7,2 ± 4,5 <sup>Bab</sup>	13,5 ± 8,0 <sup>Ab</sup>
	TCA + TM	19,5 ± 10,8 <sup>Ba</sup>	34,1 ± 4,7 <sup>BC</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Bb</sup>	7,7 ± 3,0 <sup>Aa</sup>

N.A. = não se aplica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre tratamentos e as letras minúsculas representam as diferenças entre os substratos. Controle: biomassa não colonizada; TCA: torta de semente de pinhão-manso; CCV: casca de coco verde; TM: torta de macaúba.

Na mistura de casca de coco verde com a TCA, *S. commune* (FPB117), *P. lecomtei* (CC40) e *F. hepatica* (CC102) foram capazes de crescer nas tortas, degradar acima de 90% o gossipol presente no substrato, possuir atividades antioxidantes semelhantes estatisticamente entre si (apenas *S. commune* (FPB117) pelo ensaio de ABTS apresentou valor maior), aumento proporcional na concentração de proteína, indicando serem bioconversores. *P. lecomtei* (CC40) e *S. commune* (FPB117) obtiveram resultados de teores de ergosterol quase o dobro do teor de *F. hepatica* (CC102) (1291,0 e 1132,0  $\mu\text{g/g}$ ; contra 676,7  $\mu\text{g/g}$ ). Em relação à atividade antioxidante, pelo ensaio de DPPH, *F. hepatica* (CC102) apresentou o maior valor de TEAC e pelo ensaio de ABTS, *S. commune* (FPB117) que apresentou o maior valor. Entretanto, os três tratamentos apresentaram valores próximos nos dois ensaios (Tabela 10). Em relação ao aumento aparente de proteína bruta, *S. commune* (FPB117) apresentou 36,2%, *F. hepatica* (CC102) 34% e *P. lecomtei* (CC40) apresentou 24,0%.

Devido os três tratamentos apresentarem características promissoras para as finalidades propostas neste trabalho (atividade antioxidante e ganho de substâncias bioativas). Nenhuma destas espécies é comercializada, portanto foi utilizado como critério de seleção a espécie ser comestível. Além disso, como o objetivo deste trabalho é utilizar o SMS como fonte de bioativos, também foi avaliado qual basidiomicetos tem mais facilidade para frutificar.

*S. commune* (FPB117) é considerado um cogumelo não comestível, devido sua consistência fibrosa, apesar de ser consumido em comunidades tradicionais do México (RUAN-SOTO, et al., 2006). Seu cultivo é considerado fácil, bem como da obtenção dos seus basidiomas, sua temperatura ótima de crescimento é de 35°C (DASANAYAKA & WIJEYARATNE, 2017).

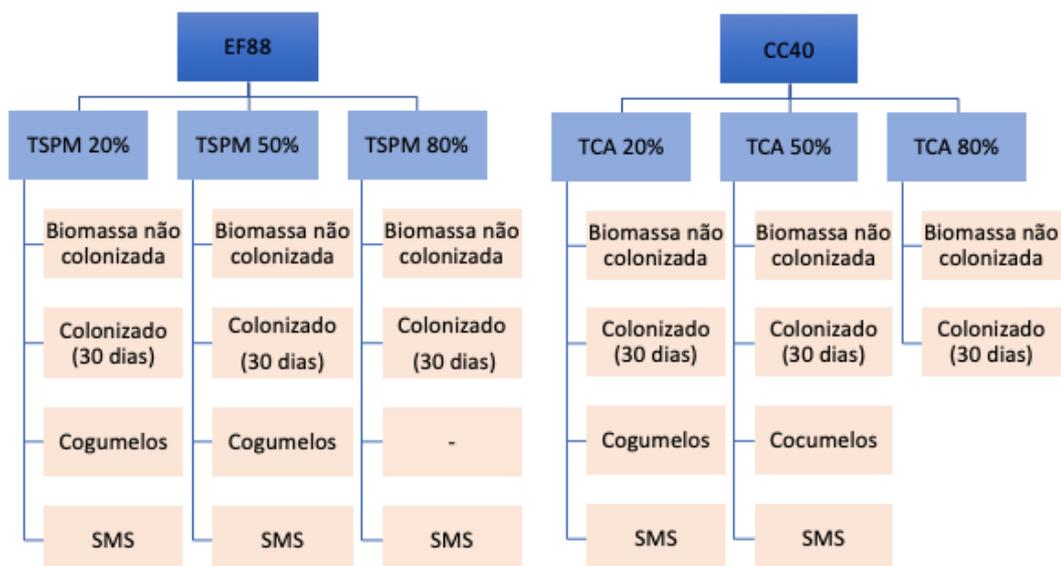
Os basidiomas de *F. hepatica* (CC102) são comestíveis, foi utilizado como substituto no passado e hoje é encontrado apenas em alguns mercados na França. É reportado que seu gosto é amargo e lembra o gosto de carne crua. Sua condição ótima de frutificação é em temperatura de 15° a 20°C e 70% de umidade (Hattori & Tanaka, 1997). Na maior parte do Brasil, portanto, sua frutificação é onerosa pois requer a utilização de câmaras frias.

*P. lecomtei* (CC40) é uma espécie de basidiomiceto encontrado facilmente nas florestas tropicais brasileiras e consumido comumente em comunidades indígenas brasileiras e em algumas regiões do Japão (VARGAS-ISLA, et al., 2013). Como seus basidiomas são facilmente encontrados em florestas tropicais, não é necessário o uso câmaras frias para sua frutificação.

Entre *S. commune* (FPB117) e *P. lecomtei* (CC40), os que possuem maior facilidade para sua frutificação pelo clima brasileiro, o critério de desempate usado nesta etapa da triagem foi a velocidade de crescimento maior do *P. lecomtei* (CC40). Além disto, a falta de conhecimento científico sobre o *P. lecomtei* (CC40), uma espécie nativa brasileira, aponta a necessidade de aprofundar os estudos em suas propriedades. As atividades antioxidantes, as  $\beta$ -glucanas e atividades antitumorais de *S. commune* (FPB117) são amplamente discutidas no mundo científico (KOMATSU, 1969; DU, 2017; ARBAAYAH, 2013; KLAUS, 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre *P. lecomtei* (CC40). Na base de dados Capes Periódicos, são encontradas 18 publicações sobre esta espécie e no Scopus apenas 2. Portanto, há uma falta de dados a respeito de suas possíveis utilizações farmacêuticas e medicinais. A partir dos resultados obtidos na triagem deste estudo, é possível identificar que *P. lecomtei* (CC40) é uma espécie promissora para seu cultivo em substratos de torta de semente de algodão. A investigação da atividade antimicrobiana, antioxidante e prebiótica de seus extratos podem ser de grande relevância para enriquecimento do conhecimento científico.

## **2. Produção dos colonizados, SMS e cogumelos e seus extratos**

Nesta etapa foram obtidas as amostras conforme Figura 30. Nas condições de TSPM e TCA a 80% não houve formação de basidiomas. Na condição de TCA 80% obteve-se o SMS, porém por ter havido alto índice de contaminação com outros microrganismos neste tratamento, a etapa de frutificação não foi continuada sendo assim, estas amostras foram desconsideradas dos ensaios posteriores.



**Figura 30.** Esquema das amostras obtidas a partir da colonização de *P. pulmonarius* (EF88) em torta de semente de pinhão-manso (TSPM) e *P. lecomtei* (CC40) em torta de caroço de algodão (TCA), com diferentes proporções de casca de coco verde.

As biomassas não colonizadas (misturas) e os colonizados de 30 dias foram submetidos às análises de teor de compostos tóxicos, composição centesimal, teor de  $\beta$ -glucanas, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e atividade prebiótica. As amostras foram nomeadas conforme Tabela 11.

**Tabela 11.** Códigos das amostras utilizadas nas análises de teor de compostos tóxicos, composição centesimal e teor de  $\beta$ -glucanas.

Código	Amostra
TCA M 20	Biomassa não colonizada de TCA a 20%
TCA M 50	Biomassa não colonizada de TCA a 50%
TCA M 80	Biomassa não colonizada de TCA a 80%
TCA C 20	Colonizado (30 dias) de CC40 em TCA 20%
TCA C 50	Colonizado (30 dias) de CC40 em TCA 50%
TCA C 80	Colonizado (30 dias) de CC40 em TCA 80%
TSPM M 20	Biomassa não colonizada de TSPM a 20%
TSPM M 50	Biomassa não colonizada de TSPM a 50%
TSPM M 80	Biomassa não colonizada de TSPM a 80%
TSPM C 20	Colonizado (30 dias) de EF88 em TCA 20%
TSPM C 50	Colonizado (30 dias) de EF88 em TCA 20%
TSPM C 80	Colonizado (30 dias) de EF88 em TCA 20%

TCA: torta de caroço de algodão; TSPM: torta de semente de pinhão manso; CC40: *Panus lecomtei*; EF88: *P. pulmonarius*.

Devido à grande quantidade de amostras obtidas no experimento, para os ensaios de atividade antioxidante, antimicrobiana e prebiótica foram utilizados apenas os extratos das biomassas colonizadas por 30 dias. Devido à pequena quantidade de cogumelos obtida, os mesmos não foram utilizados em nenhuma análise. Os extratos foram nomeados com códigos descritos na Tabela 12.

**Tabela 12.** Descrição dos códigos dos extratos

<b>Código</b>	<b>Extrato</b>
<b>MCC20</b>	Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de CC40 em TCA a 20%
<b>MCC50</b>	Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de CC40 em TCA a 50%
<b>MCC80</b>	Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de CC40 em TCA a 80%
<b>MEF20</b>	Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de EF88 em TSPM a 20%
<b>MEF50</b>	Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de EF88 em TSPM a 50%
<b>MEF80</b>	Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de EF88 em TSPM a 80%
<b>ACC20</b>	Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de CC40 em TCA a 20%
<b>ACC50</b>	Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de CC40 em TCA a 50%
<b>ACC80</b>	Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de CC40 em TCA a 80%
<b>AEF20</b>	Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de EF88 em TSPM a 20%
<b>AEF50</b>	Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de EF88 em TSPM a 50%
<b>AEF80</b>	Extrato aquoso do colonizado de 30 dias de EF88 em TSPM a 80%

TCA: torta de caroço de algodão; TSPM: torta de semente de pinhão manso; CC40: *Panus lecomtei*; EF88: *P. pulmonarius*.

### 2.1. Compostos tóxicos

De acordo com a Diretoria Geral De Saúde e Segurança Alimentar Europeia (DG SANTE, em inglês), são considerados seguros os níveis de 3ppm de ésteres de forbol para nutrição animal, e para humanos ainda não existem dados suficientes para afirmar um consumo seguro de ésteres de forbol (DG SANTE, 2016).

**Tabela 13.** Concentração de ésteres de forbol (ppm) nos colonizados e SMS de *P. pulmonarius* (EF88) em torta de semente de pinhão-manso (TSPM) em diferentes concentrações com coco verde.

<b>Substrato</b>	<b>Amostra</b>	<b>ppm</b>
------------------	----------------	------------

<i>P. pulmonarius</i> (EF88)	Mistura	237,7 ± 0,2
TSPM 20%	Colonizado	10,8 ± 0,0
	SMS	1,6 ± 0,0
<i>P. pulmonarius</i> (EF88)	Mistura	601,8 ± 0,0
TSPM 50%	Colonizado	55,0 ± 0,0
	SMS	5,7 ± 0,0
<i>P. pulmonarius</i> (EF88)	Mistura	64,3 ± 0,1
TSPM 80%	Colonizado	46,1 ± 0,0
	SMS	17,6 ± 0,0

Em TSPM, foi possível observar que a concentração de ésteres de forbol foi maior que 3ppm em todas as condições, exceto no SMS de TSPM 20% (Tabela 13). Os colonizados de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM 50% e em TSPM 80% foram os que apresentaram maiores concentrações, sendo de 55,0 e 46,2 ppm de ésteres de forbol em base seca, respectivamente. Estes teores foram maiores pelo fato da maior concentração de TSPM nestas condições. Em TSPM 20%, o colonizado continha 10,8 ppm de ésteres e no SMS possuiu concentração de 1,6 ppm. A partir dos resultados da tabela acima, é possível indicar que o SMS de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM 20% foi a única capaz de apresentar níveis de ésteres de forbol seguros para alimentação, caso esta biomassa fosse a única fonte nutricional do animal. Entretanto, testes de toxicidade *in vivo* são necessários para comprovar a não ausência de toxicidade.

**Tabela 14.** Concentração e gossipol (ppm) nos colonizados e SMS de *P. lecomtei* (CC40) em torta de caroço de algodão (TCA) em diferentes concentrações com coco verde.

Substrato	Amostra	ppm
<i>P. lecomtei</i> (CC40)	Mistura	0,11 ± 0,01
TCA 20%	Colonizado	0,11 ± 0,01
	SMS	0,09 ± 0,01
<i>P. lecomtei</i> (CC40)	Mistura	0,32 ± 0,04
TCA 50%	Colonizado	0,19 ± 0,01
	SMS	0,09 ± 0,01

<i>P. lecomtei</i>	Mistura	0,39 ± 0,07
(CC40)	Colonizado	0,13 ± 0,03
TCA 80%	SMS	-

Conforme Tabela 14, é possível observar que as concentrações de gossipol variaram de 0,09 a 0,11 ppm de gossipol em base seca. Nas misturas os teores de gossipol já ficaram abaixo dos níveis seguros devido à adição prévia de cal nas biomassas e ao processo de autoclavagem, necessários para o ajuste do pH e esterilização da biomassa para a inoculação do fungo, respectivamente. Níveis de gossipol em TCA sem nenhum tipo de tratamento estão em torno de 2446,93ppm (Soares Neto, 2019). Nos SMS (de 20% e 50% de TCA) as concentrações de ésteres foram de 0,09ppm. Nos colonizados, TCA 50% teve a maior concentração, de 0,19ppm; TCA 80% de 0,13 ppm e TCA 20% de 0,11 ppm. Testes *in vivo* são necessários para comprovar sua não toxicidade.

Em animais não ruminantes, níveis de gossipol a partir de 200 e 300 ppm apresentam toxicidade. Em suínos, estudos demonstram que adultos não toleram mais de 60 ppm de gossipol em TCA. Os ruminantes demonstraram tolerar níveis maiores de gossipol, os níveis em cabras, os mais sensíveis, variam entre 350-500 mg/g de gossipol/TCA (SAUNDERS, 2017).

## 2.2. Composição centesimal

De acordo com a Tabela 15, foi possível observar que houve redução no teor de matéria mineral no SMS nas três diferentes concentrações de TSPM em relação aos colonizados e às misturas. Em relação às diferentes concentrações, TSPM 80% apresenta o maior teor de matéria mineral. É sabido que o substrato influencia na composição de minerais dos cogumelos, devido as hifas ficarem em contato direto com este material, utilizando assim os elementos essenciais para o crescimento dos basidiomas (KWAK, JUNG e KIM, 2008). Portanto, a redução no teor de matéria mineral nos SMS, indica que os minerais presentes na biomassa foram possivelmente consumidos pelos basidiomas para seu desenvolvimento. Por este motivo, o SMS de TSPM 80% não apresentou redução no teor de MM pela não produção de cogumelos nesta condição.

Em relação ao teor de lipídeos (extrato etéreo), foi observada redução nos colonizados em relação às misturas, e redução nos SMS em relação aos colonizados (Tabela 15). Esta redução ocorre devido à necessidade de consumo de lipídeos para o metabolismo dos basidiomicetos. A mistura de TSPM 80% apresentou o maior teor de lipídeos, sendo de 10,96%, enquanto de TSPM 20% e 50% foram de 6,82 e 7,45%. Nos colonizados houve redução nestes valores, e nos SMSs os teores de EE foram ainda mais reduzidos, alcançando de 0,30%, 0,53% e 1,32% em TSPM 20%, 50% e 80%, respectivamente. O conteúdo de extrato etéreo de cogumelos comestíveis pode variar de acordo com a espécie, entre 1-10%, sendo que a maior parte deste valor é composta por ácidos graxos insaturados. Em cogumelos do gênero *Pleurotus* spp., o ácido linoleico é ácido graxo encontrado em maior proporção (CASTRO, PAIVA, et al., 2007). O ácido linoleico é um ácido graxo essencial, porém não é produzido pelo ser humano, sendo obtido a partir da alimentação. Seu consumo ajuda a prevenir doenças cardiovasculares e câncer, além de modular as respostas inflamatórias e imunes, reduzir a gordura corporal e aumentar a massa óssea (DILZER e PARK, 2012).

Quanto à proteína bruta, nas concentrações de TSPM de 50% e 80% foi observado um aumento no teor nos SMS em relação aos colonizados e misturas (Tabela 15). Como basidiomicetos não são capazes de fixar nitrogênio, este é um indicativo de bioconversão do substrato por parte dos fungos. Em 20%, foi observada redução no teor de proteína nos SMS em relação ao colonizado, indicando que possivelmente os fungos precisaram degradar as proteínas para promover seu crescimento. Considerando que a mistura de TSPM 50% possui 14,44% de PB e que a mistura de TSPM 80% possui teor de 17,42%, é possível concluir que em TSPM 50% houve um aumento maior de proteína bruta (aproximadamente 4,5% em relação à mistura) do que na concentração de 80% (aproximadamente 2% em relação à mistura). Já em relação ao SMS destas duas misturas, o aumento foi de 29,7% e 24,9% em relação à mistura inicial.

**Tabela 15.** Matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e teor de proteína bruta (PB) das misturas, colonizados e SMS obtidos a partir da colonização de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (TSPM) em diferentes concentrações com coco verde.

Substrato	Amostra	MM (%)	EE (%)	PB (%)
-----------	---------	--------	--------	--------

<b>TSPM 20%</b>	<b>Mistura</b>	5,53 ± 0,3 <sup>Ab</sup>	6,82 ± 0,1 <sup>Ba</sup>	11,78 ± 0,0 <sup>Bab</sup>
	<b>Colonizado</b>	5,74 ± 0,5 <sup>Aa</sup>	5,66 ± 0,2 <sup>Ab</sup>	12,69 ± 0,2 <sup>Ba</sup>
	<b>SMS</b>	2,34 ± 0,3 <sup>Bb</sup>	0,30 ± 0,1 <sup>Cc</sup>	11,53 ± 0,4 <sup>Bb</sup>
<b>TSPM 50%</b>	<b>Mistura</b>	5,56 ± 0,0 <sup>Ab</sup>	7,45 ± 0,6 <sup>Ba</sup>	14,44 ± 1,8 <sup>Ab</sup>
	<b>Colonizado</b>	5,95 ± 0,2 <sup>Aa</sup>	4,19 ± 0,1 <sup>Ab</sup>	19,13 ± 1,2 <sup>Aab</sup>
	<b>SMS</b>	2,64 ± 0,3 <sup>Bb</sup>	0,53 ± 0,0 <sup>Bc</sup>	23,96 ± 1,8 <sup>Aa</sup>
<b>TSPM 80%</b>	<b>Mistura</b>	6,39 ± 0,2 <sup>Aa</sup>	10,96 ± 0,2 <sup>Aa</sup>	17,42 ± 1,2 <sup>Ab</sup>
	<b>Colonizado</b>	6,34 ± 0,1 <sup>Aa</sup>	5,11 ± 0,2 <sup>Bb</sup>	19,28 ± 1,6 <sup>Ab</sup>
	<b>SMS</b>	4,82 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	1,32 ± 0,8 <sup>Ac</sup>	23,19 ± 0,8 <sup>Aa</sup>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre uma mesma amostra em concentrações diferentes e as letras minúsculas representam diferenças entre amostras diferentes de uma mesma concentração.

Em TCA, o teor de matéria mineral se comportou diferente do que observado em TSPM (Tabela 16). Houve aumento no teor de MM dos SMS em relação aos colonizados e às misturas, indicando que os minerais se mantiveram em maior concentração no micélio do que nos cogumelos. Vale ressaltar que a produção de cogumelos de *P. lecomtei* (CC40) foi muito abaixo que os produzidos por *P. pulmonarius* (EF88), posto isso, a transferência dos minerais aos cogumelos não fora realizada. Assim, ocorreu com os minerais o mesmo que ocorre com a PB, uma concentração em função da perda de massa ( $\text{CO}_2$ ).

Como ocorrido em TSPM, também houve redução no teor de extrato etéreo dos colonizados em relação às misturas (Tabela 16). A mistura de TCA 50% foi a que apresentou maior teor de lipídeos (3,80%), seguida a de TCA 80% (2,87%) e de TCA 20% (1,98%). Assim como ocorrido com as amostras de TSPM, o colonizado/SMS a partir da mistura com maior teor de lipídeos também obteve maiores teores de lipídeos. Os teores de EE dos colonizados e são semelhantes ao teor de lipídeos encontrado em um colonizado de *Panus giganteus* em palha de trigo (uma mistura com 1,9% de teor de lipídeos, sendo em sua maioria gorduras insaturadas, importantes e benéficas para a alimentação (WONG, 2012). A mistura de TCA 20% possui teor de 1,98%, enquanto seu colonizado possui teor de 1,56% e seu SMS de 1,10% (Tabela 16).

Em relação à proteína bruta, foi observado um aumento em todas as concentrações do colonizado em relação à mistura, exceto de TCA 80% (Tabela 16). Em um estudo prévio de colonização de *P. giganteus* em palha de trigo que continha 10,9% de PB, foi encontrado no fermentado um teor de 11,3%, um aumento de

aproximadamente 4% no teor de proteína bruta, semelhante ao aumento ocorrido no colonizado de TCA 20% (8%) (WONG, 2012). O maior aumento de concentração de proteína (17,8%) no colonizado se deu em TCA 50%. O SMS de TCA 20% foi o único que apresentou aumento em relação ao colonizado, sendo de 68% maior que o teor de proteína da mistura, enquanto o SMS de TCA 50% aumentou 17% em relação ao teor de proteína da mistura, ou seja, manteve a concentração de proteína do colonizado. Este é um indicativo de que em TCA 20% houve maior bioconversão das moléculas, aumentando assim a concentração de proteína bruta de forma proporcional.

**Tabela 16.** Matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e teor de proteína bruta (PB) das misturas, colonizados e SMSs obtidos a partir da colonização de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (TCA) em diferentes concentrações com coco verde.

Substrato	Amostra	MM (%)	EE (%)	PB (%)
TCA 20%	Mistura	2,00 ± 0,0 <sup>Bb</sup>	1,98 ± 0,15 <sup>Bb</sup>	9,06 ± 0,2 <sup>Cb</sup>
	Colonizado	1,78 ± 0,1 <sup>Bb</sup>	1,56 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	9,78 ± 0,2 <sup>Cb</sup>
	SMS	5,18 ± 0,9 <sup>Ba</sup>	1,10 ± 0,1 <sup>Ac</sup> □	15,16 ± 1,2 <sup>Ba</sup>
TCA 50%	Mistura	2,32 ± 0,0 <sup>Ab</sup>	3,80 ± 0,3 <sup>Aa</sup>	20,17 ± 1,1 <sup>Bb</sup>
	Colonizado	2,69 ± 0,1 <sup>Ab</sup>	1,71 ± 0,0 <sup>Bb</sup>	23,75 ± 0,2 <sup>Ba</sup>
	SMS	6,33 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	0,92 ± 0,1 <sup>Ac</sup> □	23,58 ± 1,6 <sup>Aa</sup>
TCA 80%	Mistura	2,34 ± 0,1 <sup>Aa</sup>	2,87 ± 0,2 <sup>Ba</sup>	25,66 ± 1,6 <sup>Aa</sup>
	Colonizado	1,96 ± 0,2 <sup>Ba</sup>	2,54 ± 0,1 <sup>Aa</sup>	24,65 ± 0,0 <sup>Aa</sup>
	SMS	-	-	-

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre uma mesma amostra em concentrações diferentes e as letras minúsculas representam diferenças entre amostras diferentes de uma mesma concentração.

As análises de FDN e FDA visam calcular a porcentagem de fibras solúveis e insolúveis de uma amostra. As principais fibras insolúveis são a celulose e a lignina, enquanto a hemicelulose é a principal fibra solúvel. A FDN é a fração nutricional correspondente à soma da hemicelulose (HEM), celulose (CEL) e lignina (LIG). A hemicelulose é de alta digestibilidade, a celulose tem digestibilidade variável (é afetada pela maturidade das plantas) e a lignina é praticamente indigerível. A FDA corresponde à soma de celulose e lignina. Quanto maior o teor de FDA, maior a chance de haver altos teores de lignina, implicando numa digestibilidade reduzida. Sendo assim, os teores de hemicelulose foram calculados pela diferença entre FDA e

FDN, e a celulose foi calculada pela diferença entre lignina e a FDA (NOGUEIRA, 2005).

Conforme observado na Tabela 17, houve aumento no teor de lignina dos colonizados e dos SMS em relação às misturas, nas três concentrações de TSPM. Em TSPM 50%, não houve diferença estatística entre colonizado, SMS e mistura, sendo de 9,79%, 10,94% e 9,54%, respectivamente. O menor teor de lignina nos SMS foi de 9,95% (TSPM 80%) e o maior foi de 14,79% (TSPM 20%). Entretanto, nos SMS foram observadas reduções nos teores de hemicelulose em todas as concentrações de TSPM em relação às suas respectivas biomassas, indicando que *P. pulmonarius* (EF88) nestas condições degradou preferencialmente a hemicelulose. Além disso, no SMS de TSPM 80% foi observada também um aumento no teor de lignina em relação à mistura e ao colonizado, enquanto a celulose permaneceu igual ao longo de todas as etapas.

Na concentração de TSPM 20% houve aumento no teor de celulose em relação às misturas, isto pode ser explicado devido a semelhança das fibras que compõem a parede celular dos fungos com a celulose, como por exemplo a quitina, que é insolúvel tanto em detergente neutro quanto em detergente ácido (KUMAR, 2000). Outra possibilidade é de que este fungo é capaz de degradar, em maior escala, hemicelulose, e, em menor escala, lignina e celulose. Estas hipóteses, no entanto, só podem ser esclarecidas se análises específicas dos açúcares que compõem o material lignocelulósicos, utilizando para isso técnicas cromatográficas, como a metodologia NREL/TP-510-42618 (SLUITER, HAMES, et al., 2008).

**Tabela 17.** Teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), celulose (CEL) e hemicelulose (HEM) das misturas, colonizados e SMS obtidos a partir da colonização de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (TSPM) em diferentes concentrações com coco verde.

Substrato	Amostra	FDN (%)	FDA (%)	LIG (%)	CEL(%)	HEM (%)
TSPM 20%	Mistura	55,70 ± 2,6 <sup>Bb</sup>	44,21 ± 2,8 <sup>Ab</sup>	9,35 ± 0,4 <sup>Ab</sup>	33,66 ± 1,7 <sup>Ab</sup>	13,48 ± 1,1 <sup>Ba</sup>
	Colonizado	66,55 ± 3,2 <sup>Aa</sup>	51,00 ± 5,1 <sup>Aab</sup>	12,38 ± 0,4 <sup>Aab</sup>	41,13 ± 2,8 <sup>Aa</sup>	12,32 ± 1,0 <sup>Bab</sup>
	SMS	64,54 ± 4,5 <sup>Aa</sup>	53,07 ± 3,8 <sup>Aa</sup>	14,79 ± 2,9 <sup>Aa</sup>	38,28 ± 1,4 <sup>Aa</sup>	11,47 ± 0,8 <sup>Ab</sup>
TSPM 50%	Mistura	61,56 ± 0,1 <sup>Ab</sup>	45,35 ± 0,3 <sup>Aa</sup>	9,54 ± 0,9 <sup>Aa</sup>	35,81 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	16,22 ± 0,6 <sup>Aa</sup>
	Colonizado	68,57 ± 3,5 <sup>Aa</sup>	46,96 ± 3,0 <sup>Aa</sup>	9,79 ± 1,0 <sup>Ba</sup>	37,17 ± 2,1 <sup>ABa</sup>	16,28 ± 1,5 <sup>Aa</sup>
	SMS	58,37 ± 3,1 <sup>ABb</sup>	47,98 ± 2,5 <sup>Aa</sup>	10,94 ± 1,2 <sup>Ba</sup>	37,03 ± 1,6 <sup>ABa</sup>	10,40 ± 0,8 <sup>Ab</sup>
TSPM 80%	Mistura	57,18 ± 0,3 <sup>ABa</sup>	41,76 ± 1,1 <sup>Aa</sup>	6,71 ± 0,1 <sup>Bb</sup>	35,05 ± 1,0 <sup>Aa</sup>	15,42 ± 0,9 <sup>ABa</sup>
	Colonizado	55,80 ± 0,9 <sup>Ba</sup>	42,58 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	7,88 ± 0,3 <sup>Cab</sup>	34,70 ± 0,5 <sup>Ba</sup>	13,21 ± 0,6 <sup>Ba</sup>

**SMS**             $51,66 \pm 4,2^{Ba}$      $42,75 \pm 3,7^{Ba}$      $9,95 \pm 1,9^{Ba}$      $31,38 \pm 6,1^{Ba}$      $10,16 \pm 1,5^{Ab}$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre uma mesma amostra em concentrações diferentes e as letras minúsculas representam diferenças entre amostras diferentes de uma mesma concentração.

Ao contrário observado da colonização de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM, *P. lecomtei* (CC40) em TCA demonstrou ser capaz de degradar tanto lignina, quanto celulose e hemicelulose, em algumas condições (Tabela 18). Em TCA 20%, não houve redução no teor de lignina do colonizado (13,65%) e do SMS (12,53%) em relação à mistura (12,93%). Porém, em TCA 50% houve redução do SMS (10,46%) em relação à mistura (12,43%) e ao colonizado (13,69%). Em TCA 80% não houve diferença entre o teor de lignina da mistura e do colonizado. Houve redução de 19% na concentração de hemicelulose no SMS de TCA 50% (12,93%) em relação à mistura (16,16%). Em TSPM 20% não houve diferença entre os teores de hemicelulose do SMS, colonizado e mistura, e em TCA 80% houve aumento de hemicelulose do colonizado (14,68%) em relação à mistura (12,36%). Em relação à celulose, houve redução nos SMS de TCA 20% e do colonizado de TCA 80%, em relação às suas respectivas misturas. Apenas em TCA 50% que foi observado aumento na concentração de celulose.

A partir destes dados (Tabela 18), é possível verificar que as misturas 50% e 80% de coco verde com TCA foram favoráveis a uma redução no teor de lignina, enquanto em contrapartida em TCA 50% houve aumento de celulose e hemicelulose e em TCA 80% houve redução de celulose e aumento de hemicelulose. Em TCA 20% houve redução de hemicelulose seletivamente, enquanto não houve mudança nos teores de lignina e celulose.

**Tabela 18.** Teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), celulose (CEL) e hemicelulose (HEM) das misturas, colonizados e SMS obtidos a partir da colonização de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (TCA) em diferentes concentrações com coco verde.

Substrato	Amostra	FDN (%)	FDA (%)	LIG (%)	CEL (%)	HEM (%)
TCA 20%	Mistura	$56,52 \pm 1,22^{Bb}$	$42,27 \pm 0,4^{Bb}$	$12,93 \pm 0,3^{Aa}$	$29,25 \pm 0,4^{Bb}$	$14,25 \pm 0,9^{Ba}$
	Colonizado	$63,46 \pm 1,0^{Aa}$	$47,91 \pm 1,6^{Aa}$	$13,65 \pm 0,8^{Aa}$	$34,27 \pm 0,9^{Aa}$	$15,55 \pm 0,6^{Aa}$
	SMS	$53,62 \pm 2,1^{Ac}$	$39,42 \pm 3,2^{Ab}$	$12,53 \pm 1,4^{Ba}$	$26,89 \pm 2,2^{Bb}$	$14,20 \pm 1,4^{Aa}$
TCA 50%	Mistura	$56,25 \pm 1,6^{Bab}$	$40,09 \pm 1,3^{Bb}$	$12,43 \pm 1,1^{Aa}$	$27,66 \pm 0,3^{Cb}$	$16,16 \pm 0,5^{Aa}$
	Colonizado	$59,38 \pm 0,7^{Ba}$	$43,34 \pm 1,0^{Ba}$	$13,69 \pm 0,6^{Aa}$	$29,65 \pm 1,6^{Bab}$	$16,04 \pm 0,8^{Aa}$

	<b>SMS</b>	54,95 ± 2,1 <sup>Ab</sup>	42,02 ± 1,0 <sup>Aab</sup>	10,47 ± 0,8 <sup>Ab</sup>	31,55 ± 1,4 <sup>Aa</sup>	12,93 ± 1,4 <sup>Ab</sup>
	<b>Mistura</b>	66,8 ± 1,4 <sup>Aa</sup>	54,44 ± 1,0 <sup>Aa</sup>	12,72 ± 1,7 <sup>Aa</sup>	32,44 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	12,36 ± 0,4 <sup>Cb</sup>
<b>TCA 80%</b>	<b>Colonizado</b>	54,16 ± 0,3 <sup>Cb</sup>	39,47 ± 0,6 <sup>Cb</sup>	11,38 ± 1,0 <sup>Ba</sup>	26,37 ± 0,8 <sup>Cb</sup>	14,68 ± 0,6 <sup>Aa</sup>
	<b>SMS</b>	-	-	-	-	-

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre uma mesma amostra em concentrações diferentes e as letras minúsculas representam diferenças entre amostras diferentes de uma mesma concentração.

Como a lignina é o componente que promove maior resistência na estrutura das biomassas lignocelulósicas, é o componente principal que dificulta a sua digestão para animais monogástricos e ruminantes. De acordo com KNUDSEN (1997), os níveis de lignina de diferentes materiais para uso em ração animal variaram entre 0,4% de lignina (farinha de milho) e 16,9% (capim e alfafa). De acordo com os resultados dispostos acima (Tabela 18 e 19), todos os colonizados e SMS permaneceram com valores de lignina dentro dessa faixa, sendo assim possíveis de serem utilizados para a alimentação animal. A degradação de hemicelulose e celulose produzem açúcares livres, alvo de estudo para novas formas fontes de combustíveis, não sendo o objetivo deste trabalho, entretanto indicando outros potenciais do cultivo em estado sólido (CES) de basidiomicetos em biomassas lignocelulósicas (HOUFANI, ANDERS, et al., 2020).

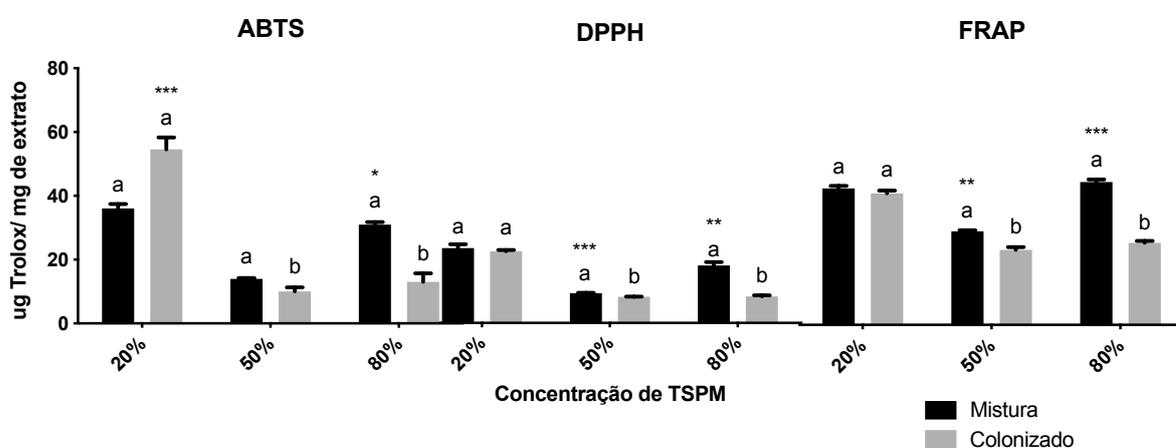
### 2.3. Atividade antioxidante

Como discutido anteriormente neste trabalho, nos extratos dos colonizados há redução na atividade antioxidante em relação aos extratos das misturas. Isso ocorre devido à produção de enzimas oxidativas responsáveis pela degradação da lignina e da celulose (oxidases, lacases, peroxidases) durante o crescimento fúngico nas biomassas lignocelulósicas (KERSTEN & CULLEN, 2007). Entretanto, sabe-se que basidiomicetos são capazes de produzir compostos com atividade antioxidante (compostos fenólicos, vitaminas, flavonoides e tocoferóis), e já são organismos conhecidos pela sua atividade antioxidante (MATTILA, MARNILA e PIHLANTO, 2017). Desta forma, a avaliação da atividade antioxidante nesta etapa é sobre quais colonizados houve menor redução na atividade antioxidante em relação à sua mistura não colonizada.

Nos extratos metanólicos dos materiais contendo TSPM, a partir dos resultados obtidos pelo teste-t que compara o colonizado com sua respectiva mistura (Figura 31),

foi possível observar que nos ensaios de FRAP e DPPH, não houve diferença entre a mistura e o colonizado na concentração de 20%. Nesta mesma concentração pelo ensaio de ABTS, houve um aumento de atividade.

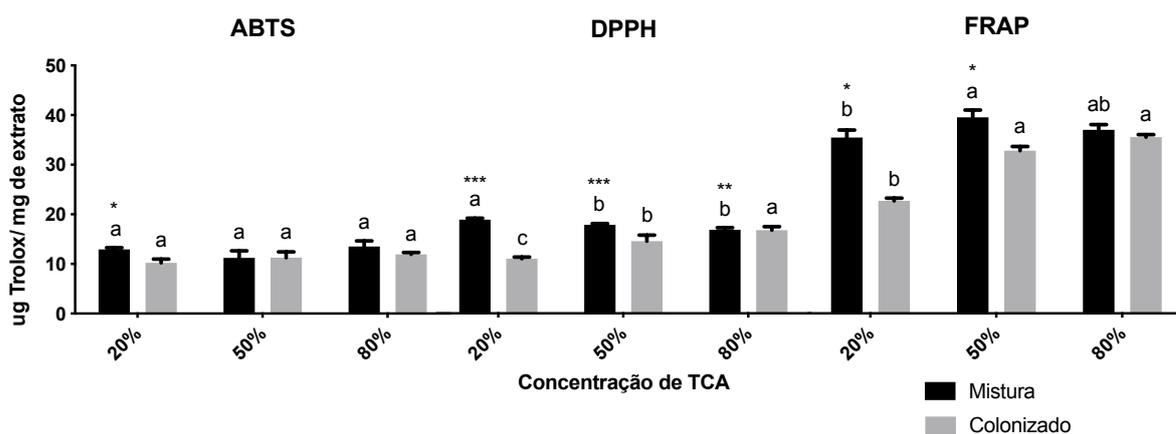
Na comparação de Tukey (todos os tratamentos entre si) MEF20 apresentou maior atividade antioxidante dentre os materiais colonizado, em relação às outras concentrações em todos os ensaios. Pelo teste-t, nas concentrações de 50% e 80% houve redução na atividade antioxidante em todos os ensaios (exceto MEF20 pelo ensaio de ABTS) dos colonizados em relação às misturas.



**Figura 31.** Atividade antioxidante ( $\mu\text{g}$  Trolox/mg extrato) pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP dos extratos metanólicos das misturas (não colonizadas) e dos colonizados (30 dias) de *P. pulmonarius* (EF88) em torta de semente de pinhão-manso (20%) + casca de coco verde (80%), torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de pinhão-manso (80%) + casca de coco verde (20%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Mistura e colonizado diferem entre si pelo Teste-t (níveis de significância: \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ). TSPM: torta de semente de pinhão-manso.

Em relação aos fermentados de TCA em diferentes concentrações, foi observada, pelo teste t, que a atividade antioxidante foi menor do que nas misturas, como observado na triagem. No entanto, para a mistura contendo 80% de TCA nos testes de FRAP e ABST a mistura e o colonizado foram iguais. É possível verificar pelo teste de Tukey (comparação de todos os tratamentos entre si) que pelos ensaios de FRAP e DPPH, a atividade antioxidante dos fermentados foi menor em MCC20 entre todos.



**Figura 32.** Atividade antioxidante ( $\mu\text{g}$  Trolox/mg extrato) pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP dos extratos metanólicos das misturas (não colonizadas) e dos colonizados (30 dias) de *P. lecomtei* (CC40) em torta de caroço de algodão (20%) + casca de coco verde (80%), torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%) e torta de semente de caroço de algodão (80%) + casca de coco verde (20%).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Mistura e colonizado diferem entre si pelo Teste-t (níveis de significância: \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ). TCA: torta de caroço de algodão.

Em um estudo prévio, a atividade antioxidante de amostras secas de basidiomas de *P. pulmonarius* pelo ensaio de captura do radical ABTS apresentou valores variando entre 45,4 e 117,2  $\mu\text{g}$  trolox/mg de amostra seca, e outro estudo com *P. ostreatus* apresentou atividade oxidante pelo ensaio de FRAP de 11,2  $\mu\text{g}$   $\text{Fe}^{2+}$ /mg de amostra seca. Em um estudo acerca da atividade antioxidante de extratos etanólicos de colonizados em palha de trigo de *Panus giganteus*, TEAC pelo ensaio de ABTS foi de 10,9  $\mu\text{mol}$  trolox/mg de extrato e o resultado de FRAP foi de 20,7  $\mu\text{mol}$   $\text{Fe}^{2+}$ /mg de extrato (TAN, BASKARAN, *et al.*, 2015; LAM e OKELLO, 2015), tais valores foram semelhantes aos encontrados pelos mesmos ensaios (Figura 32) (WONG, 2012).

#### 2.4. Teor de $\beta$ -glucanas

As  $\beta$ -glucanas foram calculadas pela diferença entre as concentrações de glucanas totais e  $\alpha$ -glucanas nos extratos aquosos. A partir da quantificação nos extratos, considerando-se a recuperação da extração aquosa, também foi possível quantificar as  $\beta$ -glucanas em base seca de colonizado/SMS.

Nos extratos aquosos dos colonizados e de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM, não houve diferença estatística na quantificação de  $\beta$ -glucanas em relação à

concentração de TSPM no substrato, o mesmo ocorreu com a quantificação de  $\beta$ -glucanas em base seca (Tabela 19). Em relação a colonizado e SMS, apenas na quantificação em base seca de  $\beta$ -glucanas de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM 80% houve uma diferença estatística, indicando que o SMS teve maior concentração.

Um estudo realizado com 39 espécies de cogumelos comercializados mostrou teores de  $\beta$ -glucanas/100g de matéria seca variando entre 7,8 e 60,8 (*Xerocomellus chrysenteron* e *Trametes versicolor* (L.) Lloyd., respectivamente). Neste mesmo estudo, basidiomas de *P. pulmonarius* continham em média 17,5  $\beta$ -glucanas/100g em base seca (bs), sendo 19,4 g/100g bs de glucanas totais e 1,9 g/100g bs de  $\alpha$ -glucanas (Sari, et al., 2017). No extrato aquoso do SMS de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM 80%, com a maior concentração de  $\beta$ -glucanas (10,6 g/100g bs), é possível observar que há um aumento na proporção de  $\alpha$ -glucanas comparada com valores encontrados em cogumelos de *P. pulmonarius* (Tabela 19). Entretanto, foram encontrados extratos com concentrações próximas à menor concentração encontrada nos cogumelos avaliados no estudo de SARI, PRANGE, et al. (2017) (7,8 g/100g bs) no extrato aquoso do colonizado de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM 20% e TSPM 80% e no extrato aquoso do SMS de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM 80%.

**Tabela 19.** Quantificação de de glucanas totais,  $\alpha$ -glucanas e  $\beta$ -glucanas nos extratos aquosos e teores de  $\beta$ -glucanas em base seca de colonizados/SMS de *P. pulmonarius* (EF88) em torta de semente de pinhão-manso com coco verde em diferentes concentrações.

Substrato	Amostra	Glucanas totais (g/100g extrato)	$\alpha$ -Glucanas (g/100g extrato)	$\beta$ -Glucanas (g/100 g de extrato)	$\beta$ -Glucanas (g/100g de colonizado)
EF88 TSPM 20%	Colonizado	9,8 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,0 <sup>a*</sup>	7,3 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
	SMS	7,3 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	6,2 $\pm$ 0,0 <sup>ab</sup>	2,3 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>
EF88 TSPM 50%	Colonizado	7,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	5,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
	SMS	7,0 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	5,4 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	1,5 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>
EF88 TSPM 80%	Colonizado	9,3 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	2,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	6,9 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	2,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
	SMS	13,8 $\pm$ 1,2 <sup>a**</sup>	3,8 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	10,6 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	4,4 $\pm$ 0,1 <sup>a*</sup>

Letras minúsculas representam diferenças entre uma mesma amostra em concentrações diferentes, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Colonizado e SMS diferem entre si pelo teste-t (níveis de significância: \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ). TSPM: torta de semente de pinhão-manso.

Os extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40) em TCA, apresentaram algumas concentrações maiores que de *P. pulmonarius* (EF88) em TCA, sendo até de 15,24

g/100g bs de extrato, no SMS em TCA a 20% (Tabela 20). Houve diferença estatística entre as concentrações de TCA, apenas na quantificação de  $\beta$ -glucanas em base seca do SMS, sendo este maior em TCA 20%. Os SMS da quantificação em extrato de TCA 20% e na quantificação em base seca de TCA 20% e TCA 50% foram maiores estatisticamente que dos colonizados. Os teores de  $\beta$ -glucanas nos extratos dos SMS de *P. lecomtei* (CC40) em TCA (14,76 e 15,24 g/100g bs de extrato) foram superiores aos teores encontrados em extratos aquosos por água quente de basidiomas de *Panus giganteus* (10,1 g/100g bs) (ELLAN, THAYAN, et al., 2019).

**Tabela 20.** Quantificação de glucanas totais,  $\alpha$ -glucanas e  $\beta$ -glucanas nos extratos aquosos e teores de  $\beta$ -glucanas em base seca de colonizado/SMS de *P. lecomtei* (CC40) em torta de caroço de algodão em diferentes concentrações com coco verde.

Substrato	Amostra	Glucanas totais (g/100g extrato)	$\alpha$ -Glucanas (g/100g extrato)	$\beta$ -Glucanas (g/100 g de extrato)	$\beta$ -Glucanas (g/100g de colonizado)
CC40 TCA 20%	Colonizado	10,6 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	2,8 $\pm$ 0,1 <sup>ab***</sup>	6,9 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
	SMS	16,7 $\pm$ 2,2 <sup>a**</sup>	1,5 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	15,2 $\pm$ 0,2 <sup>a*</sup>	8,6 $\pm$ 0,4 <sup>a*</sup>
CC40 TCA 50%	Colonizado	12,2 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 0,2 <sup>a**</sup>	9,3 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
	SMS	16,9 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	14,8 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	7,9 $\pm$ 0,1 <sup>b**</sup>
CC40 TCA 80%	Colonizado	6,5 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	2,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	4,0 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
	SMS	-	-	-	-

Letras minúsculas representam diferenças entre uma mesma amostra em concentrações diferentes, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Colonizado e SMS diferem entre si pelo Teste-t (níveis de significância: \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ). TCA: torta de caroço de algodão.

Como as  $\beta$ -glucanas são componentes presentes na membrana celular fúngica, seu aumento numa biomassa indica maior crescimento fúngico na mesma. Isto corrobora com o fato de que tanto nos colonizados e SMS de *P. lecomtei* (CC40) e *P. pulmonarius* (EF88) foram observados aumentos de  $\beta$ -glucanas nos SMS em relação aos colonizados. Em TSPM, apenas no SMS de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM 80% foi observado um valor considerável de  $\beta$ -glucanas (10,6 g/100g bs). Os extratos de SMS de *P. lecomtei* (CC40) em TCA apresentaram, no geral, maiores teores de  $\beta$ -glucanas que nos de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM. Além disso, teores de  $\beta$ -glucanas em base seca de colonizado dos SMS de TCA 20% e 50% de 7,9 e 8,6 g/100g bs serem maiores do que teores encontrados em cogumelos, que são conhecidos por serem ricos em  $\beta$ -glucanas (SARI, PRANGE, et al., 2017). Diante do

exposto, os extratos aquosos de SMS de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM 80%, SMS de *P. lecomtei* (CC40) em TCA 20% e 50% podem considerados fontes de  $\beta$ -glucanas.

## 2.5. Atividade antimicrobiana

Os principais microrganismos causadores de gastroenterites bacterianas são dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Yersinia* e *Campylobacter*. Tais infecções são causadoras de sintomas clínicos como diarreias, disenteria e febre e acometem grande parte da população mundial. A estima OMS cerca de 2 bilhões de casos por ano, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade de origem infecciosa em crianças menores que cinco anos (TORRES FILHO, 2013; WHO, 2017).

*Escherichia coli*, é uma bactéria gram-negativa e era inicialmente considerada uma bactéria comensal do trato gastrointestinal, entretanto existem uma série de cepas patogênicas associadas com gastroenterites, que são de difícil diferenciação. Ruminantes são conhecidos como grandes “reservatórios” de cepas patogênicas de *E. coli*, portanto o despejo dos dejetos destes animais em rios e pastos e o mal controle do processamento da carne pode acarretar o consumo de produtos contaminados, e enterites causadas por *E. coli* podendo rapidamente progredir para colite hemorrágica (HUMPHRIES e LINSCOTT, 2015).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva de grande relevância clínica devido sua combinação de virulência, invasividade e resistência bacteriana. O espectro de infecções de *S. aureus* vai desde acne e furúnculos, até síndrome do choque tóxico e sepsis. Sua virulência em intoxicação alimentar ocorre devido as cepas produtoras de enterotoxinas e sintomas vão desde cólicas, vômitos, enjoos, diarreia e febre, tais cepas são normalmente encontradas em carnes mal processadas. O mecanismo de ação das enterotoxinas envolve pirogênese, imunossupressão e proliferação de células T. A bactéria *S. aureus* (ATCC 27154), isolada a partir de peito de peru é uma cepa produtora de enterotoxinas relacionadas a intoxicações alimentares mais graves (LE LOIR, BARON e GAUTIER, 2003)

*Salmonella enterica* é uma bactéria gram-negativa presente no trato gastrointestinal dos vertebrados e as suas infecções ocorrem principalmente pelo consumo de alimentos mal higienizados ou pelo contato de seres humanos com animais. Mundialmente são estimados 94 milhões de caso por ano gastroenterites por *Salmonella* spp., causando em torno de 155 mil mortes. A principal cepa causadora

de infecções é de *S. enterica* Typhimurium, acarretando diarreia, febre, náuseas, dores de cabeça, quando presente no intestino delgado. Em caso de manifestações extraintestinais, podem ocorrer sepse, infecções urinárias e osteomielites (MAJOWICZ, MUSTO, *et al.*, 2010; HUMPHRIES e LINSKOTT, 2015).

Foram considerados sensíveis extratos que apresentaram halos de inibição maiores de 10 mm, e resistentes quando não houve formação de halo, ou quando este foi menor que 10 mm, conforme sugerido por alguns autores (SOUZA, HIGINO, *et al.*, 2007; OLIVEIRA, LIMA, *et al.*, 2008; AGUIAR, COSTA, *et al.*, 2008). Os extratos metanólicos apresentaram halos de inibição principalmente na concentração de 2000 µg/disco, alguns extratos apresentaram halos na concentração de 200 µg/disco, e nenhum apresentou nas concentrações de 20 e 2 µg/disco (Tabela 21). Os extratos aquosos não apresentaram halos de inibição. Todos os extratos metanólicos apresentaram halo de inibição contra *S. aureus*, e o menor halo contra esta bactéria foi do extrato de MCC20 na concentração de 2000 µg/disco. Extratos considerados sensíveis contra *S. aureus* (halos maiores que 10 mm), foram: MCC80, MEF20 e MEF80, todos na concentração de 2000 µg/disco. Contra *S. enterica* Typhi nenhum extrato apresentou halo de inibição, e contra *E. coli*, MCC80 apresentou nas concentrações de 2000 e 200 µg/disco, entretanto os halos foram menores que 10 mm.

**Tabela 21.** Médias dos halos de inibição dos extratos dos cultivos de 30 dias nas diferentes concentrações por disco contra *S. aureus* (ATCC 27154), *S. enterica* Typhi (ATCC 14028) e *E. coli* (ATCC 25299).

Extrato	Concentração (µg/disco)	Halo (mm)		
		<i>S. aureus</i> ATCC 27154	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 14028	<i>E. coli</i> ATCC 25299
<b>Amoxicilina</b>	10	35,7 ± 0,6	36,0 ± 0,0	20,6 ± 1,2
<b>Controle (-)</b>	-	-	-	-
<b>MCC20</b>	2000	7,0 ± 0,0	-	-
	200	-	-	-
<b>MCC50</b>	2000	9,5 ± 1,5	-	-
	200	8,7 ± 0,7	-	-
<b>MCC80</b>	2000	10,5 ± 0,7	-	9,0 ± 1,4
	200	9,0 ± 0,0	-	8,5 ± 0,7
<b>MEF20</b>	2000	11,5 ± 0,7	-	-
	200	8,5 ± 0,7	-	-

<b>MEF50</b>	2000	9,5 ± 0,7	-	-
	200	9,0 ± 0,0	-	-
<b>MEF80</b>	2000	11,5 ± 0,7	-	-
	200	9,0 ± 0,0	-	-

MCC20: Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (20%) + casca de coco verde (80%); MCC50: Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (50%) + casca de coco verde (50%); MCC80: Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão (80%) + casca de coco verde (20%); MEF20: Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (20%) + casca de coco verde (80%); MEF50: Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (50%) + casca de coco verde (50%); MEF80: Extrato metanólico do colonizado de 30 dias de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso (80%) + casca de coco verde (20%).

Os resultados da Tabela 21 demonstraram que os extratos apresentaram pouca e/ou nenhuma atividade contra bactérias gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica*). De acordo com as revisões de SHEN, SHAO, *et al.* (2017), ALVES, FERREIRA, *et al.* (2012) e VENTURINI, RIVERA, *et al.* (2008), a atividade antimicrobiana de cogumelos ocorre principalmente contra bactérias gram-positivas. A ausência de atividade antimicrobiana dos extratos em bactérias gram-negativas pode ter ocorrido pela presença da membrana lipoproteica que pode atuar como uma barreira, dificultando a entrada de compostos ativos de características hidrofóbicas e anfífilas, sendo permeáveis então apenas a compostos aquosos, que estão presentes e baixas quantidades em extratos metanólicos (VENTURINI, RIVERA, *et al.*, 2008).

O ensaio de microdiluição de caldo foi realizado nos extratos que apresentaram halo maior que 10 mm, sendo eles: MCC80, MEF20 e MEF80 contra *S. aureus*. As diluições seriadas foram realizadas entre as concentrações de 8 e 1000 µg/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) foi de 500 µg/mL para todos os extratos, sendo de 125 µg/mL para o controle positivo (amoxicilina). Conforme o documento M7-A6 do CLSI/NCCLS e os suplementos M100-S15 e 17, considera-se que CIM ≤100 µg/ml como atividade antimicrobiana potencialmente positiva, CIM de 100 a 500 µg/ml como atividade antimicrobiana moderada, CIM de 500 a 1000 µg/mL como atividade antimicrobiana leve e CIM >1000 µg/mL como inativo, portanto, os extratos testados neste ensaio apresentaram atividade antimicrobiana leve (NCCLS, 2003; CLSI, 2007).

## 2.6. Atividade prebiótica

O intestino humano e animal possui mais de 400 espécies de bactérias em sua microbiota intestinal, tornando-a um complexo sistema bacteriano. As bactérias predominantes são dos gêneros *Bifidobacteria* e *Lactobacillus*, no qual as Bifidobacterias compõem mais de 25% do total de bactérias presentes no intestino (AZMI, MUSTAFA, et al., 2012). Bifidobacterias e Lactobacillus são bactérias gram-positivas que fermentam carboidratos em ácidos. Lactobacillus produzem majoritariamente ácido láctico, enquanto bifidobacterias produzem principalmente ácido láctico e ácido acético (KLEEREBEZEM e VAUGHAN, 2009).

Bactérias que produzem apenas ácido láctico na fermentação são referidas como homofermentativas, e as que produzem além de ácido láctico, CO<sub>2</sub>, peróxido de hidrogênio, ácido acético e/ou álcool são conhecidas como heterofermentativas. Além disso, existem as bactérias heterofermentativas facultativas que são capazes de fermentar a glicose e produzir etanol, ácido fórmico e acético, além de ácido láctico. As bactérias homofermentativas comumente utilizam glicose para serem fermentadas em D e L-ácidos lácticos, enquanto as heterofermentativas fermentam hexoses e pentoses pela via da fosfoquetolase, obtendo-se além de ácido láctico/acético, CO<sub>2</sub> e etanol (ANJUM, MAQSOOD, et al., 2014).

Bifidobacterias e Lactobacillus conhecidos pelos benefícios na saúde. Devido sua supressão no crescimento de bactérias patogênicas, reduz a incidência de infecções gastro intestinais, melhorando a absorção de alimentos e do funcionamento do trato gastrointestinal. Além disso, são capazes de modular o sistema imune (MITSUOKA, 1990; MITSUOKA, 1996). Recentemente, Bifidobacterias e Lactobacillus vem sendo associadas a doenças neuropsicológicas, incluindo depressão, e à saúde bucal (AIZAWA, TSUJI, et al., 2016; ALANZI, HONKALA, et al., 2018)

No presente estudo, a atividade prebiótica foi testada a partir dos extratos aquosos dos colonizados de 30 dias, tanto *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM quanto de *P. lecomtei* (CC40) em TCA. A curva de crescimento a partir das leituras de densidade óptica das culturas de crescimento é um importante indicativo para se saber em qual momento o microrganismo alcançou sua fase estacionária. Após alcançada a fase estacionária, é comum verificar redução na densidade óptica celular numa cultura, indicando que as fontes de carbono presentes na cultura são limitantes para ao crescimento celular, promovendo lise bacteriana (AZMI, MUSTAFA, et al.,

2012). Por este motivo, foram realizadas coletas das culturas nos pontos 12 h, 24 h e 48 h e diluições, a fim de se saber os valores de UFC/mL nestes três pontos, tendo como uma cultura inicial de  $10^6$  UFC/mL.

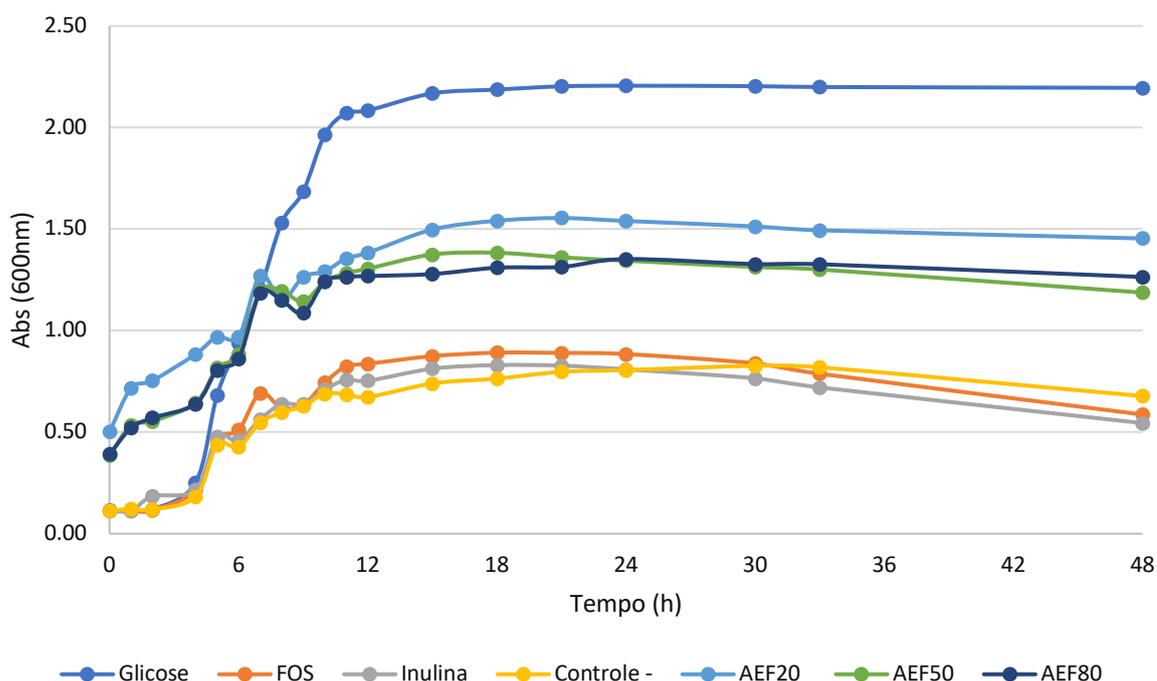
Em complemento ao crescimento dos probióticos, os sobrenadantes foram testados contra as bactérias patogênicas *E. coli* (ATCC 25922), *S. enterica* Typhi (ATCC 14028) e *S. aureus* (ATCC 27154) (produtora de enterotoxina). Através da medição dos halos de inibição de crescimento bacteriano, os sobrenadantes foram considerados sensíveis quando houve halo maior de 10 mm.

### **2.6.1. *Lactobacillus acidophilus***

*L. acidophilus* é uma bactéria gram-positiva com morfologia de haste e homofermentativa. É uma cepa termofílica, apresentando seu ótimo crescimento entre 30-45°C, e pH ideal entre 4-5, além de ser conhecida por produzir altos níveis de ácido láctico (ANJUM, MAQSOOD, et al., 2014).

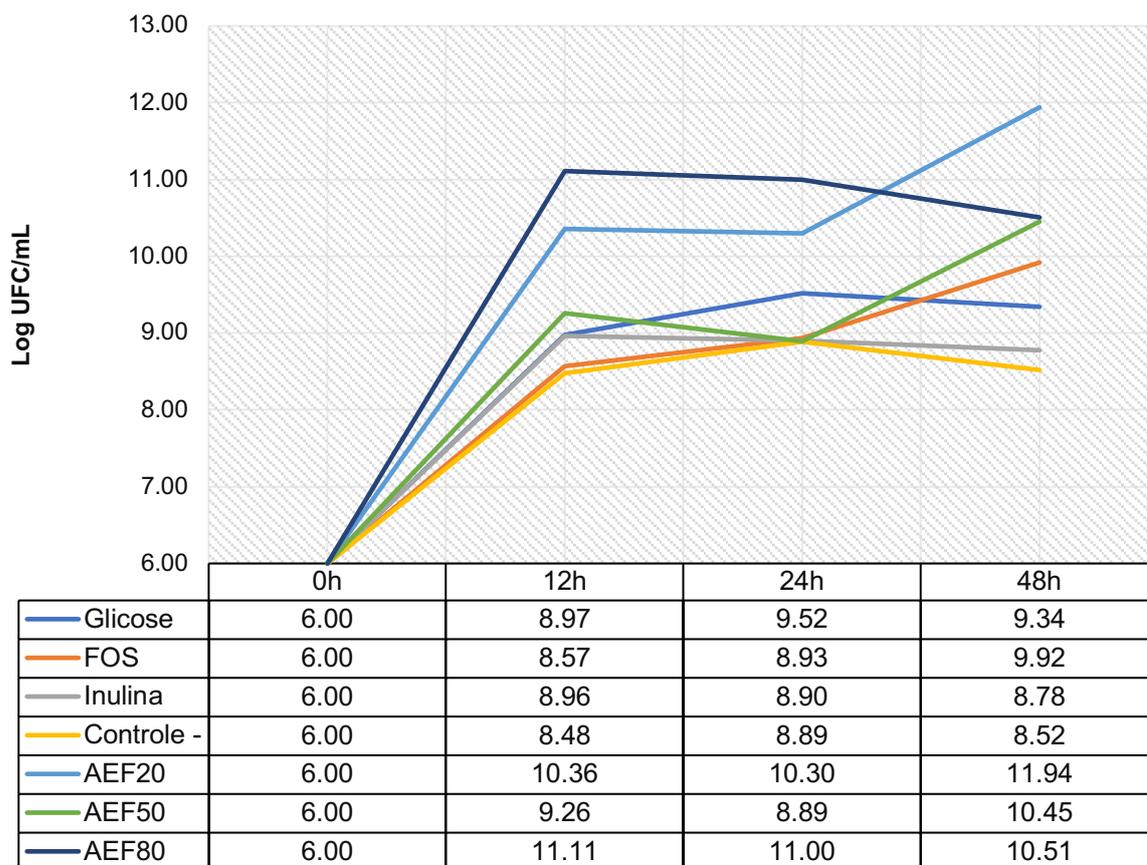
#### **2.6.1.1. Extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88)**

Através da curva da leitura da OD da curva de crescimento (Figura 33), é possível observar que o pico de crescimento, tanto com glicose quanto com os outros extratos (incluindo controle negativo e positivos), foi entre 12-15 h. O mesmo comportamento foi observado por MAZZEO, LIPPOLIS, et al. (2015). Após este tempo, as leituras mantiveram-se quase constantes, havendo oscilações leves. Observando apenas a curva de crescimento por leitura óptica, é observável que apenas a glicose manteve um alto crescimento de colônias. Por este motivo, foi realizada também a contagem de UFC/mL, por plaqueamento de diluições das culturas de cada ponto.



**Figura 33.** Curva de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. pulmonarius* (EF88) como fontes de carbono

A partir da contagem de UFC/mL (Figura 34), é possível verificar que os extratos aquosos promoveram o crescimento bacteriano por mais tempo do que nos controles (glicose, FOS, inulina e o controle negativo), o que não é possível de observar através da OD. Em 48 h, todos os extratos aquosos apresentaram contagens de UFC/mL maiores que  $10^{10}$ , sendo de AEF20 de aproximadamente  $10^{12}$ , o dobro da quantidade inicial de UFC, em contrapartida, todos os controles permaneceram com contagens menores que  $10^{10}$  no tempo de 48 h.



**Figura 34.** Log UFC/mL dos extratos AEF20, AEF50 e AEF80 em *L. acidophilus* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Conforme Tabela 22, é possível verificar que os sobrenadantes testados contra bactérias patogênicas gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica* Typhi) apenas o sobrenadante da cultura com AEF80 apresentou atividade contra *S. enterica*, um halo de média 13,4 mm. Contra *S. aureus* (ATCC 27154), os controles de glicose, FOS e inulina apresentaram halos menores que 10 mm, sendo de em média 9,5, 9,0 e 7,0 mm, respectivamente. O sobrenadante da cultura de AEF20 apresentou um halo de média 16 mm, um halo considerável de atividade antimicrobiana contra esta cepa.

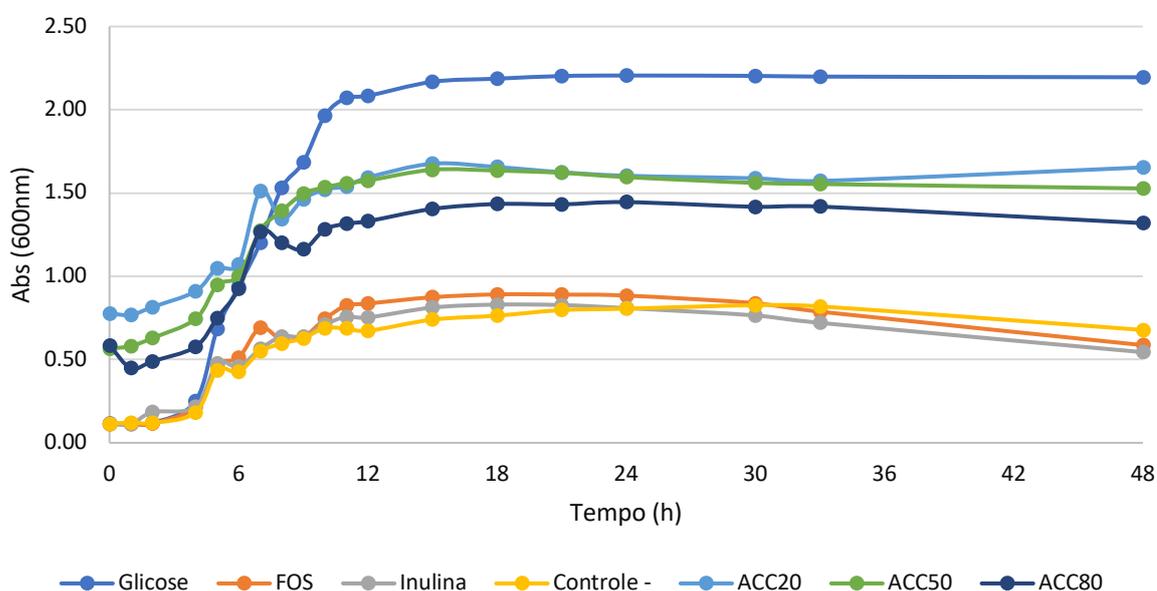
**Tabela 22** Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de *L. acidophilus* com extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88) contra bactérias patogênicas.

Sobrenadante	Halo (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25299	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 14028	<i>S. aureus</i> ATCC 27154
Amoxicilina	20,6 ± 1,2	36,0 ± 0	37,7 ± 0,6
Glicose	-	-	9,5 ± 0,7
FOS	-	-	9,0 ± 0,0

Inulina	-	-	7,0 ± 0,0
Controle -	-	-	-
AEF20	-	-	16,0 ± 1,4
AEF50	-	-	-
AEF80	-	13,4 ± 0,7	-

### 2.6.1.2. Extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40)

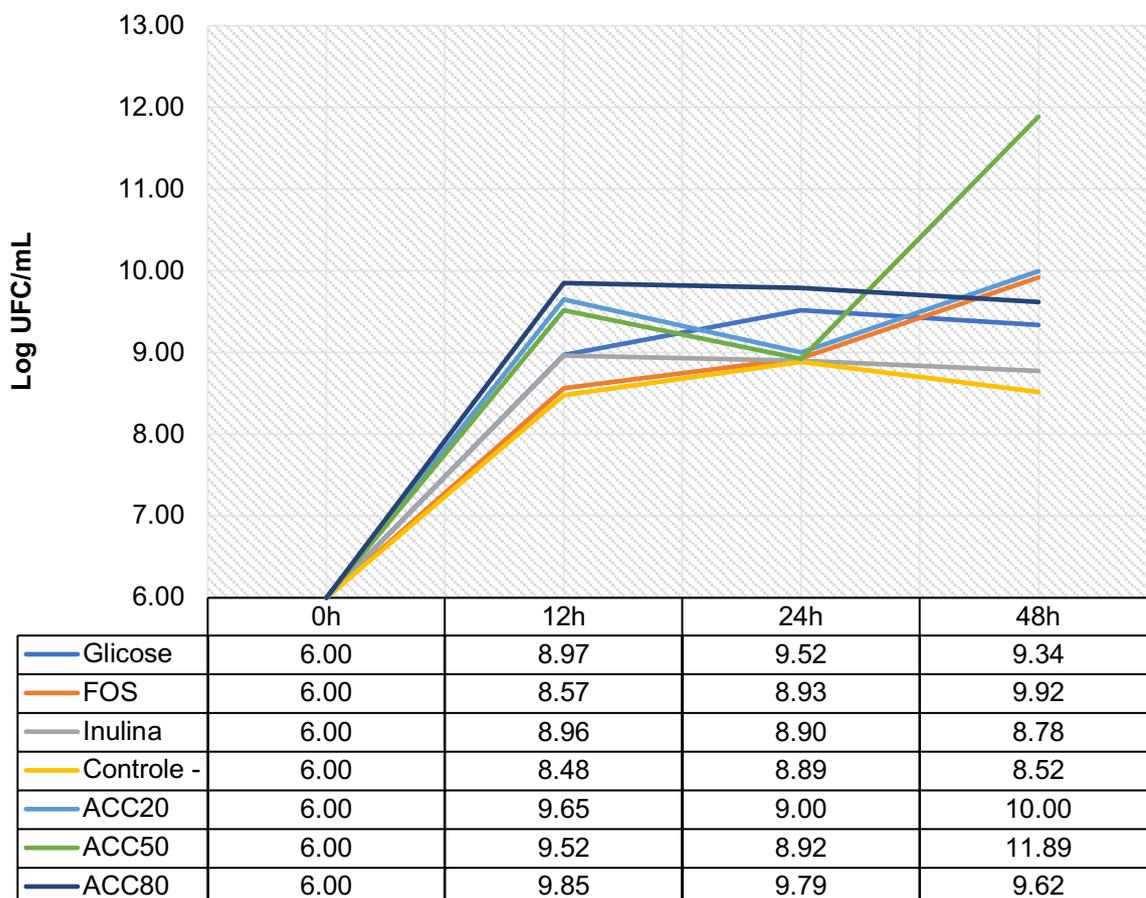
Assim como observado com os extratos de *P. pulmonarius* (EF88), o pico de crescimento foi entre 12-15 h com os extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40) (Figura 35).



**Figura 35.** Curva de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. lecomtei* (CC40) como fontes de carbono.

Em relação à contagem de UFC/mL, todos os extratos aquosos apresentaram contagens de UFC/mL em 48 h maiores que glicose (Figura 36). O extrato ACC50 apresentou o maior crescimento nas 48 h, sendo de aproximadamente  $10^{12}$  UFC/mL. ACC20 e ACC80 também apresentaram altas contagens de UFC nas 48 h, sendo de aproximadamente de  $10^{10}$  UFC/mL. A inulina se comportou de forma

semelhante ao controle positivo, assim como FOS e glicose se comportaram de formas semelhantes.



**Figura 36.** Log UFC/mL dos extratos ACC20, ACC50 e ACC80 em *Lactobacillus acidophilus* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Conforme demonstrado na Tabela 23, nenhum sobrenadante apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*, exceto o ACC80. Contra *S. enterica* Typhi apenas o sobrenadante de ACC50 apresentou atividade, tendo um halo de em média 12 mm. Contra *S. aureus*, exceto os sobrenadantes do controle negativo e de ACC80 apresentaram algum halo, no entanto apenas o ACC20 é considerado positivo para atividade antimicrobiana.

**Tabela 23.** Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de *L. acidophilus* com extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40) contra bactérias patogênicas.

Sobrenadante	Halo (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25299	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 14028	<i>S. aureus</i> ATCC 27154

<b>Amoxicilina</b>	20,6 ± 1,2	36,0 ± 0	37,7 ± 0,6
<b>Glicose</b>	-	-	9,5 ± 0,7
<b>FOS</b>	-	-	9,0 ± 0,0
<b>Inulina</b>	-	-	7,0 ± 0,0
<b>Controle -</b>	-	-	-
<b>ACC20</b>	-	-	11,5 ± 0,7
<b>ACC50</b>	-	12,0 ± 0,0	8,5 ± 0,7
<b>ACC80</b>	11,0 ± 1,4	-	-

A partir dos resultados dos extratos de *P. pulmonarius* (EF88) (Tabela 21), é possível verificar que a maioria desses extratos apresentou mais atividade antimicrobiana contra a bactéria gram-positiva (*S. aureus*). AEF20 foi capaz de induzir consideravelmente o crescimento de *L. acidophilus* e seu sobrenadante também foi capaz de produzir atividade antimicrobiana contra a cepa enteropatogênica de *S. aureus*. AEF80 também foi capaz de induzir o crescimento de *L. acidophilus* e inibir o crescimento de *S. enterica* Thyphi com um halo maior que 10 mm (Tabela 22).

Para os resultados dos extratos de *P. lecomtei* (CC40), é possível destacar ACC50 em relação à atividade antimicrobiana (Figura 36). Este extrato também propiciou um alto crescimento de *L. acidophilus* mesmo após atingida a fase estacionária (Figura 36).

Portanto, AEF20, AEF80 e ACC50 demonstraram ser potenciais extratos com atividade prebiótica e antimicrobiana associadas.

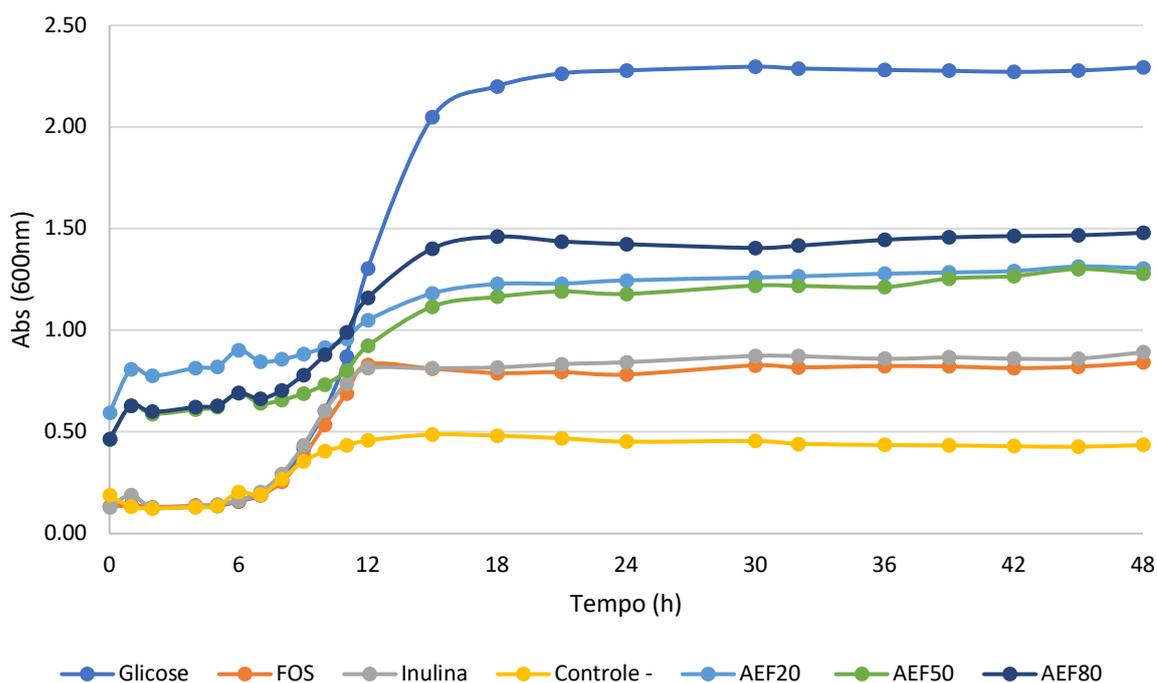
### 2.6.2. *Bifidobacterium lactis*

*B. lactis* (i.e., *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) é uma cepa originária de *B. animalis*, produzida a partir de leite fermentado, tendo como finalidade a obtenção de uma cepa aerotolerante para facilitar o estudo e a produção de alimentos a partir de uma espécie de bifidobactéria, uma vez que bactérias deste gênero são anaeróbias estritas (MEILE, LUDWIG, et al., 1997). *B. animalis* e *B. lactis* possuem o mesmo perfil fermentativo de glicose, produzindo majoritariamente ácido láctico, mas também ácido acético e ácido fórmico (MASCO, VENTURA, et al., 2004).

#### 2.6.2.1. Extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88)

Conforme disposto na Figura 37, o pico de crescimento de *B. lactis* com todas as fontes de carbono testadas foi entre 15-118 h, com glicose foi entre 18-21 h,

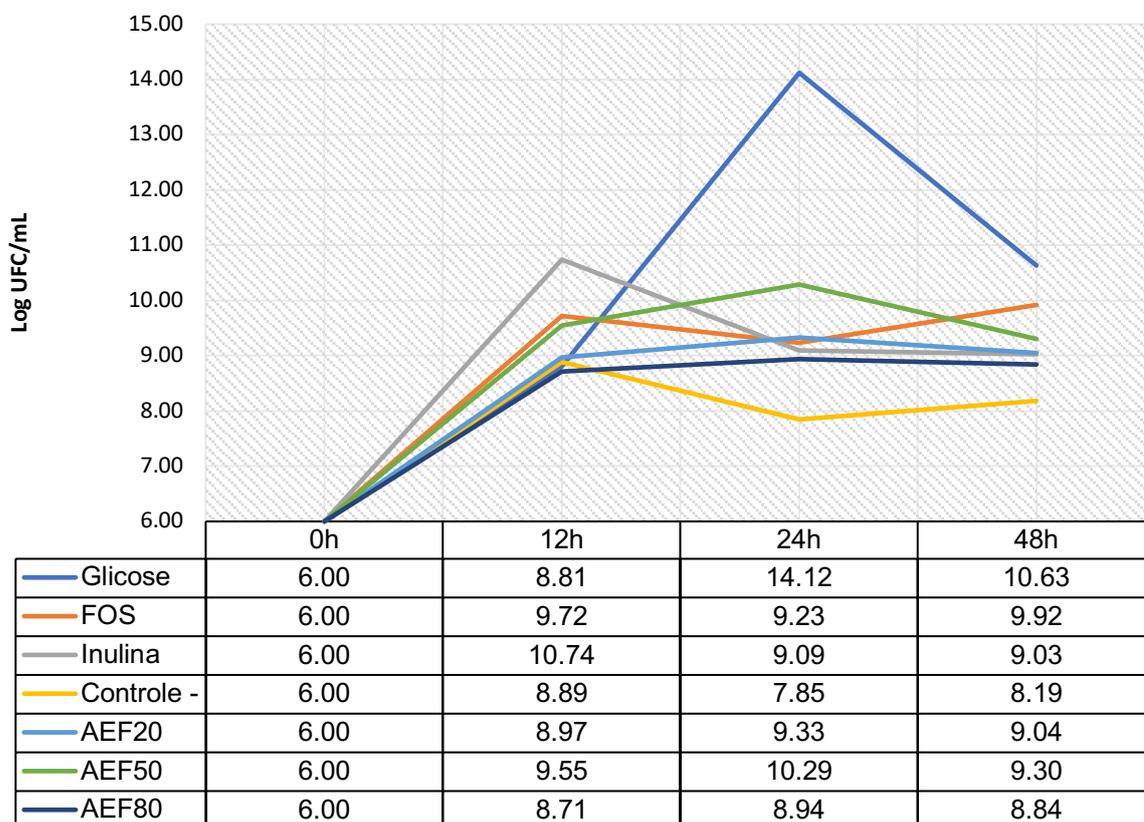
coincidindo com resultados encontrados por CANDELA, CENTANNI, *et al.* (2010). Na Figura 37 é possível observar que o crescimento das primeiras 21 h foi maior com glicose como fonte de carbono. Diferente dos resultados obtidos com *L. acidophilus*, é possível observar diferença de crescimento entre FOS, Inulina e o controle negativo. Apenas observando a curva de crescimento, o extrato que aparenta ter maior crescimento bacteriano é o AEF80.



**Figura 37.** Curva de crescimento de *Bifidobacterium lactis* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. pulmonarius* (EF88) como fontes de carbono.

Observando os resultados da Figura 38, é possível verificar que neste caso, o crescimento bacteriano foi semelhante aos resultados obtidos por absorbância (Figura 37), uma vez que a glicose apresentou as maiores contagens de UFC/mL em relação às outras fontes de carbono nos pontos 24 h e 48 h, atingindo a concentração de  $10^{14}$  UFC/mL em 24 h. AEF50 obteve maiores valores de UFC/mL que inulina em 24 h e 48 h. Em potência, inulina, FOS, AEF20 e AEF50 apresentaram concentrações de  $10^9$  UFC/mL; controle negativo e AEF80 de  $10^8$  UFC/mL e glicose de  $10^{10}$  UFC/mL. Considerando redução na contagem de UFC entre o pico de crescimento (24 h) e a fase estacionária (48 h), é possível observar que glicose apresentou uma queda de  $10^4$ x UFC/mL, enquanto FOS, inulina, AEF20 e AEF80 mantiveram suas concentrações de UFC iguais entre 24 e 48 h. AEF50 apresentou queda de  $10^x$

UFC/mL, enquanto o controle negativo apresentou um aumento de 10x UFC/mL. Portanto, o resultado de contagem de UFC contradiz o resultado dado apenas pela leitura de absorbância das culturas.



**Figura 38.** Log UFC/mL dos extratos AEF20, AEF50 e AEF80 em *Bifidobacterium lactis* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Em relação à atividade antimicrobiana dos sobrenadantes das culturas de *B. lactis* com extratos de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM, não houve nenhuma atividade contra as bactérias gram-negativas testadas. Contra *S. aureus*, os três extratos apresentaram halos de inibição maiores que 10 mm, indicando sensibilidade contra a bactéria em questão (Tabela 24).

**Tabela 24.** Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de *B. lactis* com extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88) contra bactérias patogênicas.

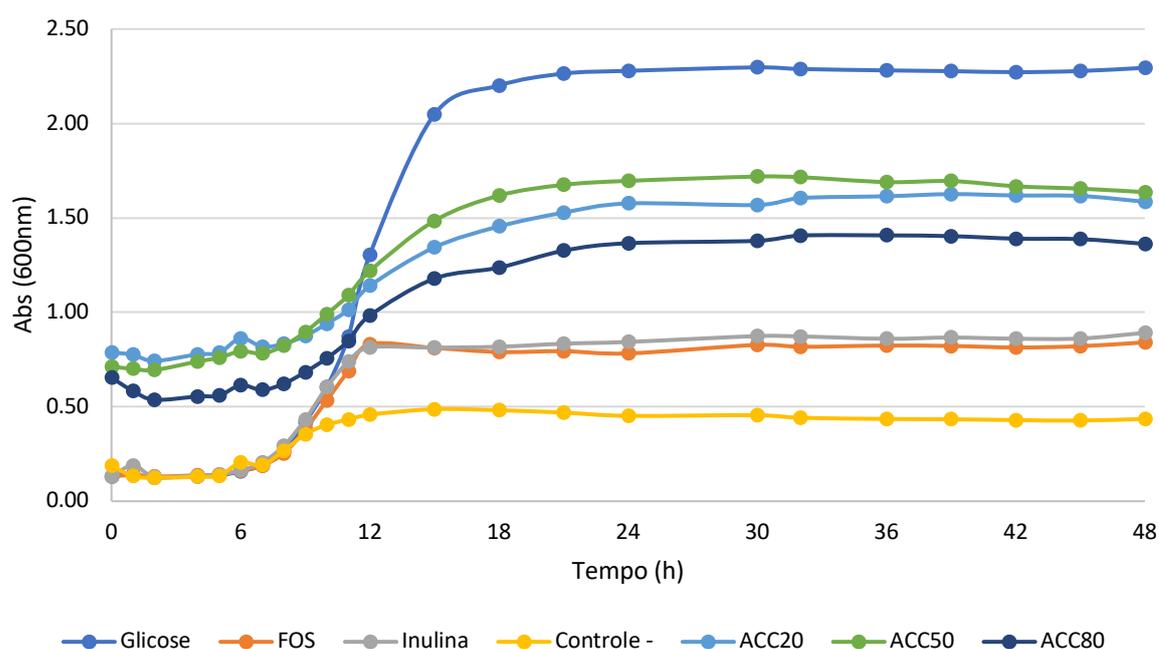
Sobrenadante	Halo (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25299	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 140248	<i>S. aureus</i> ATCC 27154
Amoxicilina	20,6 ± 1,2	36,0 ± 0	37,7 ± 0,6

<b>Glicose</b>	-	-	9,5 ± 0,7
<b>FOS</b>	-	-	9,0 ± 0,0
<b>Inulina</b>	-	-	7,0 ± 0,0
<b>Controle -</b>	-	-	-
<b>AEF20</b>	-	-	11,0 ± 0,7
<b>AEF50</b>	-	-	11,0 ± 1,4
<b>AEF80</b>	-	-	11,5 ± 2,1

Através destes resultados, podemos considerar que AEF20 foi a fonte de carbono que apresentou aumento significativo de UFC/mL, comparada com a contagem inicial (de  $10^6$  foi para  $10^9$ ), não apresentou queda entre as 24 h e 48 h, e apresentou valores semelhantes que os controles FOS e inulina. Além disso, seu sobrenadante apresentou atividade contra *S. aureus*. Indicando que para *B. lactis*, a colonização de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM tem mais efeitos prebióticos com uma maior concentração de casca de coco verde.

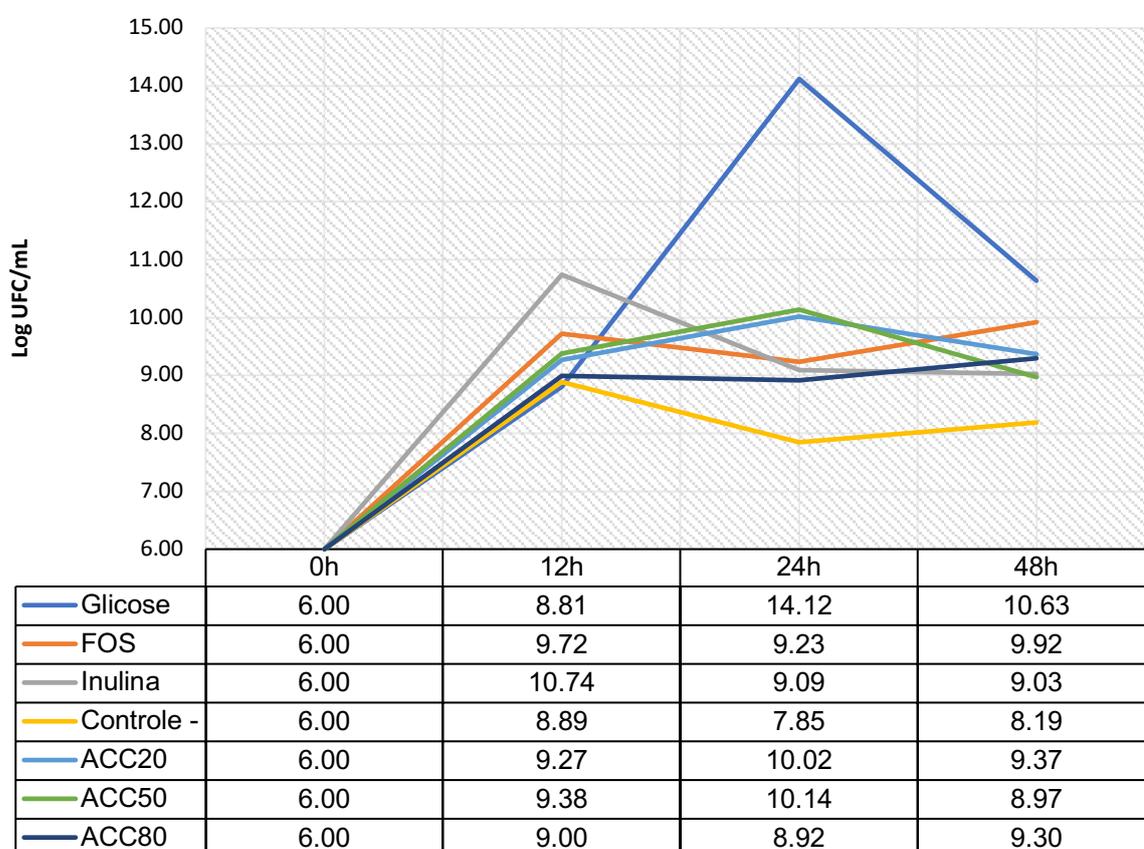
### 2.6.2.2. Extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40)

Assim como nos extratos aquosos de EF88 em TSPM, as fontes de carbono testadas tiveram seu pico de crescimento entre 15-118 h (Figura 39). Observando apenas a curva de crescimento, dentre os extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40), ACC50 apresenta aparentemente o maior crescimento.



**Figura 39.** Curva de crescimento de *Bifidobacterium lactis* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. lecomtei* (CC40) como fontes de carbono.

Considerando-se a contagem de UFC/mL dos pontos 12 h, 24 h e 48 h (Figura 40), nenhum extrato apresentou contagem de UFC/mL semelhante da glicose. FOS foi a fonte e carbono que apresentou valores mais próximos de glicose em 48 h. ACC50, diferentemente do observado na curva de crescimento (Figura 39), foi o que apresentou contagem de UFC mais baixa dos outros extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40) em 48 h, no entanto apresentou melhor resultado entre os extratos em 12 h e 24 h. Em todas as fontes de carbono há aumento de UFC/mL em 24 h e redução em 48 h. Este comportamento não foi observado com as fontes de carbono FOS, no controle negativo e no extrato ACC80, no qual houve aumento de UFC de 24 h para 48 h. ACC20 e ACC80 foram as fontes de carbono que ao final das 48 h apresentaram  $10^9$  UFC/mL, o mais próximo de glicose e FOS e inulina, e 10x mais UFC que o controle negativo.



**Figura 40.** Log UFC/mL dos extratos ACC20, ACC50 e ACC80 em *Bifidobacterium lactis* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Assim como ocorrido com os sobrenadantes das culturas de *B. lactis* com extratos aquosos de EF88, não houve atividade contra as bactérias gram-negativas, apenas contra *S. aureus*. Os sobrenadantes dos extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88) apresentaram halos maiores que os controles positivos (glicose, FOS e inulina), e todos foram maiores que 10 mm, sendo que de ACC20 foi de 15 mm (Tabela 25).

**Tabela 25.** Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de *B. lactis* com extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40) contra bactérias patogênicas.

Sobrenadante	Halo (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25299	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 14028	<i>S. aureus</i> ATCC 27154
Amoxicilina	20,6 ± 1,2	36,0 ± 0	37,7 ± 0,6
Glicose	-	-	9,5 ± 0,7
FOS	-	-	9,0 ± 0,0
Inulina	-	-	7,0 ± 0,0
Controle -	-	-	-
ACC20	-	-	15,0 ± 0,0
ACC50	-	-	10,5 ± 0,7
ACC80	-	-	12,0 ± 0,0

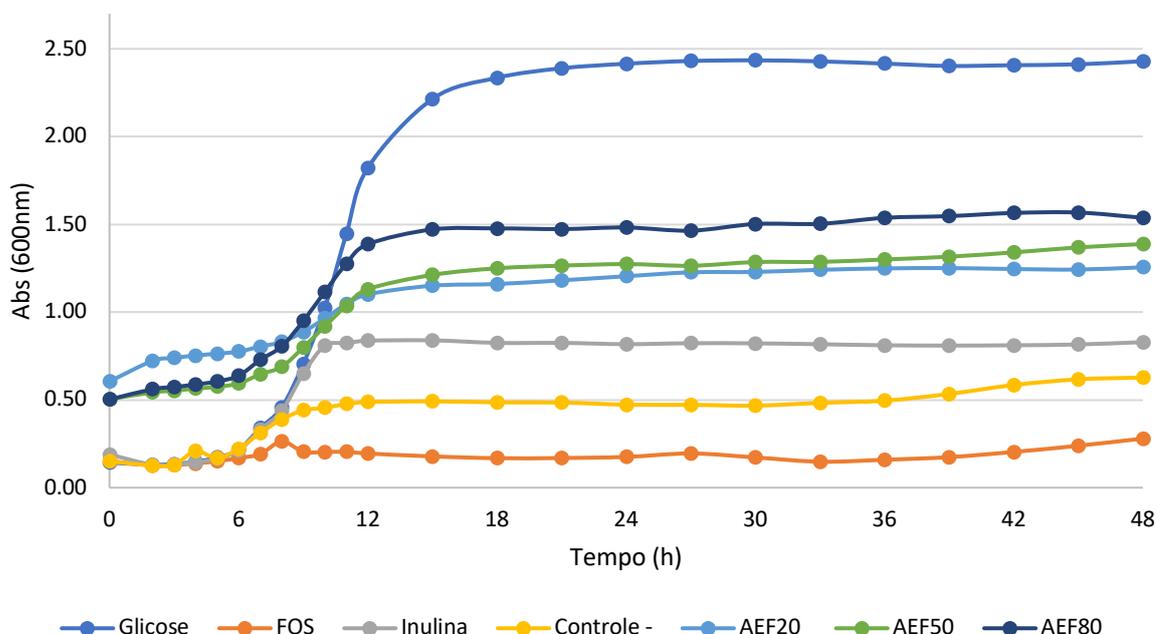
Através dos resultados apresentados foi possível identificar os extratos ACC20 e ACC80 sendo os que apresentaram maior crescimento de *B. lactis* ao longo das 48 h, que juntamente atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

### 2.6.3. *Lactobacillus rhamnosus*

*L. rhamnosus* foi a primeira espécie que teve uma cepa do gênero dos Lactobacilos a ser patenteada em 1989, devido sua capacidade de sobreviver no suco gástrico e sua adesão nos enterócitos. Sua função probiótica é para proteger a mucosa do sistema gastrointestinal, reduzindo a indução de respostas imune, sendo efetiva no combate de infecções gastrointestinais (CAPURSO, 2019).

### 2.6.3.1. Extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88)

A partir da observação da curva de crescimento (Figura 41), é possível verificar que a fase estacionária de *L. rhamnosus* se iniciou aproximadamente em 21 h com glicose, assim como encontrado por BROECKX, KIEKENS, *et al.* (2019). Com as outras fontes de carbono, a fase estacionária se iniciou em aproximadamente 15 h. Essa diferença entre o alcance da fase estacionária com as diferentes fontes de carbono indicam que naquelas culturas que atingiram a fase estacionária antes, indicando um esgotamento de nutrientes. Pela curva de crescimento, AEF80 apresentou o maior crescimento bacteriano dos extratos aquosos, e FOS não apresentou nenhum crescimento.

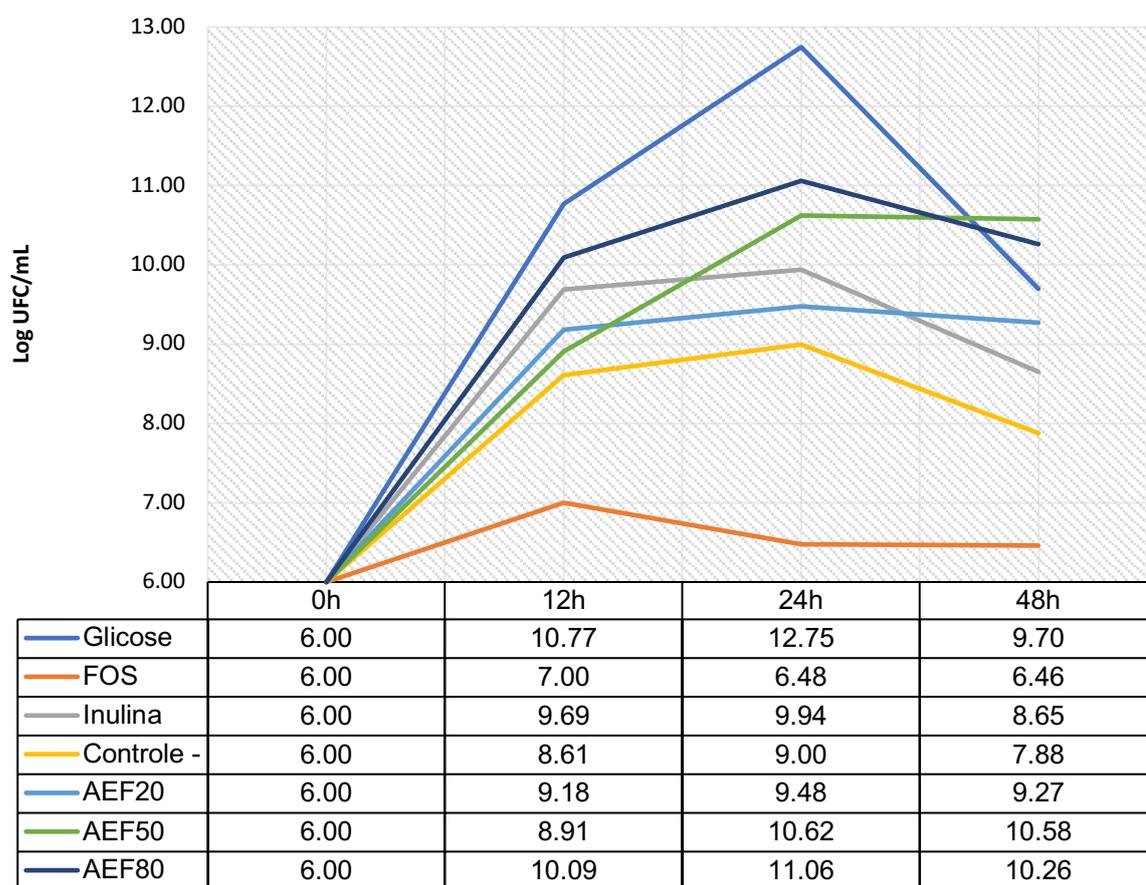


**Figura 41.** Curva de crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. pulmonarius* (EF88) como fontes de carbono.

A partir da contagem de UFC/mL das culturas (Figura 42), é possível verificar que de fato não houve crescimento expressivo com FOS, possivelmente por *L. rhamnosus* preferir monossacarídeos, não tendo seu crescimento de forma expressiva em FOS (Koh, *et al.*, 2013).

O crescimento significativo com glicose fica evidenciado com a contagem de UFC, atingindo aproximadamente  $10^{13}$  UFC/mL nas 24 h, entretanto há uma queda entre 24 h e 48 h, com esta mesma fonte de carbono, totalizando aproximadamente

$10^{10}$  UFC/mL. AEF80 apresentou o maior crescimento bacteriano nas primeiras 24 h, assim como observado na curva de crescimento, atingindo  $10^{11}$  UFC/mL. Sua queda nas últimas 24 h é leve, totalizando  $10^{10}$  UFC/mL ao final deste tempo. AEF50 apresentou um comportamento de crescimento durante todos os tempos, finalizando as 48 h com aproximadamente  $10^{11}$  UFC/mL. AEF20 também apresentou uma queda leve entre 24 h e 48 h, entretanto seu crescimento total de colônias não foi maior que  $10^9$  UFC/mL. Inulina também apresentou uma queda nas últimas 24 h, finalizando o tempo de incubação com a contagem de aproximadamente  $10^9$  UFC/mL. Sendo assim, os extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM apresentaram crescimentos superiores que os controles positivos, e uma queda nas últimas 24 h menor que de glicose.



**Figura 42.** Log UFC/mL dos extratos AEF20, AEF50 e AEF80 em *Lactobacillus rhamnosus* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Todos os extratos testados apresentaram halos de inibição maiores que 10 mm em *S. aureus* (Tabela 26). Não houve halos de inibição contra as bactérias gram-negativas testadas.

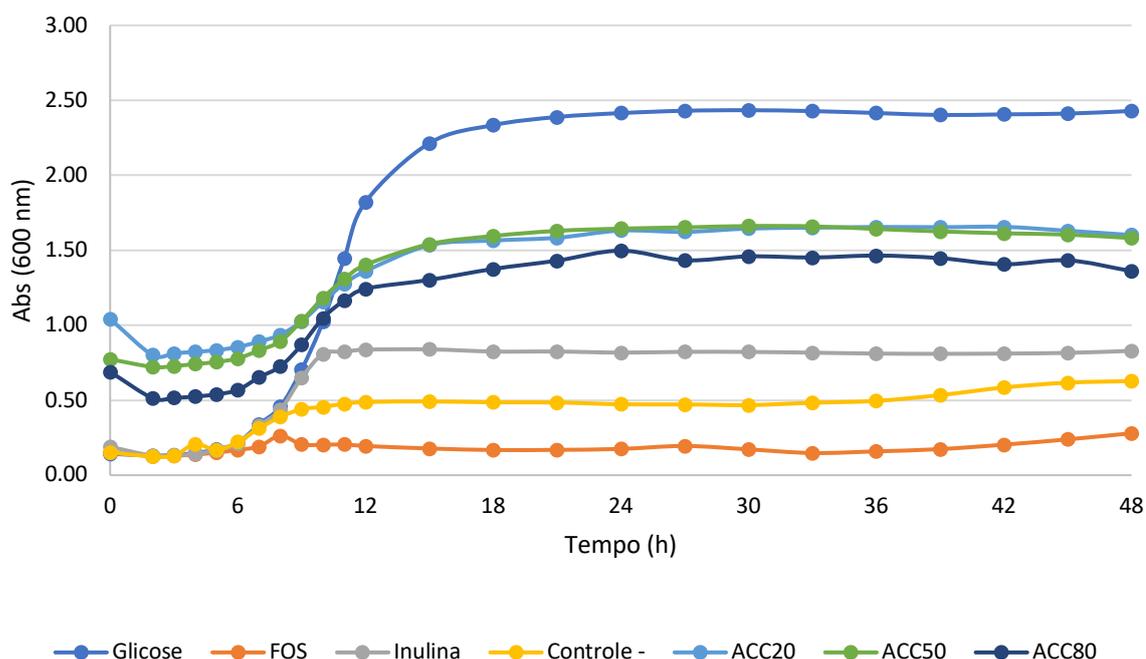
**Tabela 26.** Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de *L. rhamnosus* com extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88) contra bactérias patogênicas.

Sobrenadante	Halo (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25299	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 14028	<i>S. aureus</i> ATCC 27154
Amoxicilina	20,6 ± 1,2	36,0 ± 0	37,7 ± 0,6
Glicose	-	-	-
FOS	-	-	-
Inulina	-	-	-
Controle -	-	-	-
AEF20	-	-	13,5 ± 2,1
AEF50	-	-	14,5 ± 1,9
AEF80	-	-	15,5 ± 0,6

AEF80 foi o extrato capaz de induzir o maior crescimento microbiano e apresentar o maior halo de inibição contra *S. aureus*.

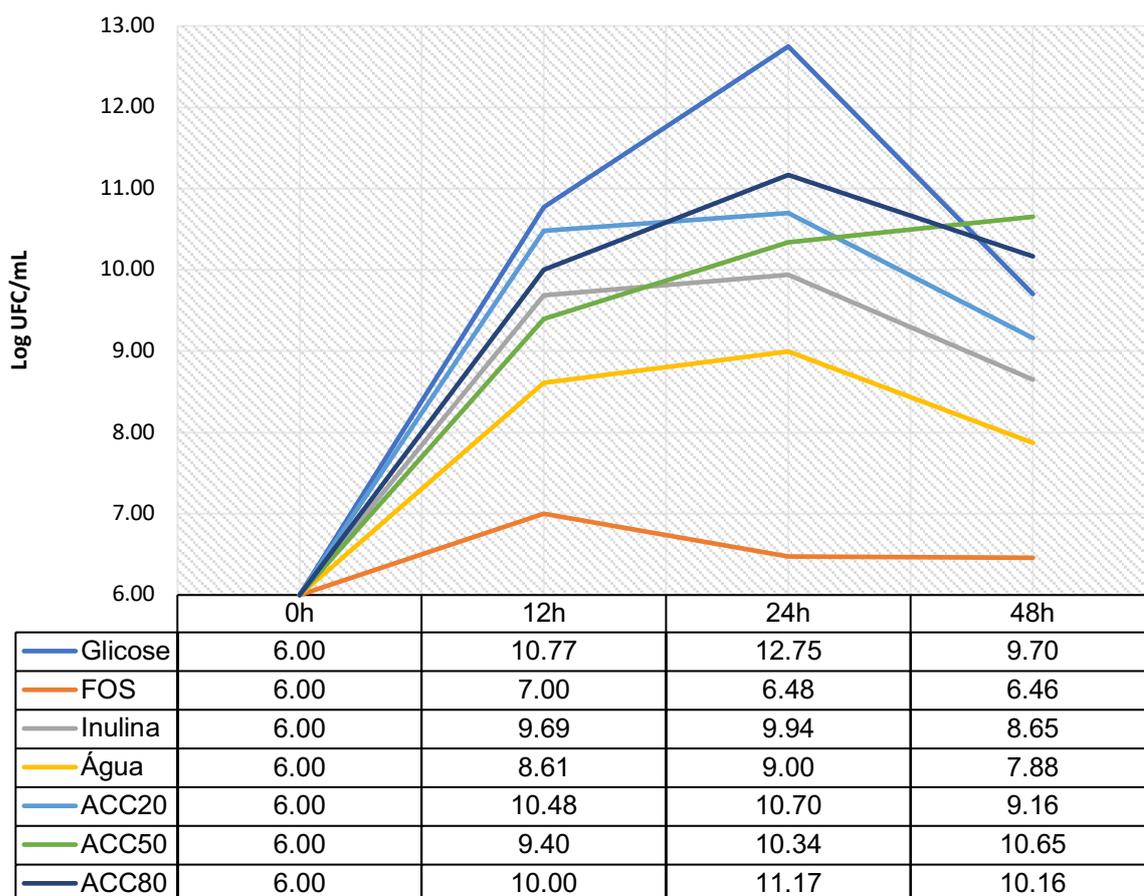
### 2.6.3.2. Extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40)

Assim como observado com os extratos de *P. pulmonarius* (EF88), a fase estacionária de *L. rhamnosus* com os extratos aquosos se iniciaram antes que com glicose, entre 15 h e 118 h (Figura 43). Neste caso, os extratos ACC20 e ACC50 apresentaram comportamentos bastante semelhantes, enquanto ACC80 aparentou crescimento bacteriano menor.



**Figura 43.** Curva de crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. lecomtei* (CC40) como fontes de carbono.

Observando a Figura 44, é possível verificar que os extratos ACC50 e ACC80 apresentaram contagens finais (48 h) superiores às contagens de glicose ( $10^9$  UFC/mL) e de inulina ( $10^8$  UFC/mL). ACC50 apresenta um comportamento de crescimento em todos os tempos, indicando o não esgotamento de suas fontes de carbono por *L. rhamnosus* nesta condição. Em 48 h sua contagem é de aproximadamente  $10^{11}$  UFC/mL. ACC80 apresenta queda na contagem das últimas 24 h, entretanto a contagem é maior que a de glicose, FOS e inulina, de em torno de  $10^{10}$  UFC/mL. ACC20 demonstrou comportamento semelhante com inulina, totalizando uma contagem final em torno de  $10^9$  UFC/mL.



**Figura 44.** Log UFC/mL dos extratos ACC20, ACC50 e ACC80 em *Lactobacillus rhamnosus* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Assim como observado com os extratos de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM, os sobrenadantes das culturas com os extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40) em TCA apresentaram pouca ou nenhuma atividade contra *E. coli* e *S. enterica* Typhi (Tabela 27). Contra *S. aureus* todos os sobrenadantes apresentaram halos de inibição superiores a 10 mm, sendo de ACC20 o maior de todos (16 mm).

**Tabela 27.** Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de *L. rhamnosus* com extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40) contra bactérias patogênicas.

Sobrenadante	Halo (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25299	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 14028	<i>S. aureus</i> ATCC 27154
Amoxicilina	20,6 ± 1,2	36,0 ± 0	37,7 ± 0,6
Glicose	-	-	-
FOS	-	-	-
Inulina	-	-	-
Controle -	-	-	-

<b>ACC20</b>	-	-	16,5 ± 2,1
<b>ACC50</b>	-	8,5 ± 0,7	11,0 ± 0,0
<b>ACC80</b>	-	-	14,5 ± 0,7

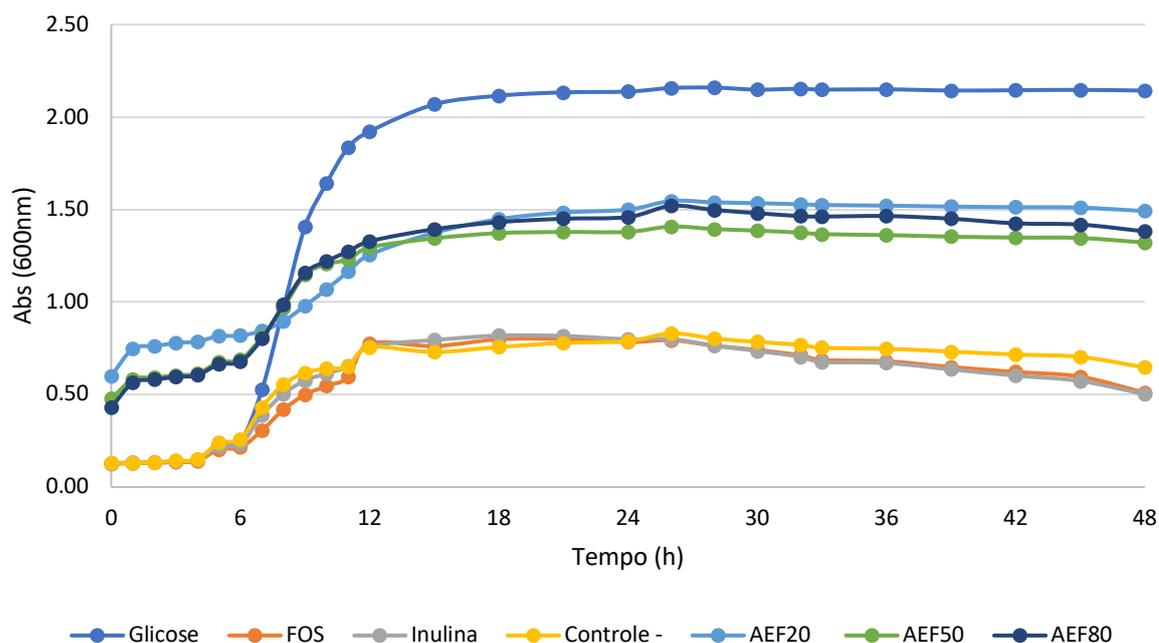
A partir dos resultados dos extratos como fontes de carbono para o crescimento de *L. rhamnosus*, foi possível observar que os extratos cultivados com menores proporções de casca de coco, AEF80, ACC50 e ACC80 foram os que possuíram maior evidência de atividade prebiótica, sendo pouca ou nenhuma sua atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e potencialmente presente contra *S. aureus*.

#### **2.6.4. *Lactobacillus plantarum***

*L. plantarum* é uma bactéria probiótica heterofermentativa, anaeróbia facultativa e amplamente encontrada no trato gastrointestinal de humanos. É uma das poucas espécies do gênero *Lactobacillus* que é utilizada tradicional e industrialmente na conservação de alimentos, além de ser encontrada na microbiota intestinal (DE VRIES, VAUGHAN, et al., 2006).

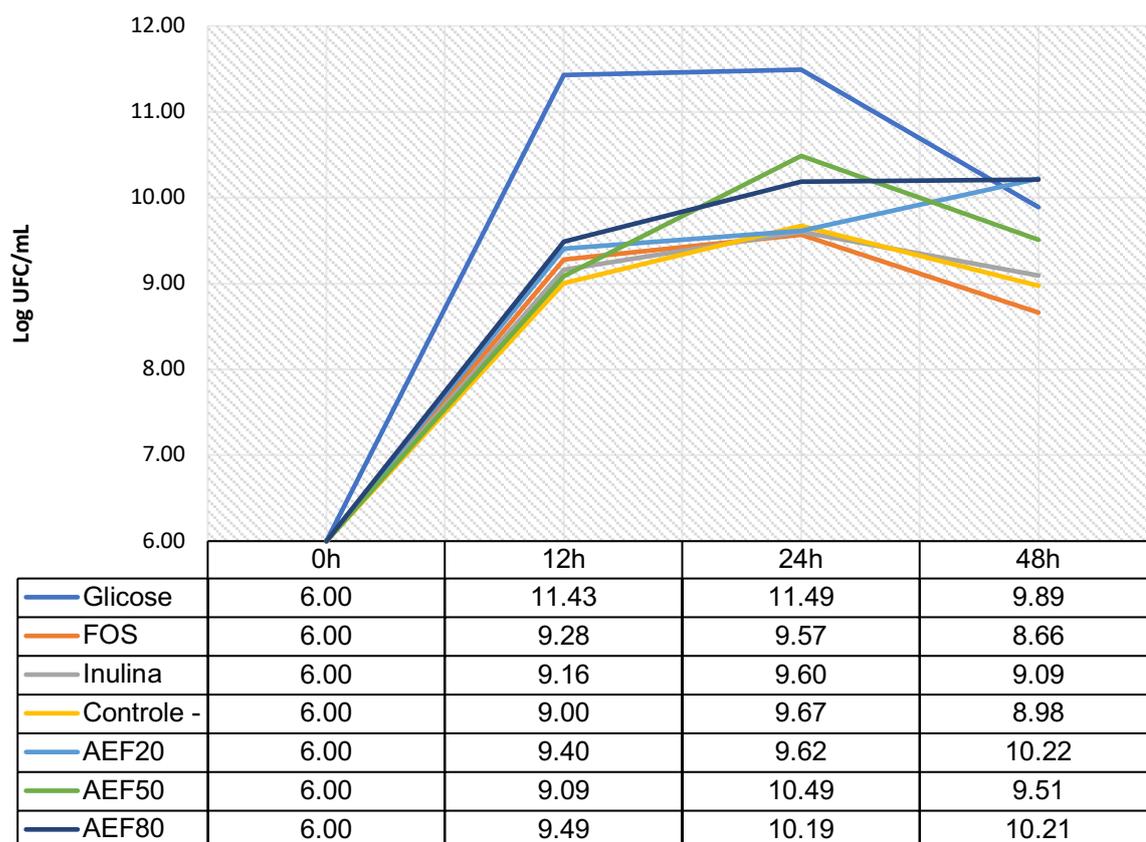
##### **2.6.1.1. Extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88)**

A partir da curva de crescimento de *L. plantarum* (Figura 45) é possível observar que a fase estacionária se iniciou em torno de 118 h com todas as fontes de carbono. FOS, inulina e o controle negativo apresentaram perfis de crescimento semelhante. Dentre os extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88), todos apresentaram curvas de crescimento semelhantes entre si.



**Figura 45.** Curva de crescimento de *Lactobacillus plantarum* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. pulmonarius* (EF88) como fontes de carbono.

A partir da contagem de UFC/mL (Figura 46), é possível observar que a glicose se comportou de forma semelhante observada nos outros microrganismos avaliados anteriormente. Há um pico de crescimento bacteriano em torno de 24 h, seguido de uma queda nas últimas 24 h de crescimento. Neste caso o pico sendo de  $10^{11}$  UFC/mL, e a contagem final em torno de  $10^{10}$  UFC/mL. FOS, inulina e o controle negativo apresentaram contagens semelhantes em todos os tempos, finalizando o tempo de cultura com aproximadamente  $10^9$  UFC/mL. AEF20 e AEF80 apresentaram crescimento contínuo em todos os pontos, indicando que não houve esgotamento das fontes de carbono nas primeiras 24 h. Nas 48 h a contagem das culturas com AEF20 e AEF80 como fontes de carbono foram de  $10^{10}$  UFC/mL. A cultura com AEF50 apresentou comportamento diferente dos outros extratos, havendo redução de contagem nas 24 h finais, resultando numa contagem de em torno de  $10^{10}$  UFC/mL.



**Figura 46.** Log UFC/mL dos extratos AEF20, AEF50 e AEF80 em *Lactobacillus plantarum* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Apesar da indução do crescimento dos extratos de EF88 no crescimento bacteriano de *L. plantarum*, não foi observado nenhum halo de inibição sensível contra nenhuma das bactérias testadas. Foram observados pequenos halos de inibição contra *E. coli*, apenas com os sobrenadantes de FOS, AEF20 e AEF80 (Tabela 28).

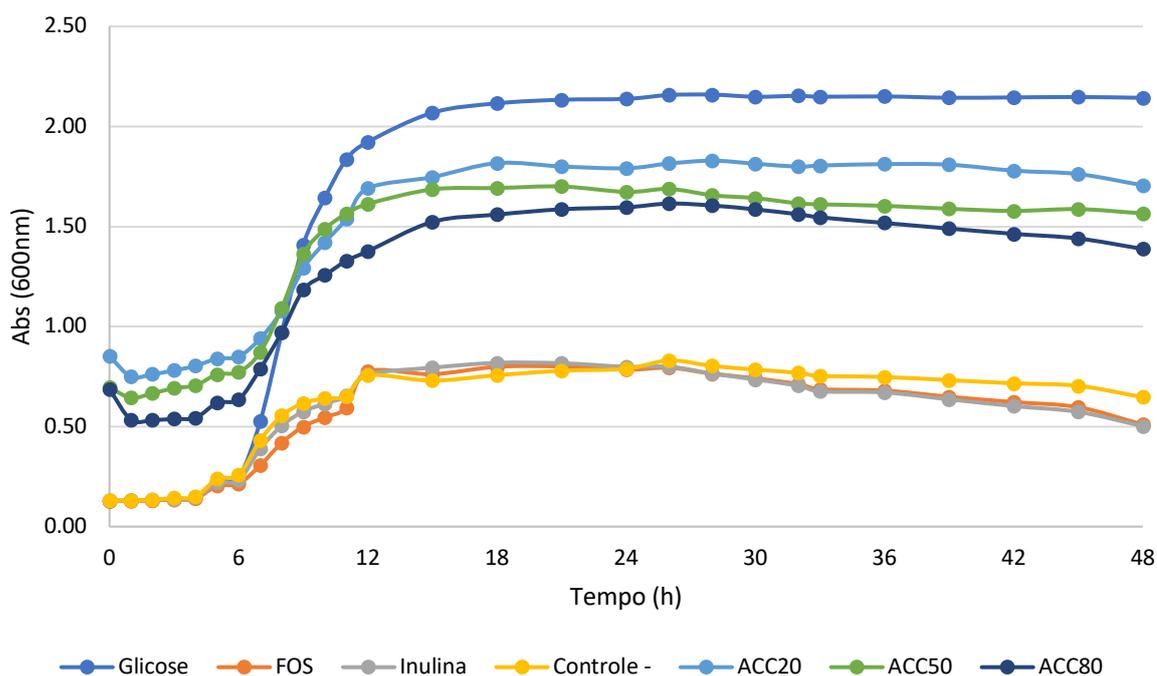
**Tabela 28.** Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de *L. plantarum* com extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88) contra bactérias patogênicas.

Sobrenadante	Halo (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25299	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 14028	<i>S. aureus</i> ATCC 27154
Amoxicilina	20,6 ± 1,2	36,0 ± 0	37,7 ± 0,6
Glucose	-	-	-
FOS	8,0 ± 0,0	-	-
Inulina	-	-	-
Controle -	-	-	-
AEF20	8,0 ± 0,0	-	-
AEF50	8,0 ± 0,7	-	-

Através dos resultados obtidos com os extratos aquosos de EF88 em TSPM como fontes de carbono para *L. plantarum* não é possível afirmar que possuem atividade prebiótica pelo fato dos sobrenadantes das culturas não apresentarem atividade antimicrobiana contra nenhuma das bactérias testadas.

### 2.6.1.2. Extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40)

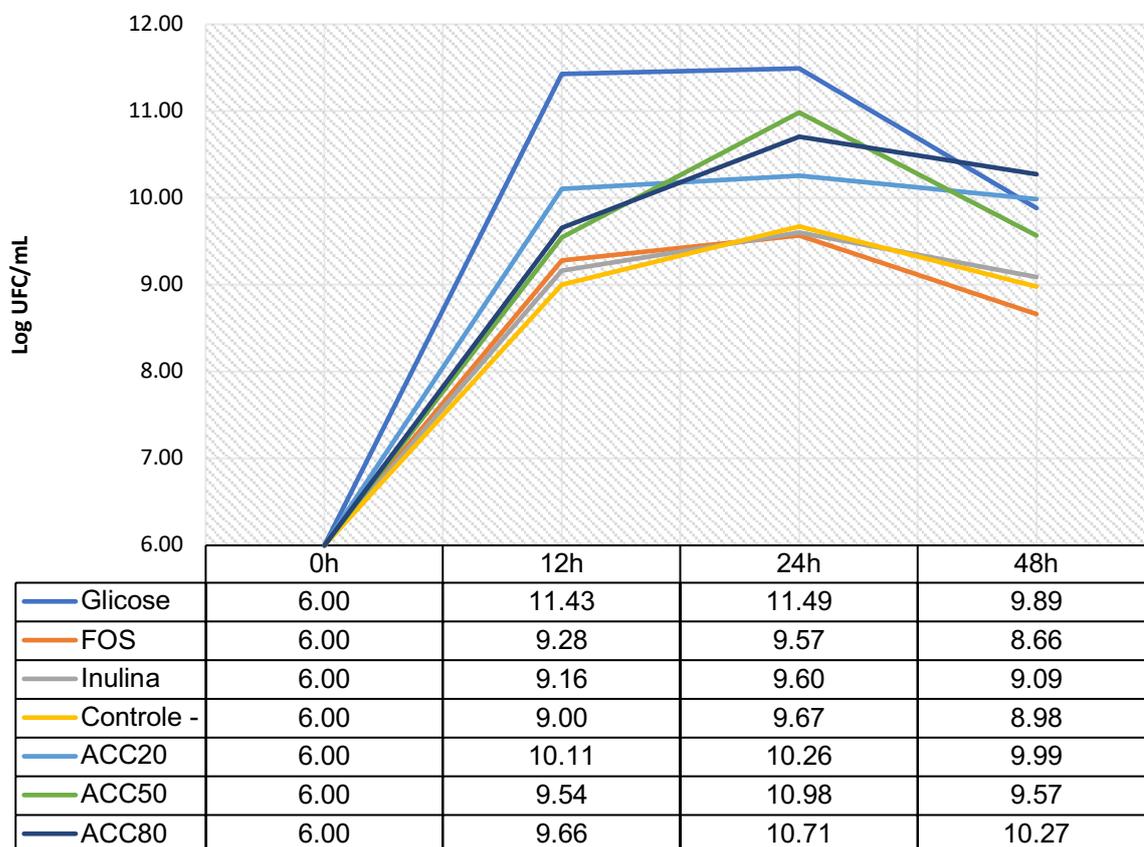
Assim como observado com os extratos de *P. pulmonarius* (EF88), os extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40) como fonte de carbono para o crescimento de *L. plantarum* tiveram sua fase estacionária em torno de 118 h, observando-se suas curvas de crescimento (Figura 47). De acordo com a Figura 47, os extratos de *P. lecomtei* (CC40) apresentaram comportamentos semelhantes de crescimento.



**Figura 47.** Curva de crescimento de *Lactobacillus plantarum* com o uso de extratos aquosos de fermentados de *P. lecomtei* (CC40) como fontes de carbono.

Observando-se as contagens de UFC/mL, todos apresentaram queda na contagem de colônias nas últimas 24 h (Figura 48). Sendo de ACC20 a queda mais sutil, estando as contagens dentro dos  $10^{10}$  UFC/mL. ACC50 e ACC80 demonstraram quedas de contagens de colônias de aproximadamente  $10^{11}$  UFC/mL para  $10^{10}$

UFC/mL nas últimas 24 h. Mesmo assim, as contagens no tempo final de colônias dos extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40), em especial o ACC80 e o ACC20, foram maiores do que com os controles positivos e glicose.



**Figura 48.** Log UFC/mL dos extratos ACC20, ACC50 e ACC80 em *Lactobacillus plantarum* nos tempos 0 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Em relação à inibição contra as bactérias testadas, apenas o sobrenadante da cultura de *L. plantarum* com ACC20 como fonte de carbono apresentou halo de inibição indicando sensibilidade à *S. aureus* (Tabela 29). Contra *E. coli* e *S. enterica* Typhi nenhum outro sobrenadante apresentou inibição.

**Tabela 29.** Halos de inibição dos sobrenadantes das culturas de *L. plantarum* com extratos aquosos de *P. lecomtei* (CC40) contra bactérias patogênicas.

Sobrenadante	Halo (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25299	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 14028	<i>S. aureus</i> ATCC 27154
Amoxicilina	20,6 ± 1,2	36,0 ± 0	37,7 ± 0,6
Glicose	-	-	-

<b>FOS</b>	8,0 ± 0,0	-	-
<b>Inulina</b>	-	-	-
<b>Controle -</b>	-	-	-
<b>ACC20</b>	-	-	17,0 ± 1,4
<b>ACC50</b>	-	-	-
<b>ACC80</b>	-	-	-

A partir dos resultados obtidos com *L. plantarum*, apenas ACC20 como fonte de carbono foi capaz de promover crescimento bacteriano de *L. plantarum* e inibir *S. aureus*.

Sintetizando a atividade prebiótica investigada nos microrganismos *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *B. lactis*, foi possível verificar que os extratos aquosos como fontes de carbono das culturas para estes microrganismos foram responsáveis por comportamentos diferentes da glicose e dos prebióticos de referência (FOS e inulina) como fontes de carbono. As fontes de carbono FOS e inulina apresentaram, em sua grande maioria, comportamentos bastante semelhantes aos do controle negativo (apenas água), exceto com *B. lactis* e *L. acidophilus* para o FOS.

Sabe-se que FOS consiste em um monômero de glicose (G) ligado por ligações  $\alpha$ -1,2 em dois ou mais unidades de  $\beta$ -2-1-frutose (F), formando uma mistura de 1-kestose (GF<sub>2</sub>), nistose (GF<sub>3</sub>) e 1-F-frutofunanosil nistose (GF<sub>4</sub>), sendo GF<sub>2</sub> e GF<sub>3</sub> normalmente encontrada em produtos alimentícios. Frente a isto, existem duas principais rotas de fermentação pelas bactérias probióticas, sendo que lactobacilos e bifidobactérias têm preferência pela via de FOS de cadeia curta (GF<sub>3</sub>) (ENDO, TAMURA, et al., 2012). A inulina é um frutano altamente polimerizada, com diferentes graus de polimerização, obtida através da extração de raiz de chicória. Portanto, existem inulinas com baixo grau de polimerização (IN-IQ, menos de 9), médio grau de polimerização (IN-EXL, entre 10 e 22) e de alto grau de polimerização (IN-HP, acima de 23). As bactérias probióticas não são capazes de fermentar todos os tipos de inulina, tendo no geral, preferência pelas inulinas de baixo grau de polimerização (BIEDRZYCKA e BIELECKA, 2004).

Pelo fato da FOS e inulina terem sido adquirida por fontes comerciais, não é possível garantir quais dos monômeros de FOS e em quais graus de polimerização se encontra a inulina. Pelos resultados obtidos neste trabalho, possivelmente eram FOS de cadeia longa e inulina média e/ou altamente polimerizada, de difícil

fermentação por parte das bactérias probióticas testadas. Para ensaios futuros, recomenda-se a utilização de FOS e inulina de nível padrão, para se ter certeza de quais monômeros e a quantos graus de polimerização se encontram.

Em relação aos extratos aquosos de *P. pulmonarius* (EF88) em TSPM, AEF20 foi o extrato como fonte de carbono que apresentou propriedades prebióticas em todas as bactérias testadas. Como fonte de carbono para *L. acidophilus* e *L. plantarum*, AEF20 proporcionou crescimento de contagem de colônias crescente durante as 48 h, demonstrando que as fontes de carbono não haviam se esgotado ainda durante este tempo, sendo que com a glicose o esgotamento foi em 24 h. As contagens finais de UFC/mL de *L. acidophilus* e *L. plantarum* foram respectivamente de aproximadamente  $10^{12}$  e  $10^{10}$  UFC/mL. Para o crescimento de *B. lactis* e *L. rhamnosus*, apesar de não terem apresentado crescimento crescente, não apresentaram quedas bruscas nas contagens de colônias das últimas 24 h e ao final do tempo de cultivo suas contagens foram de aproximadamente de  $10^9$  UFC/mL. Em relação à inibição do crescimento de bactérias patogênicas, os sobrenadantes das culturas de AEF20 com *L. acidophilus*, *B. lactis* e *L. rhamnosus* apresentaram halos de inibição maiores que 10 mm contra *S. aureus*. Apenas o sobrenadante da cultura com *L. plantarum* que não apresentaram halos sensíveis contra nenhuma bactéria patogênica. Vale destacar que o sobrenadante da cultura de AEF80 como fonte de carbono para *L. acidophilus* apresentou halo de inibição contra *S. enterica* Typhi, sendo o único sobrenadante de cultura que apresentou atividade antimicrobiana contra uma bactéria gram-negativa testada.

Os extratos aquosos obtidos a partir de cultivos de *P. lecomtei* (CC40) com diferentes proporções de TCA + CCV usados como fontes de carbono para a cultura das bactérias probióticas testados que induziram a um crescimento contínuo de colônias foram ACC50 com *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, tendo ao final dessas culturas contagens de aproximadamente  $10^{12}$  e  $10^{11}$  UFC/mL, respectivamente. ACC80 como fonte de carbono para *B. lactis* e *L. plantarum*, apresentaram menores quedas na contagem de colônias nas últimas 24 h, sendo que em *B. lactis* houve aumento na contagem de 24 h em relação a 48 h. As duas culturas com ACC80 ao final do tempo de crescimento tiveram suas contagens de colônias em torno de  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC/mL, com valores próximos ao controle de glicose de cada bactéria. O sobrenadante da cultura de *L. acidophilus* com ACC20 como fonte de carbono apresentou halo de inibição maior de 10 mm contra *S. enterica* Typhi, enquanto o

sobrenadante de *L. rhamnosus* com esta mesma fonte de carbono apresentou halo pequeno contra *S. enterica* Typhi, este sobrenadante também apresentou halo maior que 10 mm contra *S. aureus*. O sobrenadante da cultura de *B. lactis* com ACC80 inibiu *S. aureus*, e o único sobrenadante de cultura de *L. plantarum* que apresentou inibição contra alguma bactéria patogênica (*S. aureus*, neste caso) foi com ACC20 como fonte de carbono.

Como observado nos resultados dos extratos metanólicos dos cultivos EF88 e *P. lecomtei* (CC40) contra as bactérias patogênicas testadas, a atividade antimicrobiana foi maior contra bactérias gram-positivas, corroborando com os achados nas atividades prebióticas, indicando que as moléculas presentes nestes extratos e encontradas nas culturas probióticas são moléculas lipofílicas ou anfifílicas. Entretanto, infecções causadas por *S. aureus* são de grande relevância clínica, sendo considerado um dos principais patógenos associados a gastroenterites e infecções comunitárias e hospitalares (ANDERSON, LIN, et al., 2012).

Vale ressaltar que grande número de infecções causadas por *S. aureus* são oriundas de carnes mal processadas. O uso de antibióticos para porcos e aves já foi evidenciado como potencialmente prejudicial ao ser humano e ao ambiente, favorecendo a resistência de microrganismos aos antibióticos, tendo seu uso regulado em alguns países. A adição de tortas proteicas tratadas com basidiomicetos na nutrição animal pode ser de grande importância, pois além de conter compostos bioativos, como  $\beta$ -glucanas (em especial no SMS do tratamento com *P. pulmonarius* (EF88) com 80% de TSPM; e no SMS do tratamento com *P. lecomtei* (CC40) contendo 50% de TCA), e serem ricos em proteína, também possuem potencial antimicrobiano e prebiótico, podendo assim reduzir o uso de antibióticos na pecuária, reduzindo assim a resistência antimicrobiana pelo uso de antibióticos de referência e infecções de agentes patogênicos.

## VI. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a colonização de sete espécies diferentes de basidiomicetos (*Agaricus subrufensis*, *Lentinula edodes*, *Schizophyllum commune*, *Fistulina hepatica*, *Pleurotus pulmonarius*, *Panus lecomtei* e *Ganoderma lucidum*) em biomassas ricas em proteica (torta de semente de pinhão-manso e torta de caroço de algodão), com a adição de biomassas lignocelulósicas (casca de coco verde e torta de macaúba), em relação a atividade antioxidante, compostos fenólicos, crescimento, redução no teor de compostos tóxicos, entre outros, com a finalidade de produzir um substrato pós-cultivo (SMS) para alimentação animal. O substrato foi avaliado quanto ao seu teor de matéria mineral, lipídeos, proteínas, lignina, celulose e hemicelulose; teor de  $\beta$ -glucanas; atividade antioxidante, antimicrobiana e prebiótica.

Para torta de semente de pinhão-manso foi escolhido *P. pulmonarius* com casca de coco verde e para torta de caroço de algodão foi escolhido *P. lecomtei* também com casca de coco verde, por aparentemente esta mistura apresentar ganhos em atividade antioxidante. Os dois fungos foram capazes de degradar os compostos tóxicos, além de produzir substratos ricos em proteínas.

A partir dos cultivos com diferentes proporções de tortas e casca de coco verde, verificou-se que o maior incremento de concentração de proteína no material pós-cultivo em relação a mistura inicial se deu no colonizado e no SMS da mistura TSPM50% e TCA50%. O material lignocelulósico foi reduzido principalmente quanto a hemicelulose no SMS de TSMP50% e TSMP80%, e quanto a hemicelulose e lignina no SMS do TCA50%.

Extratos aquosos e metanólicos foram obtidos destes diferentes cultivos. Os extratos metanólicos demonstraram de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso a 20% com casca de coco verde e o extrato de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão a 80% com casca de coco verde foram os que apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante. No entanto, em geral, o efeito da colonização foi negativo para a atividade antioxidante.

Os extratos aquosos não apresentaram atividade antimicrobiana, somente os extratos metanólicos. Dando destaque aos extratos de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso a 20% e a 80%, e de *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão a 80%. Estes extratos apresentaram atividade antimicrobiana leve contra *S. aureus* (ATCC 27154).

Para avaliação da atividade prebiótica, os extratos aquosos foram testados como fontes de carbono para o cultivo de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum*. Além disso, os sobrenadantes das culturas destes microrganismos com as diferentes fontes de carbono foram testados contra agentes patogênicos. Em sua maioria, os sobrenadantes apresentaram atividade contra *S. aureus* (ATCC 27154). Os extratos que se destacaram na combinação destas duas atividades foram os de *P. pulmonarius* em torta de semente de pinhão-manso a 20% e *P. lecomtei* em torta de caroço de algodão a 50% e 80%, sendo estes extratos que apresentaram altos teores de  $\beta$ -glucanas.

Em relação às  $\beta$ -glucanas, em TSPM o SMS a 80% apresentou os maiores teores, mas em termos de colonizado, TSPM 20% foi superior em relação às outras concentrações. Já em TCA, os maiores teores de  $\beta$ -glucanas foram encontrados no colonizado de a 50%, podendo ser o responsável pela melhor atividade prebiótica deste extrato aquoso.

Considerando os resultados obtidos, o cultivo de *P. pulmonarius* e *P. lecomtei* em torta de semente de pinhão-manso e torta de caroço de algodão, respectivamente, com a adição de casca de coco verde como biomassa lignocelulósica, indicaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 27154), atividade prebiótica para lactobacilos e bifidobactérias, além de seus extratos apresentaram altos teores de  $\beta$ -glucanas e não houve incremento na atividade antioxidante. Tendo destaque os cultivos de *P. pulmonarius* em TSPM20% e *P. lecomtei* em TCA80%.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELGADIR, W. S. et al. Comparative toxicity of *Croton macrostachys*, *Jatropha curcas* and *Piper abyssinica* seeds in Nubian goats. **Small Ruminant Research**, 48, 2003. 61-67.
- AGUIAR, J. S. et al. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436-440, 2008.
- AIDA, F. M. N. A. et al. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 11-12, p. 567-575, 2009.
- AIZAWA, E. et al. Possible association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. **Journal of affective disorders**, v. 202, p. 254-257, 2016.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.
- ALANZI, A. et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. **Beneficial microbes**, v. 9, n. 4, p. 593-602, 2018.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALVES, M. J. et al. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. **Planta Medica**, v. 78, p. 1707-1718, 2012.
- ALVES, M. J. et al. Wild mushroom extracts potentiate the action of standard antibiotics against multiresistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 116, n. 1, 2014. 32-38.
- ANDERSON, M. J. et al. Alpha-toxin promotes *Staphylococcus aureus* mucosal biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 64, p. 1-10, 2012.
- ANJUM, N. et al. *Lactobacillus acidophilus*: characterization of the species and application in food production. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 9, p. 1241-1251, 2014.

- ANKOM TECHNOLOGY. **Acid Detergent Fiber in Feeds by Filter Bag Technique**. ANKOM Technology Method 5. [S.I.]. 2006.
- ANKOM TECHNOLOGY. **Neutral Detergent Fiber in Feeds by Filter Bag Technique**. ANKOM Technology Method 6. [S.I.]. 2006.
- ANPC. **Associação Nacional de Produtores de Cogumelos**, 2018. Disponível em: <<https://www.anpccogumelos.org/>>. Acesso em: 8 Janeiro 2019.
- ANVISA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 243, DE 26 DE JULHO DE 2018. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2018. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC\\_243\\_2018\\_.pdf/0e39ed31-1da2-4456-8f4a-afb7a6340c15](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_243_2018_.pdf/0e39ed31-1da2-4456-8f4a-afb7a6340c15)>.
- AOCS. AOCS Standard Procedure Am 5-04. In: \_\_\_\_\_ **Official Methods and Recommended Practices of the Aocs**. Champaing: [s.n.], 1998.
- APAK, R. E. A. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, 12, 2007. 1496-1547.
- ARBAAYAH, H. H. & K. Y. U. Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. **Mycosphere**, v. 4, n. 4, p. 661-673, 2013.
- ARORA, D. **Handbook of fungal biotechnology**. [S.I.]: Boca Raton: CRC Press. Taylor and Francis Group, 2003.
- ARRUDA, F. P. et al. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas L.*) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Olericultura Fibrose**, 8, n. 1, 2004. 789-799.
- AZMI, A. F. M. N. et al. Prebiotic activity of polysaccharides extracted from *Gigantochloa levis* (Buluh beting) shoots. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1635-1651, 2012.
- BACH, F. et al. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 2382-2392, 2017.
- BALAKUMAR, R. et al. Antibacterial and antifungal activity of fruit bodies of *Phellinus* mushroom extract. **International Journal of Biosciences**, 1, n. 3, 2011. 72-77.
- BARROS, L. et al. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. **European Food Research Technology**, v. 225, p. 151-156, 2007.

- BARROS, L.; BAPTISTA, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. **Food and Chemical Toxicology**, 45, 2007. 1731-1737.
- BELEWU, M. A.; AHMED, O.; IBRAHIM, S. O. Solid state fermentation of *Jatropha curcas* kernel cake with cocktail of fungi. **International Journal of Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 12-19, 2011.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 3-4, p. 170-175, 2004.
- BISEN, P. S. et al. *Lentinula edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. **Current Medicinal Chemistry**, 17, n. 22, 2010. 2419-2430.
- BOH, B. et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. **Biotechnology Annual Review**, Amsterdam, The Netherlands, 13, 2007. 265-301.
- BOSE, A.; KEHARIA, H. Phorbol ester degradation in *Jatropha* seedcake using white rot fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 447-450, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BRSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, 28, 1995. 25-30.
- BROECKX, G. et al. Effects of initial cell concentration, growth phase, and process parameters on the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying. **Drying Technology**, v. 1, p. 1-19, 2019.
- CANDELA, M. et al. DnaK from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* is a surface-exposed human plasminogen receptor upregulated in response to bile salts. **Microbiology**, v. 146, n. 6, p. 1609-1618, 2010.
- CAPURSO, L. Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A review. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 53, p. S1-S41, 2019.
- CARRASCO-GONZALEZ, J. A.; SERNA-SALDIVAR, S. O.; GUTIERREZ-URIBE, J. A. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. **Journal of Food Composition and Analysis**, 58, 2017. 69-81.
- CASALICCHIO, G. et al. Research on the amino acid composition of some fungi. **Micologia Italiana**, 4, 1975. 21-32.

- CASTRO, A. L. A. D. et al. Avaliação da produção de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) singer utilizando resíduo do beneficiamento têxtil do algodão como substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1286-1290, 2007.
- CENBRAM. *Panus lecomtei*. **Programa de Pesquisa em Biodiversidade**, 2012. Disponível em: <[https://ppbio.inpa.gov.br/fungoteca/panus\\_lecomtei](https://ppbio.inpa.gov.br/fungoteca/panus_lecomtei)>. Acesso em: 25 Janeiro 2019.
- CHANG, S. T. Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. In: CHEUNG, P. C. K. **Mushrooms as Functional Foods**. [S.l.]: Wiley: Hoboken, 2008. p. 1-33.
- CHANG, S.-T.; MILES, P. G. **Mushrooms**: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. [S.l.]: Boca Raton: CRC Press, 2004.
- CHEN, W. Q. et al. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on serum lipids and lipoperoxidation in experimental hyperlipidemic rats. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 30, 2005. 1358-1360.
- CHERIAN, E. et al. Free radical scavenging and mitochondrial antioxidant activities of Reishi- *Ganoderma lucidum*. **J. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, 20, 2011. 289-308.
- CHERONIS, J. C.; & REPINE, J. E. Proteases, protease inhibitors and protease-derived peptides (importance in human pathophysiology and therapeutics). **Agents and actions supplements.**, 1993.
- CHOWDHARY, A. et al. *Schizophyllum commune* as an emerging fungal pathogen: a review and report of two cases. **Mycoses**, 56, 2013. 1-10.
- CHYE, F. Y.; WONG, J. Y.; LEE, J.-S. Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms. **Food Science Technology Institute**, 14, n. 4, 2008. 375-384.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. (CLSI/NCCS M100 - S17). [S.l.]. 2007.
- CONCEICAO, A. A. et al. Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. **Plos One**, v. 13, n. 5, 2018.
- CÖR, D. et al. Two-stage extraction of antitumor, antioxidant and antiacetylcholinesterase compounds from *Ganoderma lucidum* fruiting body. **Journal of Supercritic Fluids**, 91, 2014. 53-60.

- CÖR, D.; KNEZ, Ž.; HRNČIČ, M. K. Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma Lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review. **Molecules**, 23, n. 649, 2018. 1-21.
- CORRÊA, R. C. et al. The emerging use of mycosterols in food industry along with the current trend of extended use of bioactive phytosterols. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, n. 19-35, 2017.
- COSTA, A. G. et al. Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível: revisão. **Revista DAE**, 194, 2014. 36-51.
- CUNHA, J. R. B. **Processo de destoxificação da torta da semente de *Jatropha curcas* L. (pinhão- manso) utilizando enzimas extracelulares de macrofungos**. Universidade Federal de Lavras. [S.l.]. 2017.
- DA LUZ, J. M. R. et al. Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in jatropha biodiesel residues. **LWT - Food Science and Technology**, 50, 2013. 575-580.
- DA SILVA, A. C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v. 13, p. 375-384, 2011.
- DA SILVA, M. D. C. S. et al. Growth and Tolerance of *Pleurotus ostreatus* at Different Selenium Forms. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 2, 2019.
- DASANAYAKA, P. N.; WIJEYARATNE, S. C. Cultivation of *Schizophyllum commune* mushroom on different wood substrates. **Journal of Tropical Forestry and Environment**, v. 7, n. 1, p. 65-73, 2017.
- DE MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas**, 19, n. 2, 2015. 1465-1391.
- DE SOUSA, V. M. C.; DOS SANTOS, E. F.; SGARBIERI, V. C. The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, p. 4, 2011.
- DE VRIES, M. C. et al. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1018-1028, 2006.

- DEEPALAKSHMI, K.; MIRUNALINI, S. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. **Journal of Biochemical Technology**, 5, 2014. 718-726.
- DG SANTE. **Summary report of the standing committee on plants, animals, food and feed**. European Commission Health and Food Safety Directorate-General. Bruxelles. 2016.
- DIAS, S. E.; ABE, C.; SCHWAN, R. F. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Scientia Agricola**, 61, n. 5, 2004. 545-549.
- DILZER, A.; PARK, Y. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 6, p. 488-513, 2012.
- DINESH BADU, P. D.; SUBHASREE, R. S. The Sacred Mushroom "Reishi"—A Review. **Am-Euras. J. Bot.**, 1, 2008. 107-110.
- DONG, J. Y. et al. Preliminary results on nematicidal activity from culture filtrates of Basidiomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchoididae). **Annals of Microbiology**, 56, n. 2, 2006. 163-166.
- DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n. 3, p. 510-521, 2008.
- DU, B. et al. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. **Trends in Food Science & Technology**, 41, n. 1, 2015. 49-59.
- DU, B.; ZHU, F.; XU, B. An insight into the anti-inflammatory properties of edible and medicinal mushrooms. **Journal of Functional Foods**, 47, 2018. 334-342.
- EGGEN, T.; SASEK, V. Use of edible and medicinal oyster mushroom [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr) Kumm.] spent compost in remediation of chemically polluted soils. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 4, 2002. 255-261.
- EL ENSHASY, H. A.; HATTIKAUL, R. Mushroom immunomodulators: Unique molecules with unlimited applications. **Trends in Biotechnology**, 31, n. 12, 2013. 668-677.
- ELLAN, K. et al. Anti-viral activity of culinary and medicinal mushroom extracts against dengue virus serotype 2: an in-vitro study. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 260, 2019.
- ENDO, H. et al. Comparison of fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus* and *Bacteroides* species. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 176-179, 2012.

- EVANS, F. J. Environmental hazards of diterpene esters from plants. In: EVANS, F. J. **Naturally occurring phorbol esters**. [S.l.]: CRC Press, Boca Raton, 1986. p. 1-31.
- EZEQUIEL, J. M. B. **Farelo de algodão como fonte alternativa de proteína alternativa de origem animal**. Simpósio sobre Ingredientes na Alimentação Animal. Uberlândia: Anais do Simpósio sobre Ingredientes na Alimentação Animal. 2002.
- EZEQUIEL, J. M. B. **Uso do caroço de algodão na alimentação de ruminantes**. III Simpósio Goiano sobre manejo e nutrição de bovinos. Goiânia: Anais do III Simpósio Goiano sobre manejo e nutrição de bovinos. 2001.
- FAOSTAT. Crops. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>>.
- FARASATA, M. et al. Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 1, p. 163-170, 2014.
- FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2004.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Cremistry, Ultrastructure, Reactions**. Belin: De Gruyter, 1984.
- FERREIRA, I. C.; BARROS, L.; ABREU, R. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, 16, n. 12, 2009. 1543-1560.
- FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Advance Access Publication**, 27, 2008. 3-15.
- FIRST-NATURE.COM. *Fistulina hepatica*. **First-Nature.com**, 2018. Disponível em: <<https://www.first-nature.com/fungi/fistulina-hepatica.php>>. Acesso em: 25 Janeiro 2019.
- FREREJACQUE, M. Presence of D-arabitol in *Fistulina hepatica*. **Comptes Rendus Hebdomadaire des Seances de l'Academie des Sciences**, 1939. 1123-1124.
- FROTA, B. R.; ALVES, A. A. **Tratamento Enzimático Da Fibra Do Coco Verde Para Alimentação De Ruminante**. Universidade Federal do Piauí. [S.l.]. 2015.
- FU, L. et al. Rapid and accurate determination of the lignin content of lignocellulosic biomass by solid-state NMR. **Fuel**, 141, 2015. 39-45.
- GADELHA, I. C. N. et al. Gossypol toxicity from cottonseed products. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

- GEORGE, S. et al. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 2005. 1370-1373.
- GERASIMENYA, V. P. et al. Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm extracts. **International Journal of Medicinal Mushroom**, 4, 2002. 127-132.
- GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Review**, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.
- GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbiological Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. New York: Cambridge University Press. 2007. 335-357 p.
- GOEL, G. et al. Phorbol esters: structure, biological activity and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, 26, 2007. 279-288.
- GOMES, D. et al. Censo paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais. **Pesquisa & Tecnologia**, 13, n. 1, 2016. 1-6.
- 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**. Universidade Federal do Tocantins. [S.I.]. 2015.
- 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. **Expressão diferencial de genes associados à degradação enzimática e destoxificação da torta de pinhão-manso em *Pleurotus pulmonarius***. Universidade de Brasília. Brasília, p. 186. 2019.
- GU, Y.; LIN, Y. C.; RIKIHISA, Y. Inhibitory effect of gossypol on steroidogenic pathways in cultured bovine luteal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 169, 1990. 455-461.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ra Ed. ed. Oxford: Oxford University Press., 1999.
- HATTORI, R.; TANAKA, H. **Method for growing fruit body of *Fistulina hepatica***. US5590489A, 7 Janeiro 1997.

- HE, P. 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**, 69, 2016. 48-53.
- HETLAND, G. et al. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, p. 363-370, 2008.
- HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycology Research**, 111, 2007. 509-547.
- HIROTA, M. et al. A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L. an intramolecular diester of 12-deoxy16-hydroxyphorbol. **Cancer Research**, 48, 1988. 5800-5804.
- HOLMBERG, C. A. et al. Pathological and toxicological studies of calves fed a high concentration cottonseed meal diet. **Veterinary Pathology**, 25, 1988. 147-153.
- HORSZWALD, A.; ANDLAUER, W. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, v. 1, n. 4, p. 189-199, 2011.
- HOUFANI, A. A. et al. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars—a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 134, p. 105481, 2020.
- HUMPHRIES, R. M.; LINSCOTT, A. J. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 3-31, 2015.
- INÁCIO, F. D. et al. Produção de Protease e Lacase por Basidiomicetos. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 359-362, 2013.
- ISLAM, M. **Cultivation Techniques of Edible Mushrooms: Agaricus bisporus, Pleurotus spp., Lentinula edodes and Volvariella volvacea**. [S.l.], p. 10.13140/RG.2.1.1304.0162. 2015.
- JAGADISH, L. K. et al. Comparative study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach before and after boiling. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 654-661, 2009.
- JAYACHANDRAN, M.; XIAO, J.; XU, B. A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota. **International Journal of Molecular Science**., v. 18, p. 1934, 2017.
- JORDAN, S. N.; MULLEN, G. J.; MURPHY, M. C. Composition variability of spent mushroom compost in Ireland. **Bioresource Technology**, 99, n. 2, 2008. 411-418.

- KAGAN, V. E. **Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids and lysophospholipids.** In Vitamin E: biochemistry and health implications. New York, NY: Annals of the New York Academy of Sciences. 1989. p. 121-135.
- KALAČ, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 2, p. 209-218, 2013.
- KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L. A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, v. 31, p. 671-701, 1996.
- KAO, C. et al. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: Active ingredients and pathways. **Functional Foods in Health and Disease**, 3, 2013. 48-65.
- KARWA, A. S.; RAI, M. K. Naturally Occurring Medicinal Mushroom-Derived Antimicrobials: A Case-Study Using Lingzhi or Reishi *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 14, 2012. 481-490.
- KASUYA, M. C. M. et al. **Bio-detoxification of jatropha seed cake and its use in animal feed.** Biodiesel-Feedstocks, Production and Applications. [S.l.]: Intech. 2012.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International**, v. 25, p. 1270141, 2009.
- KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, 97, n. 1, 2005. 12-24.
- KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, 44, n. 2, 2007. 77-87.
- KHASANOV, A.; DAVRANOV, K.; HASANOV, H. Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Cotton Ground Oil-Cake Proteins. **Journal of Food Science and Engineering**, p. 147-150, 2017.
- KHATUA, S.; PAUL, S.; ACHARYA, K. Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: a review. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 6, n. 5, p. 3, 2013.
- KIM, D. H. et al. Changes of phytochemical components (urushiols, polyphenols, gallotannins) and antioxidant capacity during *Fomitella fraxinea*-mediated fermentation of *Toxicodendron vernicifluum* bark. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 683, 2019.

- KIRK, P. M. et al. **Ainsworth & Bisby's - Dictionary of The Fungi**. 10. ed. ed. [S.l.]: Wallingford: CABI Europe, 2008.
- KLAMER, M.; & BÅÅTH, E. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18: 2ω6, 9. **Soil Biology and Biochemistry**, 36, n. 1, 2004. 57-65.
- KLAUS, A. et al. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2005-2011, 2011.
- KLEEREBEZEM, M.; VAUGHAN, E. E. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 269-290, 2009.
- KNUDSEN, H.; VESTERHOLD, J. **Funga Nordica**. 2. ed. ed. Copenhagen: Nordsvamp: [s.n.], 2008.
- KNUDSEN, K. E. B. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. **Animal feed science and technology**, v. 67, n. 4, p. 319-338, 1997.
- KOH, J. H. et al. Synbiotic impact of tagatose on viability of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG mediated by the phosphotransferase system (PTS). **Food microbiology**, v. 36, n. 1, p. 7-13, 2013.
- KOHARI, E. K.; AMAZONAS, M. A. A.; CARVALHO, F. J. P. C. **Potencial de crescimento micelial do fungo *Pleurotus sajor-caju* em serragem e casca de *Pinnus spp* e resíduo de infusão de erva-mate**. Workshop Sulamericano Sobre Usos Alternativos de Resíduos de Origem Florestal e Urbana. Curitiba: Colombo: Embrapa-Florestas. 1997. p. 150-155.
- KOMATSU, N. et al. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. **GANN Japanese Journal of Cancer Research**, v. 60, n. 2, p. 137-144, 1969.
- KONG, G.; DAUD, K. M.; ZHU, S. Effects of pigment glands and gossypol on growth, development and insecticide-resistance of cotton bollworm (*Heliothis armigera* (Hübner)). **Crop Protection**, 29, n. 8, 2010. 813-819.
- KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a industrial view point. **Biotechnology Advancy**, New York, v. 17, p. 561-594, 1999.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

- KUO, M. *Pleurotus pulmonarius*. **MushroomExpert.Com**, 2017. Disponível em: <[https://www.mushroomexpert.com/pleurotus\\_pulmonarius.html](https://www.mushroomexpert.com/pleurotus_pulmonarius.html)>. Acesso em: 25 Janeiro 2019.
- KWAK, A. M. et al. Water extract from spent mushroom substrate of *Hericium erinaceus* suppresses bacterial wilt disease of tomato. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 311-318, 2015.
- KWAK, W. S.; JUNG, S. H.; KIM, Y. I. Broiler litter supplementation improves storage and feed-nutritional value of sawdust-based spent mushroom substrate. **Bioresource Technology**, 99, n. 8, 2008. 2947-2955.
- LAM, Y. S.; OKELLO, E. J. Determination of lovastatin,  $\beta$ -glucan, total polyphenols, and antioxidant activity in raw and processed oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (higher Basidiomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 17, n. 2, 2015.
- LAMPI, A. M. E. A. Antioxidant activities of alpha and gammatocopherols in the oxidation of rapeseed oil triglycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 649-755, 1999.
- LANA, R. D. P. Sistema de suplementação alimentar para bovinos de corte em pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31, n. 1, 2002. 451-459.
- LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Matérias-primas oleaginosas para biorrefinarias. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2011. p. 29-43.
- LAVIOLA, B. G.; DIAS, L. A. S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, 32, n. 1, 2008. 1969-1975.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LI, R. K. et al. Anti-atherosclerotic properties of higher mushrooms (a clinico-experimental investigation). **Vopr. Pitan.**, 1, 1989. 16-19.
- LIKTOR-BUSA, E. et al. Investigation of Hungarian mushrooms for antibacterial activity and synergistic effects with standard antibiotics against resistant bacterial strains. **Letters in Applied Microbiology**, 62, n. 6, 2016. 437-334.
- LIU, X. et al. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. **Journal of food composition and Analysis**, v. 21, n. 3, p. 219-228, 2008.

- LIŻEWSKA, K. et al. Resistant dextrins as prebiotic. In: CHANG, C.-F. **Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. [S.l.]: Europe: InTech, 2012. p. 261-288.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 3, n. 7, p. 509, 2002.
- MA, Y. et al. A study on recycling of spent mushroom substrate to prepare chars and activated carbon. **Bioresources**, 9, n. 3, 2014. 3939-3954.
- MACNEIL, A. et al. Activation of the Epstein–Barr virus lytic cycle by the latex of the plant *Euphorbia tirucall*. **British Journal of Cancer**, 88, 2003. 1566-1569.
- MAJOWICZ, S. E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella gastroenteritis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 882-889, 2010.
- MAKKAR, H. P. S. et al. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, 1997.
- MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**, 62, 1998. 207-215.
- MANABE, S.; NUBER, D. C.; LIN, Y. C. Zone-specific hepatotoxicity of gossypol in perfused rat liver. **Toxicol**, 29, n. 6, 1991. 787-790.
- MARIMUTHU, S.; MAHENDRAN, S. Evaluation Of Different Protein Precipitates Of A Wild Mushroom, *Ganoderma Lucidum* For Antibacterial Activities Against Human Pathogenic Bacteria. **Evaluation**, v. 12, n. 7, 2019.
- MASCO, L. et al. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1137-1143, 2004.
- MATTILA, P. H.; MARNILA, P.; PIHLANTO, A. Wild and Cultivated Mushrooms. In: YAHIA, E. M. **Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health**. 2nd. ed. [S.l.]: [s.n.], 2017. p. 1279-1303.
- MAZZEO, M. F. et al. *Lactobacillus acidophilus*—Rutin Interplay Investigated by Proteomics. **PloS one**, v. 10, n. 11, 2015.

- MCCLEARY, B. V.; CODD, R. Measurement of (1-3)(1-4)- $\beta$ -d-glucan in barley and oats: a streamlined enzymatic procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 55, p. 303-312, 1991.
- MEILE, L. et al. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 57-64, 1997.
- MENDONÇA, S. et al. Applications of *Jatropha curcas* Cake. In: Mulpuri, S.; Carels, N.; Bahadur, B. **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop**. [S.l.]: Springer, v. 3: A Sustainable Multipurpose Crop, 2019. p. 365-380.
- MILES, P. G.; CHANG, S. -T. **Mushroom Biology: Concise Basics and Current Developments**. [S.l.]: World Scientific Publishing, 1997.
- MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of industrial microbiology**, v. 6, n. 4, p. 263-267, 1990.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and human health. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 5, p. 2-9, 1996.
- NANO, G. M. et al. In vitro tests to evaluate potential biological activity in natural substances. **Fitoterapia**, 73, 2002. 140-146.
- NAYAN, N. et al. Variation in the solubilization of crude protein in wheat straw by different white-rot fungi. **Animal feed science and technology**, v. 242, p. 135-143, 2018.
- NCCLS, N. C. F. C. L. S. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. Pennsylvania. 2003.
- NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiological reviews**, v. 49, n. 1, p. 1, 1985.
- NITHIYANANTHAM, S.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G. Potential of *Jatropha curcas* as Biofuel. **Animal Feed and Health Products**, 89, 2012. 861-872.
- NOGUEIRA, A. R. D. A. **Manual de Laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.
- NWACHUKWU, E.; UZOETO, H. O. Antimicrobial activity of some local mushrooms on pathogenic isolates. **Journal of Medicinal Plants**, 2010.
- OHM, R. A. et al. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. **Nature Biotechnology**, 28, n. 9, 2010. 957-963.

- OJEDIRAN, T. K. et al. Nutritive value of processed dietary fungi treated *Jatropha curcas* L. kernel meals: voluntary intake, growth, organ weight and hepatic histology of broiler chicks. **Tropical Agriculture (Trinidad)**, v. 93, n. 2, p. 101-110, 2016.
- OLIVEIRA, I. S. et al. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 587-593, 2008.
- OMOJASOLA, P. F.; BENU, O. E. Fermentative Production of gibberellic acid from *Jatropha curcas* seed cake using *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. **FUTA Journal of Research in Sciences**, v. 12, n. 2, p. 242-251, 2016.
- OMS. Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance. **World Health Organization**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/antibiotics-animalseffectiveness/en/>>. Acesso em: Nov 2019.
- PALANISAMY, M. et al. Pressurized water extraction of  $\beta$ -glucan enriched fractions with bile acids-binding capacities obtained from edible mushrooms. **Biotechnology progress**, v. 30, n. 2, p. 391-400, 2014.
- PALAZZOLO, E.; LETIZIA GARGANO, M.; VENTURELLA, G. The nutritional composition of selected wild edible mushrooms from Sicily (southern Italy). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 63, n. 1, 2012. 79-83.
- PALMIERI, G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the Lignolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appl and Environmental Microbiology**, 66, n. 3, 2000. 920-924.
- PARIS, R. R.; DURAND, M.; BONNET, J. L. Identification of chlorogenic acid in mushrooms by paper chromatography. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, 18, 1960. 769-772.
- PATEL, Y.; NARAIAN, R.; SINGH, V. K. Medicinal properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): a review. **World Journal of Fungal and Plant Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2012.
- PEGLER, D. N. **The genus *Lentinus*: a world monograph**. Chicago: The University of Chicago Press. [S.l.]. 1983.
- PELKMANS, J. F. et al. Transcription factors of *Schizophyllum commune* involved in mushroom formation and modulation of vegetative growth. **Scientific Reports**, 7, 2017. 310.
- PEREIRA, J. H. B. **Valor nutritivo da torta da polpa da macaúba (*Acrocomia aculeata*) para suínos em crescimento**. Universidade de Brasília. [S.l.]. 2013.

- PHAN, C.-W.; SABARATNAM, V. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. **Applied Microbiological Technology**, 96, 2012. 863-873.
- PIRES, J. E. A. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biosciências, Universidade de São Paulo**, 2017.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.
- QINNGHE, C. et al. Screening of culture condition and properties of xylanases by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, 39, n. 11, 2003. 1561-1566.
- QUI, U.; LUI, Y. Fruitbody production in basidiomycetes. **Applied Microbiological and Biotechnology**, 54, 2000. 141-152.
- R CORE TEAM. R Foundation for Statistical Computing. **R: A language and environment for statistical**, 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.
- 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, p. 221-227, 2001.
- RAMESH, C.; PATTAR, M. G. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. **Pharmacognosy Research**, v. 2, p. 107-112, 2010.
- RASHIDI, A. N. M.; YANG, T. A. Nutritional and antioxidant values of oyster mushroom (*P. sajor-caju*) cultivated on rubber sawdust. **Journal on Advanced Science Engineering Information Technology**, n. 6, p. 161-164, 2016.
- RIBEIRO, B. et al. Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). **Food and Chemical Toxicology**, 45, n. 10, 2007. 1805-1813.
- RIBEIRO, L. F. et al. Relação energética e emissão de biodiesel de pinhão manso: análise sob uma perspectiva dinâmica. **Produção e Desenvolvimento**, 1, n. 2, 2015. 79-89.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Sciences**, 2, 1997. 152-159.

- ROUPAS, P. et al. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 687-709, 2012.
- ROYSE, D. J.; SANCHEZ-VAZQUEZ, J. E. Influence of substrate wood-chip particle size on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. **Bioresource Technology**, 76, n. 3, 2001. 229-233.
- RUAN-SOTO, F.; GARIBAY-ORIJEL, R.; CIFUENTES, J. Process and dynamics of traditional selling of wild edible mushrooms in tropical Mexico. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 2, n. 1, 2006. 3.
- SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman–Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. **Experimental and molecular pathology**, v. 93, n. 3, p. 428-433, 2012.
- SANCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiological Biotechnology**, 85, 2010. 1321-1337.
- SANODIYA, B. S. et al. *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 10, 2009. 717-742.
- SANTANA, T. D. D. **Tortas oleaginosas da produção de biodiesel como fonte nutritiva para cultivo de basidiomicetos e obtenção de proteases e fitases**. Universidade de Brasília. [S.I.]. 2016.
- SANUSI, G. O. et al. Changes in chemical composition of *Jatropha curcas* kernel cake after solid-state fermentation using some selected fungi. **Global J. Biol. Agric. Health Sci**, v. 2, n. 2, p. 62-66, 2013.
- SARI, M. et al. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. **Food Chemistry**, v. 216, p. 45-51, 2017.
- SAUNDERS, W. B. 21- Systemic and Multi-Organ Diseases. In: D., C. P., et al. **Veterinary Medicine**. 11ª Edição. ed. [S.I.]: [s.n.], 2017. p. 2002-2214.
- SAWANGWAN, T. et al. Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, p. 519-524, 2018.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster: Technomic**, 1995.
- SHEN, H. et al. Antimicrobials from Mushrooms for Assuring Food Safety. **COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY**, 16, 2017. 316-329.

- SHIMOGAKI, H. et al. Purification and properties of a novel surface-active agent- and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp. Y. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2251-2258, 1991.
- SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plants species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.
- SILVA, M. D. C. S. D. **Enriquecimento e biodisponibilidade de selênio no cogumelo de *Pleurotus ostreatus***. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Viçosa. [S.l.]. 2009.
- SILVEIRA RUEGGER, M. J. et al. Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Höhn. in lignocellulosic substrates, 32, n. 3, 2001. 211-214.
- SIWULSKI, M. et al. *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. - Health-promoting properties. A review. **Herba Polonica**, 61, 2015. 105-118.
- SLUITER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. National Renewable Energy Laboratory. [S.l.], p. 1-16. 2008.
- SMITH, K. T. **Tree disease and wood decay as agents of environmental and social change**. Proceedings of the landscape disease symposium. California: [s.n.]. 2018. p. 25-30.
- SOARES NETO, C. B. **Degradação de gossipol por macrofungos e análise do secretoma de *PANUS LECOMTEI* durante crescimento em caroço de algodão**. Embrapa Agroenergia. [S.l.]. 2019.
- SOUZA, I. A. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 572-577, 2007.
- STEUDLER, S.; BLEY, T. Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. **Bioprocess and biosystems engineering**, 38, n. 7, 2015. 1313-1323.
- SYNYTSYA, A. et al. Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. **Czech Journal of Food Sciences**, 26, n. 6, 2008. 441-446.
- TAN, Y. S. et al. Influence of customized cooking methods on the phenolic contents and antioxidant activities of selected species of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.). **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 5, p. 3058-3064, 2015.

- TORRES FILHO, H. M. Gastroenterites infecciosas. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 101, n. 2, p. 15-29, 2013.
- TSUGE, T. N. et al. Seto Cinnatriacetins A and B, new antibacterial triacetylene derivatives from the fruiting bodies of *Fistulina hepatica*. **Journal of Antibiotics**, 52, 1999. 578-581.
- VALVERDE, M. E.; HERNANDEZ-PEREZ, T.; PAREDES-LOPEZ, O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. **International Journal of Microbiology**, p. 1-14, 2015.
- VAN KUIJK, S. J. A. et al. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 1, p. 191-202, 2015.
- VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II A rapid method of the determination of fiber and lignin. **Journal of Association of Official Agricultural Chemistry**, v. 46, n. 5, 1963.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Sciences**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.
- VARGAS-ISLA, R. et al. Relationship between *Panus lecomtei* and *P. strigellus* inferred from their morphological, molecular and biological characteristics. **Mycoscience**, 56, 2015. 561-571.
- VARGAS-ISLA, R.; ISHIKAWA, N. K.; PY-DANIEL, V. Contribuições etnomicológicas dos povos indígenas da Amazônia. **Macapá**, 3, n. 1, 2013. 58-65.
- VENTURINI, M. E. et al. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. **Journal of food protection**, v. 71, n. 8, p. 1701-1706, 2008.
- VENTURINI, M. E. et al. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against food-borne bacterial strains. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 1701-1706, 2008.
- WATERHOUSE, A. Determination of Total Phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 6, p. 11.11-11.18, 2002.
- WHO. World Health Organization. **Diarrhoeal disease**, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>>. Acesso em: 5 Maio 2020.
- WISITRASSANEWONG, K. et al. *Agaricus subrufescens*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 19, 2012. 131-146.

- WONG, W. L. **Antioxidant, genoprotective and hepatoprotective activities of *Panus giganteus* (berk.)**. University of Malaya. [S.I.]. 2012.
- WU, U. S. et al. Berger Volatile compounds from the fruiting bodies of beefsteak fungus *Fistulina hepatica* (Schaeffer: Fr.) Fr. **Food Chemistry**, 92, 2005. 221-226.
- XU, X.; ZHANG, X. Lentinula edodes-Derived Polysaccharide Alters the Spatial Structure of Gut Microbiota in Mice. **Plos One**, 10, n. 1, 2015. e0115037.
- YAMAC, M.; BILGILI, F. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, p. 660-667, 2006.
- YUAN, C. et al. PSK protects macrophages from lipoperoxide accumulation and foam cell formation caused by oxidatively modified low-density lipoprotein. **Atherosclerosis**, v. 124, n. 2, p. 171-181, 1996.
- YUEN, J. W. M.; GOHEL, M. D. I. Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: A review of scientific evidence. **Nutritional Cancer Journal**, 53, 2005. 11-17.
- ZHAI, F. H.; WANG, Q.; HAN, J. R. Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 202-208, 2015.
- ZHANG, W. 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, p. 690-695, 2006.
- ZHANG, W. J. et al. Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. **Livestock Science**, 111, 2007. 1-9.
- ZHU, H. et al. Extraction, purification and antibacterial activities of a polysaccharide from spent mushroom substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, 50, n. 3, 2012. 840-843.
- ZJAWIONY, J. K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi. **Journal of Natural Products**, 67, 2004. 300-310.
- ZMITROVICH, I. V.; KOVALENKO, A. E. Lentinoid and polyporoid fungi, two generic conglomerates containing important medicinal mushrooms in molecular perspective. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 18, n. 1, 2016. 23-38.