

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**Letícia Gomes de Souza**

**INTRODUÇÃO DE *Lentinula edodes* (SHIITAKE) E  
*Pleurotus ostreatus* (SHIMEJI) EM BAGAÇO DE CANA  
TERMO EXPLODIDO PARA DIMINUIÇÃO DA  
TOXICIDADE**

LETÍCIA GOMES DE SOUZA

INTRODUÇÃO DE *Lentinula edodes* (SHIITAKE) E *Pleurotus ostreatus*  
(SHIMEJI) EM BAGAÇO DE CANA TERMO EXPLODIDO PARA  
DIMINUIÇÃO DA TOXICIDADE

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dejanira de Franceschi de Angelis**

Co-orientador: Dr<sup>a</sup> Dilza Aparecida Nalin

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de  
Biociências da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção  
do grau de Bacharela e Licenciada em  
Ciências Biológicas.

**Rio Claro**

**2013**

620.1122 Souza, Leticia Gomes de  
S729i       Introdução de Lentinula edodes (shiitake) e Pleurotus ostreatus  
(shimeji) em bagaço de cana termo explodido para diminuição da  
toxicidade / Leticia Gomes de Souza. - Rio Claro, 2013  
45 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis  
Coorientador: Dilza Aparecida Nalin

1. Biodegradação. 2. Enriquecimento. 3. Ruminantes. 3. Proteína. 4.  
Alimento. 5. Degradação. I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pois sem a Sua vontade nada e concretizado.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos em Geociências e Ciências Ambientais Aplicadas ao Petróleo – PRH 05/UNESP, ao PFRH/Petrobrás e ao PRH/ANP – FINEP/MCT, pelo apoio acadêmico e financeiro, indispensáveis à realização deste trabalho de conclusão de curso.

A professora Dejanira, que desde o meu segundo ano me acolheu com atenção e carinho como orientanda e também a Dilza, que foi muito além do que uma Coorientadora: uma amiga.

Impossível não citar as Maravilha, republica que residi durante a graduação na qual moram Laryssa e Jussara que me deram muito apoio força ao longo de todos esse anos.

Em fim a minha família que me incentivou e deu suporte, sendo compreensíveis quando precisei ficar ausente e focada nas pesquisas e principalmente ao meu namorado que acompanhou cada passo desta jornada, sempre me apoiando, consolando e incentivando.

## RESUMO

A produção de etanol ganhou destaque mundial nos investimentos de novas fontes de energia. O Brasil está entre os países líderes na produção de etanol e pesquisa desta energia. No entanto, essa atividade gera grande quantidade de resíduo, sendo o de maior volume o bagaço de cana-de-açúcar. Por esse motivo, buscam-se maneiras de utilizar esse material como, por exemplo, a queima para produção de energia e composição de volumoso na ração de ruminantes, porém há dificuldades para sua utilização total em virtude da alta produção. Esse trabalho propõe tratamento microbiológico do bagaço com *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* objetivando viabilizá-lo na composição de ração de ruminantes a fim de ser utilizado de forma mais nobre do que a sua mera queima. Após o tratamento com os fungos, foram realizados testes de quantificação de proteína bruta pelo método de Kjeldhal. Verificou-se que o teor de proteína no bagaço puro foi de 1,0% e após a fermentação o teor protéico foi de 4,2 e 4,9% com *L. edodes* e *P. ostreatus*, respectivamente. Para avaliar a qualidade protéica do produto fermentado por *L. edodes* e o *P. ostreatus* aplicou-se o método microbiológico de crescimento de *Enterococcus zymogenes* verificando-se que após a fermentação a qualidade protéica foi de 76 e 27,4% com o *L. edodes* e *P. ostreatus*, respectivamente, comparando-se com a caseína. A quantificação de aminoácidos revelou significativa melhoria protéica com alteração do perfil de aminoácidos com os tratamentos dos fungos. Quanto a DQO e DBO também foram constatadas sensíveis melhoras além de diminuição considerável da toxicidade medida pelo teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*.

## ABSTRACT

Ethanol production has gained great prominence in the investment new renewable energy sources and Brazil is among the leaders of production. However, this activity generates large amounts of waste being the largest volume of the sugar cane bagasse. For this reason looking up ways to use this material as burning for energy production and composition of forage in the diet of ruminants, however there are difficulties to use this production for this last one. This paper proposes a microbiological treatment with *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* in order to enable the bagasse in ruminant feed composition in order to be used more noble than their burning. After treatment with the fungus, tests were performed for quantifying crude protein by the method of Kjeldhal. It was verified that the protein content in the pure bagasse was 1.0% after fermentation the protein content was 4.2% with *L.edodes* and 4.9% with *P. ostreatus*. To evaluate the protein quality of the product fermented by *L. edodes* and *P. ostreatus* was applied microbiological method for growth of *Enterococcus zimoogenes* verifying that after fermentation the protein quality was 76 and 27.4% with *L. edodes* and *P.ostreatus*, respectively, compared with casein. The quantification of amino acids showed significant improvement of protein with altered amino acid profile with treatments of fungos. About of DQO and BOD were also found considerable improvement besides considerable drop in toxicity as measured by acute toxicity test with *Daphnia similis*.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	7
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1.Produção de bagaço de cana-de-açúcar.....	9
2.2. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar.....	10
2.3. Composição do bagaço de cana-de-açúcar.....	11
2.4. Produção de bagaço de cana-de-açúcar termo explodido.....	12
2.5. Micro-organismos lignocelulíticos.....	13
2.5.1. <i>Lentinula edodes</i> (shiitake).....	14
2.5.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> (shiimeji).....	16
2.6. <i>Enterococcus zymogenes</i> .....	17
2.7. <i>Pseudokirchineriella subcaptata</i> .....	18
2.8. <i>Daphnia similis</i> .....	18
3.OBJETIVOS.....	21
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Material.....	22
4.1.1. Micro-organismos.....	22
4.1.1.1. <i>Lentinula edodes</i> .....	22
4.1.1.2 <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	22
4.1.1.3 <i>Enterococcus zymogenes</i> .....	22
4.1.1.4. <i>Daphnia similis</i> .....	22
4.1.1.5 <i>Pseudokirchnieriella subcaptata</i> .....	23
4.1.2. Obtenção de bagaço de cana termo explodido.....	23
4.1.3. Equipamentos, vidraria e reagentes.....	23
4.2. Métodos.....	23
4.2.1 Manutenção de cultura dos fungos.....	23
4.2.2 Manutenção de cultura <i>Enterococcus zymogenes</i> .....	23
4.2.3 Manutenção de <i>Daphnia similis</i> .....	24

4.2.4 Preparo dos substratos para a inoculação .....	24
4.2.5. Preparo do lixiviado do bagaço de cana de açúcar.....	26
4.2.6 Caracterização do lixiviado .....	26
4.2.7 Avaliação de toxicidade .....	27
4.2.8 Quantificação da proteína bruta.....	27
4.2.9.1 Avaliação da qualidade empregando o método de <i>Enterococcus zymogenes</i> ....	28
4.2.9.2 Meio de cultivo para o <i>E. zymogenes</i> .....	29
4.2.9.3 Ensaio biológico com <i>Enterococcus zymogenes</i> .....	29
4.2.10 Quantificação e qualificação de aminoácidos/grama .....	30
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.1. Caracterização do substrato.....	31
5.2 Cultivo dos fungos.....	31
5.3 Caracterização do lixiviado. ....	32
5.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio e Demanda Química de Oxigênio (DQO) do lixiviado do bagaço.....	33
5.5 Toxicidade .....	34
5.6 Quantificação protéica do bagaço microbiologicamente modificado .....	34
5.7. Qualidade protéica do bagaço microbiologicamente modificado empregando o método de <i>Enterococcus zymogenes</i> .....	35
5.8 Aminoácidos grama do bagaço de cana termo explodido .....	36
6.CONCLUSÃO.....	40
7.REFERÊNCIAS .....	41



## 1. INTRODUÇÃO

Atividade industrial normalmente gera resíduos principalmente por ineficiência dos processos de conversão. Frequentemente, isto resulta em contaminação ambiental. Na indústria suco-alcooleira, o resíduo produzido em grande quantidade é o bagaço de cana de açúcar. O Brasil é o país que acumula o maior volume desse resíduo no mundo, com cerca de 600 milhões de toneladas/ano. Considerando-se este volume, procuram-se alternativas de para sua utilização. Uma dessas formas é a queima para produção de energia. Há uma estimativa que só no Estado de São Paulo, entre 1.200 e 1.500 Megawatts de energia são produzidos para consumo próprio. No entanto ainda restam 20% da massa total deste que não é usada para esse fim. Soma-se a isso o fato da queima do material resultar na liberação de gases poluentes como monóxido de carbono e dióxido de carbono, além de produtos sólidos como fuligem e cinzas. Além disso, as instalações de estruturas termoelétricas demandam de um alto custo. Por esses motivos buscam-se alternativas para utilizar o bagaço como a sua incorporação em rações de animais, fabricação de papel, celulose e papelão, processos fermentativos, entre outros como uma forma de utilização desse material além da simples queima, e atribuindo-lhe algum valor econômico vantajoso.

Quanto a sua utilização na alimentação de animais, o bagaço é de difícil digestão devido a sua composição rica em celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente 41; 25 e 20%. O bagaço *in natura* tem fibras muito resistentes e com limitações para a sua

utilização na alimentação de ruminantes. Para torná-lo mais acessível o bagaço de cana pode ser tratado para liberar os seus compostos principais mediante o aquecimento sob alta pressão seguido de descompressão (steam explosion) e, desta forma, ser melhor aproveitado pelos ruminantes. Durante este processo ocorre a produção de compostos fenólicos, furfural, 5-hidroximetilfurfural que são inibidores dos micro-organismos do rumem. Este trabalho propõe um tratamento microbiológico com *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus ostreatus* (shimeji) em bagaço termo explodido a fim de torná-lo menos tóxico e mais digerível para os ruminantes. Desta forma o bagaço de cana de açúcar poderá ser utilizado na alimentação de animais. Considera-se ainda que o material apresenta enriquecimento proteico e que este não provém de origem animal, evitando possíveis riscos de contaminação oriundos da proteína de origem animal, como o incidente da doença da vaca-louca. Alguns tipos de materiais de origem animal que compõe rações causam preocupação em virtude da possibilidade de transmissão de doenças de origem viral.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Produção de bagaço de cana-de-açúcar**

A atividade industrial tornou-se essencial para a sociedade moderna, pois é por meio dela que surgiram produtos que movem a economia, melhoram a qualidade de vida e tornam-se essenciais para a população. Porém, essa atividade normalmente produz resíduos industriais em geral pela ineficiência dos processos de conversão, que acabam resultando em contaminação ambiental. Nos anos recentes a preocupação mundial aumentou motivados pelos prejuízos ambientais resultantes das atividades antrópicas. Contudo, eventos industriais continuam a acontecer, mediante os processos de produção geralmente poluentes que quase sempre geram resíduos (FREIRE, at al; 2000). O Brasil é o país que mais produz cana-de-açúcar no mundo, e sendo assim, um subproduto desta agroindústria produzido em grande escala é o bagaço. Cerca de 600 milhões de toneladas desse material foram produzidos no ano de 2011 (ÚNICA;2011). Este valor representa cerca de 33% do peso da cana integral constituindo o principal resíduo das usinas que processam essa matéria prima sendo que cerca de 80% deste é utilizado como fonte de energia substituindo óleo combustível ou a hidroenergia. (TEIXEIRA;PIRES;NASCIMENTO; 2007).

O grande volume gerado de bagaço de cana de açúcar advém do estímulo na sua produção para extração do caldo que, uma vez concentrado e purificado se obtém a sacarose que mediante a fermentação produz etanol. O etanol participa como alternativa de combustível renovável em substituição aos derivados do petróleo.

## **2.2. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar**

Estima-se que no Estado de São Paulo a indústria sucroalcooleira gera para consumo próprio entre 1.200 e 1.500 Megawatts de energia elétrica em 40 usinas. Esta quantidade de energia gerada pela queima do bagaço torna auto-suficientes unidades industriais e produzindo excedentes de 158 Mw que são vendidos às concessionárias. Tal energia é obtida pela movimentação de turbinas pelo vapor gerado na queima do bagaço.

Ainda que a queima seja uma forma proveitosa de se utilizar o bagaço, aproximadamente 20% da massa total deste que não é usada para esse fim. Entretanto há quem julgue que a queima do bagaço seja uma atividade desfavorável ao meio ambiente, uma vez que resulta na liberação de gases poluentes como monóxido de carbono e dióxido de carbono, além de produtos sólidos como fuligem e cinzas. O alto custo para a instalação de estruturas que permitem a queima e captação de energia também são fatores limitantes desta atividade. Em vista disto que as empresas vêm investindo em alternativas para utilizar o restante deste resíduo como a sua incorporação em rações de animais, fabricação de papel, celulose e papelão, aditivos para serem agregados em sínteses de polímeros, processos fermentativos, entre outros.

Do ponto de vista da incorporação em ração de animais sabe-se que resíduos originados na produção agrícola e na agroindústria ainda necessitam de estudos para serem melhor aproveitados e se tornarem uma alternativa viável economicamente. Há muitos produtos originados de processamentos nas indústrias com potencial de uso, principalmente para os animais ruminantes, e na maioria dos casos com diminuição nos custos da produção. ( SILVA et al, 2002).

O Brasil sendo detentor de um grande rebanho bovino tem na geração do bagaço de cana oportunidade de alimentar os animais com mais eficiência se for associada a formulação de ração com a safra sucroalcooleira. Assim quando se analisa as condições da pecuária brasileira, verifica-se que há coincidência entre o período de

safrade cana-de-açúcar e o período de seca e conseqüentemente de falta de alimento para ruminantes em regiões do Brasil tanto no sudeste como o nordeste (SILVA et al; 2007). Sendo assim, pelo fato do bagaço representar uma fonte potencial de alimento para estes animais, este pode ser utilizado para minimizar o problema. O emprego do bagaço como ração é uma forma dos criadores de bovinos em áreas afetadas pela seca manterem a alimentação desses animais nestes períodos desfavoráveis, além de contribuir para um aproveitamento mais nobre da matéria orgânica que em geral é obtida em solos ricos e de boas condições hídricas. Além disso, estabelecem se relações ambientais menos agressivas minimizando os efeitos causados pelo acúmulo deste subproduto (CASTRO, et al 2008).

Por outro lado os ruminantes, para alcançarem sua máxima produtividade estipuladas pela carga genética, precisam consumir quantidades suficientes de energia, água, proteína, minerais e de algumas vitaminas, além da estrutura física dos alimentos que deve ser considerada quando se deseja otimizar uma boa nutrição. Nesse sentido muitos dos materiais volumosos não apresentam níveis suficientes de nutrientes necessários para maximizar a produção, havendo necessidade de suplementação(SILVA et al,2002). A digestibilidade a absorção também são fatores que determinam o valor nutritivo de um alimento. De todos os nutrientes necessários às exigências nutricionais para manutenção e crescimento de bovinos, a energia oriunda da biodegradação efetuada pelo rumem partindo da celulose e hemicelulose constitui a principal contribuição dos volumosos. A eficiência da digestão microbiana dos carboidratos no rúmen relaciona-se com a digestibilidade do volumoso e, juntamente com a taxa de digestão desses mesmos carboidratos, irão determinar o valor nutritivo para o ruminante, sob os aspectos energético, e proteico. (ÍTAVO et al, 2002). Mertens (1994) relatou que o valor nutritivo de um volumoso pode ser avaliado pela sua digestibilidade de seus teores de proteína bruta e das paredes celulares das células vegetais, características intimamente correlacionadas com o consumo de matéria seca.

### **2.3. Composição do bagaço de cana-de-açúcar**

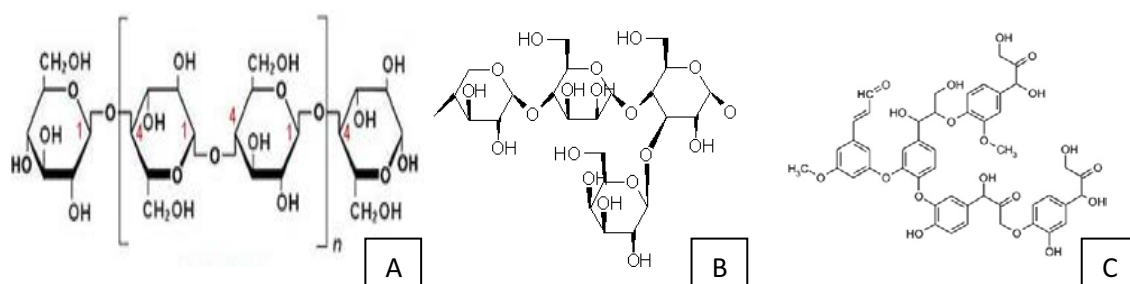
O valor nutritivo do bagaço é baixo devido a sua composição que é constituída principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente 41; 25 e 20% (tabela1). Devido a sua composição, o material mesmo depois de fragmentado apresenta-se de difícil digestão dado a resistência das fibras (TEIXEIRA et al, 2007).

**Tabela1:** Composição das fibras lignocelulósucas do bagaço de cana e seus respectivos teores energéticos.

Componente	% em massa no bagaço integral seco	Poder calorífico (MJ/kg)
Celulose	41	17,0
Hemicelulose	25	17,5
Lignina	20	20,1
Bagaço	-	18,5

Fonte: SANTOS (2011)

Sabe-se que a celulose (Figura1) é o composto polimérico encontrado em maior frequência no mundo. Este polímero é constituído essencialmente de glicose e apresenta grande massa molecular, insolúvel em água e pode ser representada pela fórmula  $C_6H_{10}O_5$ . Sua hidrólise completa produz o monossacarídeo glicose –D (+) e a manose. É o principal componente das fibras vegetais formando camadas inter cruzadas longas e muito resistentes. Além da celulose existem as fibras de hemicelulose formada pelo monômero xilose. Essa rede é impregnada por outras cadeias polissacarídicas com propriedades cimentares e por uma substância polimérica denominada lignina. Essa última é composta por um polímero heterogêneo e complexo e sua fórmula química é constituída por muitos compostos entre eles os fenólicos. Sua síntese é formada por unidades propano-fenólicas arranjada tridimensionalmente. A lignina envolve as fibras de celulose e hemicelulose e apresentam difícil biodegradação. (CUNHA, 2003).



**Figura1:** Estrutura química da: (A)celulose; (B)hemicelulose; (C)lignina.

Fonte:(SANTOS,2001)

#### 2.4. Produção de bagaço de cana-de-açúcar termo explodido

Depois do processo de extração do caldo de cana, o bagaço resultante é submetido à temperatura de 200°C e 15 atm de pressão e a seguir despressurizado processo denominado *steam explosion*. Neste processo ocorre produção de compostos fenólicos, furfural, 5-hidroximetilfurfural que são inibidores da fermentação (NADALINI,1991). Tais compostos afetam o crescimento de bactérias e diminuem a atividade enzimática do rúmen (FONSECA;2009). Diante dessa característica, para ser utilizado como ração o bagaço termo explodido necessita de tempo de maturação e eventualmente tratamento prévio para tornar a digestão dos ruminantes mais acessível (BURGI, 1985).

## 2.5. Micro-organismos lignocelulíticos

Os fungos para o seu desenvolvimento excretam enzimas capazes de degradar celulose, hemicelulose, lignina, fenóis, proteínas e carboidratos, permitindo que cresçam em ampla gama de resíduos vegetais. (RAJARATHNAM et al., 1998).O valor nutricional do cogumelo está relacionado com a possibilidade de que 80% de suas proteínas são digeríveis e assimiláveis sendo que nos vegetais somente 50 ou 60% das proteínas chegam a ser aproveitadas na digestão. Muitos cogumelos são considerados saborosos e podem ser consumidos crus ou cozidos, complementando qualquer preparado a base de carne ou constituir o ingrediente principal de uma receita culinária (MOLENA, 1986). A produção de alguns desses cogumelos comestíveis é considerada um processos economicamente viável de bioconversão de resíduos lignocelulósicos pela hifas dos fungos (THOMAS et al., 1998;).

As enzimas capazes de promover a biodegradação da celulose são as pertencentes ao complexo de celulasas, a hemicelulose e degradada pela xilanase e a lignina pelas lacases e peroxidases.

O bagaço de cana ao ser submetido ao aquecimento libera glicose, xilose e compostos fenólicos. Das pentoses a principal é a xilose a qual sob pressão e aquecimento em condições ácidas forma o furfural e o metilfurfural indesejáveis devido a suas toxicidade.

Para buscar a detoxicação do bagaço termo explodido este será tratado por dois fungos. O fungo *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* foram escolhido pelo fato de apresentarem a capacidade lignolítica, ou seja, que mediante enzimas hidrolíticas e

oxidativas são capazes de degradar os polímeros e monômeros que compõem materiais lignocelulósicos. Além disto, soma-se o fato desses fungos serem mundialmente reconhecidos como um fungos comestíveis e em vista disto, tem possibilidade de gerar um insumo comercializável para compor não apenas um componente chamado volumoso, mas sim um ingrediente nutritivo como ração animal.

### 2.5.1. *Lentinula edodes* (shiitake)

O *Lentinula edodes* (Figura 2 ) é um fungo aeróbio, lignolítico, responsável pelo que se denomina podridão branca, que segue a seguinte classificação segundo Urban et al, 2001:

- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Classe: Basidiomycetes
- Subclasse: Holobasidiomycetidae,
- Ordem: Agaricales,
- Família:Tricholomataceae
- Gênero: *Lentinula*
- Espécie: *Lentinula edodes*



**Figura 2:** (A) Carpóforos de *Lentinula edodes*. (B) Organização do cultivo na madeira.

Nutricionalmente, o *L. edodes* é um fungo de alto valor nutritivo, contendo minerais essenciais (zinco, cálcio, fósforo, ferro, sódio, cobre, magnésio e potássio) e



com quantidades significativas de vitaminas e/ou seus precursores tais como, tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina, biotina, ácido ascórbico (vitamina C), ergosterol (precursor da vitamina D), ácido pantotênico (vitamina A), vitaminas E, B6 e B12, fibras, além de conter valor calórico baixo (OEI, 2005; CHEN, 2005). Apresenta grande potencial medicinal com os anticancerígenos lentinan o KS-2, o LAP1, e as enzimas polifenol oxidases, as antivirais KS-2, eritadenina, lentinan, JLS e Ac2P, imunopotenciadores EP3 e EPS4, o hipocolesterolêmico eritadenina, agente hepatoprotetor, os antibactericidas lentinan, cortinellin e lentinamicin, o antifúngico lentinan (HATVANI, 2001)

*L.edodes* é o segundo cogumelo mais cultivado no mundo (Oei, 2005), cuja produção cresceu no período de 1986 a 1997 cerca de 400% (Chen, 2005). Nas Américas Central e do Sul, o cultivo comercial vem se desenvolvendo nos últimos 25 anos, especialmente desde 1990 (Lahmann; Rinker, 1991). Seu cultivo teve início na China, por volta de 960 d.C., sendo introduzido no Japão em 1500 por agricultores chineses (Przybylowicz; Donoghue, 1990). No Brasil, seu cultivo vem crescendo significativamente, devido ao bom retorno econômico, possibilidade de ser cultivado em pequenas áreas e necessitar de baixo investimento inicial (Rossi, 1999). Tradicionalmente, o Shiitake é produzido em toras de eucalipto (Figura 2 B), porém a utilização de outros substratos à base de diversos resíduos agrícolas vem ganhando espaço, uma vez que a colheita acontece mais rapidamente e a eficiência biológica do fungo é bastante elevada (Przybylowicz & Donoghue, 1988; Hiromoto, 1991; Levanon et al., 1993). *L.edodes* é apto a utilizar lignina, celulose e hemicelulose como fonte de carbono e nutrientes, pode ser cultivado em uma grande variedade de resíduos agrícolas, dentre eles o bagaço de cana (Buswell et al., 1996; Eira ; Minhoni, 1996; Rossi, 1999). O bagaço, pelas características fibrosas quando prensado, pode condicionar espaços com aeração suficiente para o crescimento micelial do fungo apresentando isto como uma vantagem para o cultivo de Shiitake. No entanto, por ser resultante de cana-de-açúcar que sofreu diversos tipos de tratamentos e lavagens em usinas sucroalcooleiras apresentam-se como um resíduo final rico em parede celular, de baixo conteúdo de células inteiras, baixa densidade e pobre em proteínas e minerais (Santos, 1990). Com isso, a suplementação com nutrientes, de preferência solúveis para estarem prontamente disponíveis para o fungo, promove crescimento e rápida colonização do bagaço, o que é desejável do ponto de vista tecnológico.

### 2.5.2. *Pleurotus ostreatus* (shiimeji)

O *Pleurotus ostreatus* é conhecido pelos orientais como Hiratake e, e no restante do mundo como Shimeji.(Figura3 A) Pode também ser chamado de cogumelo ostra, devido a sua forma. É conhecido como um dos cogumelos comestíveis mais nutritivos e saborosos (BONONI et al., 1995; COHEN et al., 2002). É classificado segundo Urban et al,2001 da seguinte forma:

- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Classe: Basidiomycetes
- Subclasse: Holobasidiomycetidae,
- Ordem: Agaricales,
- Família: Pleurotaceae
- Gênero: *Pleurotus*
- Espécie: *Pleurotus ostreatus*



**Figura 3:** (A) *Pleurotus ostreatus* em seu habitat natural. (B) Carpóforos pronto para a colheita.

*Pleurotus spp* pertencem ao grupo de fungos que possuem um alto valor nutricional, com diversas propriedades terapêuticas e biotecnológicas. Conhecidos como

fungos da podridão branca da madeira por serem eficientes na degradação da lignina devido a sua capacidade de produzir enzimas lignocelulolíticas, principalmente lacases, Mn peroxidase e peroxidase versátil, que têm numerosas aplicações industriais. (COHEN et al,2002)

*Pleurotus* até cerca de 50 anos atrás, era coletado diretamente da natureza (Figura3 ), porém a partir de 1970 iniciou-se o seu cultivo em escala comercial. No final da década de 50, houve as primeiras tentativas de promover o cultivo empregando serragem como substrato. Porém no início da década de 60 passou-se a empregar outros substratos como palhas secas, capim, palha de arroz e palha de trigo para a produção em escala comercial (Figura3 B). Como *Pleurotus ostreatus* tem sabor agradável e grande disponibilidade, houve possibilidade de ampliar o cultivo nestes últimos anos e em 1995 sua produção mundial ocupava o quarto lugar entre os cogumelos comestíveis (BONONI et al. 1995).

A incorporação de *P. ostreatus* na dieta alimentar pode ser considerada positiva pois possui considerável valor nutricional em proteína, fibra, carboidrato, vitaminas e minerais além de baixo valor calórico, gorduras e sódio (SILVEIRA, 2003). Em seu conteúdo proteico destacam-se a lisina, arginina e treonina em altas concentrações (JWANNY et al., 1995). Em termos nutricionais segundo a “Food Policy and Nutrition Division” ele é composto de 90,8% de água. A sua composição centesimal em base seca é: 30,4% de proteína; 2,2% de gordura; 48,9% de carboidratos; 8,7% de fibra e 9,8% de cinzas e seu valor energético é de 345 kcal. (BISARIA ; MADAN,1983).

## **2.6. *Enterococcus zymogenes***

As bactérias do gênero *Enterococcus* são conhecidas por possuir baixa virulência quando comparado com outros cocos Gram-positivos, possuir uma alta capacidade de adaptação e sobrevivência em meios adversos e não produzem esporos. Esse termo *Enterococcus* foi estipulado para organismos que crescem entre 10 e 45<sup>0</sup> C, em pH 9,6 e capazes de crescer em meio com NaCl a 6,5% e em bile-esculina. No decorrer dos anos varias espécies de *Enterococcus* foram isoladas de humanos e animais e na década de 80 com o avanço nas técnicas moleculares houve ampliação da classificação constatando-se que o *Streptococcus faecalis* subespécies *liquefaciens* e *zymogenes* eram apenas uma espécie.(MURRAY,1990).

Entre os métodos eficientes para se medir a qualidade proteica de uma determinada amostra, é o método baseado na resposta de crescimento de *Enterococcus zymogenes* frente à qualidade da amostra de proteínas de Ford, 1962. Como resultado, tem-se a relação dos aminoácidos essenciais para o crescimento desta bactéria (valina, metionina, isoleucina, leucina, arginina, histidina, triptofano e ácido glutâmico) que se apresenta como um conjunto muito semelhante ao descrito para seres humanos, com exceção da lisina que também considerada um dos aminoácidos essenciais para os seres humanos, porém não é de necessidade absoluta para esse microorganismo, embora sua ausência prejudique o seu crescimento. Possui como vantagem comparada a outros métodos *in vivo* a pequena quantidade de amostra necessária, sua simplicidade e rapidez de resposta. (FORD, 1962)

### 2.7. *Pseudokirchineriella subcaptata*

A *Pseudokirchineriella subcaptata* (Figura 4) é uma alga verde unicelular que contém apenas um cloroplasto longo com presença de clorofilas a e b Podem formar grupos de 4 a 16 indivíduos. Sua reprodução é assexuada mediante auto-esporos (JANSSEN; HEIJERICK,2003). Tem capacidade de dividirem-se uniformemente e não se aderem a superfícies, além de ciclo de vida curto, altas taxas de crescimento, facilidade de manutenção e capacidade de crescer em meios sintéticos bem definidos. Tudo isso induz facilidades para manutenção de ensaios biológicos. (VIDOTTI E ROLLEMBERG, 2004). Devido à sua sensibilidade a muitas substâncias, especialmente herbicidas e metais, esta alga é utilizada em testes ecotoxicológicos.(BLAISE E FÉRARD, 2005). Embora a *P. subcaptata* é empregada como organismo teste, nos ensaios de toxicidade aguda é utilizada como alimento para criação de *Daphnia similis*



**Figura4** : *Pseudokirchineriella subcaptata* (HEIJERICK,2003).

### 2.8. *Daphnia similis*

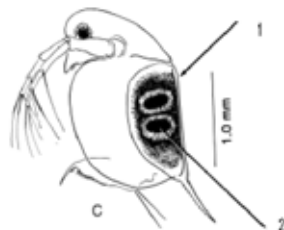
A *D. similis* (Figura5) é um microcrustáceo classificado da seguinte forma:

- Reino: Animalia
- Filo: Crustacea
- Classe: Branchiopoda
- Ordem: Cladocera
- Família: Daphniidae
- Gênero: Daphnia
- Espécie: *Daphnia similis*



**Figura5:** *Daphnia similis*.

A reprodução na família Daphnidae geralmente é partenogenética rara a ocorrência de machos, surgindo quando ocorrem condições ambientais não favoráveis. Podendo ocorrer então a reprodução sexuada com geração de efípios, estrutura que abriga ovos de resistência (Figura 6). Esses efípios são extremamente resistentes à dessecação e à temperatura e são capazes de eclodir meses ou anos após terem sido armazenados no ambiente seco ou no frio (STORER et al., 2002)



- 1- Efípio
- 2- Ovo de Resistência

**Figura6:** Efípio de *Daphnia pulicaria*. (DODSON ; FREY, 2001. Adaptado.)

Esse microcrustáceo é recomendado mundialmente em testes de toxicidade por muitos órgãos de controle ambiental, pois atende muitos dos critérios para uso como organismo-teste, como por exemplo: possuem ampla distribuição nos corpos d'água, é uma espécie-chave em muitas cadeias alimentares, o ciclo de vida é curto e são partenogenéticos (estabilidade genética), são facilmente criados em laboratórios e sensíveis a vários contaminantes podendo, assim, serem considerados como bioindicadores. (BEATRICI, 2001)

Dentre os ensaios biológicos possíveis de serem executados com *Daphnia similis* destaca-se o de toxicidade aguda que objetiva avaliar a dose ou a concentração de um agente tóxico que possa produzir efeitos aos organismos expostos em um período de tempo relativamente curto. Tal período de exposição pode variar de acordo com o organismo e seu ciclo de vida. Normalmente para cladóceros o ciclo é de 24h e para peixes 96h. Os bioensaios agudos permitem estimar os valores de concentração tóxica efetivas (CE50) que é a imobilidade a 50% da população ou de concentração letal (CL50) que é a mortalidade de 50% da população, que são calculados aplicando-se vários métodos estatísticos. O resultado expressa os valores de concentrações efetivas e letais considerando-se a 50% dos organismos uma vez que estas respostas são mais reprodutíveis, oferecendo maior grau de confiabilidade para serem extrapoladas para uma população (COSTA et al., 2008). A vantagem desse bioensaio agudo é que são de baixo custo, simples e confiáveis (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008).

### **3. OBJETIVOS**

Utilizar o bagaço de cana termo-explodido como substrato para os fungos, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* objetivando a sua detoxificação e transformação em um produto de melhor qualidade nutricional para compor rações de ruminantes.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Micro-organismos**

##### **4.1.1.1. *Lentinula edodes***

A cultura na forma de “spawr” foi adquirida da FUNGIFLORA, município de Valinhos, S.P.

##### **4.1.1.2 *Pleurotus ostreatus***

A cultura na forma de “spawr” foi adquirida da FUNGIFLORA, município de Valinhos, S.P.

##### **4.1.1.3 *Enterococcus zymogenes***

*Enterococcus zymogenes* proveniente do Agricultural Research Service (US Department of Agricultural) Northern Regional Research Center, foi gentilmente ofertado pela Profa. Dra. Aureluce Demonte do Departamento de Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara – SP.

##### **4.1.1.4 *Daphnia similis***

Os microcrustáceos *Daphnia similis* originalmente provenientes da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), foram criados no Laboratório de Ensino



de Toxicidade de Águas, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, da UNESP – Rio Claro/SP, seguindo as normas propostas pela a norma ABNT NBR 12713:2009.

#### **4.1.1.5 *Pseudokirchneriella subcaptata***

Originalmente proveniente da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB)

#### **4.1.2. Obtenção de bagaço de cana termo explodido**

O bagaço de cana termo explodido é proveniente da Indústria Nardine-Catanduva-S.P., e gentilmente ofertado pelo Prof. Octavio Valsechi do Centro de Ciências Agrárias – UFSCAR, Campus de Araras

O material foi mantido em temperatura ambiente

#### **4.1.3. Equipamentos, vidraria e reagentes**

Para realizar os experimentos utilizou-se estufas a 30 e 37°C, aparelho destilador de Kjeldahl, vidraria comumente utilizada em laboratório de microbiologia, carbonato de cálcio, selenito de sódio e mistura digestora (  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  e  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), e reagentes comuns de laboratório.

### **4.2. Métodos**

#### **4.2.1 Manutenção de cultura dos fungos**

As culturas de ambos os fungos acondicionadas em sacos de PVC foram armazenados na embalagem de origem, sob refrigeração a  $10^0\text{C} +_-$  em câmara fria.

#### **4.2.2 Manutenção de cultura *Enterococcus zymogenes***

A cultura de *E. zymogenes* foi mantida em meio de manutenção em congelamento composto de meio basal (tabela 2) com 10% de glicerol. Posteriormente foram colocados 3 mL de inóculo ativo com 10 mL desse meio com glicerol e levados diretamente ao freezer antes do crescimento da cultura.

**Tabela 2:** Composição de meio basal para *Enterococcus zymogenes*

<b>Componentes</b>	<b>Peso</b>
Glicose	30,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	45,0 g
Ac. Cítrico	1,25 g
Acetato de sódio	6,25 g
Adenina	12,5 mg
Guanina	12,5 mg
Uracila	12,5 mg
Xantina	12,5 mg
Ácido Ascórbico	1,25 g
Mistura Vitamínica	35,0 mg
Solução de minerais	25 ml
Tween 80	2,5 ml
Ajustar pH para 7,2 com ácido fosfórico	
Ajustar volume total para 500 ml	

#### 4.2.3 Manutenção de *Daphnia similis*

A criação dos microcrustáceos foi realizado com água procedente do Ribeirão Rio Claro/SP, coletada mensalmente. A água coletada para cultivo, é filtrada em rede de plâncton de 45 µm para retirada do material particulado e posteriormente é avaliada a dureza que é ajustada para atingir os valores entre 40 e 48 mg/L de CaCO<sub>3</sub>, afim de seguir os procedimentos especificados na Norma ABNT 12713, 2009.

A água é mantida em aeração permanente visando sua estabilização físico-química e saturação do oxigênio dissolvido, que deve manter-se entre 7 a 9 mg/O<sub>2</sub>/L.

As *Daphnias* foram alimentadas com a microalga *Pseudokirchineriella subcapitata*, na concentração de 2,0 x 10<sup>6</sup> células por organismo, aproximadamente, complementado com ração para truta.

#### 4.2.4 Preparo dos substratos para a inoculação

Para selecionar o melhor substrato para o desenvolvimento de *L. edodes* e *P. ostreatus* foram preparadas varias formulações de acordo com o seguinte protocolo:

**Tabela3:** Demonstração dos diferentes substratos utilizados para o crescimento dos fungos

Amostra	Bagaço de cana termo explodido (g)	Inóculo (%)	CaCO <sub>3</sub> (g)	Complemento proteico (2 g)
1	20	1	0.0	de Farelo de soja
2	20	1	0.0	de Farelo de aveia
3	20	1	0.0	de Farelo de arroz
4	20	1	0.0	de Farelo de trigo
5	20	1	0,7	de Farelo de soja
6	20	1	0,7	de Farelo de aveia
7	20	1	0,7	de Farelo de arroz
8	20	1	0,7	de Farelo de trigo

A todas as amostras foram adicionados 10 mL de água destilada e autoclavados. Posteriormente foram mantidos em estufa à 25 °C. O *L. edodes* desenvolveu-se em 8 dias em estufa e o *P. ostreatus* em 5 dias.

Após o crescimento dos fungos os materiais foram desidratados em estufa a 50°C, triturados e submetidos a análises de toxicidade aguda, proteína bruta total, qualidade proteica, DQO, DBO, aminoácido totais.



**Figura 7:** Bagaço de cana termo explodido inoculado com os fungos antes da fermentação.

#### 4.2.5. Preparo do lixiviado do bagaço de cana de açúcar.

Preparou-se o lixiviado do bagaço de cana termo hidrolisado e do bagaço fermentado com *L. edodes* e *P. ostreatus* em 1L de água destilada. Para cada material colocou-se à percolar lentamente em recipiente adaptado e protegido com algodão (Figura 8). Com o lixiviado obtido efetuou-se análise do Brix, pH, demanda química de oxigênio(DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), toxicidade aguda com *D. similis*.



**Figura 8:** Preparação do lixiviado do bagaço de cana

#### 4.2.6 Caracterização do lixiviado

O lixiviado obtido foi caracterizado quanto ao brix por meio do refratômetro, pH obtido com o pHmetro, DBO e DQO e toxicidade aguda com *Daphnia similis*.

A demanda bioquímica de oxigênio é um indicador de concentração de matéria biodegradável. O oxigênio é necessário e exigido por micro-organismos para promoverem a biodegradação das substâncias dissolvidas na amostra. O teste foi realizado em duplicata a temperatura constante de 20°C e durante um período de incubação de 5 dias. As amostras foram diluídas em água de diluição e foi medido o oxigênio dissolvido (OD) no início do experimento. Após 5 dias mediu-se o OD da outra amostra. A diferença de concentração de oxigênio representa a DBO, isto é, o oxigênio consumido para oxidar a matéria orgânica via respiração dos microrganismos. Como trata-se de uma amostra de resíduo industrial que possui poucos micro-organismos foi necessário a adicionar a "semente", que é um inóculo de mistura de bactérias procedentes do esgoto doméstico ( RAND,1992).

A demanda química de oxigênio (DQO) é um indicador da concentração de oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica em meio ácido e com condições energéticas por ação de um agente químico oxidante forte, sendo o mais utilizado o dicromato. Este parâmetro aponta portanto a estimativa total da quantidade de matéria orgânica da amostra, biodegradável ou não.

#### 4.2.7 Avaliação de toxicidade

Esse teste de toxicidade foi realizado seguindo a norma ABNT NBR 12713:2009, utilizando-se a *Daphnia similis* pois trata-se de um microcrustáceo com alta sensibilidade a diversos causadores de toxicidade em ambientes aquáticos.

Durante o teste, indivíduos com 6 a 24 horas de idade foram expostos às amostras do lixiviado do bagaço antes e após a fermentação, por um período de 4 a 48 horas. Posteriormente foi calculada a Concentração Efetiva Média (CE 50) e a Concentração Letal Média (CL 50), que é determinada de acordo com a imobilidade ou mortalidade de 50% dos indivíduos. (GHERARDI-GOLGSTEIN et. al., 1990).

Para a realização do teste, adicionou-se em tubos de ensaio 10 mL lixiviado do bagaço puro e do bagaço fermentado com os fungos.

Após 48 horas realizou-se a contagem dos indivíduos imóveis ou mortos em cada amostra. Os dados foram trabalhados estatisticamente no software Spearman-Kärber ICP-Program para testes de toxicidade.

#### 4.2.8 Quantificação da proteína bruta

O experimento foi realizado no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, do Instituto de Biociências - UNESP, Rio Claro-SP, empregando o método de Kjeldhal.

A quantificação de nitrogênio é medida em 4 etapas:

- **Preparo da amostra e mineralização com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: Colocou-se em cada tubo digestor entre 0,04 a 0,05g de amostra seca e pulverizada; uma ponta de espátula de solução digestora K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + CuSO<sub>4</sub> – 1:1; 3 cristais pequenos de selenito de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O); e 2 mL de ácido sulfúrico P.A. (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Aqueceu-se os tubos no Bloco Digestor (200 - 230°C) até adquirir coloração translúcida (esverdeada ou azulada) e posteriormente adicionou-se cuidadosamente 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada no tubo.

- **Destilação no destilador de Kjeldahl**: Procedeu-se a destilação da amostra no aparelho de destilação de Kjeldhal.(Figura 9)



**Figura 9:** Destilados de Kjeldhal em operação

Fonte: MORALES, 2012.

- **Titulação do destilado:** Procedeu-se a titulação da solução de  $H_2SO_4$  (que recolheu a amostra destilada) contra solução de NaOH 0,01N até a viragem de vermelho para amarelo (ambas as soluções padronizadas)

-**Cálculos:**

mL. NaOH 0.01 gasto na titulação da amostra – mL. NaOH 0,01 gasto na titulação do branco = mL. de  $H_2SO_4$  0.01 consumido na titulação

1,0 mL de  $H_2SO_4$  0,01N = 0,14 mg Nitrogênio

6,25g de Proteínas = 1,0g de Nitrogênio

$$\frac{X \text{ mg Proteínas} \cdot 100}{\text{Peso da Amostra}} = \% \text{ de Proteínas}$$

#### 4.2.9.1 Avaliação da qualidade empregando o método de *Enterococcus zymogenes*

O teste é baseado no crescimento de *Enterococcus zymogenes*, relacionando a necessidade de aminoácidos essenciais desse micro-organismo, que é semelhante à humana. Trata-se de um meio indireto de avaliação do Valor Nutricional Relativo das

proteínas na amostra, e a eficiência se da pelo uso de enzimas do trato gastrointestinal humano, utilizadas na hidrólise do material e é comparada com a proteína padrão (caseína).FORD (1962)

#### 4.2.9.2 Meio de cultivo para o *E. zymogenes*

Preparou-se meio de cultivo (tabela 4) para a ativação da cultura de bactéria, com um total de 2 subculturas com intervalos de 24 horas com a proporção de 1 mL de inóculo para 10 mL de meio de cultivo.

**Tabela 4:** Composição do meio de cultivo para *Enteococcus zymogenes*

Meio Basal (tab. 2)	20 mL
Triptona	200 mg
Água Destilada	Ajustar para 100 mL
Ph	Ajustar para 7,2

#### 4.2.9.3 Ensaio biológico com *Enteococcus zymogenes*

O teste microbiológico com *Enteococcus zymogenes* e realizado em 3 etapas.

- **Preparo das amostras (pré-hidrólise):** pesou-se equivalente a 100 mg de proteínas tomando como base os valores obtidos de proteína bruta, das amostras de bagaço puro, bagaço fermentado com *L.edodes* e com *P.ostreatus*. Adicionou 40 mL solução de  $\beta$ -glicerofosfato de sódio, Sigma G-5422 (20 g/litro) e ajustou para 8,0 o pH com NaOH ou ácido fosfórico. Colocou-se em banho-maria 48°C, sob agitação lenta e constante, e acrescentou 4,0 mL de solução de pronase Sigma P-5147 (1 mg/mL). Depois de 3 horas resfriou ate temperatura ambiente e ajustou o pH para 7,2 com ác. fosfórico ( $H_3PO_4$ ) ou hidróxido de sódio (NAOH) e o volume para 100 mL. Esterilizou-se a frio em membrana milipore de 0,22  $\mu$ m.

- **Ensaio:** o ensaio foi realizado em quintuplicata (4 teste + 1 branco). Em tubos esterilizados colocou-se: 2,0 mL de meio basal esterilizado a frio + 2,0 mL da amostra + 7,0 mL de água esterilizado + 100  $\mu$ L do inóculo. No tubo branco colocou-se 100  $\mu$ l de inóculo inativo. Foram encubados em 37°C/ 48 horas. Um tubo contendo somente solução de pronase nas mesmas condições da hidrólise também foi preparado. Após o período de incubação os tubos foram esterilizados em autoclave (121°C por 15 minutos).

- **Titulação:** titular com NaOH 0,1 N até pH 7,2. Os cálculos são realizados descontando-se volume de NaOH gasto com branco da respectiva amostra e da pronase e foram expressos em % do volume gasto com a amostra padrão (caseína). (TAVANO et. al, 2004)

#### **4.2.10 Quantificação e qualificação de aminoácidos/grama**

Foram enviadas amostras de bagaço termo hidrolisado puro e de bagaço fermentado com ambos os fungos para Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do ITAL, Campinas/SP (Instituto de Tecnologia de Alimentos).

Hidrolisou-se 25mg das amostras com 10mL de HCl 6N, a vácuo a 110°C por 22 horas. A amostra foi recuperada em diluente pH = 2,2. Posteriormente 25µL foi injetado no analisador Dionex DX 300, afim de realizar a separação dos aminoácidos em coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninhidrina, usando-se como referência solução padrão de aminoácidos Pierce (SPACKMAN et al, 1958; SPIES, 1967).



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização do substrato

O bagaço de cana termo hidrolisado possui uma coloração mais escura com aroma adocicado e rigidez das fibras . Após a fermentação com os fungos pode-se observar aumento considerável da maleabilidade das fibras, o aroma modificou-se para uma predominância fungica de acordo com os inoculados e o substrato sofreu modificação para cor clara amarelada (Figura10), uma vez que a lignina foi biodegradada pelos fungos.



**Figura10:** Bagaço termo explodido colonizado pelo fungo.

### 5.2 Cultivo dos fungos

Segundo Rossi (1990), o *Lentinula edodes* é tradicionalmente cultivado em toras de eucalipto, como mostrado anteriormente na Figura 2 . No entanto tentativas de produzi-lo em diversos resíduos agrícolas vem ganhando espaço para produção comercial. Dentre esses resíduos esta o bagaço de cana de açúcar que pela sua composição atende as necessidades degradativas dos fungos.

Comparando-se as diferentes formulações propostas para cultivo dos fungos ilustrado na Figura 7, verificou-se que o carbonato de cálcio foi importante para o crescimento dos fungos. O carbonato melhorou o pH do bagaço que apresenta-se ácido e dificulta o desenvolvimento adequado das hifas. A suplementação com os tipos farelo também auxiliou os fungos se desenvolverem em menor tempo, isto implica em viabilização de sua aplicação na indústria. Desses farelos o de melhor resultado foi o farelo de aveia. (Figura 11)

Comparando-se o tempo de desenvolvimento dos fungos, verificou-se que o *Pleurotus ostreatus* apresentam desenvolvimento mais rápido (5 dias) do que o *Lentinula edodes* (8 dias) sendo, portanto, uma vantagem em processos industriais e tecnológicos.



**Figura11:** Bagaço de cana termo explodido inoculado com o fungo após 5 dias: (A) sem a adição; (B) com adição de carbonato; (C) com a adição de do carbonato de cálcio e farelo de aveia.

### 5.3 Caracterização do lixiviado.

No lixiviado obtido do bagaço puro bem como do bagaço fermentado com os fungos, registrou-se modificações em alguns parâmetros. O pH do lixiviado do bagaço termo explodido puro tinha acidez de 3,2 antes do crescimento microbológico e após a fermentação com *L.edodes* o pH do lixiviado foi de 4,1 e com o *P. ostreatus* 4,5. A coloração do lixiviado de cor âmbar também ficou visivelmente mais clara após a fermentação (Figura 12):

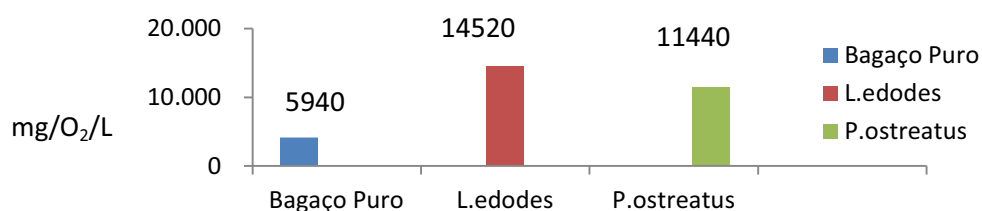


**Figura 12:** A esquerda temos o líquido do bagaço fermentado, ao centro o líquido do bagaço antes da fermentação e a direita água.

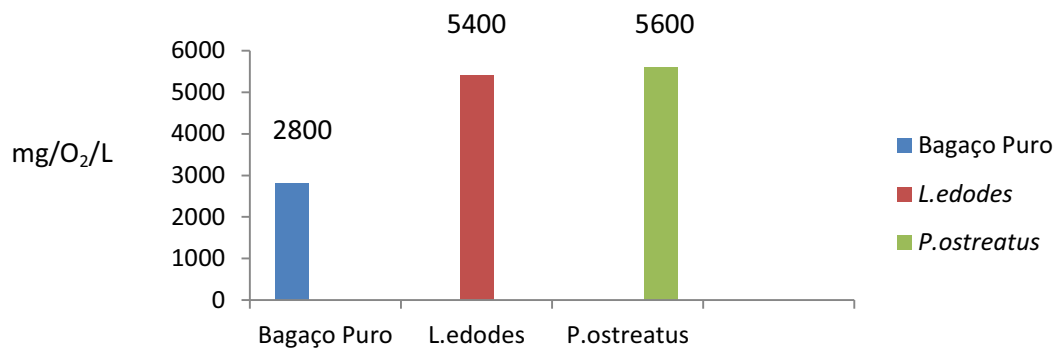
#### 5.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio e Demanda Química de Oxigênio (DQO) do líquido do bagaço.

Tanto a (DQO) quanto a (DBO) tiveram aumento após a fermentação com ambos os fungos indicando melhoria do material.

Analisando-se a (DQO) registrou-se que a quantidade de oxigênio necessária para degradar toda a matéria orgânica praticamente triplicou para o *L. edodes* é mais do que dobro para o *P. ostreatus* (Figura 12) o que indica aumento considerável na presença de matéria orgânica das amostras. Tal fato pode ser confirmado com a QBO, pois houve também aumento significativo do consumo de  $O_2$  indicando a degradação de matéria orgânica das amostras que foi solubilizada (Figura 13). Esse aumento da DBO indica um aumento da matéria orgânica, e também aumento da capacidade de degradação do material, ou seja, após a fermentação com os fungos, o bagaço mediante biodegradação liberou substâncias que foram solubilizadas na água indicando melhor possibilidade de aproveitamento como ração.



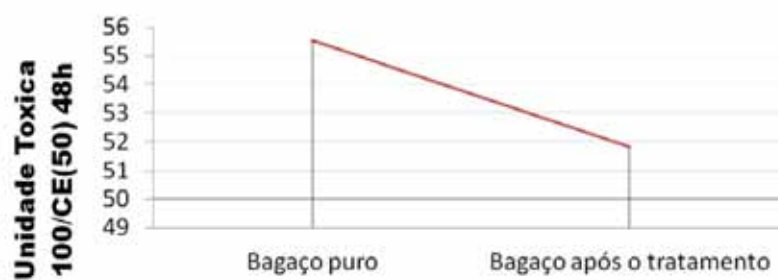
**Figura 13:**Quantificação da Demanda Química de Oxigênio(DQO) em mg/O<sub>2</sub> antes e após a fermentação com *L.edodes* e *P.ostreatus*



**Figura 14:** Quantificação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) em mg/O<sub>2</sub> antes e após a fermentação com *L.edodes* e *P.ostreatus*

### 5.5 Toxicidade

Os dados de toxicidade aguda registrados na Figura 15 indicam a diminuição da toxicidade do lixiviado do bagaço sobre *Daphnia similis* antes e após o tratamento com os fungos *L. edodes* e *P. ostratus*.



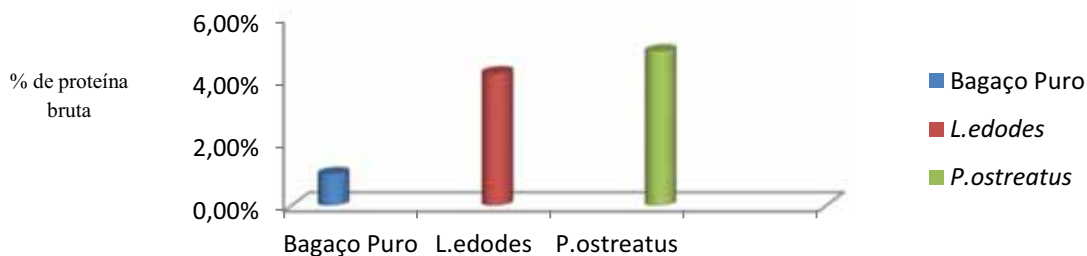
**Figura 15:** Toxicidade do bagaço antes e após a fermentação frente ao teste de *Daphnia similis*

Considerando-se que o rumem é uma mistura complexa de micro-organismos principalmente de bactérias e protozoários, a diminuição de toxicidade pode ser um indicativo importante para o equilíbrio da alimentação dos ruminantes.

### 5.6 Quantificação protéica do bagaço microbiologicamente modificado

Os resultados da análise de nitrogênio total (proteína bruta) pelo método de Kjeldhal registrados na Figura 15, indicam que antes da fermentação o bagaço puro possuía entorno de 1% de proteína bruta. Após a fermentação com o *L. edodes* esse valor aumentou para 4,2% e com o *P. ostreatus* para 4,9% (Fig. 16). Esses dados permitem concluir que a presença dos fungos na biodegradação do bagaço resulta em aumento do teor proteico, não só pela presença dos fungos mas ainda pela evolução do CO<sub>2</sub> nas soluções. Os valores de nitrogenio total (N x 6,25) indicam que o *P. ostreatus*

apresentou-se com mais vantagens proteicas, mesmo que o seu tempo de inoculação tenha sido menor que a do *L. edodes*.



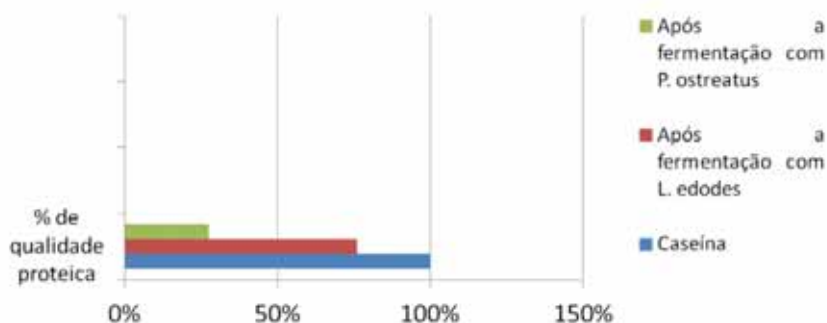
:

**Figura16:** Porcentagem de proteína bruta antes e após a fermentação com *L. edodes* e *Pleurotus ostratus*.

### 5.7. Qualidade protéica do bagaço microbiologicamente modificado empregando o método de *Enterococcus zymogenes*

Assumindo que a qualidade protéica da caseína apresenta valor de 100%, pode-se comparar a qualidade protéica do bagaço após a fermentação com *P. ostreatus* e *L. edodes*. Na figura 17 verifica-se que o bagaço tratado com o *P. ostreatus* atingiu o resultado 27% após a fermentação e o *L. edodes* assumiu o valor de 76% de qualidade proteica. Considerando-se o resultado de ambos, o bagaço microbiologicamente tratado com o *L. edodes* apresenta cerca de 49% superior a qualidade proteica do *P.ostreatus*.

No entanto deve-se destacar novamente o fato do *L.edodes* necessitar de mais tempo para colonizar o bagaço,



**Figur17.** Qualidade protéica do substrato microbiologicamente modificado pelo *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*, avaliado pelo método de *Enterococcus zymogenes*

### **5.8 Aminoácidos grama do bagaço de cana termo explodido**

O bagaço de cana de açúcar apresenta-se pobre em proteína e a fermentação em estado sólido possui uma perspectiva positiva para aumento do teor proteico. As proteínas são essenciais, pois estão relacionadas aos processos vitais dos organismos, tais como a formação de tecidos, de enzimas e de hormônios, entre outros, sendo secundariamente usadas como fonte de energia. Nesse sentido a digestibilidade das proteínas é muito importante, e nem todos os fatores que afetam a digestibilidade são conhecidos. Sabe-se que as proteínas de origem vegetal são menos digeríveis que as proteínas de origem animal e sendo assim, as proteínas que tem origem microbiana possuem melhor digestibilidade sendo um método de incorporação de proteínas.(MACARI, 1994.)

Apesar de uma dieta ter alta digestibilidade ela pode ser pobre em proteínas devido a uma deficiência de aminoácidos essenciais, exigidos para a síntese de proteínas corporais. Sendo assim é necessário realizar quantificação tanto da digestibilidade quanto das proteínas, quanto à composição do padrão proteico com consequente absorção das proteínas pelos tecidos e eficiência de ganho. Nesse sentido as proteínas de origem vegetal possuem baixo valor biológico, pois apresentam a falta de pelo menos um aminoácido essencial e, portanto não são suficientes para suprir as necessidades orgânicas.

A Tabela 5 indica que houve melhora significativa do padrão de aminoácidos totais do bagaço após a fermentação com ambos os fungos.

**Tabela 5** . Aminoácido grama dos tratamentos do bagaço microbiologicamente modificado com *L. edodis* e *P.ostreatus*.

Aminoácidos totais ( mg/100g)	Bagaço de cana Puro	Bagaço + farelo aveia	Bagaço + farelo aveia + <i>L. edodis</i>	Bagaço + farelo de aveia+ <i>P.ostreatus</i>
Ácido aspártico	33,40	? 6,86	73,38	72,30
Ácido glutâmico	127,99	?39,24	214,03	295,74
Serina	5,20	32,84	89,25	12,76
Glicina	25,38	54,22	116,32	68,82
Histidina	165,55	?17,35	39,76	430,64
Arginina	14,97	11,25	61,08	27,75
Treonina	30,34	27,76	67,74	71,40
Alanina	72,99	60,65	123,07	55,53
Prolina	43,47	60,27	119,80	168,29
Tirosina	17,87	18,96	41,10	35,33
Valina	49,10	59,09	118,89	149,53
Metionina	ND	2,80	5,39	4,62
Cistina	6,95	?N.D.	ND	550,65
Isoleucina	34,04	40,39	89,07	137,21
Leucina	68,33	73,75	145,41	214,18
Fenilalanina	25,03	38,79	79,65	116,74
Lisina	ND	11,87	54,65	81,88
Triptofano	ND	ND	ND	ND

?: Resultados a serem confirmados.

Com base na Tabela 5, alguns aminoácidos devem ser destacados: ácido glutâmico, treonina, prolina, valina, isoleucina, leucina e lisina. Esses aminoácidos tiveram aumento considerável na composição do material. Sabe-se que o ácido glutâmico participa na via metabólica da glicólise, é o precursor de vários aminoácidos como glutamina, prolina, gaba, ornitina e arginina além de ser o neurotransmissor mais comum do sistema nervoso dos mamíferos. (SILVA, et al 2001). A prolina é o componente primário para formação do colágeno, a treonina é o mais abundante aminoácido da imunoglobulina IgG, a valina junto com a isoleucina e leucina estimula o crescimento e a reparação do tecido muscular, e a lisina auxilia na formação do colágeno cartilagens, tecidos conectivos e no crescimento ósseo. A lisina também está envolvida com o crescimento normal de crianças. (STRADIOTTI, et al 2004). Desse modo, o bagaço ao ser enriquecido com esses teores de aminoácidos resulta em melhorias das funções descritas acima nos animais que dele se alimentam.

A Tabela 6 mostra o perfil de aminoácidos contidos em outros materiais. É possível verificar valores menores dos aminoácidos quando comparados ao bagaço de cana termo explodido após a fermentação com os fungos.

**Tabela 6:** Valores de aminoácidos totais de diferentes compostos contidos em 100g de proteína

Aminoácidos totais ( mg/100g de proteína)	Torta de soja	Grãos de ervilha	Semente de girassol
Ácido aspártico	11,7	12,2	10,1
Ácido glutâmico	18,5	18,3	22,3
Serina	4,1	4,4	3,9
Glicina	4,1	4,4	4,5
Histidina	2,9	2,1	2,9
Arginina	7,5	8,8	9,6
Treonina	3,9	4,5	3,5
Alanina	4,2	4,2	4,2
Prolina	5,5	4,3	4,3
Tirosina	3,5	3,9	3,0
Valina	5,4	5,0	6,0
Metionina + cistina	3,6	2,6	3,8
Isoleucina	5,6	4,9	5,3
Leucina	7,6	8,0	6,9
Fenilalanina	5,4	5,4	6,0
Lisina	6,3	6,8	3,5

Fonte: STARON,1983



A Tabela 7 mostra o perfil de aminoácidos de alguns micro-organismos. Novamente é possível notar que tanto o *P. ostreatus* quanto o *L. edodes* tem capacidade de enriquecimento do bagaço de cana superior a esses valores.

**Tabela7:** Valores de aminoácidos totais de diferentes micro-organismos em 100g de proteína

Aminoácidos totais ( mg/100g de proteína)	Bacteria	Champignon de Paris	Aspergillus oryzae
Ácido aspártico	9,4	9,5	9,8
Ácido glutâmico	15,0	24,7	17,5
Serina	4,3	4,7	5,2
Glicina	4,2	4,2	4,5
Histidina	2,6	1,7	3,2
Arginina	5,8	4,9	6,5
Treonina	4,8	5,0	4,5
Alanina	6,3	7,9	5,8
Prolina	5,5	6,1	5,3
Tirosina	3,4	1,8	3,7
Valina	5,6	5,7	5,5
Metionina + cistina	4,1	2,0	2,9
Isoleucina	6,1	4,6	5,4
Leucina	10,1	6,4	9,0
Fenilalanina	4,3	3,8	4,7
Lisina	8,3	6,9	6,9

Fonte: STARON,1983

## 6. CONCLUSÃO

- Após o desenvolvimento desta pesquisa, conclui-se que a inoculação e crescimento de *Lentinula edodes* e o *Pleurotus ostreatus* induzem modificação no bagaço de cana-de-açúcar termo hidrolisado.
- Em alguns aspectos como a quantificação de proteína o *L. edodes* apresentou resultados superiores, no entanto isso pode ter ocorrido devido ao maior tempo necessário para completa colonização do substrato.
- O bagaço termo explodido apresentou-se enriquecido quanto a quantidade e qualidade proteica.
- A toxicidade aguda com *Daphnia similis* apresentou diminuição
- Os valores de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) indicam que houve melhoria quanto a solubilização das substancias polimerizadas contidas no bagaço.
- A fermentação em estado semi-sólido do bagaço termo explodido com o *Pleurotus ostreatus* e o *Lentinula edodes* pode ser uma alternativa para melhorar o seu aproveitamento.

## 7. REFERÊNCIAS

ANDRADE, M.C.N. de; CALONEGO, F.W.; MINHONI, M.T. de A.; SEVERO, E.T.D.; KOPYTOWSKI F.J. Avaliação do crescimento micelial de linhagens de shiitake, da produção em toras de eucalipto e de alterações físicas da madeira. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.29, p.23,27, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NORMA 12713, 2008.

BEATRICI, A. C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas**. 18 f. Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Instituto de Biociências, UFRGS, 2001

BISARIA, R.; MADAN, M. Mushrooms: potential protein source from cellulosic residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, 251-259, 1983.

BLAISE, C. AND FÉRARD, J. F. Eds. Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Toxicity Test Methods, Springer. (2005).

BONONI, V.L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S.F.B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1995.

BURGI, R. Produção de bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado e avaliação do seu valor nutritivo para ruminantes, ( Mestrado – ESALQ/USP) - Piracicaba-SP, 61p.1985

BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. In: International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, , University Park. Proceedings.University Park : Pennsylvania State University, 1996. p. 113-122.

CASTRO, L.B.B.N; OLIVEIRA L.A; MOREIRA R.F; MURTA R.M. *Pubvet*, v. 2, n. 30, ed. 41, Art. 465,Londrina, 2008.

CHEN, A. W. What is shiitake? In: *L. edodes* cultivation. Korea: MushWord, 2005. cap. 1, p. 3-32.

COHEN, R. L.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Appl. **Microbiological Biotechnology.**, v. 58, n. 5 p. 582-594, 2002.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E. L.G . A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008

CUNHA, M.B, **Atividade enzimática, Cinética e Modelagem Matemática da decomposição de *Utricularia breviscapa* da Lagoa do Óleo** (Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio - SP). 2003 (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 133p.

DIFCO Manual, Michigan, Tenth Edition, 1984

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis. Botucatu : **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais**, 1996. 96 p.

EIRA, A.F. & MINHONI, M.T.A. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis. 2.ed. Botucatu: **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais**, 1997. 115p.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. New York: Springer, Berlin Heidelberg, 1990.

FONSECA B.G. Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*- Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.2009.

FORD, D. K. : Culture of human genital "T-strain" pleuropneumonia-like organisms. J. Bact. 84: 1028-1034 (1962)

FREIRE R. S.; PELEGRINI R.; KUBOTA L. T. E DURÁN N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - CP 6154 - 13083-970 - Campinas – SP.- **Quím.Nova** vol.23 n.4, São Paulo, July/Aug. 2000

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; et. al. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo:CETESB, 17 p. 1990

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **Amsterdam**, v. 17, n. 1, p. 71-74, 2001.

HIROMOTO, B. T. Comparative analysis of shiitake culture systems. In: International Congress on The Science and Cultivation Of Edible Fungi. Dublin: Balkema, 1991. v. 2, p. 489-496, 1991

ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F. Consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente de fenos de gramíneas do gênero *Cynodon* e rações concentradas utilizando indicadores internos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1024-1032, 2002.

JANSSEN, C. R.; HEIJERICK, D.G. Algal toxicity tests for environmental risk assessments of metals. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 178, p. 23-52, 2003.

JWANNY, E.W.; RASHAD, M.M.; ABDU, H.M. Solid-state fermentation of agricultural wastes into food through *Pleurotus* cultivation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, 1995.

LAHMANN, O.; RINKER, D.L. Historical development of commercial mushroom production in central and South America. In: Proceedings Phase Of A Shiitake (*Lentinula Edodes*) Culture, v. 3. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 221-40.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALEZ. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1994. 296p

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 12, p.355-381, 2008

MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: National Conference On Forage Quality. Evaluation And Utilization, 1994. University of Nebraska. Lincoln: p.450-493, 1994.

MOLENA, O. O moderno cultivo de cogumelos. São Paulo: Nobel, 1986.

MORALES, E.M. Viabilidade de obtenção de alimento funcional a base de farinha de mesocarpo de babaçu (*orbignya* sp.) e folhas de mandioca (*manihot esculenta*) mediante fermentação por *rhizopus microsporus* var. *Oligosporus*. UNESP-RC.2012. 86pg. Tese de mestrado.

MURRAY, B.E. The life and the times of the Enterococcus. Rev: Clin Microbiol 1990;3:46-65.

NADALINI, M.F.C. Ação do fungo sobre microrganismos em culturas puras na fermentação etanólica..Dissertação C.B. Biologia Vegetal,I.B. UNESP. 1991

OEI, P. Mushroom cultivation. 3rd ed. The Netherlands: Backhuys Publishers, 2005. 429 p.

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. Shiitake grower's. **Handbook: the art and science of mushroom cultivation**. Dubuque:Kendall, 1990.

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation. Dubuque : Kendall/Hunt, 1988. 217 p.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M.; BANO, Z. Biodegradative and Biosynthetic Capacities of Mushrooms: Present and Future Strategies. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, 91-236, 1998.

RAND, M. C., GREEMBERG, A.G.,TARAJ, M.J.(Ed.) Standard methods for examination of water and wastewater.18.ed., Washington: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, 1992.

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.6, p.887-891, 2001.

ROSSI, I. H. Suplementação de bagaço de cana para cultivo axênico do cogumelo Shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]. Jaboticabal : UNESP, 1999. 120 p. Dissertação de Mestrado.

SANTOS, E.A.; SILVA, D.S.; QUEIROZ FILHO, J.L. Composiçãoquímica do capim-elefante cv. Roxo cortado em diferentes alturas. Revista Brasileira de Zootecnia, n.30, n.1, p.18-23, 2001.

SANTOS, F. A. P. O bagaço de cana-de-açúcar tratado sob pressão de vapor como alternativa para a alimentação de bovinos na entressafra das pastagens. Campinas: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990. 203 p.

SANTOS,M.T.;LIMA,O.J.;NASSAR,E.J.;CIUFFI,K.J.;CALEFI,P.S. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana de açúcar por análise térmica. **Química Nova**. v.34, n.3,p.507-511,2011.

SILVA, F.A., MORAES, G.H.K., RODRIGUES, A.C.P. et al. 2001b. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina D<sub>3</sub> no desempenho e nas anomalias ósseas de pintos de corte. *R. bras. zootec.*, 30(6):2059-2066.

SILVA, L.D.F.; EZEQUIEL, J.M.B.; AZEVEDO, P.S. Digestão total e parcial de alguns componentes de dietas contendo diferentes níveis de casca de soja e fontes de nitrogênio, em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**,v.31, n.3, p.1258-1268, 2002.

SILVA, V. L. M.M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. Departamento de Química - Universidade Estadual da Paraíba-Campina Grande – PB, 6p. 2007.

SILVEIRA, M.L.L. Comparação entre o desempenho do inoculo sólido e inoculo líquido para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003

STARON,T. L'encyclopedie nutritionnelle de l'homme.v1.,p261-301,1983

STORER, T. I. ; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. (Ed.). **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002

STRADIOTTI JR., D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004a.

TAVANO, O. L.; SILVA JÚNIOR, S. I.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Avaliação nutricional de proteínas do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) por método químico e microbiológico. Alimentos e Nutrição (UNESP), Araraquara, v.15, n. 1, p. 17-22, 2004.

TEIXEIRA F.A.; PIRES A.V.; NASCIMENTO P.V.N. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria 1695-7504,Volumen VIII Número 6, 2007

THOMAS, G.V.; PRABHU, S.R.; REENY, M.Z.; BOPAIAH, B.M. Evaluation of lignocellulosic biomass from coconut palm as substrat for cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Wourld Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, 879-882, 1998.

UNICA (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo). 2011 Cana-de-açúcar: subprodutos. Disponível em: [www.unica.com.br](http://www.unica.com.br). Acesso: 22/mar/2013

URBEN, A. F. et al. Produção de cogumelos comestíveis por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília: **EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001. 151 p.

VIDOTTI, E. C., ROLLEMBERG, M. C. (2004). Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, vol. 27.