

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

PAOLA FERNANDA SANCHEZ FIORIN

**BIO-CONVERSÃO DO CAROÇO DE ALGODÃO EM FARELO VISANDO A
MELHORIA NUTRICIONAL ATRAVÉS DO CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* PELA
METODOLOGIA JUN-CAO MODIFICADA PARA A PRODUÇÃO DE UMA
RAÇÃO BOVINA COM MAIOR PORCENTAGEM NUTRITIVA**

DOURADOS
2016

PAOLA FERNANDA SANCHEZ FIORIN

**BIO-CONVERSÃO DO CAROÇO DE ALGODÃO EM FARELO VISANDO A
MELHORIA NUTRICIONAL ATRAVÉS DO CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* PELA
METODOLOGIA JUN-CAO MODIFICADA PARA A PRODUÇÃO DE UMA
RAÇÃO BOVINA COM MAIOR PORCENTAGEM NUTRITIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais.
Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

DOURADOS

2016

PAOLA FERNANDA SANCHEZ FIORIN

**BIO-CONVERSÃO DO CAROÇO DE ALGODÃO EM FARELO VISANDO A
MELHORIA NUTRICIONAL ATRAVÉS DO CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* PELA
METODOLOGIA JUN-CAO MODIFICADA PARA A PRODUÇÃO DE UMA
RAÇÃO BOVINA COM MAIOR PORCENTAGEM NUTRITIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
FCBA - UFGD

Avaliador: Cinthia Aparecida de Andrade Silva
FCBA - UFGD

Avaliadora: Prof. Dr. Gisele Jane de Jesus
FCBA – UFGD

Dourados, 06 de Outubro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Com a realização deste trabalho e o que ele representa agradeço a Deus, pela etapa concluída e tudo que Ele tem me possibilitado.

Agradeço aos meus pais Michela Viviane Sanchez Fiorin e Nilton Sergio Fiorin pela vida e todo o suporte prestado nesses anos de graduação.

Aos meus professores que nesta caminhada deram o seu melhor pelo aprendizado, juntamente com os técnicos desta instituição.

Agradeço aos meus colegas e amigos por compartilhar experiências, especialmente meus amigos da IV turma pelo convívio diário.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz, o meu muito obrigado pelo esforço e dedicação no processo de orientação deste trabalho.

À todos que contribuíram direta e indiretamente na participação e realização deste trabalho.

Aos examinadores da banca pelo aceite e tempo dedicado.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar com mais inteligência.”

Henry Ford

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Composição proximal do substrato com e sem cultivo no tempo final | 18 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| RESUMO GERAL | 08 |
| 1 Introdução geral | 08 |
| 2 Objetivos | 10 |
| REFERÊNCIAS | 10 |
| 3 Artigo | 13 |
| 4 Considerações Finais | 23 |
| APÊNDICE 1 | 27 |
| APÊNDICE 2 | 28 |
| APÊNDICE 3 | 29 |
| APÊNDICE 4 | 30 |
| APÊNDICE 5 | 31 |
| APÊNDICE 6 | 32 |
| APÊNDICE 7 | 34 |
| APÊNDICE 8 | 36 |
| APÊNDICE 9 | 38 |
| APÊNDICE 10 | 40 |
| ANEXO 1 | 42 |

Resumo geral

Por conta da exploração econômica, cada vez mais a busca por alimentos de alta qualidade e menos dispendiosos vem crescendo, com o intuito de prevalecer o alto valor nutricional. O baixo custo e todos os nutrientes necessários são fundamentais para uma produção alta visando um bom equilíbrio econômico. O farelo de algodão se encaixa nesses requisitos, por ser um subproduto equivalente da extração do óleo do caroço de algodão e pelas suas exigências nutricionais serem altas. Com a inserção do fungo *Pleurotus ostreatus* para a miceliação, reforça o fato de que além de ser de fácil adaptação e manutenção, possui também um baixo custo de cultura. O único fator negativo do farelo de algodão é o gossipol, uma toxina presente no substrato que é tóxica para os monogástricos levando a morte em pouco tempo, enquanto que nos ruminantes é tóxica do ponto de vista acumulativo, resultante em edemas pulmonares, etc. Os fungos do gênero *Pleurotus* possuem capacidade degradante de substâncias tóxicas, devido ao seu complexo lignina-degradante, onde a lacase é a principal atuante.

Palavras-chave: *Pleurotus ostreatus*, nutrição, caroço de algodão, farelo de algodão;

1. Introdução geral:

Entre as espécies mais competitivas, como o *Agaricus bisporus* e o *Lentinula edodes*, os cogumelos do gênero *Pleurotus*, são atualmente também considerados interessantes, do ponto de vista comercial, pela fácil adaptação, manutenção e baixo custo de cultura (RAMOS et al., 2003). O cultivo das espécies de *Pleurotus* produz alimento de alto valor nutricional a partir de muitos resíduos agroindustriais e, estes, podem ser uma boa fonte de proteína e outras substâncias de interesse como: os minerais cálcio, fósforo, ferro, magnésio, fibras alimentares solúveis, fibras alimentares insolúveis, beta glucanas, quitina, compostos fenólicos e ribonuclease (SILVA; COSTA; CLEMENTE, 2004; NGAI; NG, 2004; MANZI et al., 2004).

O caroço de algodão com línter possui 23,0% de proteína bruta (PB), 17,8% de extrato etéreo (EE), 47,0% de fibra em detergente neutro (FDN), 39% de fibra em detergente ácido (FDA) e 95% de nutrientes digestíveis totais (NDT) (NRC, 2007), fazendo deste produto um bom suplemento proteico e energético, indicando bom desempenho produtivo de animais alimentados com caroço de algodão (MADRUGA; VIEIRA; CUNHA, 2008; BERNARDES;

COELHO; CARVALHO, 2007; ROGERS; POORE; PASCHAL, 2002; KANDYLIS; NIKOKYRIS; DELIGIANNIS, 1998). O alto teor relativo de proteína bruta e o baixo custo do farelo de algodão o tornaram uma opção para a formulação de dietas para animais. Dessa forma, alguns trabalhos têm apresentado desempenhos satisfatórios de ruminantes alimentados com farelo de algodão (KANDYLIS; NIKOKYRIS; DELIGIANNIS, 1999; ROGERS; POORE; PASCHAL, 2002).

Entre os componentes do farelo de algodão está o gossipol, um composto polifenólico tóxico encontrado na planta de algodão em quantidade considerada perigosa para a saúde. Concentra-se no algodão, mas também pode ser encontrada em outras partes da planta do algodão, como a casca, folhas, caules. Gossipol existe em duas formas: livre e ligada. A forma livre é tóxica, enquanto gossipol que se liga a proteínas não apresenta toxidez (MORGAN, 1989).

Fungos do gênero *Pleurotus* têm sido utilizados para degradar vários tipos de substâncias recalcitrantes de natureza fenólica como: azul brilhante de remazol R (MACHADO; MATHEUS, 2006; MACHADO; MATHEUS; BONONI, 2005), azul remazol marinho (ERDEN et al., 2009), 2,4 diclorofenol (SILVA et al., 2009) dentre muitas outras. A atividade de degradação desse tipo de compostos se deve ao complexo lignina-degradante destes fungos, o qual é composto por enzimas, tais como a lignina peroxidase (EC 1.11.1.7), a manganês peroxidase (EC 1.11.1.7 e EC 1.11.1.13), lacase (benzendiol: oxigênio-oxidoreductase - EC 1.10.3.2) e tirosinase (também conhecida como as polifenoloxidase - EC 1.14.18.1) (BANAT et al., 1996; BARR; AUST, 1994; BEVILAQUA et al., 2002; ERDEN et al., 2009; FLOWERS; OHNISHI; PENNING, 1997; KENNETH, 1995).

Segundo Wang e Plhak (2004), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e os métodos colorimétricos nem sempre apresentam o mesmo resultado, devido à natureza empírica dos mesmos e a existência de diversos tipos de gossipol ligados e, além disso, o método da AOCS está sujeito a interferência de outros compostos terpenóides que coexistem nas amostras de subprodutos do algodão, enquanto o método de cromatografia líquida requer um preparo muito cuidadoso e detalhista da amostra. Em contrapartida, Hron et al. (1990), consideraram um método simples, sensível e de reprodutibilidade nos resultados.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Promover a bioconversão do caroço em farelo, visando a melhoria da composição centesimal a fim de aumentar as composições nutricionais pela presença do fungo *Pleurotus ostreatus*, com uma detoxificação do gossipol, viabilizando a utilização desse farelo na ração animal para ruminantes.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1- Garantir uma bioconversão do caroço de algodão em farelo;
- 2- Verificar as condições de cultivo dos fungos do gênero *Pleurotus* para completa miceliação;
- 3- Análise da composição centesimal do farelo antes e depois da miceliação, para verificação de melhorias nas alterações nutricionais;
- 4- Verificar o decréscimo da concentração de gossipol no farelo;

REFERÊNCIAS

BANAT, M.B.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227. 1996.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 79-87, 1994.

BEVILAQUA, J.V.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA Jr, G.L.S. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, n.2, p. 151-158. 2002.

BERNARDES, E.B.; COELHO, S.G.; CARVALHO, A.U; OLIVEIRA, H.N.; REIS, R.B.; SATURNINO, H.M.; SILVA, C.A.; COSTA, T.C. Efeito da substituição do feno de Tifton 85 pelo caroço de algodão como fonte de fibra na dieta de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 955-964, 2007.

ERDEN, E.; UCAR, M.C.; TEKINGEZER; PAZARLIOGLU, N.K. Rastreo de enzimas ligninolíticas de fungos autóctones e aplicações para descoloração de Remazole Marine Blue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, P. 346-353. 2009.

FLOWERS, L.; OHNISHI, S.T.; PENNING, T.M. DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones: role of reactive oxygen species, Cu (II)/Cu(I) redox cycling, and *o*-semiquinone anion radicals. **Biochemistry**, v. 36, p. 8640-8648, 1997.

HRON, R.J.; KUK, M.S.; ABRAHAM, G. Determination of Free and Total Gossypol by High Performance Liquid Chromatography. **Journal of American Oil Chemistry Society**, New York, v. 67, n. 3, 1990.

KANDYLIS, K.; NIKOKYRIS, P.N.; DELIGIANNIS, K. Performance of growing, fattening lambs fed whole cotton seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture, Malden**, v. 78, p. 281-289, 1998.

KANDYLIS, K.; NIKOKYRIS, P.N.; DELIGIANNIS, K. Performance of growing, fattening lambs fed diets containing different proportions of cotton seed meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture, Malden**, v. 79, p. 1613-1319, 1999.

KENNETH, E.H. Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by ligninolytic fungi. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 5, p. 41-43, 1995.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R. Biodegradation of remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 468-473. 2006.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue r decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252. 2005.

MADRUGA, M.S.; VIEIRA, T.R.L.; CUNHA, M.G.G. et al. Efeito de dietas com níveis crescentes de caroço de algodão integral sobre a composição química e o perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros Santa Inês. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 8, p. 1496-1502, 2008.

MANZI, P.; MARCONI, S.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO L. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. **Food Chemistry**, v. 84, p. 201–206, 2004.

MORGAN, S.E. Gossypol as a toxicant in livestock. In Burrows GE (ed): **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. Philadelphia. W.B. Saunders, 1989, pp 251-263.

NGAI, P.H.K.; NG, T.B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides**, v. 25, p. 11–17, 2004.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL **Nutrients requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington, D.C.: Nacional Academy Press, 2007. 384p.

RAMOS, A. C.; SAPATA, M. M.; CANDEIAS, M.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, M. L. **Cultura de cogumelos do gênero *Pleurotus***. Portugal: INIAP, 2003. p. 605-611.

ROGERS, G.M.; POORE, M.H.; PASCHAL, J.C. Feeding cotton products to cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, p. 267-294, 2002.

SILVA, S.O.; COSTA, S.M.G.; CLEMENTE E. Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél., substrates and residue after cultivation. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 531-535, 2004.

SILVA, H. H. B.; SCHNEIDER, A. L. S.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Biodegradação de 2,4 diclorofenol por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 6, p. 1563-1577. 2009.

WANG, X.; PLHAK, L.C. Monoclonal antibodies for the analysis of gossypol in cottonseed products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, Davis**, v. 52, p. 709-712, 2004.

Artigo:

Bio-conversão do caroço de algodão em farelo visando a melhoria nutricional através do cultivo de *Pleurotus ostreatus* pela metodologia Jun-cao modificada para a produção de uma ração bovina com maior porcentagem nutritiva.

Bio-conversion of cottonseed meal in order to improve nutrition through *Pleurotus ostreatus* cultivation modified by Jun-cao methodology to the production of a bovine feed with greater nutritive percentage.

Fiorin, P.F.S; Paz, M.F; 2015. Avenida Guaicurus, Km12. Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Cidade Universitária, CEP: 79804-970 Dourados-MS, Brasil. paahsanchez17@gmail.com; mfpaz9@gmail.com

Resumo

Há muitos substratos disponíveis para a formulação de rações bovinas, dentre eles o farelo de girassol, feno moído de alfafa, farelo de canola, farelo de soja e o farelo de algodão, todos alimentos denominados fibrosos e médio teor proteico (proteína bruta a cima de 17%). O farelo de algodão, além de ser um subproduto em alta quantidade a partir de indústrias, possui a vantagem de ter uma boa aceitabilidade pelos animais, além do seu baixo custo por unidade de proteína inferior ao farelo de soja. Porém, como desvantagem, o farelo apresenta uma toxina denominada de gossipol, um alcaloide polifenólico com baixa capacidade de degradação, sendo este totalmente prejudicial aos animais monogástricos, enquanto que para os ruminantes, causa problemas no decorrer do tempo como hemorragias levando a possível morte. O objetivo do trabalho foi a melhoria da composição nutricional do substrato com a miceliação do fungo *P. ostreatus*, visando a detoxificação do gossipol. As metodologias para as análises bromatológicas seguiram o método da AOAC (1995), consistiram em análises de lipídeo, fibra bruta, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e proteínas. Com a introdução do fungo no substrato, as melhoras na questão nutricional foram evidentes, priorizando a diminuição do teor lipídico e o aumento do teor proteico. A detoxificação do farelo não foi possível devido o método de extração, que não atuou na liberação da toxina no reagente.

Palavras chave: Gossypol. *Pleurotus ostreatus*. Ruminantes. Farelo de algodão.

Abstract

There are many substrates available for the formulation of cattle feed, including sunflower meal, ground alfalfa hay, canola meal, soybean meal and cottonseed meal, all food called fiber and high protein content (crude protein up to 17%). The cottonseed meal, besides being a byproduct in high quantity from industries, has the advantage of having a good acceptance by the animals, besides its low cost per unit protein lower than soybean meal. However, as a disadvantage, bran has a known toxin gossypol a polifenólico alkaloid with low degradability, which is totally detrimental to monogastric animals, while for ruminants, causing problems over time as bleeding leading to possible death. The objective is to improve the nutritional composition of the substrate with the mycelium of the fungus *P. ostreatus*, aimed at detoxification of gossypol. The methods for chemical analysis followed the method of the AOAC (1995), consisted of lipid analysis, crude fiber, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and proteins. With the introduction of the fungus on the substrate, improvements in nutritional matters were evident, giving priority to reduction of lipid content and increased protein content. The detoxification of the meal was not possible because the extraction method, which did not act in the release of the toxin in the reagent.

Key words: Gossypol. *Pleurotus ostreatus*. Ruminants. Cottonseed meal.

I Introdução

A alimentação destaca-se como principal item associado aos custos de produção na exploração econômica de animais ruminantes e não ruminantes e torna-se então, imprescindível o desenvolvimento de alternativas para minimizar o seu efeito sobre o custo nessa atividade (VILELA, 2004). O custo de alimentação do rebanho varia de acordo com a composição de alimentos na dieta, por isso buscam-se alimentos alternativos de qualidade e baixo custo. Porém a dieta deve atender as exigências nutricionais para que na produção animal não resulte em quedas no desempenho animal e perdas econômicas.

O farelo de algodão é uma rica fonte de proteína nessas condições, sendo muito utilizado na alimentação de ruminantes no Brasil, pois é um subproduto de indústria e está no terceiro lugar de farelo proteico mais produzido no mundo, perdendo apenas para o farelo de

soja e de canola. O farelo de algodão é um resíduo da obtenção do óleo, que pode ser realizado tanto pelo esmagamento mecânico do caroço quanto por uso de solventes. Este é muito utilizado para formulação de ração animal, devido a sua alta composição nutricional e por conter proteína de boa qualidade. Diferencia-se dos outros farelos por estar amplamente disponível, possuir custos por unidade de proteína inferior ao farelo de soja, por exemplo, além de ser mais palatável e possuir bom perfil de aminoácidos, o que permite a substituição de alimentos volumosos e concentrados sem prejudicar a fermentação ruminal (EMBRAPA, 2003). Como ponto negativo, os subprodutos do algodão possuem uma toxina chamada gossipol, um alcalóide polifenólico tóxico em sua forma livre. É totalmente tóxico aos animais monogástricos e para os ruminantes o acúmulo dessa toxina em quantidades descontroladas, com o decorrer do tempo, causa graves problemas como edemas pulmonares e hemorragias hepáticas. No caso de ruminantes há uma tolerância um pouco maior do que para monogástricos, devido à atividade microbiana do rúmen (MORGAN, 1989).

Os fungos da podridão branca da madeira, tais como: *Agaricus sp.*, *Pleurotus sp.*, *L. edodes* e *Phanerochaete chrysosporium*, são basidiomicetos que se desenvolvem em madeira em decomposição não degradam somente a lignina, mas também um amplo espectro de organopolutos ambientais e recalcitrantes como PAHs, que não são prontamente degradados por outros microrganismos (BOYLE; WIESNER; RICHARDSON, 1998; BELIVAQUA, 2002). O fungo da espécie *Pleurotus ostreatus* possui a capacidade de catalisar a oxidação de um amplo espectro de moléculas que contém um anel aromático que é substituído com grupos de elétrons, ou seja, possui um complexo lignina-degradante que é composto por enzimas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase, tirosinase e a lacase. A lacase através de uma reação de oxidação converte a toxicidade presente em polifenóis em quinonas, que rapidamente são condensadas formando pigmentos escuros insolúveis, assim deixarão de ser tóxicas e mudarão a cor e o odor do alimento, sendo melhor para uma ração animal (ARAÚJO, 2004; ARAÚJO et al., 2005).

Como os fungos do gênero *Pleurotus* não fixam nitrogênio atmosférico, o aumento no teor de proteínas do substrato deve ser atribuído à perda de carboidratos característica do crescimento fúngico (NICOLINI, 1993), o que possibilita melhor desenvolvimento do animal.

O método de cultivo de fungos em substratos surgiu com a invenção da técnica Jun-Cao, uma prática chinesa, na qual utiliza como processo de produção, a técnica de cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais em substratos que incluem gramíneas para o crescimento e produção de corpos frutíferos.

O objetivo do trabalho consistiu na melhoria da composição nutricional da bioconversão do caroço de algodão em farelo, visando uma possível detoxificação do mesmo pela degradação enzimática do gossipol através do cultivo com *Pleurotus ostreatus*.

II Material e Métodos

II.I Obtenção do substrato

O caroço de algodão sem a fibra foi disponibilizado pelo assentamento Itamaraty, em Ponta Porã/MS, em um saco de 60 kg.

II.II Tratamento do farelo

O caroço de algodão foi mantido em freezer a -20°C para que se mantivesse congelado para evitar a proliferação de insetos. Não passou por nenhuma fase de tratamento com solventes ou estufas. Antes de adicionar água no substrato, foi feita uma análise de umidade em que caracterizou o substrato com um percentual de aproximadamente 71% de água em sua composição.

Então, foram separados 5 sacos contendo 70 g do substrato, com 50 mL de água destilada, fechados com rolhas de gaze (bonecas) para proporcionar trocas gasosas. Logo após o ajuste da umidade, os sacos foram autoclavados a 121°C durante 1 hora. Após a autoclavagem, 2 sacos foram corretamente identificados e adicionado mais 30 mL de água destilada.

II.III Cultivo/ Manutenção do fungo

O *Pleurotus ostreatus* foi adquirido na empresa Funghi e Flora, saco de 1 kg e foram mantidos repiques sucessivos em meio de cultura Batata dextrose ágar (BDA) e Agar Sabouraud Dextrose como objetivo de obter uma purificação para a obtenção de um banco de trabalho. Assim, 4 tubos de ensaio com o micélio crescido no meio estiveram por dois meses em refrigerador a uma temperatura de 4°C , sendo substituído após esse período por culturas mais novas.

II.IV Preparo do inoculante (“Spawn”)

Os inoculantes foram preparados através da inoculação de 10g de hifas viáveis em um substrato composto por 200 g de arroz cozido. Estes foram autoclavados por 1 hora a 121°C em frascos de cultivo de vidro com capacidade de 540 g com tampas.

II.V Inoculação do fungo no substrato

Foi inoculado cerca de 4 g do fungo nos sacos de cultivo contendo substrato em condições totalmente assépticas.

II.VI Análises Bromatológicas

As análises bromatológicas (centesimais) foram executadas seguindo os procedimentos da AOAC methods (1995). Foram realizadas as análises de: lipídeos seguindo o protocolo de Bligh Dyer (1959); fibra bruta, fibra em detergente neutro e detergente ácido pelo método descrito por VAN SOEST (1968); Proteínas pelo método Kjeldahl (1883) sem modificação.

II.VI Extração e Análise do Gossipol

Foram feitos dois tipos diferentes de extração e análise, a primeira foi através da metodologia proposta por Wang (1987), com algumas modificações. Foram pesados, 0,2g do farelo de caroço de algodão, e logo após foram submersos em acetona (10 mL) durante 16 horas. Logo após, os extratos foram filtrados em papel de filtro sob vácuo, com 3 lavagens do resíduo (2 mL de acetona a cada lavagem). O filtrado foi seco em estufa a 60°C e redissolvido em 10 mL de clorofórmio:ácido acético (99:1, v/v). Foram coletados 2 mL da solução e filtrado em um microfiltro de seringa. A cromatografia foi realizada utilizando coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm, i.d. 5 µm), eluição gradiente (80:20; metanol-0,1% ácido ortofosfórico:água, 70:30, v/v e clorofórmio), fluxo de 1,1 mLx min⁻¹ e quantificação a 254nm (detector de arranjo de fotodiodos).

A segunda diferiu-se apenas na quantidade pesada do farelo que foi de 1g e a troca do clorofórmio pelo etanol PA 95%. Já o método cromatográfico foi feito por UPLC Agilent 1290, equipado com coluna Rezex ROA – Organic Acid H+(8%) (Phenomenex). A fase

móvel realizada foi trifluoroacético (TFA) a 0,005 M, a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, com temperatura de 55°C e o volume injetado foi de 20 µL. Estes compostos foram detectados por um detector refratômetro diferencial Agilent 1260 (RID), acoplado a um módulo de aquisição de dados (adaptado de FONSECA et al., 2013).

II.VII Análise estatística

Os dados de análise foram tratados pelo Teste de Tukey utilizando-se o programa ASSISTAT Versão 7.7 beta (2016).

III Resultados e Discussão

III.I Miceliação

A miceliação do fungo *Pleurotus ostreatus* ocorreu em temperatura ambiente, durante o período de 15 dias. Todos os 5 sacos obtiveram um crescimento fúngico mesmo com diferentes concentrações de água. Porém, os 2 sacos que tinham 80 mL de água destilada no total, com o decorrer do tempo foram contaminados por outros fungos, provavelmente devido à umidade excessiva no substrato, então foram descartados.

III.II Análises bromatológicas.

Os resultados da análise bromatológica estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição proximal do substrato com e sem cultivo no tempo final.

| Amostras | Lipídeos (%) | Fibra Bruta (%) | FDN (%) | FDA (%) | Proteína (%) |
|----------|--------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|
| SS | 8,16a±0,0017 | 47,33a±0,065 | 24,6a±0,030 | 19,0a±0,036 | 18,4a±0,033 |
| SM | 0,60b±0,0038 | 37,00a±0,106 | 26,6a±0,011 | 20,3a±0,020 | 18,5a±0,019 |

Legenda: SS – Substrato sem cultivo. SM - Substrato miceliado. Letras iguais na coluna significam que não há significância estatística pelo teste de Tukey.

A análise de lipídeos que foi feita no laboratório da Faculdade de Engenharia de Alimentos, obteve como resultado que será exemplificado e detalhado, todo o peso das amostras, no apêndice 1.

O caroço de algodão em sua composição possui uma grande quantidade de óleo e com a miceliação do fungo, o valor percentual de lipídeos diminuiu de maneira significativa como apresentado na tabela acima, comprovando a eficiência do *P. ostreatus* em tornar a ração com o farelo de algodão mais saudável para os ruminantes, priorizando o aumento do teor proteico. Reforçando esse resultado, segundo a Embrapa (2015), os lipídeos não costumam ocorrer em grandes quantidades em dietas de ruminantes. Esses animais tiveram sua evolução vinculada ao consumo de forragens, que naturalmente têm valores baixos deste nutriente, próximos a 3% na matéria seca (MS) (30 g de lipídeos para cada kg de MS). Naturalmente, portanto, esse nutriente tem limitações na sua inclusão nas dietas, não devendo ultrapassar os 6% da MS ingerida (60 g de lipídeos para cada kg de MS). O principal motivo seria uma influência negativa da gordura na degradabilidade da fibra.

Para a obtenção do resultado da determinação de fibras foram coletados o peso das amostras no tecido de TNT, o peso do cadinho vazio, o peso do cadinho pós estufa a 105°C e pós mufla 800°C. Todos demonstrados no apêndice 2.

A fibra, por se tratar de um carboidrato é uma fonte de energia para os microrganismos no rúmen, caracteriza alimentos a fim de estabelecer limites máximos de ingredientes nas rações animais. No entanto, os nutricionistas não chegaram a um consenso sobre uma definição uniforme de fibra, bem como sobre a concentração de fibra ideal para a otimização do consumo de energia por bovinos (MERTENS; BRODERICK; SIMONS, 1994), pois a fibra é essencial, já que os ácidos graxos voláteis produzidos pela fibra durante a fermentação ruminal são as principais fontes de energia para o animal (MERTENS, 2001). Alimentos com alta fibra tipicamente diminuem o consumo de matéria seca, pois são de baixa digestibilidade. Esta pode ser uma consequência do material, que pode estar tomando lugar na capacidade física do rúmen. O alimento ingerido deve ser removido do rúmen via fermentação ou passagem para dar espaço a entrada de consumo adicional (MERTENS; BRODERICK; SIMONS, 1994). Segundo Weiss (1999), a fibra é a fração menos digerível do alimento por se tratar da parede celular da planta, ou seja, as enzimas dos mamíferos são incapazes de digeri-las, porém se trata de um componente essencial para a mastigação e ruminação dos mesmos. Entretanto, quando o teor de fibra das dietas é baixo, inúmeras respostas podem ser desencadeadas, desde a alteração da fermentação no rúmen, acidose grave, o que pode resultar na morte do animal (MERTENS, 1997).

Assim, segundo os resultados obtidos, houve uma diminuição de 10,33%, e todas as amostras cultivadas com o fungo *P. ostreatus* obtiveram um número percentual relevante de fibras em sua composição, já que é um composto essencial em qualquer alimento, além de

diminuir a porcentagem em relação às amostras sem cultivo, sendo um ponto positivo para a formulação da ração já que essa diminuição facilita e aumenta a digestibilidade no consumo animal. O grande problema da fibra bruta (FB) é que parte dos componentes da parede celular, celulose e lignina, são solubilizadas. Assim, a FB subestima o valor real da fibra e, portanto, os teores de FDN e FDA são sempre maiores que a FB (EMBRAPA, 2015).

Para a obtenção do resultado da determinação de FDN foram coletados o peso dos sacos de TNT vazios, o peso da amostra e o peso do saco pós-procedimento. Todos demonstrados no apêndice 3.

Quando a umidade é retirada do substrato em si, o que ocorre é uma concentração dos nutrientes, neste caso, o nutriente mais abundante é a fibra que, normalmente, é analisada como fibra em detergente neutro (FDN). Ela representa os carboidratos estruturais e mais a lignina, o principal fator antinutricional dos alimentos para ruminantes. A FDN seria a melhor opção disponível para representar a fibra da dieta, uma vez que aceitemos para ela a definição de Mertens (2002): fibra insolúvel dos alimentos (indigestível ou lentamente digestível) que ocupa espaço no trato digestivo. A sugestão dos autores do método dos detergentes para evitar esse tipo de uso da FDA seria no sentido de que a fração que melhor representa a fibra é a FDN e, assim, ela que deveria ser usada para qualquer modelo nutricional para uma abordagem mecanística (causal) e não meramente empírica (matemática). Assim, os ruminantes necessitam de suficientes quantidades de fibra em detergente neutro (FDN) na dieta para manter a função ruminal e maximizar a produção (EMBRAPA, 2015). Quando os animais são alimentados com carboidratos estruturais, a FDN pode ser caracterizada como fisicamente efetiva, a qual estimula a mastigação e auxilia no tamponamento do rúmen, ou é FDN degradável por microrganismos do rúmen, que leva a produção de ácidos resultantes de fermentação ruminal. Portanto, a FDN também pode contribuir para a produção de ácidos (NOCEK, 1997).

Com os resultados obtidos, o aumento de 2% de FDN se destacou como uma mudança nutricional positiva, pois de acordo com Warner (1981), o aumento nos teores de fibra insolúvel na dieta pode provocar diminuição no tempo de passagem da digesta pelo trato gastrintestinal (TGI), podendo ser decorrente da estimulação física da fibra insolúvel sobre as paredes do TGI, que tende a aumentar a motilidade e a taxa de passagem. O aumento dos teores dessa fração provoca também diluição da energia da dieta, levando a um aumento compensatório no consumo para que atinja os níveis energéticos exigidos para o crescimento, desenvolvimento e produção (WARPECHOWSKI, 1996). Dos três métodos utilizados para quantificar a fibra (FDN, FDA, FB), somente a FDN mensura os três maiores componentes

indigestíveis ou incompletamente digestíveis das plantas: hemicelulose, celulose e lignina (MERTENS, 1997).

Para a obtenção do resultado da determinação de FDA foram coletados o peso dos sacos de TNT vazios, o peso da amostra e o peso do saco pós procedimento. Todos demonstrados no apêndice 4.

Como o FDA não contém hemicelulose, não é uma boa estimativa da fibra como é definida nutricionalmente, pois não contém todos os polissacarídeos parcialmente digeríveis do alimento. A concentração de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) em forragens tem uma alta correlação negativa com a digestibilidade aparente da proteína. A composição química do NIDA e a relação entre concentrações de NIDA e digestibilidade é diferente entre concentrados e forrageiras, portanto, o uso de uma única equação para relacionar NIDA com digestibilidade para todos os alimentos não está correto (WEISS, 1999). Portanto, o aumento de 1,3% de FDA, não se caracteriza como uma mudança nutricional positiva, porque apesar de o aumento ter sido baixo, o correto seria a diminuição da FDA para trazer benefícios ao caroço.

Para a obtenção do resultado da determinação de proteínas foram coletados o peso das amostras nos tubos, a normalidade do ácido (N 0,1), o valor em mL do HCl na titulação de cada amostra, o fator de correção do ácido (133) e o fator de conversão (6,25). Os outros valores estão demonstrados no apêndice 5.

Segundo Coultate (2004), através do conhecimento da concentração da proteína nos alimentos e sua composição de aminoácidos, pode ser medida a qualidade nutricional da mesma. Para a determinação dos aminoácidos em um alimento, são utilizadas técnicas cromatográficas. O método mais utilizado para a determinação da concentração de proteína é o de Kjeldahl, que parte do conceito de que a fração de nitrogênio não-proteico de um alimento é irrelevante e, na determinação de nitrogênio total obtém-se o conteúdo de proteínas. A proporção de nitrogênio para a maioria das proteínas é de 16% do peso total, ou seja, em 100 g de proteínas, 16 g corresponde a nitrogênio. Assim, um fator de 6.25, que é a diferença entre o peso total e o peso correspondente ao nitrogênio, é utilizado para converter o teor deste em concentração de proteínas. Em alguns alimentos, como cereais, que têm variações na concentração de aminoácidos, um fator diferenciado é utilizado para obter-se maior precisão (COULTATE, 2004; ZENEON; PASCUET; TIGELA, 2008).

A proteína é um dos nutrientes mais nobres para os seres vivos, estando envolvida em funções vitais diversas no organismo tais como: crescimento e reparo dos tecidos, catálise enzimática, transporte e armazenamento, movimento coordenado, sustentação mecânica,

proteção imunitária, geração e transmissão de impulsos nervosos, controle do metabolismo, do crescimento e da diferenciação celular. Portanto, garantir adequado suprimento proteico aos animais significa provê-los de um nutriente essencial para manutenção de sua homeostase, propiciando a produção de carne de forma eficiente. Os ruminantes apresentam peculiaridades em sua nutrição proteica, porém, suas demandas em proteína são atendidas através de aminoácidos absorvidos no intestino delgado, como em qualquer outro animal, apesar de grande parte da proteína absorvível (50 a 80%) ser advinda da proteína microbiana sintetizada no rúmen (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

Segundo os resultados positivos obtidos com a análise, é possível fazer a classificação do substrato como um alimento concentrado, ou seja, energético, pois possui uma porcentagem inferior a 20% de proteína bruta. Assim, caracteriza-se por ter uma melhor padronização, tanto quanto qualidade constante, teores constantes e porcentagem de matéria seca constante. Por isso, mesmo com um aumento pequeno de 0,46% de proteína bruta após a miceliação do fungo, o substrato tem como vantagem todas essas características, sendo muito mais energético e proteico. A deficiência proteica pode limitar a produção animal, não só pelo decréscimo nas taxas de digestão e de passagem devido a teores de PB abaixo do limite crítico, mas também em função de um aporte subótimo de aminoácidos no duodeno, em função da menor produção de proteína microbiana (PRESTON & LENG, 1987).

Furlani e Godoy (2007) descrevem os cogumelos como um alimento com excelente valor nutritivo e alto teor de proteínas contendo em amostras, obtidas do comércio do estado de São Paulo, em base seca: *A. bisporus* 28,45%, *L. edodes* 18,22% e *Pleurotus spp.* 22,22%. Dentre muitos fatores que podem influenciar o valor proteico dos cogumelos talvez o mais importante seja o substrato (FURLANI, 2004).

Devido o substrato não ser um farelo propriamente dito, e sim uma bioconversão do caroço de algodão, a superfície de contato é menor, o que explica que a miceliação do fungo não foi completa, mas apenas em algumas partes. Com uma moagem completa, na questão da granulometria, aumentaria a superfície de contato e o aumento de proteína seria maior. O mesmo fator, explica o porquê de uma porcentagem inferior ao encontrado na literatura para o farelo de algodão, pois neste caso o farelo é resultado da extração do óleo, o que resulta em um percentual maior de proteína por amostragem. O caroço, por sua vez, ainda tem na sua composição todos os componentes, inclusive a própria casca, diminuindo assim significativamente a participação percentual do teor proteico.

III.VII Análise do Gossipol

Nos dois métodos diferentes de análise do gossipol foi impossibilitado a visualização de picos da toxina tanto na amostra padrão e no controle positivo, que seria indispensável a apresentação do mesmo. Apesar de terem sido realizadas duas metodologias diferentes de extração, a ausência de picos de gossipol deve ser resultado de insucesso nesta etapa, em que o método não condiz a extração da toxina no líquido, incapacitando a visualização nos dois métodos distintos.

IV Considerações Finais

O farelo de caroço de algodão submetido à miceliação do fungo *Pleurotus ostreatus*, obteve muitas melhorias referidas a sua composição nutricional. Todas as análises bromatológicas aumentaram a qualidade nutricional para formulação da ração bovina, obedecendo as margens de porcentagens de cada uma em si. No caso houve uma grande diminuição dos teores de gorduras, de 7,5% sendo uma melhoria grande no caso do caroço, por este ser muito oleoso e prejudicar o valor nutricional da ração. Apesar do baixo aumento de FDA (1,3%) ter prejudicado a composição, a diminuição da FB (10%) e o aumento da FDN (2%) são resultados compensatórios que agregam uma ótima composição nutricional à formulação da ração. O aumento da porcentagem proteica, mesmo que baixo, atingiu o êxito do projeto em si, demonstrando a ação positiva do fungo para este aspecto. Porém, com o resultado negativo da ausência de análise da toxina gossipol, o que no caso impossibilita a produção da ração para comercialização, a pesquisa continuará a fim de testes e novas extrações até o resultado positivo do mesmo, atingindo assim perspectivas futuras.

Referências

- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 3ª. ed. Viçosa: UFV, 2004.
- ARAÚJO, J.H.B; UEMURA, V.O; MORAES, F.F; BARBOSA, A.M; ZANIN, G.M.A Comparative Study on Fungal Laccases Immobilized on Chitosan. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. An Internacional Journal. v 48. pp 1-6, 2005.
- AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Official methods of analysis. 16. ed. Washington: AOAC, 1995.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.88 (Supl. 1), p.E9-E21, 2005.

BEVILAQUA, J.V.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA Jr, G.L.S. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, n.2, p. 151-158. 2002.

BOYLE, D.; WIESNER, C.; RICHARDSON, A. Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, n.7, p. 873-882, 1998.

COULTATE, T.P.; Alimentos a química de seus componentes, 3ª edição, **Artmed**, Porto Alegre, 2004, pg 113-116.

EMBRAPA. 2003. Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar. Subprodutos do algodão. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/subprodutos.htm>

EMBRAPA. 2015. Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/120040/1/Nutricao-Animal-livro-em-baixa.pdf>

FONSECA, G.G.; DE CARVALHO, N.M.B.; GOMBERT, A.K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 5055-5067, 2013.

FURLANI, R.P.Z. Valor nutricional de cogumelos cultivados no Brasil. 2004. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 88p, 2004.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p. 154-157, 2007.

MERTENS, D.R., BRODERICK, G.A.; SIMONS, R. Efficacy of carbohydrate sources for improving utilization of N in alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, v. 77(Suppl. 1), p.240 (Abstr.), 1994.

MERTENS, D.R. Creating a system for meeting the fiber requirement of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1463, 1997.

- MERTENS, D.R. Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations. In: **Simpósio internacional de bovino de leite**, 2., 2001, Lavras. Anais:UFLA-FAEPE, 2001. p.25-36.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal AOAC International**, v.85, p. 1217-1240, 2002.
- MORGAN, S.E. Gossypol as a toxicant in livestock. In **Burrows GE (ed): The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. Philadelphia. W.B. Saunders, 1989, pp 251-263.
- NICOLINI, L.; VOLPE, C.; PEZZOTTI, A.; CARILLI, A. Changes in in-vitro digestibility of orange peels and distillery grape stalks after solid-state fermentation by higher fungi. **Bioresource Technology**, v.45, p. 17-20, 1993.
- NOCEK, J.E. Bovine acidosis: implication on laminitis. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1005, 1997.
- PESTON, T.R.; LENG, R.A. Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and subtropics. **Penambul Books: Armidale**, N.S.W. p. 245, 1987.
- VILELA D. Produção de Leite em Pasto: atualidades e perspectivas futuras. **Anais Sul-leite Simpósio sobre Manejo Estratégico da Pastagem**, Viçosa, MG, p.419-463, 2004.
- WANG, M.Z. Analysis of gossypol by highperformance liquid chromatography. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 1-11, 1987.
- WARNER, A.C.I. Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds. **Nutr. Abstr. Rev. (Series B), Farnham Royal**, v.51, p.789-820, 1981.
- WARPECHOWSKI, M.B. Efeito da fibra insolúvel da dieta sobre a passagem no trato gastrointestinal de aves intactas, cecoctomizadas e fistuladas no íleo terminal. 1996. 125f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2004.
- WEISS, W.P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: **Cornell nutrition conference for feed manufacturers**, 61., 1999, Proceedings..., Ithaca: Cornell University, 1999. p. 176-185.

ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. (Coord.). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 edição, **Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 2008, pg 122-124.

APÊNDICE 1: Identificação de cada amostra seguida por legenda, além de cada quantidade pesada pelo peso da amostra, peso do cadinho vazio e massa do cadinho com a amostra.

| Amostras | Peso amostra (g) | Peso do cadinho vazio | Massa do cadinho + amostra |
|-----------------|-------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| 1. SS | 2,3 | 23,9499 | 23,9968 |
| 2. SS | 2,2 | 30,7052 | 30,7492 |
| 3. SS | 2,0 | 28,6522 | 28,6939 |
| 4. SM | 2,0 | 22,8080 | 22,8132 |
| 5. SM | 2,1 | 31,5402 | 31,5423 |
| 6. SM | 2,0 | 39,8454 | 39,8472 |

Legenda: SS: amostra sem cultivo; SM: amostra com cultivo;

APÊNDICE 2: Identificação de cada amostra seguida por legenda, além de cada quantidade pesada pelo peso das amostras, peso do cadinho vazio e peso do cadinho pós estufa e pós mufla.

| Amostras | Peso amostra (g) | Peso cadinho vazio | Peso cadinho pós estufa | Peso cadinho pós mufla |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. SS | 0,7210 | 43,6916 | 44,0442 | 43,6662 |
| 2. SS | 0,6426 | 30,4294 | 30,7590 | 30,4370 |
| 3. SS | 0,9731 | 25,6103 | 26,0026 | 25,6126 |
| 4. SM | 0,8524 | 30,7071 | 30,9656 | 30,7143 |
| 5. SM | 0,6607 | 38,4484 | 38,7564 | 38,4297 |
| 6. SM | 0,9335 | 32,6047 | 32,9145 | 32,6066 |

Legenda: SS: amostra sem cultivo; SM: amostra com cultivo;

APÊNDICE 3: Identificação de cada amostra seguida por legenda, além de cada quantidade pesada pelo peso das amostras, peso do saco de TNT vazio e peso do saco pós procedimento.

| Amostras | Peso amostra (g) | Peso saco TNT vazio (g) | Peso saco TNT pós procedimento (g) |
|-----------------|-------------------------|------------------------------------|---|
| 1. SS | 0,5412 | 0,5040 | 0,6336 |
| 2. SS | 0,5229 | 0,4674 | 0,5845 |
| 3. SS | 0,5059 | 0,4196 | 0,5612 |
| 4. SM | 0,5325 | 0,5983 | 0,7467 |
| 5. SM | 0,5192 | 0,5608 | 0,6962 |
| 6. SM | 0,5252 | 0,4618 | 0,6007 |

Legenda: SS: amostra sem cultivo; SM: amostra com cultivo;

APÊNDICE 4: Identificação de cada amostra seguida por legenda, além de cada quantidade pesada pelo peso das amostras, peso do saco de TNT vazio e peso do saco pós procedimento.

| Amostras | Peso amostras (g) | Peso saco TNT vazio (g) | Peso saco TNT pós procedimento (g) |
|-----------------|--------------------------|--------------------------------|---|
| 1. SS | 0,5412 | 0,5040 | 0,5883 |
| 2. SS | 0,5229 | 0,4674 | 0,5543 |
| 3. SS | 0,5059 | 0,4196 | 0,5313 |
| 4. SM | 0,5325 | 0,5983 | 0,7136 |
| 5. SM | 0,5192 | 0,5608 | 0,6527 |
| 6. SM | 0,5252 | 0,4618 | 0,5727 |

Legenda: SS: amostra sem cultivo; SM: amostra com cultivo;

APÊNDICE 5: Valores dos pesos das amostras e os valores dos mL utilizado para a titulação:

| Amostras | Peso das amostras (g) | mL (HCl) Titulação |
|-----------------|------------------------------|---------------------------|
| 1. SS | 0,3103 | 7,1 |
| 2. SS | 0,3114 | 5,4 |
| 3. SS | 0,3005 | 7,5 |
| 4. SM | 0,3166 | 7,7 |
| 5. SM | 0,3015 | 6,8 |
| 6. SM | 0,3274 | 6,5 |

Legenda: SS: amostra sem cultivo; SM: amostra com cultivo;

APÊNDICE 6: Estatística da análise de Lipídeos.

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2016) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 13/05/2016

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

| | FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|----|----------|----------|----------|----|
| Tratamentos | 1 | 85.80602 | 85.80602 | 982.6992 | ** |
| Resíduo | 4 | 0.34927 | 0.08732 | | |
| Total | 5 | 86.15528 | | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

| GL | GLR | F-crit | F | p |
|----|-----|---------|----------|--------|
| 1 | 4 | 21.1977 | 982.6992 | <.0001 |

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

| | |
|---|-----------|
| 1 | 8.16333 a |
| 2 | 0.60000 b |

dms = 0.67047

MG = 4.38167

CV% = 6.74

Ponto médio = 4.35000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

 Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
 Shapiro-Wilk (W) 0.72819 0.01208 Não

DADOS

 8.15 8.00 8.34
 1.04 .40 .36

OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer.

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário. Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa

APÊNDICE 7: Estatística da análise de Fibra Bruta.

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2016) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 13/05/2016

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

| | FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|----|-----------|-----------|--------|----|
| Tratamentos | 1 | 160.16667 | 160.16667 | 2.0891 | ns |
| Resíduo | 4 | 306.66667 | 76.66667 | | |
| Total | | 5 | 466.83333 | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

| | GL | GLR | F-crit | F | p |
|---|----|--------|--------|--------|---|
| 1 | 4 | 7.7086 | 2.0891 | 0.2217 | |

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1 47.33333 a

2 37.00000 a

dms = 19.86713

MG = 42.16667

CV% = 20.77

Ponto médio = 40.50000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

```

-----
Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
Shapiro-Wilk (W) 0.88750 0.30530 Sim
-----

```

DADOS

```

-----
52 50 40
29 49 33
-----

```

OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer.

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise.

SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa.

APÊNDICE 8: Estatística da análise de Fibra Detergente Neutro.

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2016) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 13/05/2016

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

| | FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|----|----|----------|---------|-----------|
| Tratamentos | 1 | | 6.00000 | 6.00000 | 1.1250 ns |
| Resíduo | | 4 | 21.33333 | 5.33333 | |
| Total | | 5 | 27.33333 | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

| GL | GLR | F-crit | F | p |
|----|-----|--------|-------|--------|
| 1 | 4 | 7.7086 | 1.125 | 0.3485 |

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

| | |
|---|------------|
| 1 | 24.66667 a |
| 2 | 26.66667 a |

dms = 5.24000

MG = 25.66667

CV% = 9.00

Ponto médio = 25.00000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

 Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
 Shapiro-Wilk (W) 0.90758 0.42065 Sim

DADOS

 24 22 28

28 26 26

OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer.

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa.

APÊNDICE 9: Estatística da análise de Fibra Detergente Ácido.

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2016) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 13/05/2016

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

| FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|----|----------|---------|-----------|
| Tratamentos | 1 | 2.66667 | 2.66667 | 0.3077 ns |
| Resíduo | 4 | 34.66667 | 8.66667 | |
| Total | 5 | 37.33333 | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

| GL | GLR | F-crit | F | p |
|----|-----|--------|----------|--------|
| 1 | 4 | 0.0011 | 0.307692 | 0.6085 |

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1 19.00000 a

2 20.33333 a

dms = 6.67972

MG = 19.66667

CV% = 14.97

Ponto médio = 18.50000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

 Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
 Shapiro-Wilk (W) 0.87391 0.24222 Sim

DADOS

 15 20 22

22 18 21

OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer .

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação.

Não entenda essa ocorrência como erro na análise

SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa.

APÊNDICE 10: Estatística da análise de Proteínas.

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2016) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 13/05/2016

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

| FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|----|----------|---------|-----------|
| Tratamentos | 1 | 0.31740 | 0.31740 | 0.0440 ns |
| Resíduo | 4 | 28.85960 | 7.21490 | |
| Total | 5 | 29.17700 | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

| GL | GLR | F-crit | F | p |
|----|-----|--------|----------|-------|
| 1 | 4 | 0.0011 | 0.043992 | 0.844 |

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1 18.04000 a

2 18.50000 a

dms = 6.09463

MG = 18.27000

CV% = 14.70

Ponto médio = 17.56000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

 Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
 Shapiro-Wilk (W) 0.91854 0.49488 Sim

DADOS

 19.00 14.37 20.75
 20.25 18.75 16.50

OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer.

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise.

SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade
 SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 dms = Diferença mínima significativa.

ANEXO 1: Normas da Revista escolhida para publicação.

Orientações editoriais para publicação de artigos na Revista Evidência

Os artigos a serem publicados na Evidência podem ser enquadrados como Pesquisa, Revisão (Review), MiniReview, Nota Científica. Devem ser submetidos ao periódico, obedecendo aos critérios a seguir:

Artigos

PESQUISA

Os artigos devem ser elaborados em folha formato A4, margens superior e esquerda 3 cm, margens inferior e direita 2 cm, entrelinhas 1,5, fonte *Times New Roman*, tamanho 12, com exceção das ilustrações, tabelas, notas e citações diretas em recuo, cujas fontes devem apresentar tamanho 10, entradas de parágrafo, 1,25, a partir da margem. O texto deve ser justificado, exceto as referências, que são alinhadas à margem esquerda. Os artigos devem apresentar extensão de 15 a 25 páginas.

As páginas devem ser numeradas à margem superior direita.

Para as tabelas e ilustrações (fotografias, mapas, gráficos, quadros, fluxogramas, organogramas, diagramas, esquemas, entre outras), é necessário que os arquivos originais sejam enviados, também, em arquivo digital, separadamente. As imagens digitalizadas devem apresentar resolução de 300 dpi. As ilustrações e tabelas devem ser numeradas de acordo com suas respectivas referências no corpo do texto, e os títulos, escritos sem abreviações, apresentando a fonte de referência em tamanho 10 e entrelinhas simples. Todas as tabelas e ilustrações devem apresentar a fonte de origem dos dados. Símbolos e fórmulas matemáticas devem ser elaborados em *software* que possibilite a formatação para o programa *In Design*, sem perda de suas formas originais. Evitar o uso de palavras como “abaixo”, “acima” para referir-se a tabelas e ilustrações. Faça, por exemplo: conforme Tabela 5; de acordo com o Gráfico 2.

Organização do Artigo: o artigo científico deve ser constituído por:

- a) Título: deve figurar na página de abertura do texto, seguido do título em inglês;
- b) Nome(s) do(s) autor(es): acompanhado(s) da titulação do(s) autor(es), local de trabalho, endereço completo, função que exerce(m) e e-mail; essas informações devem aparecer em nota de rodapé;
- c) Resumo na língua do texto: deve ser apresentado na terceira pessoa do singular, na voz ativa e redigido em um único parágrafo, com extensão de 100 a 250 palavras.
- d) Palavras-chave na língua do texto: palavras que representam os principais assuntos tratados no texto (entre 3 a 5 palavras); devem figurar logo abaixo do resumo, antecedidas da expressão Palavras-chave:, separadas entre si por ponto e finalizadas também por ponto;

- e) Resumo em inglês: versão do resumo na língua do texto utilizando as mesmas características (*Abstract, Keywords*);
- f) Introdução: apresenta a delimitação do assunto, além de outros elementos sobre o tema explanado e objetivos da pesquisa.
- g) Material e Métodos: apresenta toda a metodologia utilizada para o desenvolvimento da pesquisa, incluindo material utilizado e, quando necessário, a referência bibliográfica de técnicas, métodos. Podem ser utilizados subitens.
- h) Resultados e Discussão: aborda os resultados da pesquisa de forma a responder às questões apresentadas na introdução, discutindo-se os dados com a literatura científica e as perspectivas futuras de continuação da pesquisa a partir de outros focos.
- i) Conclusão (opcional): concluir sobre os resultados obtidos, de forma breve e objetiva. Pode ser feita também na forma de tópicos. Torna-se desnecessária a abertura de nova seção, quando a conclusão for apresentada nos resultados e discussão.

REVISÃO (*REVIEW*)

Artigos de revisão sobre temas dentro do foco da revista, com preferência para convites encaminhados diretamente ao pesquisador expert na área.

MINIRREVISÃO (*MINIREVIEW*)

Publicação de revisões curtas de temas atuais apenas em Biotecnologia e Ciência de Alimentos.

MÉTODOS

Artigos relacionados ao desenvolvimento e/ou avaliação de metodologias, métodos e técnicas.

NOTA CIENTÍFICA

São breves comunicações (máx. 4 páginas editadas), cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com densidade insuficiente para constituir um artigo científico completo.

- Os elementos da Nota Científica devem ser: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo (max. de 100 palavras), palavras-chave, título em inglês, *Abstract, keywords*, texto (incluindo introdução, material e métodos, resultados (ou resultados e discussão), Referências (10-15).

Referências: devem ser colocadas ao final do trabalho, classificadas em formato numérico, de acordo com a entrada no documento (Estilo Vancouver). Sempre que possível indicar o endereço eletrônico da publicação ou o número DOI (*Direct Object Identifier System*) de cada artigo.

Para a lista de referências, seguem alguns exemplos.

Livro

Oliveira MN. Tecnologia de produtos lácteos funcionais. São Paulo: Atheneu; 2009. 384 p.

Capítulo de livro

Bordignon-Junior SE, Gelinski JMLN. Perspectivas de indução na produção de bacteriocinas. In: Gelinski JMLN, Baratto CM, organizadores. Tópicos Especiais em Ciência e Biotecnologia. Joaçaba: Ed. Unoesc; 2013. p. 63-78.

Artigo de Revista

Vicente VA, Orélis-Ribeiro R, Najafzadeh MJ, Sun J, Guerra RS, Miesch S, et al. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). *Veterinary Microbiology* 2012;158 (1-2):109-22. doi:10.1016/j.vetmic.2012.01.031.2012.

Citações: deve ser observada a NBR 10520 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2002) no que diz respeito ao Sistema numérico de entrada. As literais curtas, que apresentam até três linhas, devem fazer parte do corpo do texto entre aspas; as literais longas são apresentadas em recuo de 4 cm da margem esquerda, fonte 10, entrelinhas simples, sem aspas. Para as citações no corpo do texto, usa-se o sistema numérico, conforme exemplos: Segundo Vallejo,¹ as orientações [...], ou: As orientações¹ [...].

Os títulos devem ser numerados em números arábicos, da Introdução à Conclusão, obedecendo à hierarquia que segue:

1 SEÇÃO PRIMÁRIA

| | | |
|--------------------------|-------|-------------|
| 1.1 | SEÇÃO | SECUNDÁRIA |
| 1.1.1 Seção | | terciária |
| 1.1.1.1 | Seção | quaternária |
| 1.1.1.1.1 Seção quinária | | |

Orientações gerais

- a) A exatidão das referências e as ideias expressas e/ou defendidas nos textos são de inteira responsabilidade dos autores.
- b) O texto deve passar por revisão linguística antes de ser encaminhado à Editora, conforme Resolução nº 38/Consun/2007 – Define política e diretrizes para as publicações.
- c) As palavras em língua estrangeira devem estar em itálico.
- d) O Editor Científico do periódico e a Editora Unoesc não se responsabilizam pelo extravio ou eventual perda de material, devendo o autor manter cópias do original.
- e) É admitida a publicação de artigos em língua inglesa, desde que autorizada pelo Conselho Editorial do periódico.
- f) Os trabalhos são enviados por meio digitalizado – elaborados no programa *Word*.
- g) O artigo deve ser inédito, seguindo a linha editorial da revista. Serão submetidos à apreciação do corpo editorial, com a omissão do nome do autor e dos avaliadores durante o processo *double blind review* (o autor não sabe quem é o avaliador e este também desconhece quem é o autor). Após o processo, caso haja necessidade, os avaliadores proporão alterações, visando à melhora do trabalho, com o objetivo de publicá-lo. Se as alterações forem demasiadas, os avaliadores podem rejeitar o artigo de maneira bem fundamentada. Os originais não serão devolvidos.
- h) Após a avaliação, os artigos serão encaminhados à Editora para os processos de revisão, normalização e formatação.
- i) O trabalho dos autores e dos consultores não será remunerado.

Importante

A Revista é publicada em formato eletrônico (PDF), disponibilizado pela internet na página da Revista e/ou na(s) página(s) do(s) indexador(es). A Revista permitirá o acesso aos artigos e demais textos, não autorizando qualquer comercialização e/ou alteração dos dados. Desse modo, o(s) autor(es) fica(m) ciente(s) da cessão de seus direitos autorais de publicação à Revista, a qual optará pelo tipo de formato de publicação: físico e/ou eletrônico.

Sempre que a pesquisa envolver o uso de animais ou seres humanos, o número de protocolo e aprovação pelo Comitê Ética para pesquisa com animais ou seres humanos (CEUA ou CEP, respectivamente) deverá ser informado e o documento digitalizado deverá ser anexado durante o encaminhamento do artigo.

Para ciência dos autores, informamos que o material editado (originais, rascunhos, miolo) permanecerá armazenado na Editora Unoesc pelo período de um ano, após ser publicado, conforme Política Editorial, sendo posteriormente reciclado.

Os artigos devem ser submetidos via endereço eletrônico <http://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia> após cadastramento de autores e obtenção de login e senha de acesso.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)
3. URLs para as referências foram informadas quando necessário.
4. O texto está em espaço 1,5; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento, como anexos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na seção Sobre a Revista.
6. As referências são classificadas em formato numérico, de acordo com a entrada no documento (Estilo Vancouver).

Declaração de Direito Autoral

Autores mantém os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a [Creative Commons Attribution License](#) que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria do trabalho e publicação inicial nesta revista.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.