

MAIANE DE PAULA ALVES

**USO DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE COGUMELOS *Pleurotus ostreatus*
ENRIQUECIDOS COM SELÊNIO NA DIETA DE RUMINANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya

Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani

Marcelo Teixeira Rodrigues

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

A474u
2020
Alves, Maiane de Paula, 1991-
 Uso do resíduo da produção de cogumelos *Pleurotus*
 ostreatus enriquecidos com selênio na dieta de ruminantes /
 Maiane de Paula Alves. – Viçosa, MG, 2020.
 45 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Nutrição animal. 2. Bagaço da cana. 3. Selênio. 4. Stress oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 636.085

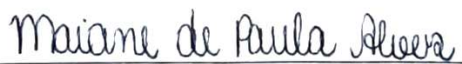
MAIANE DE PAULA ALVES

**USO DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE COGUMELOS *Pleurotus ostreatus*
ENRIQUECIDOS COM SELÊNIO NA DIETA DE RUMINANTES**

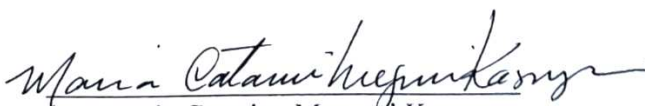
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de agosto de 2020.

Assentimento:



Maiane de Paula Alves
Autora



Maria Catarina Megumi Kasuya
Orientadora

Dedicatória

À minha família, em especial à minha mãe Margarida Maria de Paula Alves, por todo amor, apoio e ensinamento.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder ânimo para seguir.

À Universidade Federal de Viçosa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Maria Catarina Kasuya pela orientação.

Às Professoras Cláudia Sampaio e Magna Coroa, aos Professores Hilário Mantovani e Marcelo Rodrigues, à Doutora Juliana Soares, ao Doutor Mateus Nunes e ao Técnico Antônio Carlos Teixeira pela colaboração nas pesquisas.

Aos Estudantes, Funcionários e Professores do Departamento de Biologia Celular, Departamento de Microbiologia, Departamento de Solos e Departamento de Zootecnia (em especial, aos Setores de Caprinocultura e Nutrição Animal) pela colaboração durante os experimentos.

À minha família, em especial a minha mãe Margarida Alves e os meus irmãos Maíra Alves e Marcos Alves, por estarem sempre ao meu lado.

Aos amigos Cássia Soares, Diene Souza, Edmar Campos, Maurício Ferreira e Vicente Casali, por toda ajuda e incentivo.

E a todos que contribuíram de alguma forma, muito obrigada!

BIOGRAFIA

MAIANE DE PAULA ALVES, filha de Margarida Maria de Paula Alves e Mário Pinto Alves, nasceu em Ponte Nova, Minas Gerais, em 01 de abril de 1991.

Graduou-se em janeiro de 2017 em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em 2018, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa com término em 2020.

“Os obstáculos são crescimentos para o espírito.”

Santa Rita de Cássia

RESUMO

ALVES, Maiane de Paula, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2020. **Uso do resíduo da produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* enriquecidos com selênio na dieta de ruminantes.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Marcelo Teixeira Rodrigues.

Buscando uma alternativa de aproveitamento do resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* enriquecidos com selênio (Se), o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o uso desse resíduo na nutrição e no status antioxidante de ruminantes. Para tanto, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo*. Em ensaios de fermentação ruminal *in vitro* avaliamos o pH, o resíduo da degradação da fibra em detergente neutro, o nitrogênio amoniacal ruminal e os ácidos orgânicos voláteis. Os seguintes tratamentos foram testados: (I) bagaço de cana-de-açúcar não colonizado; (II) resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* não enriquecidos e (III) resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *P. ostreatus* enriquecidos com Se. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o PROC GLIMMIX do software SAS (Statistical Analysis System), os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Observou-se que o resíduo não colonizado apresentou maior fração potencialmente degradável e menor fração indegradável em relação aos resíduos colonizados ($P < 0,05$) e não foram observadas diferenças entre os demais parâmetros ($P > 0,05$). No experimento *in vivo*, avaliamos o efeito do resíduo enriquecido com Se no status antioxidante de caprinos da raça Pardo Alpina. Os seguintes tratamentos foram testados: (I) sem adição de Se (controle); (II) resíduo não enriquecido + selenito de sódio (Na_2SeO_3); (III) Na_2SeO_3 e (IV) resíduo enriquecido com Se. Após 30 dias, foram coletadas amostras de sangue dos animais para realização das análises das atividades das enzimas glutatona peroxidase, superóxido dismutase, catalase e dos teores de óxido nítrico, proteína carbonilada e malondialdeído. Todas as variáveis foram analisadas como delineamento inteiramente casualizado no PROC GLIMMIX do software SAS. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para as variáveis avaliadas. Concluímos que o resíduo não altera o padrão fermentativo ruminal e nem o status oxidativo sanguíneo.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Selênio. Nutrição animal. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

ALVES, Maiane de Paula, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2020. **Residue used for production of selenium-enriched *Pleurotus ostreatus* mushroom in ruminant diet.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Marcelo Teixeira Rodrigues.

Searching for an alternative of using the residue from sugarcane bagasse used for the production of Se-enriched *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with Se, the present study evaluated the use of this residue in the nutrition and antioxidant status of ruminants. For this, assays were performed in vitro and in vivo. In ruminal fermentation tests in vitro, we evaluated the pH, the fiber degradation residue in neutral detergent, the ruminal ammonia-nitrogen and volatile organic acids. The following treatments were tested: (I) non-colonized sugarcane bagasse; (II) residue from sugarcane bagasse obtained after the production of non-Se-enriched mushrooms of *P. ostreatus* and (III) residue from sugarcane bagasse obtained after the production of Se-enriched mushrooms of *P. ostreatus*. Statistical analyzes were performed using PROC GLIMMIX from the SAS software (Statistical Analysis System), the data obtained were subjected to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test at 5% significance. It was observed that the non-colonized sugarcane bagasse had a higher potentially degradable fraction and a lower undegradable fraction in relation to the colonized residues ($P < 0.05$) and no differences were observed for other parameters ($P > 0.05$). In the in vivo experiment, the effect of the residue enriched with Se on the antioxidant status of Alpine Pardo goats was evaluated. The following treatments were tested: (I) without adding Se (control); (II) non-enriched residue + sodium selenite (Na_2SeO_3); (III) Na_2SeO_3 and (IV) residue enriched with Se. After 30 days, blood samples were collected from the animals to analyze the activities of the enzymes glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and the levels of nitric oxide, carbonylated protein and malondialdehyde. All variables were analyzed in a completely randomized design in PROC GLIMMIX of the SAS software. There were no differences ($P > 0.05$) for the variables evaluated. We can conclude that tested residue does not alter the rumen fermentative pattern or oxidative status.

Keywords: Sugarcane bagasse residue. Selenium. Animal nutrition. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Valores de pH em função do tempo de incubação quando os resíduos foram incubados em líquido ruminal de bovinos. Pontos seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade **26**

Figura 2 - Valores de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) em função do tempo, quando os resíduos foram incubados em líquido ruminal de bovinos. Pontos seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade **27**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), cinzas e lignina nos resíduos BNC, RNE e RES **24**

Tabela 2 - Fração potencialmente degradável da FDN (U), fração indegradável da FDN (I), taxa fracional de degradação (k), pH ruminal (pH), nitrogênio amoniacal ruminal (NAR), acetato (A), propionato (P), butirato (B) e relação acetato:propionato (A:P) nos resíduos BNC, RNE e RES **25**

Tabela 3 - Avaliação dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no sangue de caprinos, após 30 dias alimentados com dieta adicionada de: I = sem adição de selênio (controle) ; II = Na₂SeO₃; III = resíduo não enriquecido + Na₂SeO₃; IV= resíduo enriquecido com selênio **39**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Acetato
AOV	Ácidos orgânicos voláteis
A:P	Relação acetato:propionato
B	Butirato
BDA	Batata, dextrose e ágar
BNC	Bagaço de cana-de-açúcar não colonizado
BOD	Bio-Oxygen Demand
$C_6H_8N_2O_2S$	Sulfanilamida
CAT	Catalase
CEUAP	Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ϵ_{ijk}	Erro aleatório
EPM	Erro padrão da média
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FDNi	Fibra indegradável em detergente neutro
g	Força centrífuga
GSH-Px	Glutathione peroxidase
I	Fração indegradável da fibra em detergente neutro
INCT	Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia
k	Taxa fracional de degradação
MDA	Malondialdeído

μ	Média geral
MS	Matéria seca
m/v	Massa por volume
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAR	Nitrogênio amoniacal ruminal
NED	N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride
NRC	National Research Council
P	Propionato
PB	Proteína bruta
PCN	Proteína carbonilada
PIDN	Proteína indegradável em detergente neutro
RES	Resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> enriquecidos com selênio
RNE	Resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> não enriquecidos
SAS	Statistical Analysis System
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Ti	Efeito fixo para tratamento
TNT	Tecido não-tecido
U	Fração potencialmente degradável da fibra em detergente neutro
U mL ⁻¹	Unidade por mililitro
v/v	Volume por volume

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca Registrada

± Mais ou menos

% Porcentagem

> Maior

< Menor

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
Referências	16
CAPÍTULO 1	
Resumo	17
Abstract	18
Introdução	19
Material e Métodos	19
Resultados e Discussão	23
Conclusão	27
Referências	28
CAPÍTULO 2	
Resumo	31
Abstract	32
Introdução	33
Material e Métodos	34
Resultados e Discussão	37
Conclusão	39
Referências	40
CONCLUSÕES GERAIS	43
ANEXO 1	44
ANEXO 2	45

INTRODUÇÃO GERAL

Pesquisas têm sido realizadas a fim de se obter alimentos enriquecidos com minerais, tais como cogumelos comestíveis enriquecidos com selênio (Se), que possam ser adicionados à dieta para o suprimento de carências nutricionais (DA SILVA et al., 2010; OLIVEIRA & NAOZUKA, 2019; LEE et al., 2006). *Pleurotus ostreatus* é uma das principais espécies de cogumelos cultivadas, devido à sua rápida colonização e degradação de diferentes resíduos agrícolas. Além disso, é uma espécie com alto teor de proteínas, fibras, minerais e vitaminas (CORRÊA et al., 2016) e com capacidade de converter compostos inorgânicos presentes nos resíduos utilizados para seu cultivo, em compostos orgânicos que são mais biodisponíveis (ASSUNÇÃO et al., 2014).

Para assimilar os nutrientes, *P. ostreatus* sintetiza enzimas extracelulares, tais como hemiceluloses, celulasas e lacases, que degradam os compostos lignocelulósicos (NAKAJIMA et al., 2018). Para o cultivo do cogumelo *P. ostreatus*, os produtores optam principalmente pela utilização do bagaço de cana-de-açúcar, devido à alta produtividade de cogumelos que é obtida, além de ser um resíduo, facilmente adquirido a baixo custo em várias regiões brasileiras, o que incentiva ainda mais a sua utilização. Entretanto, após a produção desses cogumelos, novos resíduos são gerados: um bloco de resíduos lignocelulósicos com micélio do fungo.

Buscando uma alternativa de aproveitamento desses resíduos, nosso objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito do resíduo bagaço de cana-de-açúcar, gerado após a produção do cogumelo comestível *P. ostreatus*, enriquecido ou não com Se, como uma fonte de fibras e de Se para ruminantes.

REFERÊNCIAS

ASSUNÇÃO, L. S.; SILVA, M. C. S.; FERNANDEZ, M. G.; GARCÍA-BARRERA, T.; GOMÉZ ARIZA, J. L.; BAUTISTA, J.; KASUYA, M. C. M. **Speciation of selenium in *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes* mushrooms**. *Journal of Biotechnology Letters*, v. 5 (1), p. 79-86, 2014.

CORRÊA, R. C. G.; BRUGNARI, T.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R. **Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings**. *Trends in Food Science & Technology*, v. 50, p. 103-135, 2016.

DA SILVA, M. C. S.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V.; VANETTI, M. C. D.; BAZZOLLI, D. M. S.; COSTA, N. M. B.; KASUYA, M. C. M. **In vivo bioavailability of selenium in enriched *Pleurotus ostreatus* mushrooms**. *Metallomics*, v. 2, p. 162-166, 2010.

LEE, S. H.; PARK, B. Y.; LEE, S. S.; CHOI, N. J.; LEE, J. H.; YEO, J. M.; HA, J. K.; MAENG, W. J.; KIM, W. Y. **Effects of spent composts of selenium-enriched mushroom and sodium selenite on plasma glutathione peroxidase activity and selenium deposition in finishing Hanwoo steers**. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 19 (7), p. 984-991, 2006.

NAKAJIMA, V. M.; SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H. **Screening and decolorizing potential of enzymes from spent mushroom composts of six different mushrooms**. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 13, p. 58-61, 2018.

OLIVEIRA, A. P.; NAOZUKA, J. **Preliminary results on the feasibility of producing selenium-enriched pink (*Pleurotus djamor*) and white (*Pleurotus ostreatus*) oyster mushrooms: bioaccumulation, bioaccessibility, and Se-proteins distribution**. *Microchemical Journal*, v. 145, p. 1143-1150, 2019.

CAPÍTULO 1

Fermentação ruminal in vitro dos resíduos da produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com selênio

ALVES, M. P.¹; DA SILVA, J. S.¹; COSTA, A. C.²; SOUZA, D. F.³; PAIXÃO, R. T.²; SAMPAIO, C. B.²; MANTOVANI, H. C.¹; KASUYA, M. C. M.¹

¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36570-900, Brasil

² Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36570-900, Brasil

³ Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36570-900, Brasil

Autor (E-mail): maiane.alves@ufv.br

RESUMO

O objetivo do presente estudo, foi verificar se o resíduo da produção de cogumelos enriquecidos ou não com selênio (Se) pode alterar as características fermentativas ruminais. Os seguintes tratamentos foram testados: (I) bagaço de cana-de-açúcar não colonizado; (II) resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* não enriquecidos e (III) resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *P. ostreatus* enriquecidos com Se. Em ensaios de fermentação in vitro utilizando-se líquido ruminal, foram feitas as medições de pH e a avaliação do resíduo da degradação da fibra em detergente neutro nos tempos de incubação 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 h. As concentrações de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) foram mensuradas nos tempos de incubação 0, 6, 12, 24 e 48 h e as concentrações de ácidos orgânicos voláteis (AOV), após 24 h de incubação. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o PROC GLIMMIX do software SAS e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores de pH e NAR não foram influenciados ($P>0,05$) pelos tipos de tratamentos, nem pela interação tratamento x tempo, porém houve efeito do tempo de incubação ($P<0,05$). Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) na produção de AOV. O bagaço de cana-de-açúcar não colonizado apresentou maior valor da fração potencialmente degradável ($P<0,05$) e menor valor da fração indegradável, quando comparado aos demais tratamentos ($P<0,05$). Concluímos que os resíduos testados não causam alterações nos parâmetros fermentativos.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Nutrição animal. Rúmen.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate if residues from the production of mushrooms enriched or not with selenium can alter the ruminal fermentative characteristics. The following treatments were tested: (I) non-colonized sugarcane bagasse; (II) residue from sugarcane bagasse obtained after the production of non-Se-enriched mushrooms of *Pleurotus ostreatus* and (III) residue from sugarcane bagasse obtained after the production of Se-enriched mushrooms of *P. ostreatus*. In vitro fermentation tests, pH measurements and residue evaluation of the fiber degradation in neutral detergent were performed at incubation times 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 h. The ruminal ammoniacal nitrogen (RAN) concentrations were measured at 0, 6, 12, 24 and 48 h incubation times and the volatile organic acid (VOA) concentrations after 24 h incubation. Statistical analyzes were performed using PROC GLIMMIX from the SAS software and the data obtained were subjected to analysis of variance and the means compared by Tukey's test at 5% significance. The pH and RAN values were not influenced ($P>0.05$) by the types of treatments, nor by the treatment x time interaction, however there was an effect of the incubation time ($P<0.05$). There were no differences ($P>0.05$) in the production of VOA. The non-colonized sugarcane bagasse showed a higher value of the potentially degradable fraction ($P<0.05$) and a lower value of the undegradable fraction, when compared to the other treatments ($P<0.05$). We conclude that the tested residues do not cause changes in the fermentative parameters.

Keywords: Sugarcane bagasse. Animal nutrition. Rumen.

INTRODUÇÃO

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos principais substratos utilizados para o cultivo dos cogumelos de *Pleurotus ostreatus*. Após a frutificação dos cogumelos, os resíduos compostos por bagaço de cana-de-açúcar e micélio fúngico são normalmente descartados. Esses resíduos apresentam menores teores de lignina quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar não colonizado, além de maiores teores da proteína bruta (BENTO et al., 2014).

Alternativas de uso são necessárias, a fim de se evitar o acúmulo desses resíduos no ambiente, o que pode gerar impactos ambientais. Além disso, é importante considerar o resíduo da produção de cogumelos enriquecidos com micronutrientes, como o selênio (Se), pois o micronutriente fica retido no resíduo, que ao ser descartado incorretamente, pode causar toxicidade a diversos organismos.

Na dieta de ruminantes, o bagaço de cana-de-açúcar é comumente adicionado como fonte de fibras e o Se como micronutriente essencial. Assim, considerando a importância de um adequado fornecimento de fibras e de Se para a produção de desses animais, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito dos resíduos gerados após a produção de cogumelos de *P. ostreatus* enriquecido ou não com Se nos padrões fermentativos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Associações Micorrízicas e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios pertencentes ao Departamento de Microbiologia e no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia, Viçosa, Minas Gerais. Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 30/2020), seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

1. Obtenção do substrato

1.1 Microrganismo e condição de cultivo

Foi utilizado o fungo *P. ostreatus*, isolado Plo 02, pertencente à coleção de fungos do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O fungo foi cultivado em placa de Petri contendo meio BDA e

incubado em BOD a 25 °C. Após 7 dias de incubação, o micélio foi utilizado para a produção de inóculo (Spawn) em grãos de sorgo. Antes da inoculação, os grãos de sorgo foram tratados em solução de cloro a 2 % (v/v), lavados e cozidos em água por 45 min. Após a retirada do excesso de água, foi adicionado sulfato de cálcio (CaSO₄) e carbonato de cálcio (CaCO₃), na proporção 4:1, em quantidade equivalente a 2 % da massa seca dos grãos. Cerca de 150 g desses grãos foram acondicionados em frascos de vidro de 200 mL e autoclavados a 121 °C por 60 min (LUZ et al., 2013).

1.2 Preparo do substrato de cultivo

O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado da feira livre de Viçosa, colocado para secar e, posteriormente, picado em moinho de martelo com peneira de 10 mm. Esse bagaço picado foi imerso em solução de cal hidratada (Ca(OH)₂), a 2 % (m/v) por um período de 16 h. Posteriormente, realizou-se a centrifugação do material para retirada do excesso de água e procedeu a inoculação com o fungo, de acordo com a técnica sugerida por NUNES et al. (2017).

1.3 Enriquecimento do substrato de cultivo com Se

Após a centrifugação, um quilograma desse substrato foi acondicionado em cada sacola plástica. Foram adicionados 10 mL de solução de selenito de sódio (Na₂SeO₃), na concentração de 25 mg de Se Kg⁻¹ de substrato. Em seguida, inoculou-se 150 g de inóculo. Também foram cultivados substratos com o fungo sem a adição de Se, onde foram adicionados 10 mL de água destilada (DA SILVA et al., 2010). As sacolas contendo o substrato inoculado com o fungo, foram armazenadas em temperatura ambiente até a completa colonização do substrato, aproximadamente 30 dias.

1.4 Choque térmico, frutificação e colheita dos cogumelos

Após a completa colonização do substrato, as sacolas foram mantidas a 10 °C durante 24 h, para indução dos primórdios fúngicos. Após esse período, as sacolas foram transferidas para sala de frutificação, com umidade relativa e temperatura de cerca de 80 % e de 23 °C, respectivamente. A colheita dos cogumelos foi realizada antes da completa abertura do píleo.

Após a colheita dos cogumelos, os resíduos foram secos e moídos em moinho de faca utilizando-se peneira de 1 mm.

1.5 Composição química dos resíduos

Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), lignina e cinzas nos resíduos, foram seguidas as seguintes metodologias (DETMANN et al., 2012): MS (Método INCT-CA G-003/1); PB (Método INCT-CA N-001/1); PIDN (INCT-CA N-004/1); FDN (Método INCT-CA F-002/1); FDNi (INCT-CA F-008/1); FDA (Método INCT-CA F-004/1); EE (Método INCT-CA G-004/1); lignina (Método INCT-CA F-005/1) e cinzas (Método INCT-CA M-001/1).

2 Análises dos parâmetros fermentativos

2.1 Obtenção do líquido ruminal e incubação in vitro

Foram utilizadas duas novilhas da raça Nelore fistuladas no rúmen, alimentadas com bagaço de cana-de-açúcar fornecido à vontade e mistura mineral completa e tiveram livre acesso à água. Após 15 dias de adaptação à dieta, foi realizada a coleta do líquido ruminal no período da manhã, antes do fornecimento da dieta aos animais. O líquido ruminal coletado foi acondicionado em garrafa térmica e transferido para sala climatizada (39 °C), onde foi filtrado, utilizando-se sacos de tecido de algodão. Posteriormente, 10 mL de inóculo ruminal, foi adicionado sob fluxo contínuo de dióxido de carbono (CO₂) em frasco contendo 250 mg de resíduo adicionado de 40 mL de solução tampão McDougall (MCDOUGALL, 1949). Os frascos foram fechados com tampas de borracha e lacres de alumínio e mantidos sob agitação orbital, utilizando-se uma mesa agitadora (Tecnal[®]). Foram incubados 10 frascos por tratamento e o procedimento de incubação foi repetido 4 vezes. Foram avaliados os seguintes tratamentos: (I) bagaço de cana-de-açúcar não colonizado (BNC); (II) resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *P. ostreatus* não enriquecidos (RNE); (III) resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *P. ostreatus* enriquecidos com Se (RES).

2.2. Determinação do pH

Para avaliação do pH, utilizou-se um medidor digital de pH (Digimed[®]), modelo DM-2P previamente calibrado. As medições de pH foram realizadas nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 h após a incubação.

2.3. Determinação da degradação dos resíduos da FDN

Foram avaliados os tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 h após a incubação. Ao final de cada tempo de incubação os frascos foram retirados da sala climatizada e o conteúdo filtrado em cadinhos filtrantes (porosidade grossa). A análise de FDN do resíduo filtrado foi realizada conforme a Metodologia (INCT-CA F-002/1) descrita por DETMANN et al. (2012).

2.4. Determinação da concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR)

A concentração de NAR foi determinada pelo método colorimétrico, conforme metodologia descrita por CHANEY & MARBACH (1962). Para medição da absorbância, utilizou-se espectrofotômetro da marca Thermo Scientific[®] modelo Multiskan GO. A absorbância foi medida a 630 nm e foi utilizado o cloreto de amônio (NH₄Cl) como padrão. A concentração de NAR foi avaliada nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 h após a incubação.

2.5. Determinação das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (AOV)

As concentrações de AOV foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O processamento de limpeza das amostras foi realizado conforme metodologia descrita por SIEGFRIED et al. (1984). Foi utilizado cromatógrafo da marca Thermo Scientific[®] modelo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração Shodex RI-101 mantido a 45 °C. Para separação dos ácidos orgânicos foi utilizada coluna de exclusão iônica Phenomenex Rezex ROA mantida a 45 °C. Utilizou-se ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mmol como fase móvel. Para a curva de calibração, foram realizadas diluições seriadas a partir de padrões com as seguintes concentrações: ácido acético (60 mM), o ácido propiônico (40 mM) e o ácido butírico (20 mM). As concentrações dos AOV (ácidos acético, propiônico e butírico) foram avaliadas após 24 h de incubação.

3. Análises estatísticas

Os valores de pH e NAR obtidos para os diferentes tempos de incubação foram avaliados segundo esquema fatorial (tratamento x tempo de incubação). Os resíduos de FDN nos diferentes tempos, para cada tratamento, foram submetidos, por intermédio do algoritmo de Gauss-Newton, ao ajustamento do modelo não-linear descrito por VAN MILGEN et al. (1991).

As análises estatísticas foram realizadas usando o procedimento PROC GLIMMIX do software SAS (Statistical Analysis System). Os dados obtidos das análises foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve um aumento do teor de PB nos resíduos obtidos após a produção dos cogumelos *P. ostreatus*, em comparação ao bagaço de cana-de-açúcar não colonizado (Tabela 1). O aumento da proporção de PB nos resíduos colonizados é devido à degradação de parte dos compostos lignocelulósicos (TUYEN et al., 2013) e à síntese das proteínas fúngicas (KERMANI et al., 2019). Entretanto, observamos um aumento de PIDN nos substratos colonizados (Tabela 1), mas ao avaliarmos a diferença da PB com o PIDN, observamos que a quantidade de PB disponível é 275 % e 328 % maior, respectivamente nos resíduos colonizados sem ou com Se.

Tabela 1 - Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), cinzas e lignina nos resíduos BNC, RNE e RES

Item (%)	Tratamentos*		
	BNC	RNE	RES
MS ¹	90,25	89,76	90,39
PB ²	1,37	2,95	3,29
PIDN ²	0,56	0,72	0,70
FDN ²	69,29	63,80	62,74
FDNi ²	21,01	32,44	32,24
FDA ²	52,46	48,83	48,85
EE ²	0,43	0,20	0,15
Cinzas ²	10,11	7,72	7,65
Lignina ²	7,00	5,75	5,99

*BNC - bagaço de cana-de-açúcar não colonizado; RNE - resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* não enriquecidos; RES - resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* enriquecidos com selênio; ¹porcentagem com base na matéria natural; ²porcentagem com base na matéria seca

O bagaço de cana-de-açúcar não colonizado apresentou maior valor da fração U e menor valor da fração I comparado aos resíduos colonizados ($P < 0,05$) (Tabela 2). Esse resultado é corroborado pela avaliação descritiva da composição química, onde se verifica um aumento da FDNi nos resíduos colonizados (Tabela 1). A diminuição da degradabilidade da fibra pode ser devido à utilização de compostos como a hemicelulose e a celulose pelo fungo (BENTO et al., 2014; ZHENG et al., 2020). Verifica-se também que houve redução no teor de lignina quando o resíduo é colonizado (Tabela 1), o que foi também verificado por BENTO et al. (2014) em resíduo de bagaço de cana-de-açúcar e também por KASUYA et al. (2015) em resíduo de café.

Tabela 2 - Fração potencialmente degradável da FDN (U), fração indegradável da FDN (I), taxa fracional de degradação (k), pH ruminal (pH), nitrogênio amoniacal ruminal (NAR), acetato (A), propionato (P), butirato (B) e relação acetato:propionato (A:P) nos resíduos BNC, RNE e RES

Item	Tratamentos			EPM	Valor P
	BNC	RNE	RES		
U	66,79a	49,37b	53,57b	2,82	0,01
I	33,20a	50,64b	46,44b	2,82	0,01
k ¹	0,055	0,041	0,041	0,008	0,504
pH	6,8	6,8	6,8	0,01	0,97
NAR ²	0,048	0,067	0,060	0,04	0,066
A ³	59,212	51,213	45,207	7,237	0,252
P ³	33,574	42,552	48,181	5,585	0,292
B ³	7,213	6,234	6,611	1,526	0,721
A:P	2,079	1,417	1,344	0,532	0,242

*BNC - bagaço de cana-de-açúcar não colonizado; RNE - resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* não enriquecidos; RES - resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* enriquecidos com selênio; EPM - erro padrão da média; ¹dados em h⁻¹; ²dados em mg dL⁻¹; ³dados em porcentagem (%); médias nas linhas seguidas por letras diferentes diferiram a 5 % de probabilidade

Não foi observado efeito para tratamento ($P>0,05$), assim como não houve interação entre tratamento e tempo de incubação sobre o pH ($P>0,05$) (Figura 1). No entanto, houve efeito do tempo de incubação nos valores de pH ($P<0,05$). Até as 6 h de incubação, houve queda nos valores de pH e após esse período, o pH manteve-se estável (Figura 1). O valor de pH igual a 6,75, obtido após 12 h de incubação, foi o menor valor observado durante todo o período de incubação. Considerando que o pH é um dos principais fatores que afetam a atividade microbiana e, conseqüentemente, a digestibilidade das fibras (HOOVER, 1986), O valor de pH observado (Figura 1) corrobora com a falta de efeito para tratamentos, pois valores de pH acima de 6,0 não afetam negativamente a atividade das enzimas produzidas pelos microrganismos fibrolíticos, como as celulasas e as xilanasas (MOULD & ØRSKOV, 1983, MORGAVI et al., 2000, MOURIÑO et al., 2001).

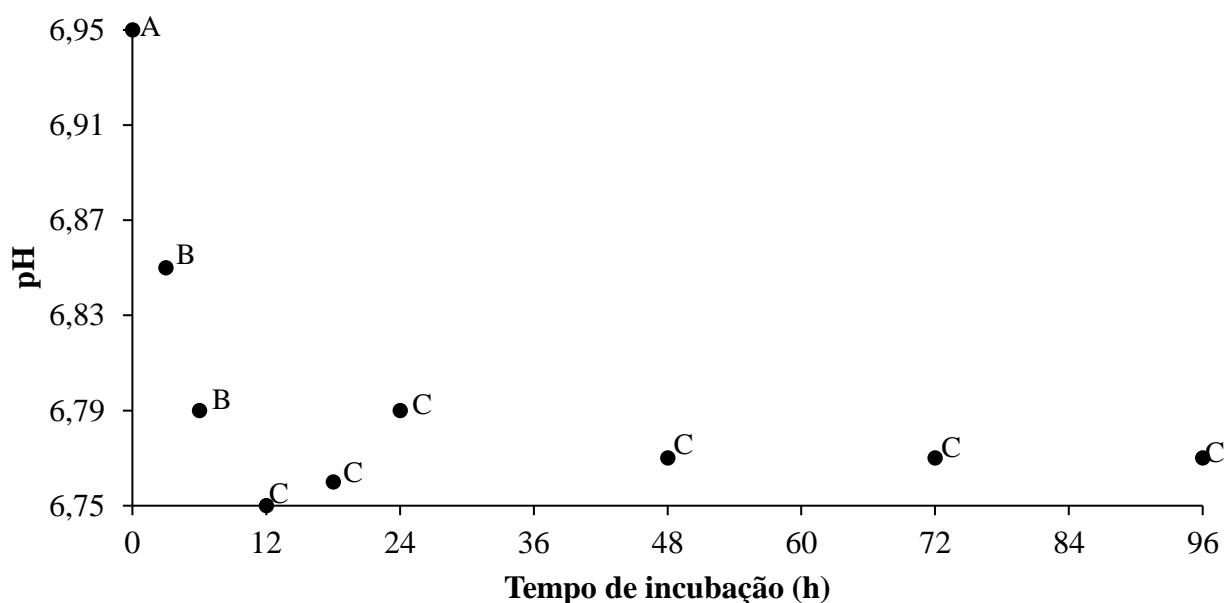


Figura 1 - Valores de pH em função do tempo de incubação quando os resíduos foram incubados em líquido ruminal de bovinos. Pontos seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

A produção de NAR aumentou ao decorrer do tempo ($P < 0,05$), atingindo a concentração de $0,2125 \text{ mg dL}^{-1}$ após 48 h de incubação (Figura 2), sendo esta tendência, comumente observada na incubação *in vitro*, devido à utilização da proteína presente no meio, pelos microrganismos (QUIGLEY et al., 1992). Porém, mesmo com a produção crescente de NAR, os valores obtidos foram menores que 5 mg dL^{-1} , que é considerado um valor mínimo adequado para manter o crescimento microbiano no rúmen (SATTER & SLYTER, 1974). A baixa produção de NAR pode estar relacionada com o baixo teor de PB dos resíduos (Tabela 1), pois, nas condições tropicais, teores de PB abaixo de 8 % da MS, limita a atividade microbiana (LAZZARINI et al., 2009; SAMPAIO et al., 2010). Assim, a suplementação de forragens de baixa qualidade com nitrogênio aumenta a produção de NAR (ORTIZ-RUBIO et al., 2007; DETMANN et al., 2011).

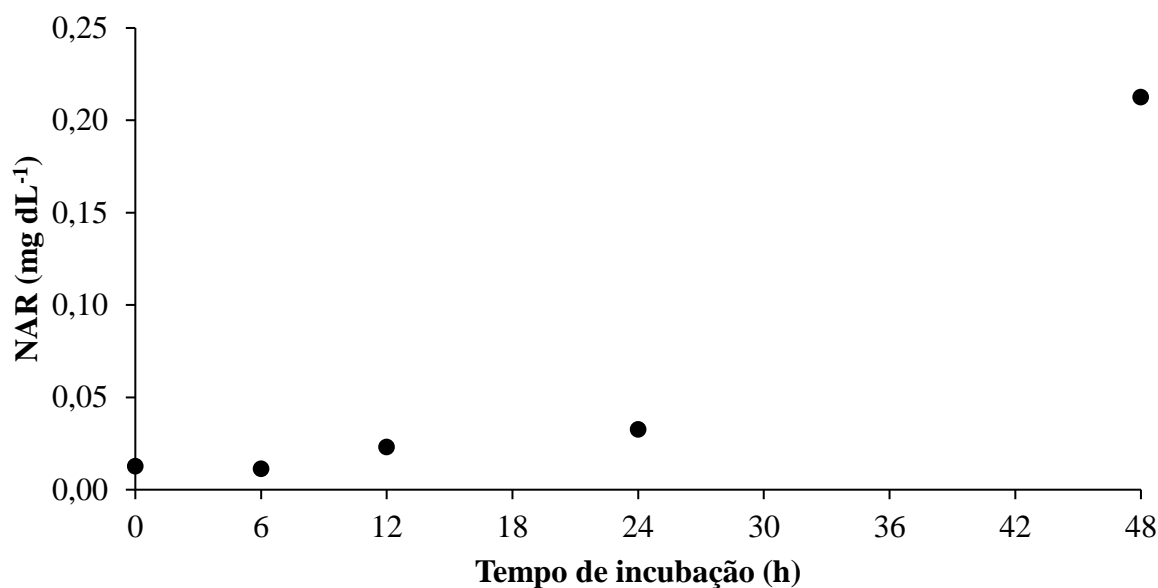


Figura 2 - Valores de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) em função do tempo, quando os resíduos foram incubados em líquido ruminal de bovinos. Pontos seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

A produção de AOV não apresentou diferenças significativas em relação aos resíduos testados ($P > 0,05$). Porém, observamos que a produção de propionato, que é considerado o principal precursor gliconeogênico em ruminantes, aumentou 26,74 % em resíduo colonizado não enriquecido e 43,5 % em resíduo colonizado enriquecido com Se, em relação ao resíduo não colonizado (Tabela 2). Os resultados indicam que os produtos gerados na fermentação estão compatíveis com valores observados em dietas com volumosos que são comumente fornecidas aos ruminantes (VAN SOEST, 1994). O aumento na produção de propionato está em concordância com os resultados observados quando leveduras selenizadas foram adicionadas à dieta de caprinos (ABBASI et al., 2018) e de bovinos (WANG et al., 2009).

CONCLUSÃO

Os resíduos obtidos após a produção dos cogumelos *P. ostreatus*, enriquecidos ou não com Se, podem ser utilizados na alimentação de ruminantes, pois não trazem efeitos negativos no padrão fermentativo, além de aumentar o teor de proteína bruta disponível.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, B.; MALHI, M.; ALI SIYAL, F.; ARAIN, M. A.; BHUTTO, Z. A.; SOOMRO, S.; RUI, R. **Influence of dietary selenium yeast on fermentation pattern mucosal growth and glutathione peroxidase (gsh-px) activity in colon of goat.** Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research, v. 7 (6), p. 253-359, 2018.
- BENTO, C. B. P.; DA SILVA, J. S.; RODRIGUES, M. T.; KASUYA, M. C. M.; MANTOVANI, H. C. **Influence of white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of lignocellulosic agro-industrial residues.** African Journal of Microbiology Research, v. 8 (28), p. 2724-2732, 2014.
- CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. **Modified reagents for determination of urea and ammonia.** Clinical Chemistry, v. 8 (2), p. 130-132, 1962.
- DA SILVA, M. C. S.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V.; VANETTI, M. C. D.; BAZZOLLI, D. M. S.; COSTA, N. M. B.; KASUYA, M. C. M. **In vivo bioavailability of selenium in enriched Pleurotus ostreatus mushrooms.** Metallomics, v. 2, p. 162-166, 2010.
- DETMANN, E.; DE QUEIROZ, A. C.; ZORZI, K.; MANTOVANI, H. C.; BAYÃO, G. F. V.; GOMES, M. P. C. **Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com proteína verdadeira e/ou nitrogênio não-proteico.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 40 (6), p. 1272-1279, 2011.
- DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C.; BERCHIELLI, T. T.; SALIBA, E. O. S.; CABRAL, L. S.; PINA, D. S.; LADEIRA, M. M.; AZEVEDO, J. A. G. **Métodos para Análise de Alimentos.** INCT - Ciência Animal. Visconde do Rio Branco: Suprema; 1ed, 214p, 2012.
- HOOVER, W. H. **Chemical factors involved in ruminal fiber digestion.** Journal of Dairy Science, v. 69, p. 2755-2766, 1986.
- KASUYA, M. C. M.; DA LUZ, J. M. R.; NUNES, M. D.; DA SILVA, M. C. S.; DE CARVALHO, D. R.; ASSUNÇÃO, L. S.; PAULA, T. A.; MOURA, C.; BENTO, C. B. P. **Production of selenium-enriched mushrooms in coffee husks and use of this colonized residue.** In book: Coffee in Health and Disease Prevention, p. 301-309, 2015.
- KERMANI, M. M. M.; BAHROLOLOUM, S.; KOOHZADI F. **Investigating the possibility of producing animal feed from sugarcane bagasse using oyster mushrooms: a case in rural entrepreneurship.** Journal of Global Entrepreneurship Research, v. 9 (52), 8p, 2019.
- LAZZARINI, I.; DETMANN, E.; SAMPAIO, C. B.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, F. A. **Dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61 (3), p. 635-647, 2009.
- LUZ, J. M. R.; PAES, S. A.; TORRES, D. P.; NUNES, M. D.; DA SILVA, J. S.; MANTOVANI, H. C.; KASUYA, M. C. M. **Production of edible mushroom and**

degradation of antinutritional factors in jatropha biodiesel residues. LWT - Food Science and Technology, v. 50, p. 575-580, 2013.

MCDUGALL, E. I. **Studies on ruminal saliva. The composition and output of sheeps saliva.** Journal Biochemistry, v. 43, p. 99-109, 1949.

MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L.; RODE, L. M.; IWAASA, A. D.; YANG, W. Z.; MCALLISTER, T. A.; WANG, Y. **Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*.** Journal of Dairy Science, v. 83, p. 1310-1321, 2000.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R. **Manipulation of rumen fluid ph and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate.** Animal Feed Science and Technology, v.10 (1), p. 1-14, 1983.

MOURIÑO, F.; AKKARAWONGSA, R.; WEIMER P. J. **Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro.** Journal of Dairy Science, v. 84, p. 848-859, 2001.

NUNES, M. D.; DA SILVA, M. C. S.; SCHRAM, J. G. S.; DA SILVA, J. S.; TAMAI, Y.; KASUYA, M. C. M. **Pleurotus ostreatus, mushrooms production using quick and cheap methods and the challenges to the use of coffee husk as substrate.** African Journal of Microbiology Research, v. 11 (31), p. 1252-1258, 2017.

ORTIZ-RUBIO, M. A.; ØRSKOV, E. R.; MILNE, J.; GALINA, H. M. A. **Effect of different sources of nitrogen on in situ degradability and feed intake of Zebu cattle fed sugarcane tops (*Saccharum officinarum*).** Animal Feed Science and Technology, v. 139, p. 143-158, 2007.

QUIGLEY, J. D.; BOEHMS, S. I.; STEEN, T. M.; HEITMANN, R. N. **Effects of lasalocid on selected ruminal and blood metabolites in young calves.** Journal of Dairy Science, v. 75, p. 2235-2241, 1992.

SAMPAIO, C. B.; DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C.; DE SOUZA, M. A.; LAZZARINI, I.; RODRIGUES PAULINO, P. V.; DE QUEIROZ A. C. **Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds.** Tropical Animal Health and Production, v. 42, p. 1471-1479, 2010.

SAS. **SAS and STAT User's Guide, Release 9.1.** SAS Institute Inc., Cary, NC. 2003.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. **Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro.** British Journal of Nutrition, v. 32, p. 199-208, 1974.

SIEGFRIED, R.; RÜCKEMANN, H.; STUMPF, G. **Method for the determination of organic-acids in silage by high-performance liquid-chromatography.** Landwirtschaftliche Forschung, v. 37, p. 298-304, 1984.

TUYEN, D. V.; PHUONG, H. N.; CONE, J. W.; BAARS, J. J. P.; SONNENBERG, A. S. M.; HENDRIKS, W. H. **Effect of fungal treatments of fibrous agricultural by-products on**

chemical composition and in vitro rumen fermentation and methane production. Bioresource Technology, v. 129, p. 256-263, 2013.

VAN MILGEN, J.; MURPHY, M. R.; BERGER, L. L. **A compartmental model to analyze ruminal digestion.** Journal of Dairy Science, v. 74, p. 2515-2529, 1991.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant.** 2ed. (Cornell University Press, Ithaca, NY), 476p, 1994.

WANG, C.; LIU, Q.; YANG, W. Z.; DONG, Q.; YANG, X. M.; HE, D. C.; ZHANG, P.; DONG, K. H.; HUANG, Y. X. **Effects of selenium yeast on rumen fermentation, lactation performance and feed digestibilities in lactating dairy cows.** Livestock Science, v. 126, p. 239-244, 2009.

ZHENG, M.; ZUO, S.; NIU, D.; JIANG, D.; TAO, Y.; XU, C. **Effect of four species of white rot fungi on the chemical composition and in vitro rumen degradability of naked oat straw.** Waste and Biomass Valorization, 2020.

CAPÍTULO 2

Resíduo da produção de cogumelos enriquecidos com selênio na atividade antioxidante sanguínea em caprinos

ALVES, M. P.¹; SOUZA, D. F.²; BASTOS, D. S. S.³; SILVA, M. C. S.¹; LIMA, M. C.⁴; SAMPAIO, C. B.⁵; RODRIGUES, M. T.⁵; MANTOVANI, H. C.¹; KASUYA, M. C. M.¹

¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36570-900, Brasil

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 36570-900, Brasil

³ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36570-900, Brasil

⁴ Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Univiçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36576-340, Brasil

⁵ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36570-900, Brasil

Autor (E-mail): maiane.alves@ufv.br

RESUMO

O selênio (Se) é um nutriente essencial, sendo a ação antioxidante uma de suas principais funções. Na dieta de animais de produção, o Se pode ser adicionado na forma orgânica ou inorgânica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso do resíduo bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos enriquecidos com Se, no status antioxidante de caprinos da raça Pardo Alpina. Foram utilizados 16 animais, distribuídos nos seguintes tratamentos: (I) sem suplementação de Se (controle); (II) resíduo não enriquecido com Se + selenito de sódio (Na_2SeO_3); (III) Na_2SeO_3 ; (IV) resíduo enriquecido com Se. Os animais foram alojados em baias individuais e teor de Se na dieta foi de $0,3 \text{ mg Kg}^{-1}$ de matéria seca. Após 30 dias, foram coletadas amostras de sangue, antes do fornecimento da dieta, por punção da veia jugular. As amostras foram coletadas para avaliação das atividades das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase e dos teores de óxido nítrico, proteína carbonilada e malondialdeído. As variáveis foram analisadas como delineamento inteiramente casualizado, utilizando o PROC GLIMMIX do software SAS (Statistical Analysis System). Não foram observadas diferenças dos parâmetros avaliados entre os tratamentos ($P > 0,05$), o que indica que o resíduo com Se não causou toxicidade aos animais. Concluímos que o resíduo não alterou os parâmetros sanguíneos relacionados ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Glutathione peroxidase. *Pleurotus ostreatus*.

ABSTRACT

Selenium (Se) is an essential nutrient, being the antioxidant action is one of its main functions. In the diet of animals, Se can be added in organic or inorganic form. The present study was carried out with the objective to evaluate the use of sugarcane bagasse residue generated after the production of selenized mushrooms in the antioxidant status goats Pardo Alpina race. There were used 16 animals, distributed in these treatments: (I) residue enriched with Se; (II) non-enriched residue + sodium selenite (Na_2SeO_3); (III) Na_2SeO_3 ; (IV) without Se supplementation (control group). The animals were housed in individual stalls and the Se content in the diet was 0.3 mg Kg^{-1} of dry matter. After 30 days, were collected blood by puncture of the jugular vein, before the diet was supplied. The samples were collected to evaluate the activities of the enzymes glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and the levels of nitric oxide, carbonylated protein and malondialdehyde. The variables were analyzed as a completely randomized design, using PROC GLIMMIX from the SAS software (Statistical Analysis System). There were no differences in evaluated parameters in the treatments ($P>0.05$), indicating that the residue with Se didn't cause toxicity to the animals. So, it is possible to conclude that the residue can be added to the goat diet as an alternative supplement.

Keywords: Sugarcane bagasse. Glutathione peroxidase. *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUÇÃO

A suplementação de dietas de animais de produção com Se diminui os efeitos deletérios dos radicais livres, refletindo diretamente na saúde desses animais (LUKUSA & LEHLOENYA, 2017). Diferentes fontes de Se podem ser adicionadas à dieta de ruminantes. Geralmente, as fontes mais utilizadas são o selenito de sódio (Na_2SeO_3) ou a levedura selenizada. O Na_2SeO_3 por ser uma fonte inorgânica de Se, apresenta menor biodisponibilidade quando comparado à levedura selenizada, que é composta por moléculas orgânicas de Se, como selenometionina e selenocisteína (RECZYŃSKA et al., 2019).

O Na_2SeO_3 é adicionado ao substrato de cultivo de cogumelos enriquecidos com Se, como o bagaço de cana-de-açúcar (OLIVEIRA & NAOZUKA, 2019). Após a colheita dos cogumelos, os resíduos colonizados podem ser aproveitados na dieta de ruminantes, como fonte de fibras mais facilmente degradada pelos microrganismos ruminais (BENTO et al., 2014), as quais possuem ainda resíduos de Se adicionado, além daqueles incorporados ao micélio do fungo presente nesse resíduo.

O selênio (Se) é um micronutriente essencial, pois está presente no sítio ativo da enzima glutationa peroxidase (GSH-Px), que juntamente com as enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) compõem o sistema antioxidante, cuja principal função é evitar o acúmulo de radicais livres gerados durante o metabolismo (BARBOSA et al., 2010). Além da atividade das enzimas mencionadas, outros marcadores do estresse oxidativo incluem o óxido nítrico (NO), a proteína carbonilada (PCN) e o malondialdeído (MDA). O teor de NO diminui em condições de estresse devido à reação com o ânion superóxido (O_2^-) produzindo o ânion peroxinitrito (ONOO^-) (MONCADA & BOLAÑOS, 2006), enquanto a PCN é gerada a partir da oxidação proteica (LEVINE et al., 1990) e o MDA é formado durante a peroxidação lipídica (DEL RIO et al., 2005).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação da dieta de caprinos com resíduo à base de bagaço de cana-de-açúcar enriquecido com Se, resultante da produção de cogumelo *Pleurotus ostreatus*, sobre a atividade das enzimas que compõem o sistema antioxidante e a concentração de compostos relacionados ao estresse oxidativo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais e dieta

O experimento foi conduzido no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 126/2019), seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foram utilizadas 16 caprinos da raça Pardo Alpina, entre 7 a 8 meses de idade, com peso corporal médio de $32,5 \pm 6$ Kg. Os animais foram alojados em baias individuais com livre acesso à água.

A dieta fornecida aos animais foi composta de 50 % de concentrado e 50 % de volumoso. O feno de capim Tifton-85 (*Cynodon* sp.) foi utilizado como volumoso. As dietas foram fornecidas durante 30 dias, 2 vezes ao dia, considerando-se 10 % de sobra. Os seguintes tratamentos foram avaliados: (I) sem suplementação com Se (controle); (II) resíduo não enriquecido + selenito de sódio (Na_2SeO_3); (III) Na_2SeO_3 ; (IV) resíduo enriquecido com Se. O teor de Se adicionado na dieta foi calculado de acordo com as recomendações do NRC (2007) para caprinos em crescimento, que é de $0,3 \text{ mg Kg}^{-1}$ de MS.

2.2 Coleta do sangue e análises

Após 30 dias, foram coletadas amostras de sangue, antes do fornecimento da dieta, por punção da veia jugular. As amostras de sangue foram coletadas em tubos vacutainer contendo EDTA e, posteriormente, foram centrifugadas a 1000 g, a 4 °C por 10 min, para separação do plasma sanguíneo.

2.2.1 Análise da glutathiona peroxidase (GSH-Px)

A atividade da enzima GSH-Px foi determinada conforme metodologia descrita por CICHOSKI et al (2012). Foi adicionado ao plasma, tampão fosfato (60mM), azida sódica (1mM) e EDTA (0,5mM). Como controle, utilizou-se tampão reacional composto por nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) a 0,2mM, glutathiona reduzida a 1,12 mM e glutathiona redutase. Posteriormente, adicionou-se peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,72 mM e incubou-se a 37 °C por 10 min. A absorbância foi monitorada durante 5 min, usando

espectrofotômetro a 340 nm (Thermo Scientific® modelo Multiskan GO). A atividade da GSH-Px foi expressa em U mL⁻¹.

2.2.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Para determinação da SOD, inicialmente adicionou-se 3 mL de solução salina 0,9 % em 0,5 mL de sangue e realizou-se 3 lavagens de hemácias, centrifugando durante 10 min a 1000 g e retirando o sobrenadante. Após a última lavagem, adicionou-se 2 mL de água destilada à amostra e foi realizada a homogeneização. Para promover a hemólise, a amostra foi deixada a baixa temperatura (4 °C) por um período de 15 min. Em seguida, as amostras foram diluídas no Ransod Diluent (na proporção 1:200). A atividade da SOD foi expressa em U mL⁻¹.

2.2.3 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada conforme metodologia descrita por HADWAN & ABED (2015), com algumas modificações. Utilizou-se H₂O₂ como substrato. O volume de 5 µL de amostra foi incubado com 100 µL da mistura de reação, contendo H₂O₂ e tampão fosfato a pH 7,4. Após 3 min de incubação, adicionou-se 150 µL de molibdato de amônio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O) a 32,4 mM. Para a preparação do branco foram incubados 5 µL de amostra, 100 µL de solução de tampão fosfato e 150 µL de molibdato de amônio. Para cada amostra incubada, foi preparado um branco. O consumo de H₂O₂ foi determinado em espectrofotômetro a 374 nm (Thermo Scientific® modelo Multiskan GO). A atividade enzimática foi expressa em U mL⁻¹.

2.2.4 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada pelo método indireto de GRIESS (GRISHAM et al., 1996). O volume de 50 µL de plasma foi incubado com 50 µL da solução de sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S) a 1 % por 10 min. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de solução de naftil etilenodiamina diclorito (NED) a 0,1 % em ácido fosfórico (H₃PO₄) 5 % por mais 10 min. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, utilizando-se espectrofotômetro (Thermo Scientific® modelo Multiskan GO). A concentração do NO foi determinada utilizando uma

curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2). A quantidade de NO foi expressa em μM .

2.2.5 Determinação da produção de proteína carbonilada (PCN)

A produção de PCN foi determinada conforme a metodologia descrita por LEVINE (1990). O volume de 200 μL de plasma diluído em salina (0,9 %) foi incubado com 800 μL de dinitrofenilhidrazina (DNPH) a 10 mM em ácido clorídrico (HCl) 2 M por 1 h, ao abrigo de luz. Para preparação do branco foram incubados 200 μL do soro diluído com 800 μL de HCl a 2 M. Após esse período, adicionou-se 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 40 %, agitadas em vórtex, centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4 °C e descartado o sobrenadante. Os precipitados formados foram lavados 3 vezes com 1 mL de solução etanol:acetato de etila (1:1) e centrifugados novamente a 10.000 g por 10 min a 4 °C. Após a última lavagem os pellets foram ressuspensos em SDS (sodium dodecyl sulfate) a 6 %. O sobrenadante obtido foi transferido para placa de Elisa e realizada a leitura a 370 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific® modelo Multiskan GO). A quantidade de PCN foi expressa em nM mL^{-1} .

2.2.6 Determinação da produção de malondialdeído (MDA)

Para avaliação da peroxidação lipídica, foi realizada a quantificação do MDA, conforme a metodologia descrita por BUEGE & AUST (1978). Foram adicionados 400 μL de solução de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em 200 μL de plasma. A reação ocorreu a 90 °C em banho-maria durante 40 min. Após o equilíbrio com a temperatura ambiente, foram acrescentados 600 μL de n-Butanol e foi realizada a centrifugação durante 5 min a 1200 g. Após esse período, a formação de TBARS foi monitorada pela absorção de luz em espectrofotômetro (Thermo Scientific® modelo Multiskan GO) a 535 nm. O teor de MDA foi expresso em mg de proteína, sendo calculado pela razão entre a absorbância e o coeficiente de extinção molar do ácido tiobarbitúrico ($\epsilon = 0,156 \mu\text{mol L}^{-1}$). A concentração de proteína foi determinada conforme metodologia descrita por BRADFORD (1976).

3. Análises Estatísticas

Todas as variáveis foram analisadas como delineamento inteiramente casualizado, segundo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \varepsilon_{ijk}$$

Onde: μ = média geral; T_i = efeito fixo para tratamento; ε_{ijk} = erro aleatório. Todas as variáveis foram analisadas pelo PROC GLIMMIX do software SAS (Statistical Analysis System versão 9.4), as médias dos quadrados mínimos foram consideradas diferentes quando $P \leq 0,05$ e a tendência foi utilizada quando $0,05 < P < 0,10$. A variação de peso vivo foi utilizada como covariável e, caso não significativa, retirada do modelo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram encontradas diferenças significativas nas atividades das enzimas GSH-Px, SOD e CAT e nem nos teores dos compostos NO, PCN e MDA ($P > 0,05$) (Tabela 3).

A GSH-Px é uma selenoenzima do sistema de defesa antioxidante, composta por 4 átomos de Se, podendo ser utilizada para determinar de forma indireta, o Se sérico e, conseqüentemente, auxiliar na escolha da suplementação de Se (GROMADZIŃSKA et al., 2008). A metodologia de avaliação da GSH-Px é rápida, eficiente e de menor custo, quando comparada com os métodos de análise direta de Se.

No presente estudo, avaliamos a atividade da GSH-Px, que é responsável por catalisar a redução do H_2O_2 a partir da oxidação do tripeptídeo glutationa (DAY, 2009) e a atividade de outras importantes enzimas relacionadas ao sistema antioxidante (SOD e CAT). A SOD é responsável por realizar a dismutação do ânion superóxido (O_2^-), que é uma espécie reativa de oxigênio extremamente tóxica às células, em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2) (ANDREYEV et al., 2015). Enquanto a CAT decompõe o H_2O_2 em água (H_2O) e O_2 . Além das atividades das enzimas, foram avaliados os teores de compostos biológicos que servem como indicadores do estresse oxidativo (NO, PCN e MDA).

Em condições de estresse oxidativo, há aumento nos teores de NO, PCN e MDA, sendo o Se um importante antioxidante, que pode ajudar na diminuição dos efeitos deletérios desses compostos. Porém, por ser um micronutriente, a dosagem de Se fornecida aos animais, deve ser quantificada e avaliada corretamente, pois superdosagens podem gerar efeito inverso, causando toxicidade e podendo aumentar ainda mais o estresse oxidativo (SHEN et al., 1999). No

presente estudo, a dosagem de Se fornecida, não favoreceu o aumento do estresse oxidativo, indicando que a dose testada não causou toxicidade. Esse pode ser um dos motivos de não haver diferença entre os grupos de animais suplementados e o grupo controle (não suplementado com Se). Para exemplificar como determinados compostos podem induzir o estresse oxidativo, em um estudo realizado por DAUNDKAR & RAMPAL (2014) foi avaliado em caprinos, o efeito do Carbendazim, que é um fungicida utilizado na agricultura, considerado de baixa toxicidade aos mamíferos. Observou-se aumento da produção de MDA no grupo de animais expostos ao fungicida, porém no grupo de animais expostos ao fungicida e suplementados com Se, a produção de MDA diminuiu, indicando que o Se preveniu a peroxidação lipídica e que a dose utilizada desse micronutriente não foi tóxica.

Outro importante fator que contribui para a ausência de resultados no presente estudo, foi a sanidade dos animais testados. Em um estudo com caprinos realizado por DÍAZ-SÁNCHEZ et al. (2017) verificou-se que a resposta imune a *Mannheimia haemolytica*, um agente causador de doenças no sistema respiratório, aumentou em animais suplementados com Se. Além disso, as atividades de GSH-Px e CAT e a concentração de MDA foram diferentes entre os animais que receberam Se e os animais não suplementados.

O efeito do Se nos organismos depende de diferentes fatores, incluindo a interação sinérgica entre o Se e outros micronutrientes, como o iodo (AGHWAN et al., 2013) ou zinco (KUMAR et al., 2013). A fonte utilizada também pode afetar a absorção, influenciando na biodisponibilidade do elemento no organismo. O Na_2SeO_3 é a principal fonte de Se adicionada à ração animal, devido ao seu baixo custo. Em um estudo com caprinos, realizado por PAVLATA et al. (2011), observou-se que a atividade da GSH-Px no grupo de animais que receberam uma dose de Na_2SeO_3 ($0,4 \text{ mg dia}^{-1}$) foi maior quando comparada à atividade da enzima no grupo que recebeu a mesma dosagem de Se a partir de um complexo proteico produzido por *Lactobacillus acidophilus* cultivado em substrato contendo Na_2SeO_3 . Já SHI et al. (2011) verificaram que em um grupo de caprinos suplementados com nano Se elementar ($0,3 \text{ mg Kg}^{-1}$ de MS), houve o aumento da atividade da GSH-Px, SOD e CAT em relação aos grupos suplementados com o mesmo teor de Se na forma de Na_2SeO_3 ou de levedura selenizada. As respostas podem variar, de acordo com o período de suplementação. Em um experimento com caprinos, PETRERA et al. (2009) não encontraram diferenças na atividade da GSH-Px nos primeiros dias de suplementação entre o grupo controle com teor de Se na dieta basal de $0,13 \text{ mg Kg}^{-1}$ de MS e os grupos que receberam Se na forma de Na_2SeO_3 ou levedura selenizada

(0,26 mg Kg⁻¹ de MS). Porém, após o período de 112 dias, a atividade de GSH-Px no grupo controle foi menor em relação aos grupos suplementados com Na₂SeO₃ ou levedura selenizada.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o resíduo enriquecido com Se não alterou os padrões oxidativos dos animais e a dosagem de Se testada não causou toxicidade. A variação de peso vivo não influenciou (P>0,05) nenhuma das variáveis avaliadas, assim não foi utilizada no modelo estatístico.

Tabela 3 - Avaliação dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no sangue de caprinos, após 30 dias alimentados com dieta adicionada de: I = sem adição de selênio (controle); II = Na₂SeO₃; III = resíduo não enriquecido + Na₂SeO₃; IV= resíduo enriquecido com selênio

	I	II	III	IV	EPM	Valor P
GSH-Px (U mL ⁻¹)	8,58	7,38	8,18	10,19	1,79	0,7306
SOD (U mL ⁻¹)	329,39	320,47	337,11	283,44	90,12	0,9751
CAT (U mL ⁻¹)	81,32	39,99	85,64	70,74	22,82	0,5103
NO (µM)	17,50	17,31	20,24	16,82	2,83	0,8275
PCN (nM mL ⁻¹)	1,51	1,37	1,41	1,93	0,36	0,6826
MDA (nM mg de proteína ⁻¹)	0,21	0,29	0,21	0,31	0,05	0,4254

GSH-PX: glutathiona peroxidase; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; NO: óxido nítrico; PCN: proteína carbonilada; MDA: malondialdeído; EPM: erro padrão da média

CONCLUSÃO

O resíduo enriquecido com selênio obtido após a produção de cogumelos comestíveis, não causou alterações nos parâmetros sanguíneos relacionados ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- AGHWAN, Z. A.; SAZILI, A. Q.; ALIMON, A. R.; GOH, Y. M.; HILMI, M. **Blood haematology, serum thyroid hormones and glutathione peroxidase status in Kacang goats fed inorganic iodine and selenium supplemented diets.** Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, v. 26 (11), p. 1577-1582, 2013.
- ANDREYEV, A. Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; MURPHY, A. N.; STARKOV, A. A. **Mitochondrial ROS metabolism: 10 Years later.** Biochemistry (Moscow), v. 80 (5), p. 517-531, 2015.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** Revista de Nutrição, v. 23 (4), p. 629-643, 2010.
- BENTO, C. B. P.; DA SILVA, J. S.; RODRIGUES, M. T.; KASUYA, M. C. M.; MANTOVANI, H. C. **Influence of white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of lignocellulosic agro-industrial residues.** African Journal of Microbiology Research, v. 8 (28), p. 2724-2732, 2014.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. **Microsomal lipid peroxidation.** Methods in Enzymology, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CICHOSKI, A. J.; ROTTA, R. B.; SCHEUERMANN, G.; CUNHA JUNIOR, A.; BARIN, J. S. **Investigation of glutathione peroxidase activity in chicken meat under different experimental conditions.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 32 (4), p. 661-667, 2012.
- DAUNDKAR, P. S.; RAMPAL, S. **Evaluation of ameliorative potential of selenium on carbendazim induced oxidative stress in male goats.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 38, p. 711-719, 2014.
- DAY, B. J. **Catalase and glutathione peroxidase mimics.** Biochemical Pharmacology, v. 77 (3), p. 285-296, 2009.
- DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. **A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress.** Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, v. 15 (4), p. 316-328, 2005.
- DÍAZ-SÁNCHEZ, V. M.; RODRÍGUEZ-PATIÑO, G.; RAMÍREZ-NOGUERA, P.; EFRÉN RAMÍREZ-BRIBIESCA, J.; MORALES-ÁLVAREZ, J. F.; REVILLA-VÁZQUEZ, A. L.; LÓPEZ-ARELLANO, R. **Dose of selenium in goat kids and its effect on the antigenic response to Mannheimia haemolytica and oxidative stress.** Small Ruminant Research, v. 153, p. 171-174, 2017.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. Jr. **Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids**. *Methods in Enzymology*, v. 268, p. 237-246, 1996.

GROMADZIŃSKA, J.; RESZKA, E.; BRUZELIUS, K.; WASOWICZ, W.; AKESSON, B. **Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements**. *European Journal of Nutrition*, v. 47 (2), p. 29-50, 2008.

HADWAN, M. H.; ABED, H. N. **Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity**. *Data in Brief*, v. 6, p. 194-199, 2015.

KUMAR, P.; YADAV, B.; YADAV, S. **Effect of zinc and selenium supplementation on antioxidative status of seminal plasma and testosterone, T4 and T3 level in goat blood serum**. *Journal of Applied Animal Research*, v. 41 (4), p. 382-386, 2013.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A; AHN, B.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins**. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 464-478, 1990.

LUKUSA, K.; LEHLOENYA, K. C. **Selenium supplementation improves testicular characteristics and semen quality of Saanen bucks**. *Small Ruminant Research*, v. 151, p. 52-58, 2017.

MONCADA, S.; BOLAÑOS, J. P. **Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration**. *Journal of Neurochemistry*, v. 97, p. 1676-1689, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of small ruminants**, 362p, 2007.

OLIVEIRA, A. P.; NAOZUKA, J. **Preliminary results on the feasibility of producing selenium-enriched pink (*Pleurotus djamor*) and white (*Pleurotus ostreatus*) oyster mushrooms: bioaccumulation, bioaccessibility, and Se-proteins distribution**. *Microchemical Journal*, v. 145, p. 1143-1150, 2019.

PAVLATA, L.; MISUROVA, L.; PECHOVA, A.; DVORAK, R. **The effect of inorganic and organically bound forms of selenium on glutathione peroxidase activity in the blood of goats**. *Veterinarni Medicina*, v. 56 (2), p. 75-81, 2011.

PETRERA, F.; CALAMARIB, L.; BERTINC, G. **Effect of either sodium selenite or Se–yeast supplementation on selenium status and milk characteristics in dairy goats**. *Small Ruminant Research*, v. 82, p. 130-138, 2009.

RECZYŃSKA, D.; WITEK, B.; JARCZAK, J.; CZOPOWICZ, M.; MICKIEWICZ, M.; KABA, J.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BAGNICKA, E. **The impact of organic vs. inorganic selenium on dairy goat productivity and expression of selected genes in milk somatic cells**. *Journal of Dairy Research*, v. 86 (1), p. 48-54, 2019.

SAS. **SAS and STAT User's Guide, Release 9.1**. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2003.

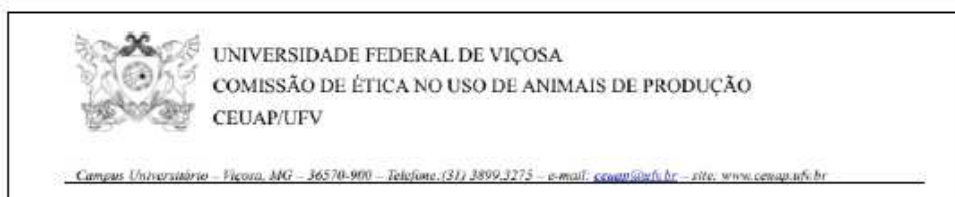
SHEN, H.; YANG, C.; ONG, C. **Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells**. *International Journal of Cancer*, v. 81, p. 820-828, 1999.

SHI, L.; XUN, W.; YUE, W.; ZHANG, C.; REN, Y.; SHI, L.; WANG, Q.; YANG, R.; LEI, F. **Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats.** *Small Ruminant Research*, v. 96, p. 49-52, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que os resíduos gerados após a produção do cogumelo *Pleurotus ostreatus* enriquecidos ou não com selênio (Se), poderão ser adicionados à dieta de ruminantes, como uma fonte de fibras e o resíduo enriquecido com Se poderá ser usado na dieta de ruminantes como uma fonte alternativa de Se.

ANEXO 1



Viçosa, 05 de abril de 2020

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Parâmetros fermentativos ruminais *in vitro* pela utilização do resíduo da produção de cogumelos comestíveis**", protocolo nº 13/2020, sob a responsabilidade de **Maria Catarina Megumi Kasuya** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) em reunião de **10 de março de 2020**.

Finalidade: (x) Pesquisa () Ensino

Vigência do Projeto: 05 de Abril 2020 a 30 de abril de 2020.

Espécie/linhagem: Bovino Nelore (*Bos indicus*)

Nº de animais: 02 / **Peso:** 250 kg / **Idade:** 02 anos / **Sexo:** Fêmea

Origem: Setor de Bovinocultura de Corte - UFV/DZO – CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "***In vitro* ruminal fermentation parameters for using edible mushroom residue**", protocol number 13/2020, under the responsibility of **Maria Catarina Megumi Kasuya** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the Use of Farm Animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Mar. 10th of 2020**.


Finality: (x) Research () Education

Duration of the Project: from Apr. 05th, 2020 to Apr. 30th, 2020.

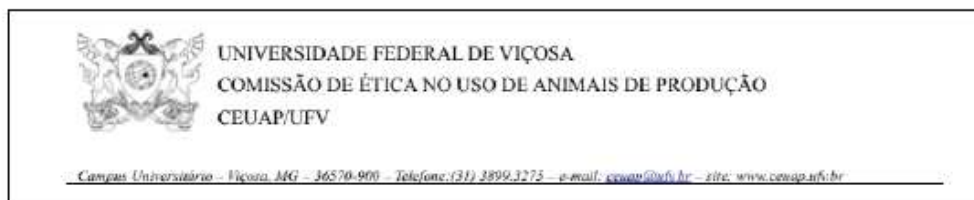
Species/strain: Nelore cattle (*Bos indicus*)

Number of animals: 02 / **Weight:** 250 kg / **Age:** 02 years / **Sex:** Female

Source: Setor de Bovinocultura de Corte - UFV/DZO – CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96


Luciana Navajas Rennó
Coordenadora da CEUAP/UFV

ANEXO 2



Viçosa, 05 de abril de 2020

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Utilização do resíduo bagaço de cana-de-açúcar obtido após a produção de cogumelos selenizados de *Pleurotus ostreatus* como suplemento na dieta de cabras", protocolo nº 126/2019, sob a responsabilidade de **Maria Catarina Megumi Kasuya** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) em reunião de **10 de março de 2020**.

Finalidade: ()Pesquisa ()Ensino

Vigência do Projeto: 05 de Abril 2020 a 31 de maio de 2020

Espécie/linhagem: Caprinos (*Capra hircus*)

Nº de animais: 16 / **Peso:** 30 kg / **Idade:** 07 a 08 meses **Sexo:** Fêmea

Origem: Setor Caprinocultura - UFV/DZO - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "Waste of production of mushroom *Pleurotus ostreatus* selenium-enriched as supplementary in diet of goats", protocol number 126/2019, under the responsibility of **Maria Catarina Megumi Kasuya** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the Use of Farm Animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Mar. 10th of 2020**.

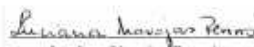
Finality: ()Research ()Education

Duration of the Project: from Apr. 05th, 2020 to May 31th, 2020.

Species/strain: Goats (*Capra hircus*)

Nº of animals: 16 / **Weight:** 30 kg / **Age:** 07 to 08 months / **Sex:** Female

Source: Setor de Caprinocultura - UFV/DZO - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96


Luciana Navajas Rennó
Coordenadora da CEUAP/UFV