

OLÍVIA GOMES MARTINS

**ANÁLISE DA PRODUTIVIDADE E SUSTENTABILIDADE DE INÓCULO DE
Pleurotus ostreatus APÓS REPICAGENS SUCESSIVAS: ESTUDO DE CASO**

**Botucatu
2019**

OLÍVIA GOMES MARTINS

**ANÁLISE DA PRODUTIVIDADE E SUSTENTABILIDADE DE INÓCULO DE
Pleurotus ostreatus APÓS REPICAGENS SUCESSIVAS: ESTUDO DE CASO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Energia na Agricultura.

Orientadora: Meire Cristina Nogueira de Andrade
Coorientador: Leonardo de Barros Pinto

Botucatu

2019

M386a	<p>Martins, Olívia Gomes</p> <p>Análise da produtividade e sustentabilidade de inóculo de <i>Pleurotus ostreatus</i> após repicagens sucessivas: estudo de caso / Olívia Gomes Martins. -- Botucatu, 2019</p> <p>66 p. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu</p> <p>Orientadora: Meire Cristina Nogueira de Andrade</p> <p>Coorientador: Leonardo de Barros Pinto</p> <p>1. Cogumelos comestíveis. 2. Cogumelos Cultivo. 3. Análise enzimática. 4. Sustentabilidade. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE DA PRODUTIVIDADE E SUSTENTABILIDADE DE INÓCULO DE *Pleurotus ostreatus* APÓS REPICAGENS SUCESSIVAS: ESTUDO DE CASO


AUTORA: OLÍVIA GOMES MARTINS

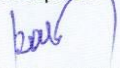
ORIENTADORA: MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE

COORDENADOR: LEONARDO DE BARROS PINTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE
Engenharia Agrônômica / Faculdade Gran Tietê


Profª. Drª. GEISIANY MARIA DE QUEIROZ-FERNANDES
Medicina / Faculdade São Leopoldo


Prof. Dr. JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS
Bioestatística / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Botucatu, 28 de fevereiro de 2019

A minha família,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor, apoio e incentivo incondicionais.

À Profa. Dra. Meire Cristina Nogueira de Andrade, pela orientação, ensinamentos, atenção e carinho de sempre.

Ao Prof. Dr. Leonardo de Barros Pinto, pela coorientação, ensinamentos, percepção sobre interdisciplinaridade e atenção.

À Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes, pelos ensinamentos e auxílio na realização da análise enzimática deste trabalho.

Ao Prof Dr. José Raimundo de Souza Passos, pelos ensinamentos e auxílio na realização da análise estatística deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, em especial ao Departamento de Economia, Sociologia e Tecnologia, pela educação e professores que auxiliaram na confecção deste trabalho.

À USC – Universidade do Sagrado Coração, por disponibilizar a infraestrutura e professores para a execução de etapas práticas do trabalho.

À empresa Funghi & Flora, por possibilitar a realização do estudo de caso.

Ao Sítio Irmãos Tonin, por disponibilizar a infraestrutura para a execução de etapas práticas do trabalho.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de mestrado concedida.

Aos queridos amigos, em especial aos amigos Paulo Emilio Ferreira Dias e Vinícius Rafael Bianchi, pelo inestimável apoio acadêmico e emocional.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste mestrado e do presente trabalho.

RESUMO

O cultivo de cogumelos comestíveis, como o *Pleurotus ostreatus* (shimeji), vêm se expandindo no Brasil devido as suas características nutricionais, medicinais e possibilidade de empregar técnicas rústicas para o seu cultivo. Um dos fatores que influenciam este cultivo é a qualidade do inóculo. Alguns produtores acreditam que as sucessivas repicagens de um micélio resultam em perda de vigor e consequente queda na produtividade, porém a literatura carece de informações referentes a essa questão. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produtividade, expressa pela perda de matéria orgânica, massa do basidioma fresco, eficiência biológica, número de cachos, atividade enzimática e caracterização química do substrato do inóculo de *P. ostreatus* em função de repicagens sucessivas, em três linhagens diferentes (SB, MB e CP3), cada qual com quatro tratamentos (I1, I2, I3 e I4, correspondendo aos inóculos repicados sucessivamente), bem como analisar o processo de produção de inóculo e sua sustentabilidade sob o ponto de vista emergético. A linhagem SB apresentou os melhores resultados de produtividade, com uma massa média de 513 g, as linhagens MB e CP3 não diferiram estatisticamente entre si quanto à produtividade, com massa média de 371 g e 310 g, respectivamente. A linhagem CP3 produziu cogumelos maiores que as demais, com uma massa média de 278 g por cacho, enquanto a linhagem SB obteve uma massa média de 218 g por cacho e a linhagem MB 185 g por cacho. As repicagens sucessivas não afetaram o tamanho dos cogumelos. Os inóculos apresentaram comportamento semelhante no substrato segundo os dados de atividade enzimática e caracterização química do substrato, indicando que as repicagens sucessivas não afetaram o comportamento do fungo no substrato. Os dados sugerem que até a quinta repicagem do micélio, não há perda significativa na produtividade, havendo diferenças apenas entre linhagens. Quanto à análise emergética, obteve-se um índice de sustentabilidade de 0,35, indicando que esta etapa do cultivo de cogumelos não é sustentável pelo alto investimento de insumos, maquinário e mão-de-obra, embora deva-se considerar o benefício posterior deste produto na cadeia produtiva, sendo recomendadas futuras análises envolvendo todas as etapas do cultivo.

Palavras-chave: Cogumelos. Atividade enzimática. Caracterização química. Análise emergética.

ABSTRACT

The cultivation of edible mushrooms, such as the *Pleurotus ostreatus* (shimeji), has been expanding in Brazil due to its nutritional and medicinal characteristics, as well as the possibility of employing rustic techniques for its cultivation. One of the factors that influence this cultivation is the quality of the spawn. Some producers believe that the successive multiplications of the mycelium results in a loss of vigor and consequently a decline in productivity, however the literature lacks information regarding this issue. Therefore, the objective of this study was to evaluate the productivity, expressed by the loss of organic matter, fresh basidioma mass, biological efficiency, number of fruiting bodies, enzymatic activity and chemical characterization of the substrate of the *Pleurotus ostreatus* spawn as a function of successive multiplications, in three different strains (SB, MB and CP3), each with four treatments (I1, I2, I3 and I4, corresponding to the successively multiplied spawns), as well as to analyse the spawn production process and its sustainability under the energetic point of view. The SB strain presented the best productivity results, with an average mass of 513 g, the MB and CP3 strains did not differ statistically among each other regarding productivity, with an average mass of 371 g and 310 g, respectively. The CP3 strain resulted in larger mushrooms than the others, with an average mass of 278 g per bunch, whereas the SB strain resulted in a mass of 218 g per bunch and the MB strain resulted in 185 g per bunch. The successive multiplications did not affect the size of the mushrooms. The spawns presented a similar behaviour on the substrate according to the data of enzymatic activity and chemical characterization of the substrate, indicating that the successive multiplications did not affect the behaviour of the fungi on the substrate. The data suggests that until the fifth multiplication of the mycelium, there is no significant loss in productivity, the differences being only among strains. Regarding the energy analysis, it was observed a sustainability index of 0,35, indicating that this stage of mushroom cultivation is not sustainable due to the high investment of inputs, machinery and labor, although the subsequent benefit of this product in the production chain should be considered, and future analyzes involving all stages of cultivation are recommended.

Keywords: Mushrooms. Enzymatic activity. Chemical characterization. Energy analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Os dez maiores países produtores de cogumelos, em toneladas por ano, no período de 2016-2017.....	21
Figura 2 –	Etapas de confecção do inóculo e inoculação de cogumelos.....	27
Figura 3 –	Etapas de repicagens sucessivas à partir do cogumelo até a produção de diferentes tipos de inóculos.....	33
Figura 4 –	Delineamento experimental.....	34
Figura 5 –	Micélio de <i>Pleurotus ostreatus</i> , proveniente da empresa Funghi & Flora, localizada em Valinhos, SP. (A) Em placas de Petri; (B) Em grãos (Inóculo confeccionado).....	35
Figura 6 –	Formulação do substrato utilizado no experimento.....	36
Figura 7 –	Fases do processo de compostagem.....	36
Figura 8 –	Compostagem realizada no pátio de compostagem, localizado no canteiro experimental da Engenharia Agronômica, no campus da USC, Bauru, SP. (A) Leira de compostagem; (B) Revirada da leira.....	37
Figura 9 –	Preparo e inoculação dos pacotes, realizado no Sítio Irmãos Tonim, Bariri, SP.....	37
Figura 10 –	Estufa experimental de Tecnologia de Cultivo de Cogumelos Comestíveis, localizada nas dependências do campus da USC, Bauru, SP. (A) Vista externa; (B) Prateleiras internas para a disposição dos pacotes de produção.....	38
Figura 11 –	Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> , realizado na estufa experimental de Tecnologia de Cultivo de Cogumelos Comestíveis, localizada nas dependências do campus da USC, Bauru, SP. (A) Pacotes dispostos na estufa; (B) Pesagem dos cachos.....	39
Figura 12 –	Análise enzimática de <i>Pleurotus ostreatus</i> , realizada no Laboratório de Biociências da Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, SP. (A) Amostras em agitador orbital; (B) Leitura em espectrofotômetro.....	41
Figura 13 –	Massa média (g) de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) segundo linhagens; (B) segundo inóculos.....	49

Figura 14 –	Número médio de cachos de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) Segundo linhagens; (B) Segundo Inóculos...	49
Figura 15 –	Massa total média (g) de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) Segundo linhagens; (B) Segundo inóculos.....	50
Figura 16 –	Número total médio de cachos de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) Segundo linhagens; (B) Segundo inóculos.....	51
Figura 17 –	Massa média (g) por cacho de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) Segundo linhagens; (B) Segundo inóculos...	52
Figura 18 –	Diagrama de fluxos energéticos do sistema de produção de inóculo.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1	Cogumelos comestíveis.....	20
3.2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	22
3.2.1	Atividade enzimática do <i>P. ostreatus</i>	23
3.2.2	Fatores que influenciam o cultivo de <i>P. ostreatus</i>	24
3.3	Inóculo	26
3.3.1	Preparo do inóculo.....	26
3.3.2	Substrato para inóculo.....	28
3.3.3	Contaminações.....	29
3.4	Sustentabilidade e emergia.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Delineamento experimental.....	33
4.2	Obtenção das linhagens.....	34
4.3	Repicagens.....	34
4.4	Preparo do inóculo.....	35
4.5	Preparo dos pacotes de cultivo.....	35
4.6	Análise de produtividade.....	38
4.6.1	Produção de cogumelos.....	38
4.6.2	Análise da atividade enzimática.....	39
4.6.2.1	Obtenção do caldo enzimático.....	39
4.6.2.2	Determinação da concentração de proteínas.....	39
4.6.2.3	Dosagem da atividade de celulase (CMCase).....	40
4.6.3	Perda da matéria orgânica.....	41
4.6.4	Eficiência biológica.....	42
4.6.5	Massa do basidioma fresco.....	42
4.6.6	Caracterização química do substrato.....	42
4.7	Análises estatísticas.....	43
4.8	Análise emergética.....	43

4.8.1	Rendimento emergético.....	43
4.8.2	Investimento emergético.....	44
4.8.3	Carga ambiental.....	44
4.8.4	Índice de sustentabilidade.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	Análise de produtividade.....	46
5.1.1	Perda de matéria orgânica, eficiência biológica e atividade enzimática.....	46
5.1.2	Massa do basidioma fresco e número de cachos.....	48
5.1.3	Caracterização química dos substratos.....	53
5.2	Análise emergética.....	55
6	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

O cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus*, de nome popular shimeji ou hiratake, é um fungo basidiomiceto de comercialização crescente na fungicultura brasileira pela sua adaptabilidade ao clima do país, por seu sabor, propriedades nutricionais, medicinais, possibilidade de cultivo em diversos substratos pela sua capacidade de degradar materiais ricos em lignina e celulose por ação enzimática, e por poder ser cultivado com técnicas rústicas. Além disso, por ser um alimento considerado saudável, com poucas calorias, baixo teor de lipídios e alto teor de proteínas e fibra (KALAČ, 2013), sua procura no mercado vem se intensificando, sendo inclusive uma boa opção dietética para vegetarianos.

Dentre os fatores que determinam o sucesso do cultivo deste cogumelo, podemos destacar a composição química do substrato, condições assépticas para a inoculação deste, condições de umidade e temperatura do armazenamento dos pacotes de cultivo, controle de pragas e a qualidade do inóculo. O inóculo é confeccionado a partir do cogumelo fresco, normalmente em grãos de trigo esterilizados.

Existem pesquisas acerca da produtividade do inóculo das linhagens de *P. ostreatus* em função do insumo utilizado para a confecção do inóculo, bem como da linhagem utilizada (NARH et al., 2011). Porém, a literatura carece de pesquisas sobre a produtividade destas em função de repicagens sucessivas, ou seja, de remover uma fração do fungo estabilizado em meio de cultura e adicionar esta fração a um novo substrato, sucessivamente, com o objetivo de se obter diversos pacotes de inóculo do micélio de uma mesma linhagem. Não se sabe ao certo se há perda de vigor e conseqüentemente perda de produtividade em virtude deste processo.

É prática comum na fungicultura a repicagem de linhagens para a produção do inóculo, porém não há respaldo da comunidade científica sobre quantas repicagens podem ser feitas de um mesmo pré-inóculo sem a perda da qualidade (produtividade), sendo o número estimado de repicagens sucessivas ideal, um conhecimento adquirido por meio da experiência das empresas especializadas neste produto (inóculo).

Quando atingido o suposto número tolerável de repicagens, há de se confeccionar novamente um pré-inóculo a partir do cogumelo fresco, gerando custos, gastos com insumos, tempo, mão de obra, infraestrutura, entre outros, o que levanta questões acerca da sustentabilidade do processo produtivo. Para avaliação da sustentabilidade de determinado produto, bem ou serviço, pode-se utilizar o cálculo emergético como indicador (VARGAS e MARTINS, 2015).

Em virtude das possíveis variações adotadas por diferentes empresas acerca do processo produtivo, torna-se pertinente a adoção da metodologia de estudo de caso, delimitando um caso específico para a busca circunstanciada de informações (VENTURA, 2007).

Portanto, ao determinar a viabilidade do inóculo em função das repicagens sucessivas, espera-se evitar o trabalho desnecessário de confecção de pré-inóculo, evitando gastos de insumos, energia e mão de obra, bem como assegurar à empresa fabricante do inóculo a viabilidade do processo (levando em consideração a qualidade e a produtividade), tendo como referência comparativa o procedimento padrão comercial adotado pela empresa em estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito das repicagens sucessivas na produtividade e sustentabilidade de inóculo de *Pleurotus ostreatus*¹.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a perda de matéria orgânica, a eficiência biológica e a atividade enzimática, quantificar o número de cachos e a massa do basidioma fresco, e caracterizar quimicamente os substratos, em função dos diferentes tipos de inóculos, obtidos à partir de repicagens sucessivas, em três linhagens diferentes de *P. ostreatus*.

Analisar o processo de produção de inóculo e sua sustentabilidade sob o ponto de vista emergético.

¹ Esta análise foi realizada em uma empresa representativa da categoria, sendo, portanto, um estudo de caso.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cogumelos comestíveis

A estrutura conhecida como cogumelo é o corpo de frutificação de um macrofungo, podendo desenvolver-se acima ou abaixo do solo, visível a olho nu e possível ser coletado à mão. Estima-se que a domesticação de cogumelos silvestres tenha se iniciado na China em 600 a. C. com o cogumelo *Auricularia auricula* em toras, e que o cultivo em substrato composto iniciou-se na França em meados de 1600 (CHANG e MILES, 2004). Segundo Chatterjee et al. (2017), as espécies mais cultivadas são *Agaricus* spp., *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*, *Volvariella volvacea*, *Hericium erinaceus*, *Auricularia auricula-judae*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Pholiota nameko*, *Lepista nuda* e *Coprinus comatus*.

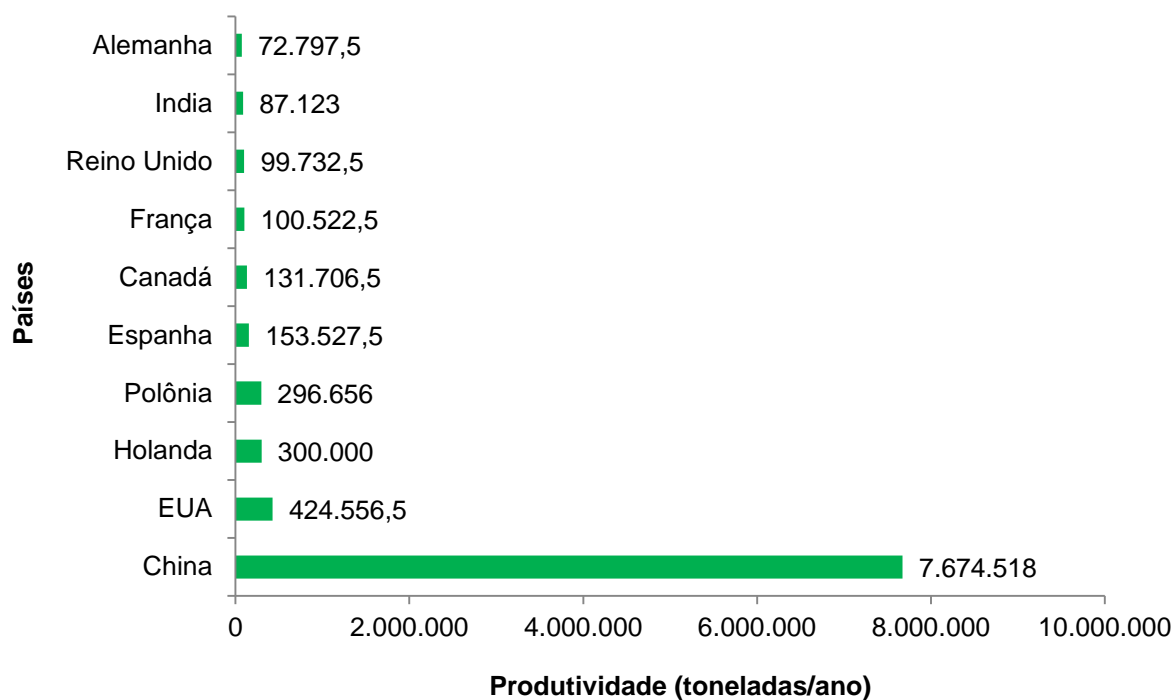
O cultivo de cogumelos comestíveis oferece diversos benefícios à economia, sociedade e meio ambiente, pois utiliza resíduos agroindustriais para o cultivo, algumas espécies não necessitam de muita tecnologia (cultivo rústico), gera empregos direta e indiretamente, é um investimento de rápido retorno aos fungicultores (algumas espécies, como o *P. ostreatus*, iniciam a frutificação de 3 a 4 semanas após a inoculação do substrato) e o seu consumo pode trazer benefícios à saúde (CHANG, 2009).

Alguns benefícios medicinais incluem a melhora do sistema imunológico, pela estimulação de células dendríticas, linfócitos NK, linfócitos T, macrófagos e produção de citocinas; prevenção do câncer, pela produção de β -glucanas, que estimula o sistema fagocitário a eliminar células estranhas, e controle de doenças cardiovasculares e Alzheimer pela presença de diversos compostos bioativos (ABDEL-AZIZ et al., 2015).

Os benefícios à saúde deste alimento se deve à presença de metabólitos primários e secundários, tais como ácido oxálico, proteínas, peptídeos, terpenos, esteroides, antraquinonas, derivados do ácido benzoico, quinolonas, alcaloides, taninos, saponinas, glicosídeos cardiotônicos, β -glucanas e fenóis. Estas propriedades estão presentes tanto no cogumelo *in natura* quanto na forma de extratos purificados (ABDEL-AZIZ et al., 2015; VALVERDE et al., 2015).

De acordo com os dados da FAO – *Food and Agriculture Organization*, a produção mundial de cogumelos e trufas ultrapassa dez milhões de toneladas ao ano, sendo a China a principal produtora, seguida por países norte-americanos e europeus (Figura 1).

Figura 1 – Os dez maiores países produtores de cogumelos, em toneladas/ano, no período de 2016-2017.



Fonte: Elaborado pela autora a partir dos dados da FAO (2019).

Apesar dos benefícios citados, o cultivo de cogumelos no Brasil é relativamente recente, tendo se fortalecido com a imigração asiática em meados do século XX (DIAS, 2010). De acordo com a Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos, no Brasil, o consumo per capita de cogumelos é de aproximadamente 160 g por ano, muito abaixo de países Asiáticos, como a China, onde o consumo per capita é de 8 kg por ano (ANPC, 2018). O Censo Paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais, realizado por Gomes et al. (2016), aponta que a maior parte dos produtores nacionais está localizada no estado de São Paulo, com uma estimativa de pouco mais de 500 produtores neste estado, empregando ao menos 5000 indivíduos, com uma produção anual de 1.062.008 toneladas, gerando uma receita de R\$ 21.240.017,00 por ano. Os autores ressaltam que os dados

nacionais são difíceis de serem reunidos, em virtude da fragmentação da cultura e também por esta ser relativamente recente. Este fato é evidenciado por o Brasil não aparecer entre os maiores países produtores segundo a FAO, sendo que de acordo com o censo previamente citado, a produção nacional anual colocaria o país logo abaixo da China.

Portanto, trata-se de um produto de grande importância econômica e social, sendo uma alternativa de complementação de renda ou até mesmo a principal atividade de diversos produtores pelo mundo, empregando milhares de indivíduos.

3.2 *Pleurotus ostreatus*

O cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus*, de nome popular “shimeji”, “hiratake” ou “cogumelo ostra”, é um fungo saprófito pertencente à classe dos basidiomicetos e é o segundo cogumelo mais cultivado do mundo, abaixo apenas do cogumelo *Agaricus bisporus* (champignon) (SÁNCHEZ, 2010). No Brasil, estima-se que o gênero *Pleurotus* spp. represente em torno de 24% da produção de cogumelos (GOMES et al., 2016). Embora ocorra naturalmente em climas temperados e durante as épocas frias de regiões de clima subtropical, é capaz de tolerar uma ampla variação térmica, o que facilita seu cultivo em diversas regiões, além de não necessitar de infraestrutura tecnificada, tornando-o atrativo para produtores rurais (CHANG e MILES, 2004).

É um cogumelo muito apreciado como iguaria gastronômica devido ao seu sabor, aroma e textura característicos (KALAČ, 2013). Nutricionalmente, a cada 100 g de cogumelos frescos, tem-se 39,27 kcal, com uma composição de 87,17% de água, 0,62% de cinzas, 0,76% de proteínas, 0,15% de lipídeos e 9,30% de carboidratos (REIS et al., 2012), o que resulta em grande procura por indivíduos em busca de alimentos de baixo teor lipídico e valor calórico. Ademais, possui diversas propriedades medicinais, como antibióticas, antibacterianas, antivirais, imunomodulatórias, antitumorais, anticolesterômicas, antiinflamatórias, antioxidantes, entre outras (COHEN et al., 2002).

O fungo *P. ostreatus* é utilizado em diversos processos biotecnológicos devido ao seu complexo enzimático. Mustafa et al. (2015) avaliaram a utilização dos fungos *P. ostreatus* e *Trichoderma reesei* no processo de biodigestão anaeróbia,

constatando que o *P. ostreatus* proporcionou 33% de degradação da lignina, o que resultou em um aumento de 120% na produção de metano.

Em processos de bioremediação, é capaz de descontaminar solos e degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes industriais e efluentes de tratamento de água por meio de ação enzimática (COHEN et al., 2002). Outra aplicabilidade deste é sua utilização na alimentação animal, por degradar materiais de baixa digestibilidade e de baixa qualidade nutricional, sendo que a adição do fungo a estes materiais resulta em um aumento de proteínas disponíveis e maior digestibilidade (AKINFEMI et al., 2010).

3.2.1 Atividade enzimática do *P. ostreatus*

Enzimas são catalizadores biológicos encontrados em todos os organismos vivos, com aplicações na indústria alimentícia, de papel e celulose, de detergentes, de biocombustíveis, entre outros, devido a sua alta especificidade de substratos. Estima-se que o mercado global de enzimas industriais ultrapasse o valor de seis bilhões de dólares até 2021 (RAVINDRAN et al., 2018).

Dentre os micro-organismos de interesse biotecnológico, os fungos basidiomicetos causadores de podridão branca, como o *Pleurotus ostreatus*, são notadamente capazes de degradar lignina, celulose e hemicelulose, atuando nesses três componentes da parede celular vegetal simultaneamente ou seletivamente na lignina e na hemicelulose. Tal processo ocorre em função do sistema enzimático extracelular lignocelulósico, no qual a celulose e a hemicelulose são hidrolisadas e a lignina é oxidada (VALADARES, 2013).

P. ostreatus é capaz de secretar peroxidases, lacases, celulasas, hemicelulasas e xilanases, sendo bem documentada a produção de manganês peroxidase, lacase e peroxidases versáteis (COHEN et al., 2002).

Durante o desenvolvimento micelial do *P. ostreatus*, a atividade enzimática é majoritariamente de enzimas oxidativas ligninolíticas. Durante a frutificação, há uma queda na produção de enzimas oxidativas e aumento na produção de enzimas hidrolíticas celulasas e hemicelulasas, possivelmente devido a uma maior necessidade energética para a produção de corpos de frutificação (VALADARES, 2013).

O complexo enzimático das celulases engloba três tipos: β -glicosidases (EC 3.2.1.21), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e endoglucanases (EC 3.2.1.4). As exoglucanases hidrolisam ligações β -1,4-glicosídicas das pontas das cadeias de celulose, produzindo celubiose. As β -glicosidases convertem moléculas de celubiose e celo-oligossacarídeos em glicose. As endoglucanases, também conhecidas como CMCase, hidrolisam ligações β -1,4-glicosídicas em regiões amorfas da celulose, disponibilizando mais terminais para a atuação das celobiohidrolases (SRIVASTAVA et al., 2018). Para ensaios de endoglucanases, o composto mais utilizado é a carboximetilcelulose (CMC), um derivado solúvel da celulose (VALADARES, 2013).

3.2.2 Fatores que influenciam o cultivo de *P. ostreatus*

Para o cultivo de *P. ostreatus*, diferentes resíduos agroindustriais podem ser utilizados, tais como bagaços, serragens, palhas, capins, folhas, entre outros (CHANG e MILES, 2004). Estes substratos, nutricionalmente pobres, podem ser acrescidos de suplementos como farelos de soja, trigo, milho ou arroz (BERNARDI et al., 2008) para atingir a relação C/N adequada à espécie. Segundo Eira (2003), a relação C/N para substratos compostados e pasteurizados para o cultivo de *P. ostreatus* deve ser na faixa de 25-50/1 ao final da fase II da compostagem.

Há extensa literatura avaliando diferentes substratos para o cultivo de *P. ostreatus*. Naraian et al. (2009) avaliaram a produtividade deste fungo em substrato à base de espiga de milho com oito suplementações diferentes, obtendo valores de eficiência biológica acima de 90% nos substratos suplementados com resíduo de semente de algodão e farelo de soja. Valores semelhantes de eficiência biológica foram obtidos em substrato de palha de milho sem suplementação e de palha de trigo, suplementada com resíduo de semente de algodão, por Fanadzo et al. (2010), e em substratos de palha de soja e palha de arroz, individualmente ou em proporção de 1:1 por Ahmed et al. (2009). A palha de arroz, pura ou misturada com palha de trigo ou papel, também resultou em altos valores de eficiência biológica segundo Sharma et al. (2013).

Tisdale et al. (2006) constataram valores de eficiência biológica acima de 70% utilizando serragens de *Casuarina equisetifolia*, *Trema orientalis* e *Falcataria*

moluccana, espécies de árvores invasoras no Havaí. Sales-Campos et al. (2010) obtiveram bons resultados utilizando serragem de marupá e de pau-de-balsa, resíduos madeiros da Amazônia, suplementados com farelos. Marino et al. (2008) avaliaram a utilização de serragem de casca de côco, resíduo comum na região do Nordeste, como suplementação no cultivo e observaram eficiência biológica maior do que os substratos sem este suplemento. Estes exemplos evidenciam que resíduos agroindustriais disponíveis em determinada região podem ser viáveis para o cultivo de *P. ostreatus*, sendo alternativas aos substratos convencionais.

Além da composição do substrato e sua relação C/N, fatores como pH, temperatura, luminosidade, umidade relativa do ar, entre outros, também são pertinentes. As condições necessárias para a colonização do substrato pelo fungo podem ser diferentes das condições para frutificação (produção de cogumelos), e também podem variar entre linhagens. Tais diferenças se devem ao fato de que o corpo de frutificação (cogumelo) é uma estrutura de sobrevivência, cuja função é a formação e liberação de esporos para a continuidade da espécie, portanto, ao se alterar as condições em que o micélio se encontra, há um estresse que resulta em uma pressão para a frutificação, embora deva-se respeitar os valores mínimos e máximos de cada fator, caso contrário o fungo não irá conseguir frutificar e morrerá (CHANG e MILES, 2004).

A umidade relativa do ar deve ser em torno de 50% a 75%, sendo que o excesso impossibilita a perspiração do fungo e proporciona o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, como bactérias, e a falta de água dificulta o transporte de nutrientes no interior das hifas. A luminosidade é necessária para a formação de primórdios em uma faixa de 200 a 640 lux, de 8 a 12 horas por dia. A ausência de luz provoca a formação de um estípite alongado e impossibilita a formação do píleo, e o excesso de luz pode causar deformações nos cogumelos e alteração na coloração do píleo (BELLETTINI et al., 2016).

A temperatura ideal para o crescimento micelial é entre 26 °C a 28 °C, e para a frutificação pode entre 15 °C a 30 °C, dependendo da linhagem. O pH ideal para o crescimento micelial e frutificação é entre 5,5 a 7,0 (BELLETTINI et al., 2016, CHANG e MILES, 2004).

3.3 Inóculo

Para o cultivo do cogumelo no substrato desejado, utiliza-se o inóculo, também conhecido como “spawn” ou “semente”, que se refere a um substrato colonizado pelo fungo. Neste trabalho será adotado o termo inóculo. A qualidade do inóculo é essencial para que o cultivo de cogumelos seja bem sucedido. A seguir são explorados os procedimentos de preparo do inóculo, bem como fatores que afetam a qualidade deste.

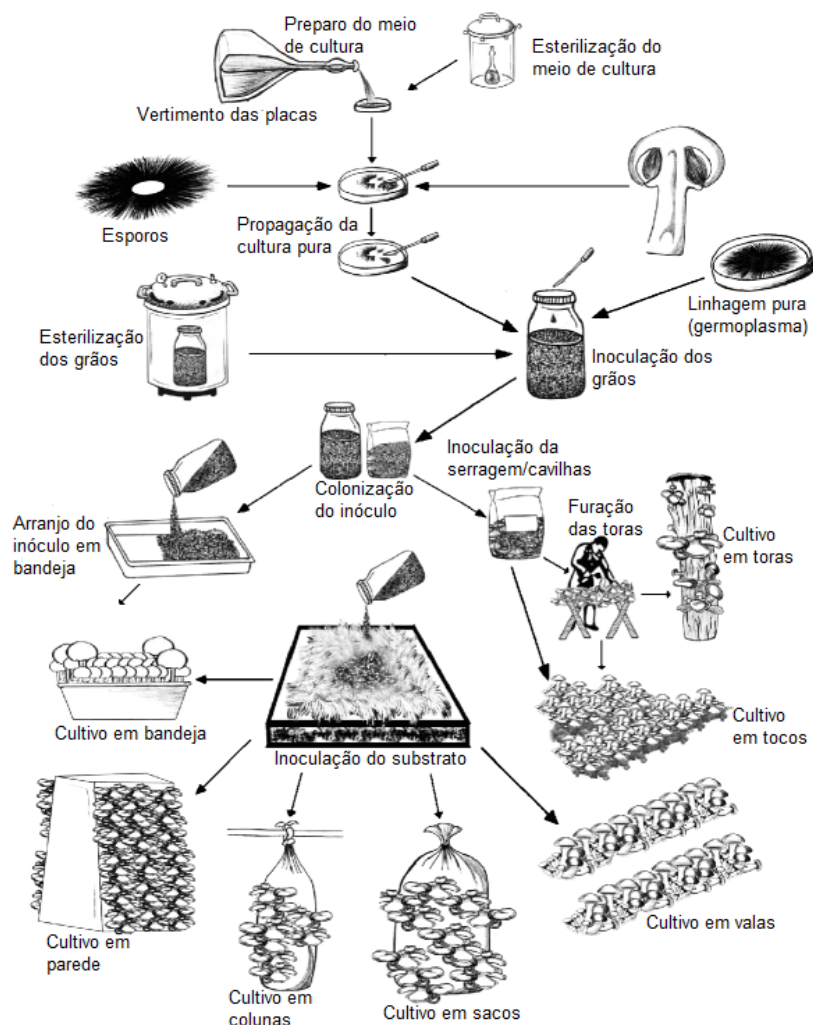
3.3.1 Preparo do inóculo

O procedimento padrão de preparo do inóculo, conforme ilustrado na Figura 2, se inicia na seleção da linhagem. É o fator mais importante a se considerar na produção do inóculo, pois uma linhagem inadequada para determinada região não trará resultados satisfatórios, mesmo nas melhores condições de substrato, pois cada linhagem possui genética própria e é adaptada a diferentes condições climáticas, podendo ter comportamentos distintos em outras condições (CHANG e MILES, 2004).

A linhagem pode ser obtida pelo cruzamento de esporos, pela remoção de uma fração do pseudotecido diplóide do interior de um píleo de um cogumelo ou adquirida de bancos de germoplasma. O meio de cultura (normalmente batata, dextrose e ágar) precisa ser esterilizado em autoclave antes de ser vertido nas placas de Petri. Quando o meio está solidificado e resfriado, adiciona-se a linhagem para que o micélio se desenvolva e colonize a placa. Na ocorrência de contaminantes, remove-se uma fração do micélio saudável e adiciona-se este a uma nova placa, até que se obtenha uma cultura pura, livre de contaminantes (CHANG e MILES, 2004; SÁNCHEZ, 2010).

Uma vez desenvolvido, este micélio será adicionado à grãos previamente cozidos e esterilizados (para algumas espécies, utiliza-se serragens ou cavilhas de madeira, como é o caso do *Lentinula edodes*), em potes de vidro ou pacotes de polipropileno ou polietileno de alta densidade com filtro para trocas gasosas. O micélio irá colonizar este substrato, que poderá ser utilizado para inoculação de diversas formas, como para o cultivo em toras, em pacotes, entre outros, sendo que todo este procedimento necessita ser realizado em condições assépticas para evitar contaminação (CHANG e MILES, 2004; SÁNCHEZ, 2010).

Figura 2 – Etapas de confecção do inóculo e inoculação de cogumelos.



Fonte: Adaptado de Sánchez (2010).

Em relação à quantidade de inóculo que deve ser adicionado ao substrato de cultivo, os valores recomendados são de 1,25 a 5% (peso úmido), que deve ser distribuído uniformemente no substrato para que a corrida micelial seja mais rápida e áreas não colonizadas fiquem menos tempo expostas a contaminantes (SÁNCHEZ, 2010).

Por se tratar de uma tarefa complexa, que exige estrutura laboratorial, a maioria dos produtores de cogumelos não confecciona o próprio inóculo, adquirindo-o de laboratórios especializados, que asseguram as condições assépticas durante o preparo, bem como a pureza da cultura, vigor do micélio e produtividade do inóculo (ROYSE, 2003).

O meio de cultura utilizado para o desenvolvimento em placas de Petri pode ainda ser enriquecido. Türkekul e Gülmez (2016) enriqueceram o meio de cultura

tradicional (BDA) com diferentes proporções de própolis para o desenvolvimento de *P. ostreatus* e concluíram que uma concentração de 0.10% de própolis proporcionou uma corrida micelial mais rápida e vigorosa que o meio não enriquecido.

Tradicionalmente, utiliza-se o inóculo sólido em grãos, porém é possível confeccionar inóculo líquido. Silveira et al. (2008) compararam a produtividade do inóculo sólido e líquido de *P. ostreatus*, não havendo diferença significativa de produtividade entre os tipos de inóculo, indicando que ambos os métodos podem ser empregados. Novos veículos miceliares estão sendo estudados com a finalidade de reaproveitamento de resíduos agroindustriais, como o estudo de Liu et al. (2018), que confeccionaram inóculo de *P. ostreatus* em caules de milho e relataram valores de produtividade semelhantes ao inóculo tradicional.

3.3.2 Substrato para inóculo

Diversos substratos podem ser utilizados para a produção de inóculos de cogumelos comestíveis ou medicinais. Há extensa literatura avaliando diferentes substratos no crescimento micelial das espécies mais populares.

Tradicionalmente, para o inóculo de *Lentinula edodes* utiliza-se serragem suplementada com farelos de arroz, milho, aveia, entre outros (PHILIPPOUSSIS et al., 2002). Rossi et al. (2003) avaliaram o crescimento micelial de *Lentinula edodes* em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farelo de arroz e melaço de cana-de-açúcar em diferentes proporções, e concluíram que a suplementação com 25-30% de farelo de arroz proporcionou o melhor resultado, enquanto o melaço não foi eficaz.

Para o inóculo de *Agaricus bisporus*, normalmente utiliza-se grãos de trigo, embora Matute et al. (2010) tenham obtido resultados satisfatórios com casca de semente de girassol em combinação com substrato exaurido de *P. ostreatus*.

De acordo com Erkel (2009), o substrato convencional para inóculo do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* é grão de trigo ou serragem. Por se tratar de um cogumelo medicinal, a maior parte da literatura existente acerca desta espécie foca em suas atividades terapêuticas e não na tecnologia de cultivo. Estes mesmos substratos também são tradicionalmente utilizados na produção do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (YOUNG et al., 2013).

Para o inóculo de *P. ostreatus*, o estudo de Narh et al. (2011) indica que o melhor substrato é a mistura de grãos de sorgo e milhete em uma proporção de 3:1, e que se utilizados individualmente, o sorgo obtém resultados melhores que o milhete. Para a espécie *P. sajor-caju*, Ambalika e Prashant (2014) compararam o crescimento micelial em grãos de trigo, arroz e grão de bico, e embora todos tenham sido eficientes, a corrida micelial mais rápida ocorreu no substrato de arroz.

Bernardi et al. (2007) avaliaram o crescimento micelial de *P. ostreatoroseus* Sing em diferentes substratos (aveia preta, aveia branca, aveia descascada, azevém, girassol, milho, soja, trigo, casca de arroz, serragem, arroz em casca e impureza de arroz) e constataram que o melhor substrato para a produção de inóculo desta espécie ocorreu nos substratos aveia preta e serragem suplementada com farelo de soja.

Kumar (2015) comparou o desenvolvimento micelial e a produtividade de inóculos produzidos à base de grãos de trigo, milho, milheto pérola, grãos de sorgo, cevada e aveia, suplementados ou não com casca de arroz, casca de grão de bico e farelo de aveia, no cultivo de *Agaricus bisporus*, *P. florida* e *Calocybe indica*. O inóculo produzido com grão de sorgo proporcionou a corrida micelial mais rápida em todas as espécies, seguido pelo milho.

Os dados provenientes da literatura indicam que, além do substrato utilizado, linhagens diferentes de uma mesma espécie podem ter resultados diferentes devido à sua própria constituição genética (CHANG e MILES, 2004; KUMAR, 2015), e que portanto a escolha da linhagem é um importante fator para a produtividade do inóculo.

3.3.3 Contaminações

A ocorrência de contaminações é um dos principais problemas encontrados na confecção de inóculos. Contaminações por bactérias, actinomicetos, leveduras e outros fungos filamentosos podem resultar na perda total do inóculo. As fontes de contaminação podem ser o substrato não esterilizado corretamente, água contaminada, a infraestrutura laboratorial e o ar. Concomitantemente, temperaturas e umidade incorretas podem favorecer o aparecimento de contaminantes. Portanto, a assepsia do laboratório, dos utensílios utilizados, das mãos dos operadores, esterilização eficaz e controle das variáveis ambientais são as medidas necessárias

para evitar os danos causados por contaminantes (CHANG e MILES, 2004; KUMAR, 2015).

Além das boas práticas laboratoriais e esterilizações eficazes, pode-se adicionar antibióticos aos substratos após a autoclavagem. Ahlawat et. al. (1997) avaliaram a eficácia de diferentes métodos físico-químicos no controle da contaminação de inóculos, e concluíram que os melhores resultados foram com a utilização dos antibióticos ampicilina, estreptociclina, estreptomicina e tetraciclina em uma concentração de 50µg/g.

Kumar (2015) avaliou o aparecimento de contaminantes em substratos preparados à base de grãos de trigo, milho, milheto pérola, grãos de sorgo, cevada e aveia, suplementados ou não com casca de arroz ou casca de grão de bico, a eficácia de diferentes números de cozimento e autoclavagem dos substratos, e da utilização dos antibióticos estreptociclina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina, neomicina e do agente químico hipoclorito de cálcio, em diferentes concentrações, no controle das contaminações. Quatro grupos de contaminantes foram identificados, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., tanto nos substratos individuais quanto misturados. Três cozimentos e três autoclavagens tiveram os melhores resultados no controle dos contaminantes. O antibiótico tetraciclina teve a melhor redução da contaminação (98,33%) e o hipoclorito de cálcio teve a pior redução (11,66%).

Novas técnicas vem sendo desenvolvidas para reduzir contaminações. Ortiz et al. (2017) avaliaram a técnica de encapsulação em alginato nos inóculos de *P. ostreatus*, *Gymnopilus pampeanus*, *Lentinula edodes* e *Agaricus bisporus*, e notaram que, além de a produtividade não ter diferido do inóculo tradicional, o alginato aparenta proteger contra contaminações, bem como garantir a viabilidade do inóculo por até 6 meses.

3.4 Sustentabilidade e emergia

Dentre as muitas definições de sustentabilidade existentes, têm-se de acordo com Ferraz (2003) que a sustentabilidade engloba três dimensões: a econômica, a ambiental e a social. Deve-se incorporar conhecimento e tecnologias na agregação de bens e serviços duráveis para se atingir o desenvolvimento sustentável. Ademais, em 1987 a Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento conceituou o

desenvolvimento sustentável como atender as necessidades do presente sem comprometer as gerações futuras de atenderem suas próprias necessidades.

No cultivo de cogumelos, além do aspecto econômico resultante do trabalho na área e comercialização do produto, bem como a questão social ligada à cultura milenar do cultivo destes e importância cultural em determinadas etnias e regiões, o aspecto ambiental é muito estudado. Existem diversos estudos acerca dos benefícios ambientais deste cultivo pela utilização de diferentes resíduos agroindustriais, eliminando estes passivos ambientais, porém apenas a questão da utilização de resíduos não basta para afirmar se é sustentável.

Na teoria geral de sistemas proposta por Bertalanffy (1950), organismos vivos são sistemas abertos, pois permitem a entrada e saída de materiais, implicando em mudanças em seus componentes. O cultivo de cogumelos, por se tratar de organismo vivo, é portanto, um sistema aberto, e ao se fazer uma análise desses sistemas, todas as variáveis precisam ser consideradas. Para o estudo completo quanto à sustentabilidade de um sistema produtivo, uma possível abordagem é pelo ponto de vista da Emergia

O conceito de Emergia surgiu em 1967 por Howard Thomas Odum, com base na teoria geral de sistemas de Bertalanffy, para estudar a energia e transformações energéticas necessárias para a geração de um produto, bem ou serviço, por meio de análise ecossistêmica-energética (VARGAS e MARTINS, 2015). Segundo Ortega (2010), o cálculo emergético vai além dos preços das variáveis envolvidas, como insumos, considerando também a utilização de recursos renováveis (usada e repostada na mesma taxa de uso) e não-renováveis (usada a uma taxa maior que a de reposição) e consequente impacto da atividade econômica.

Para o cálculo emergético, portanto, consideram-se todas as variáveis possíveis, como também as contribuições ambientais do sistema externo, as mudanças dos estoques internos, os insumos materiais, serviços econômicos, produtos e subprodutos, as perdas de insumos e os serviços externos pagos pela sociedade (ORTEGA et al., 2002).

Por considerar os custos econômicos, sociais e ambientais, usados direta ou indiretamente para a produção de um bem ou serviço (CAMPBELL, 2016), o balanço emergético (entrada e saída de emergia) permite averiguar se determinado processo produtivo é sustentável do ponto de vista das contribuições dos três pilares da

sustentabilidade (econômico, social e ambiental). Para que as variáveis possuam a mesma unidade, são expressas em joules de energia solar (seJ) (MARIANO et al., 2015), sendo cada contribuição do sistema expressa nessa unidade seguindo as transformidades necessárias. As transformidades se referem à energia necessária de um tipo para fazer uma unidade de energia de outro tipo, ou seja, é a relação entre a energia e a exergia (energia potencial), e esse índice mede a qualidade da energia e sua posição hierárquica na energia de determinado sistema (ORTEGA, 2002). Devido à dificuldade de se trabalhar com esta unidade, usa-se o seu equivalente econômico “emdólar”, que corresponde à razão energia/dinheiro, sendo que este varia com a inflação da moeda local (ORTEGA, 2010).

A partir da construção de um itinerário técnico, que discrimina todas as etapas, insumos e processos envolvidos desde o início da seleção do material de origem para repicagem até a produção final do inóculo, pode-se averiguar as variáveis para cálculo dos índices emergéticos, auxiliando na tomada de decisões sobre o processo produtivo, considerando que o resultado apenas da produtividade dos inóculos não contempla todas as variáveis (econômicas, sociais e ambientais).

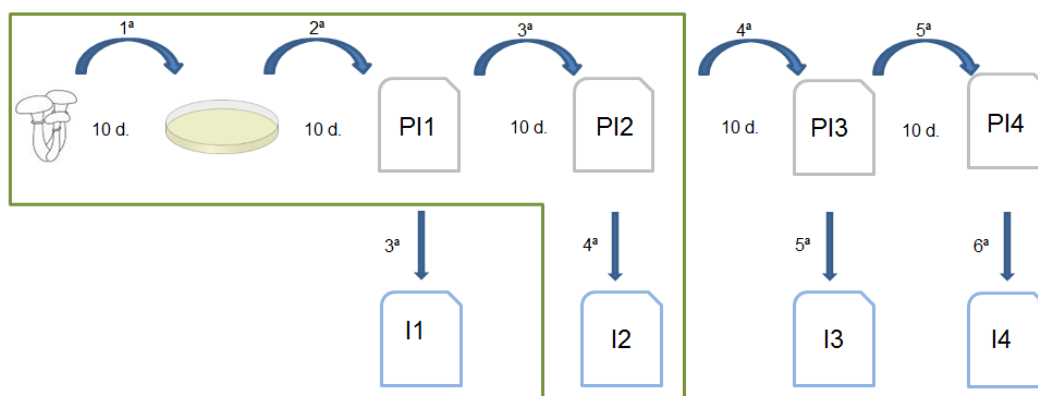
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O planejamento das repicagens e produção dos inóculos segue esquematizado na Figura 3. A área verde (em destaque na Figura 3) corresponde ao procedimento padrão da empresa em estudo, da primeira repicagem a partir do cogumelo fresco, colonização em placa de Petri, colonização em pacote de grãos para aumento da massa micelial (PI1), e novamente colonização em grãos (PI2), do qual foi confeccionado o inóculo [inóculo testemunha (I2)].

Os pacotes destacados em cinza são os pré-inoculantes, que uma vez colonizados foram refrigerados a 2-5 °C (ideal para armazenamento de curto prazo de micro-organismos, de acordo com Costa e Ferreira (1991)) para desacelerar o metabolismo destes até o final da quinta repicagem sequencial, quando então foram retirados da refrigeração, 24h antes do início da produção do inóculo (destacados em azul), para que a confecção dos inóculos ocorresse no mesmo dia e que possuísem a mesma idade fisiológica. Todos os pacotes (pré-inoculantes e inóculos) tinham 1,5 kg. A cada repicagem, aguardaram-se 10 dias para que os pacotes fossem colonizados.

Figura 3 – Etapas de repicagens sucessivas à partir do cogumelo até a produção de diferentes tipos de inóculos.



Área verde: Etapas de produção de inóculo padrão da empresa em estudo; PI1, PI2, PI3 e PI4: pré-inoculantes; I1, I2, I3 e I4: inóculos; 10d: refere-se à 10 dias de incubação.

Fonte: Elaborado pela autora.

Foram produzidos os inóculos (I1, I2, I3 e I4) de três linhagens de *P. ostreatus*, produzidos a partir dos pré-inoculantes destacados na Figura 3. O inóculo “I1”, uma etapa antes do comercializado pela empresa em questão, também foi produzido para fins de comparação da produtividade, pois alguns laboratórios o comercializam nesta etapa. Portanto, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4 (linhagens x inóculos) (Figura 4), com 12 tratamentos, cada qual com 6 repetições (pacotes de produção), totalizando assim 72 unidades experimentais.

Figura 4 – Delineamento experimental.

Linhagem 1 (CP3)*	I1 – 3 ^a repicagem
Linhagem 2 (SB)*	I2 – 4 ^a repicagem (Testemunha)
Linhagem 3 (MB)*	I3 – 5 ^a repicagem
	I4 – 6 ^a repicagem

*Linhagens de *P. ostreatus* utilizadas no presente experimento.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Obtenção das linhagens

As linhagens CP3, SB e MB de *P. ostreatus* foram cedidas pela empresa Funghi & Flora, localizada em Valinhos – SP. A escolha destas linhagens se deve ao fato de serem as mais comercializadas na região. As linhagens estavam na forma de micélio em placas de Petri com meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar).

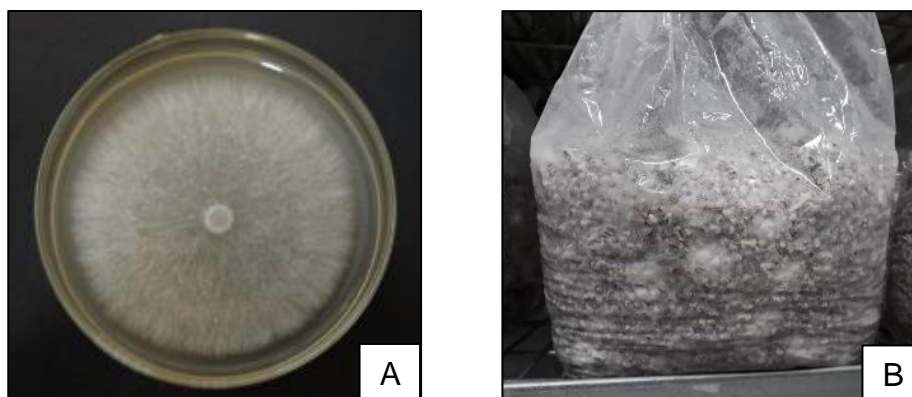
4.3 Repicagens

As linhagens foram repicadas na empresa Funghi & Flora, de Valinhos – SP. O procedimento consistiu da adição de frações do micélio contido nas placas de Petri à sacos de polipropileno contendo grãos de trigo previamente cozidos e esterilizados, que foram colonizados pelo micélio, resultando no pré-inoculante primário – PI1. Os pré-inoculantes seguintes foram repicados sequencialmente utilizando grãos colonizados do pré-inoculante anterior (PI2, PI3 e PI4, Figura 3), adicionando-os à novos sacos de polipropileno contendo grãos de trigo previamente cozidos e esterilizados.

4.4 Preparo do inóculo

Os inóculos (I1, I2, I3 e I4) foram preparados pela empresa Funghi & Flora. O procedimento consistiu do cozimento de grãos de trigo, armazenamento destes grãos em sacos de polipropileno, esterilização em autoclave, adição do micélio armazenado em grãos de trigo (pré-inoculantes PI1, PI2, PI3 e PI4) em câmara de fluxo laminar e incubação em salas climatizadas para colonização (Figura 5).

Figura 5 – Micélio de *Pleurotus ostreatus*, proveniente da empresa Funghi & Flora, localizada em Valinhos, SP. (A) Em placas de Petri; (B) Em grãos (Inóculo confeccionado).



Fonte: Acervo da empresa Funghi & Flora.

4.5 Preparo dos pacotes de cultivo

A composição do substrato segue detalhada na Figura 6. A relação C/N inicial foi calculada para 67/1. Foram acrescentados ainda 5,1 kg de calcário (aproximadamente 3% do peso seco) e 1,7 kg de gesso (aproximadamente 1% do peso seco).

Figura 6 – Formulação do substrato utilizado no experimento.

Insumo	U (%)	Peso Úmido (Kg)	Peso Seco (Kg)	C%	C (Kg)	N%	N (Kg)
Palha de braquiária	11	171	152,19	45	68,49	0,45	0,68
Farelo de trigo	7	18	16,74	48	8,04	2,71	0,45

U= Umidade; C= Carbono; N= Nitrogênio.

Fonte: Elaborado pela autora.

O substrato foi preparado por compostagem curta (Figuras 7 e 8), seguido de pasteurização, procedimento padrão no cultivo de *Pleurotus* spp., que proporciona sucessão microbiológica e reduz a ocorrência de contaminantes (DIAS, 2010).

Figura 7 – Fases do processo de compostagem.

Dias	Atividade	Procedimento	Fase
-3	Pré-umedecimento	Umedecimento das palhas	Pré-compostagem
-2		Revirada e umedecimento das palhas	
-1		Revirada e umedecimento das palhas	
0	Montagem das leiras	Adição do farelo de trigo e calcário	Compostagem Fase I
2	1. ^a Revirada		
4	2. ^a Revirada	Adição da 1. ^a metade de gesso	
6	3. ^a Revirada	Adição da 2. ^a metade de gesso	Compostagem Fase II
9	Pasteurização	Temperatura de 62° C ± 2 por 8 horas	
10	Condicionamento	Temperatura de 48° C ± 2 por 8 dias	
18		Composto com 25° C pronto para ser inoculado	

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8 – Compostagem realizada no pátio de compostagem, localizado no canteiro experimental da Engenharia Agrônômica, no campus da USC, Bauru, SP. (A) Leira de compostagem; (B) Revirada da leira.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao final do processo de compostagem, foram preparados os pacotes de cultivo, no Sítio Irmãos Tonim, localizado em Bariri, SP. Foram preparados 6 pacotes por cada tratamento, adicionando 3 kg do composto e aproximadamente 2% deste peso do inóculo correspondente ao tratamento em sacos pretos de polipropileno (Figura 9).

Figura 9 – Preparo e inoculação dos pacotes, realizado no Sítio Irmãos Tonim, Bariri, SP.



Fonte: Elaborado pela autora.

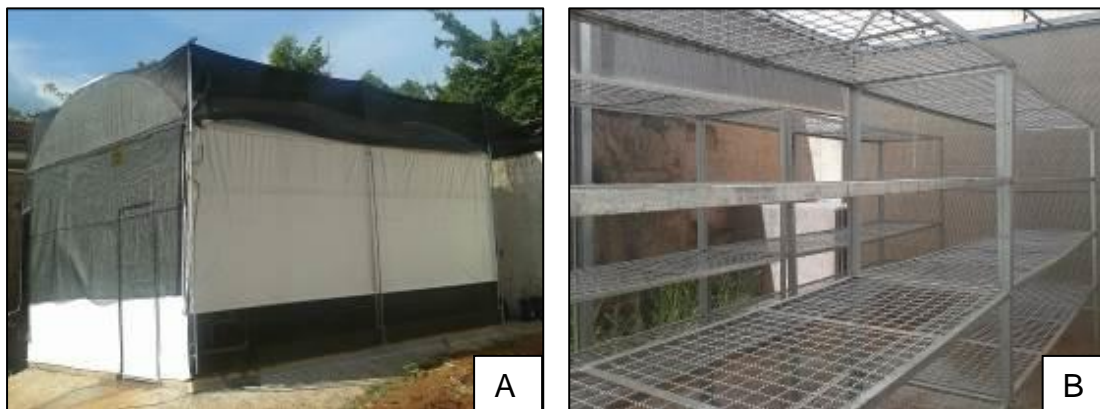
4.6 Análise de produtividade

Foram adotados como parâmetros de produtividade a perda de matéria orgânica (%), eficiência biológica (%), massa do basidioma fresco (g), número de cachos (estes parâmetros são referentes à produção de cogumelos), atividade enzimática do inóculo (U/mg) e caracterização química dos substratos, descritos a seguir.

4.6.1 Produção de cogumelos

A produção foi realizada nas dependências do campus da Universidade do Sagrado Coração (USC) – Bauru, em estufa experimental 4 x 6 localizada no canteiro experimental da Engenharia Agrônômica (Figura 10). Os pacotes de cultivo foram dispostos de maneira aleatória nas prateleiras.

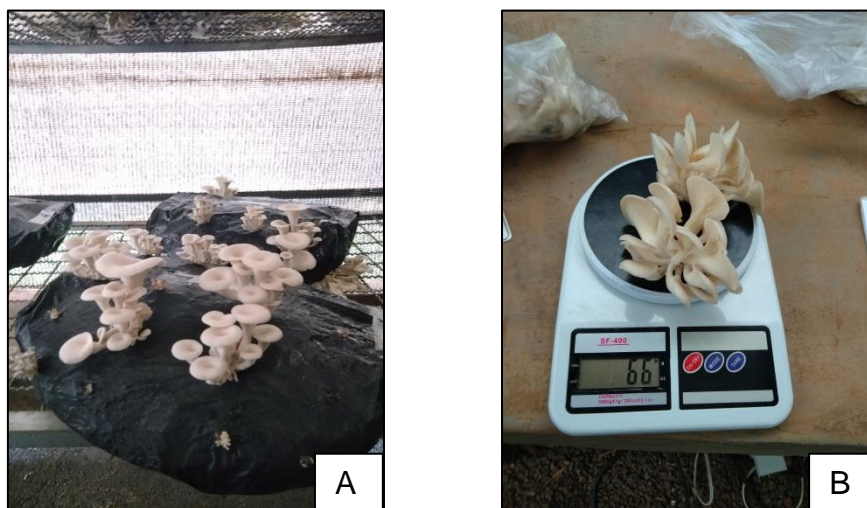
Figura 10 – Estufa experimental de Tecnologia de Cultivo de Cogumelos Comestíveis, localizada nas dependências do campus da USC, Bauru, SP. (A) Vista externa; (B) Prateleiras internas para a disposição dos pacotes de produção.



Fonte: Elaborado pela autora.

O ciclo de cultivo teve duração de 90 dias, contados a partir do dia da inoculação. Os cachos de cogumelos de cada pacote foram colhidos, contados e pesados para análises (Figura 11). Durante o ciclo de cultivo, a temperatura se manteve na média de 26 °C e a umidade relativa de 71%, aferidos diariamente por termohigrômetro.

Figura 11 – Cultivo de *Pleurotus ostreatus*, realizado na estufa experimental de Tecnologia de Cultivo de Cogumelos Comestíveis, localizada nas dependências do campus da USC, Bauru, SP. (A) Pacotes dispostos na estufa; (B) Pesagem dos cachos.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.6.2 Análise da atividade enzimática

Essa análise foi realizada pela determinação da atividade somente da enzima celulase (CMCase), com metodologia adaptada de Baldrian et al (2010), no Laboratório de Biociências da Universidade do Sagrado Coração (USC) – Bauru, SP.

4.6.2.1 Obtenção do caldo enzimático

O caldo enzimático foi obtido por meio da adição de 3g das amostras úmidas dos inóculos a 48 mL (50mM) de tampão fosfato (pH 7), que foram agitadas durante 2 horas a 8 °C em agitador orbital a 100 rpm min⁻¹ (Figura 12A). Após este período, o líquido foi filtrado em papel filtro (Iandolo et al., 2011) e o extrato bruto enzimático foi utilizado para as medições de atividade de celulase.

4.6.2.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Bradford (1976) empregando-se uma curva analítica contendo albumina de soro bovino

confeccionada com soluções-padrão em concentrações que variaram de 50 a 250 $\mu\text{g/mL}$, que passaram pelos mesmos procedimentos das amostras, descrito a seguir. A determinação do coeficiente de extinção molar foi baseada na lei de Lambert-Beer, onde o gráfico da curva da absorbância x concentração da amostra ($\mu\text{mols/mL}$) foi traçado, determinando-se o coeficiente angular. O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado a partir da seguinte equação: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, em que A = Absorbância, ϵ = absortividade, b = caminho óptico (1 cm) e c = concentração.

Os extratos brutos enzimáticos de cada tratamento (50 μL) foram adicionados a 1,5 mL do reagente de Bradford e mantidos durante cinco minutos em temperatura ambiente. O branco foi preparado com 1,5 mL do reagente de Bradford e 50 μL do extrato bruto previamente desnaturado, durante 15 minutos em banho fervente a 100 $^{\circ}\text{C}$.

4.6.2.3 Dosagem da atividade de celulase (CMCase)

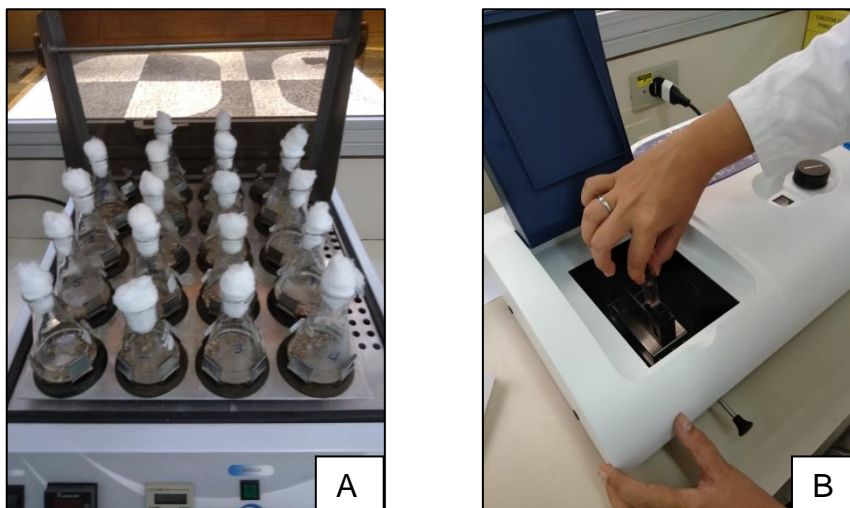
A quantidade de açúcares redutores liberados foi quantificada utilizando glicose como padrão, onde uma unidade de celulase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto, conforme as condições experimentais.

As atividades enzimáticas foram quantificadas empregando-se curvas analíticas de glicose com soluções que variaram de 0,277 a 1,387 $\mu\text{mol/mL}$ que passaram pelos mesmos procedimentos das amostras, permitindo determinar o coeficiente de extinção molar baseado na lei de Lambert-Beer, onde o gráfico da curva da absorbância x concentração da amostra ($\mu\text{mols/mL}$) foi traçado.

Os extratos brutos enzimáticos de cada tratamento (500 μL) foram adicionados a 500 μL de carboximetilcelulose a 2%, previamente preparada em tampão citrato a 0,5 M, pH 4,8. O branco foi preparado com 500 μL do extrato bruto desnaturado em banho fervente a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e 500 μL de carboximetilcelulose a 2%. As soluções foram incubadas em banho maria a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Foi adicionado 1 mL de DNS à cada solução que em seguida foram levadas para o banho fervente a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Foram adicionados 5 mL de água para arrefecimento e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Figura 12B)

a 540 nm, o aparelho foi zerado previamente com o branco (GHOSE, 1987; CUNHA et al., 2012).

Figura 12 – Análise da atividade de celulase (CMCase) de *Pleurotus ostreatus*, realizada no Laboratório de Biociências da Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, SP. (A) Amostras em agitador orbital; (B) Leitura em espectrofotômetro.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.6.3 Perda da matéria orgânica

Esta avaliação foi realizada segundo Rajarathman e Bano (1989). A perda de matéria orgânica (PMO) é o índice que avalia a decomposição do substrato pelo fungo, sofrido durante o cultivo. Tal índice é baseado na perda da matéria orgânica decomposta pelo fungo que é determinada por meio da diferença entre a massa seca do substrato inicial, e a massa seca do substrato residual (pós-colheita). Assim, a PMO foi avaliada conforme expressa pela seguinte fórmula:

$$PMO (\%) = \frac{MSSI (g) - MSSR (g)}{MSSI (g)} \times 100$$

Onde

MSSI = Massa seca do substrato inicial

MSSR = Massa seca do substrato residual

4.6.4 Eficiência biológica

A produtividade foi expressa através da eficiência biológica (EB) que representa o percentual de conversão de substrato em biomassa fúngica (cogumelos), de acordo com a seguinte fórmula:

$$EB (\%) = \frac{MFTC (g)}{MSSI (g)} \times 100$$

Onde

MFTC = Massa fresca total de cogumelos

MSSI = Massa seca do substrato inicial

4.6.5 Massa do basidioma fresco

A análise de Massa do Basidioma Fresco (MBF) foi feita a partir da colheita e pesagem dos cogumelos frescos de cada unidade experimental, que foram somados para cálculo das médias de cada inóculo.

4.6.6 Caracterização química do substrato

Foram colhidas amostras em duplicatas do substrato utilizado para o cultivo de cogumelos antes do cultivo e após (substrato exaurido) para análise química, onde foram avaliados os seguintes parâmetros: teor de nitrogênio (N), carbono (C), a relação carbono/nitrogênio (C/N), o teor de umidade (%), de matéria orgânica (%) e o pH. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Análise Química de Fertilizantes e Corretivos, pertencente ao Departamento de Recursos Naturais – Ciência do Solo – FCA/ UNESP, Botucatu, SP, de acordo com a metodologia do MAPA (2014).

4.7 Análises estatísticas

Para as variáveis perda de matéria orgânica, eficiência biológica e atividade enzimática, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%) (SNEDECOR e COCHRAN, 1972). Para tanto, foi utilizado o programa SISVAR 4.2 desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA).

Para as variáveis massa de basidiomas frescos, massa acumulada de basidiomas frescos e gramas por cachos acumuladas, foram ajustados modelos lineares generalizados com a distribuição gama e função de ligação logarítmica tendo como fatores linhagem e inóculos (Nelder e Wedderburn, 1972).

Para a variável número de cachos de basidiomas frescos e número de cachos acumulados foram ajustados modelos lineares generalizados com a distribuição binomial negativa e função de ligação logarítmica tendo como fatores linhagem e inóculos (Nelder e Wedderburn, 1972).

A qualidade dos ajustes de todos os modelos lineares generalizados ajustados foi feita através da análise de desvios (*deviance*), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados. Para comparações entre tratamentos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999) do procedimento *genmod* do programa estatístico SAS – *Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition*.

4.8 Análise emergética

Foram determinadas as variáveis do processo produtivo, desde a primeira repicagem do cogumelo fresco para placa de Petri até a confecção do inóculo, a partir da construção do itinerário técnico da produção de inóculos. As variáveis foram convertidas por meio das transformidades próprias de cada uma, para cálculo dos fluxos emergéticos e dos indicadores emergéticos. Os seguintes indicadores emergéticos foram calculados utilizando o aplicativo para Excel desenvolvido por Barrella (2004), que baseia-se metodologia de Odum (1996) :

4.8.1 Rendimento emergético

O rendimento emergético (*emergy yield ratio* – EYR) é calculado pela razão da energia total dividida pela energia do setor econômico:

$$EYR = \frac{Y}{F} = \frac{R + N + F}{F}$$

Onde:

Y – Energia do fluxo de saída

R – Somatório dos Fatores Renováveis

N – Somatório dos Fatores Não renováveis

F – Somatório dos Fatores Econômicos

4.8.2 Investimento energético

O investimento energético (*environmental investment ratio* – EIR) consiste da energia do setor econômico dividida pela somatória dos recursos renováveis e não renováveis:

$$EIR = \frac{F}{N + R}$$

Onde:

R – Somatório dos Fatores Renováveis

N – Somatório dos Fatores Não renováveis

F – Somatório dos Fatores Econômicos

4.8.3 Carga ambiental

A carga ambiental (*environmental loading ratio* – ELR) é obtida dividindo a energia dos fatores econômicos e não renováveis pela energia dos fatores renováveis:

$$ELR = \frac{N + F}{R}$$

Onde:

R – Somatório dos Fatores Renováveis

N – Somatório dos Fatores Não renováveis

F – Somatório dos Fatores Econômicos

4.8.4 Índice de sustentabilidade

O índice de sustentabilidade (*sustainability index* – SI) é a relação entre o rendimento emergético e o índice de carga ambiental:

$$SI = \frac{EYR}{ELR}$$

Onde:

EYR – Rendimento emergético (emergy yield ratio)

ELR – Carga ambiental (environmental loading ratio)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de produtividade

Os resultados referentes aos parâmetros de produtividade (perda de matéria orgânica, eficiência biológica, atividade enzimática, massa do basidioma fresco, número de cachos e caracterização química dos substratos) estão descritos a seguir.

5.1.1 Perda de matéria orgânica, eficiência biológica e atividade enzimática

Na Tabela 1 estão expressos os valores médios de perda de matéria orgânica, eficiência biológica e atividade enzimática de CMCase de cada tratamento por linhagem.

Não houve interação significativa entre linhagem e inóculo. Os valores de perda de matéria orgânica não mostraram diferença estatística significativa entre si, sendo o valor mais baixo de 47,16% e o mais alto de 62,97%. Estes valores estão matematicamente acima dos encontrados por Tavares (2015), que cultivou *P. ostreatus* em compostos à base de palha de feijão e bagaço de cana-de açúcar, com o valor de PMO mais baixo de 30,36% e o mais alto de 43,52%. A autora ressalta que os valores de perda de matéria orgânica não estão correlacionados com a eficiência biológica.

O valor mais baixo de eficiência biológica foi de 29,67%, no inóculo I4 da linhagem MB, e os valores mais altos foram de 61,62% e 66,02% nos inóculos I3 das linhagens CP3 e SB, respectivamente. lossi et al. (2018) avaliaram a eficiência biológica de espécies de *Pleurotus* spp. em palha de braquiária tratada com água alcalina, e constataram a eficiência biológica mais baixa, de 6,13%, na palha tratada com 0.5% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e a mais alta, de 74,75%, na palha tratada com 1% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Tanto os valores encontrados por lossi et al. (2018) quanto os do presente experimento estão matematicamente abaixo dos valores encontrados por Vieira e Andrade (2016). Estes autores cultivaram *P. ostreatus* em diferentes substratos, dois deles à base de dois cultivares diferentes de braquiária, sendo a eficiência biológica nestes substratos de 123,95% e 96,90%.

Embora os valores de atividade enzimática da CMCase tenham apresentado diferença, estes não seguem o mesmo comportamento da perda de matéria orgânica e eficiência biológica, indicando que a atividade metabólica desta enzima não está relacionada com a produtividade. Viana (2018) avaliou a produção das enzimas lacase e manganês peroxidase no inóculo de *P. ostreatus* em função de repicagens recessivas e também não constatou relação entre a atividade enzimática e a produtividade. Os valores encontrados neste experimento estão próximos aos de Goyal e Soni (2011), que relataram um valor de 0,42 a 0,48 U/mL para espécies de *Pleurotus*.

Tabela 1 - Valores médios de perda de matéria orgânica, eficiência biológica e atividade enzimática para cada tratamento. Erro padrão entre parênteses.

Linhagem	Inóculo	PMO (%)	EB (%)	Atividade enzimática (U/mg)
CP3	I1	50,18 ^a (3,22)	45,34 ^{ab} (7,10)	0,62 ^{ab} (0,15)
	I2	54,62 ^a (5,69)	41,49 ^{ab} (7,39)	0,52 ^a (0,06)
	I3	47,16 ^a (9,23)	61,62 ^a (6,92)	0,65 ^{ab} (0,08)
	I4	58,85 ^a (1,23)	53,78 ^{ab} (4,10)	0,60 ^a (0,11)
MB	I1	61,23 ^a (1,52)	46,94 ^{ab} (4,90)	0,84 ^{ab} (0,07)
	I2	60,16 ^a (1,52)	39,08 ^{ab} (6,47)	0,40 ^a (0,09)
	I3	55,77 ^a (1,58)	44,72 ^{ab} (4,19)	0,68 ^{ab} (0,07)
	I4	50,41 ^a (1,24)	29,67 ^b (4,36)	0,70 ^{ab} (0,20)
SB	I1	55,03 ^a (2,97)	52,25 ^{ab} (6,58)	0,42 ^a (0,10)
	I2	57,86 ^a (4,51)	53,61 ^{ab} (7,89)	0,58 ^a (0,06)
	I3	62,97 ^a (2,91)	66,02 ^a (4,55)	0,33 ^a (0,00)
	I4	54,17 ^a (0,85)	56,10 ^{ab} (4,81)	1,20 ^b (0,14)

CP3, MB, SB= Linhagens; I1, I2, I3, I4= Inóculos; PMO= Perda de Matéria Orgânica; EB= Eficiência Biológica; médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância para as variáveis EB e Atividade enzimática.

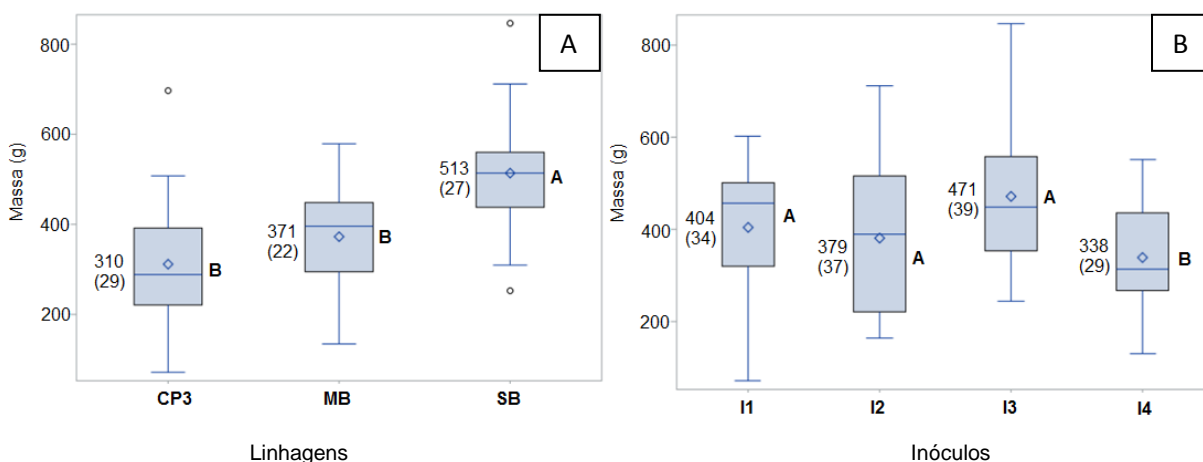
Bonomini et al. (2017) avaliaram a produtividade das enzimas celulase, lipase, lacase, amilase, pectinase, inulinase e protease durante 14 dias pelos fungos *P. sajor-caju* e *P. djamor* (os inóculos tinham 7 dias de idade), e, embora o crescimento micelial pudesse ser observado em todos os cultivos, não foi detectada celulase (CMCase) e inulinase.

Alexandrino et al. (2007) avaliaram a utilização de resíduo de laranja para a produção de enzimas por *P. ostreatus* (os inóculos tinham duas semanas de idade), observando uma alta produção de lacase e manganês peroxidase e baixa produção de celulase (CMCase) e xilanase, o que de acordo com os autores é condizente com o gênero *Pleurotus* spp. durante o desenvolvimento micelial. Matije et al. (2017) também constataram alta produção de lacase e manganês peroxidase e baixa atividade de celulasas por *P. ostreatus* (os inóculos tinham duas semanas de idade) em resíduos de casca de arroz e casca de melancia, o que também foi atribuído à fase de desenvolvimento micelial. Portanto, a baixa atividade enzimática de CMCase observada no presente estudo pode estar relacionada à fase micelial do desenvolvimento de *P. ostreatus*, uma vez que a determinação também foi realizada a partir do micélio, com aproximadamente duas semanas de idade. A fase de desenvolvimento micelial tem duração indeterminada, pois como já descrito no item 3.2.2, as condições para o desenvolvimento micelial e para a frutificação são diferentes.

5.1.2 Massa do basidioma fresco e número de cachos

Em relação aos valores de massa média (g) produzida por unidade (Figura 13), não houve interação significativa entre linhagem e inóculo, sendo as diferenças significativas aplicadas a cada fator separadamente. A linhagem SB obteve o valor médio de 513 g, superior estatisticamente às linhagens MB e CP3, com valores de 371 g e 310 g, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. Os valores médios segundo inóculos para os inóculos I1, I2 e I3 foram de 404 g, 379 g e 471 g, não diferindo estatisticamente entre estes, porém o inóculo I4 apresentou o valor médio de 338 g, diferindo estatisticamente dos demais.

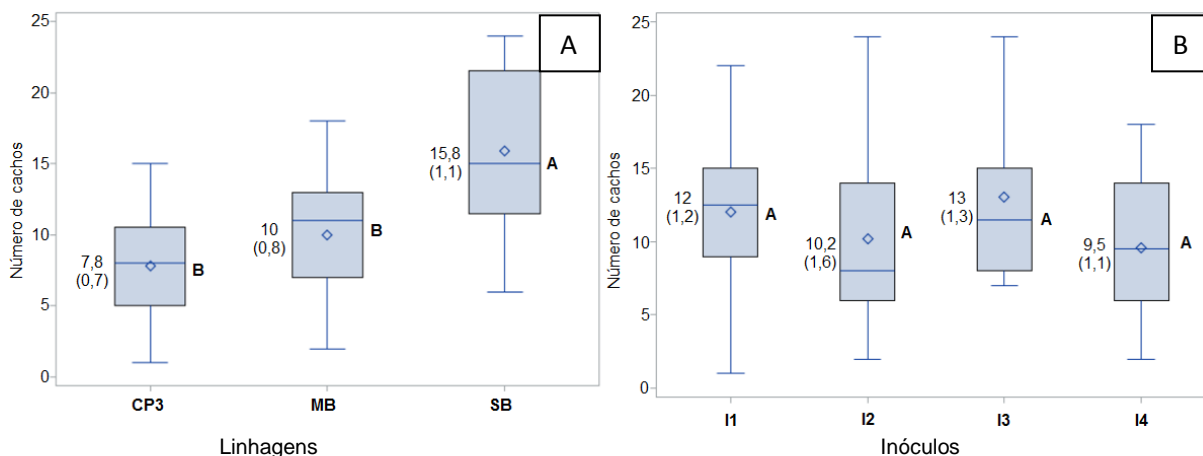
Figura 13 – Massa média (g) de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) segundo linhagens; (B) segundo inóculos.



CP3, MB, SB= Linhagens de *Pleurotus ostreatus*; I1, I2, I3, I4= Inóculos; Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de 5% de significância.

Quanto ao número médio de cachos por unidade (Figura 14), novamente não houve interação significativa entre inóculo e linhagem. A linhagem SB produziu uma média de 15,8 cachos por unidade, superior às linhagens MB e CP3, com valores de 10 e 7,8 cachos, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. Em relação aos valores segundo inóculos, não houve diferença estatística entre estes, com o valor de 12 para o inóculo I1, 10,2 para o I2, 13 para o I3 e 9,5 para o I4, sugerindo que as repicagens sucessivas não afetam o número de cachos.

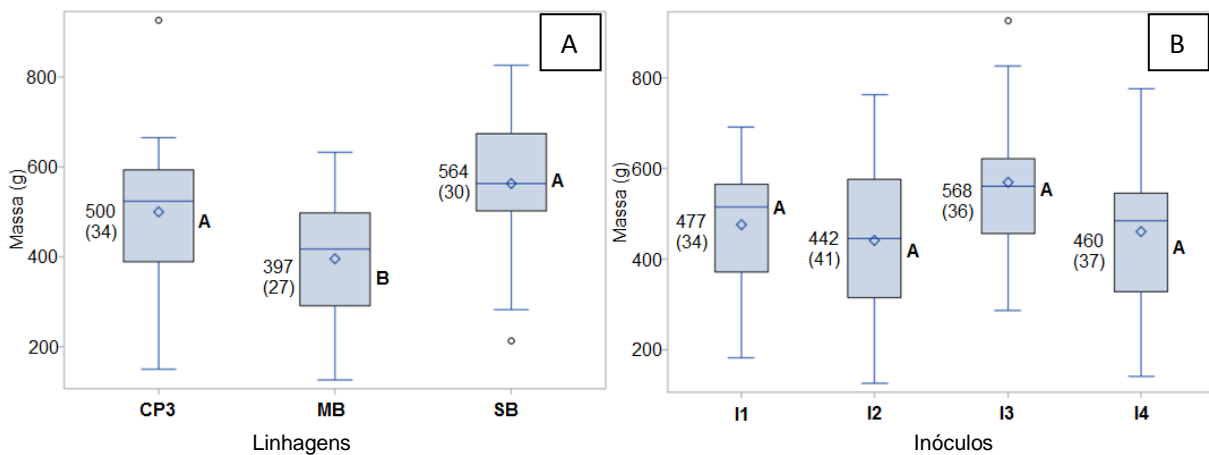
Figura 14 – Número médio de cachos de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) Segundo linhagens; (B) Segundo Inóculos



CP3, MB, SB= Linhagens de *Pleurotus ostreatus*; I1, I2, I3, I4= Inóculos; Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de 5% de significância.

Em relação aos valores de massa total média (g) por unidade (Figura 15), não houve interação significativa entre linhagem e inóculo. As linhagens SB e CP3 não diferiram estatisticamente entre si, com valores de 564 g e 500 g, respectivamente, valores superiores aos da linhagem MB, que obteve 397 g, diferindo das demais. Não houve diferença estatística entre inóculos, com valores de 477 g para o I1, 442 g para o I2, 568 g para o I3 e 460 g para o I4.

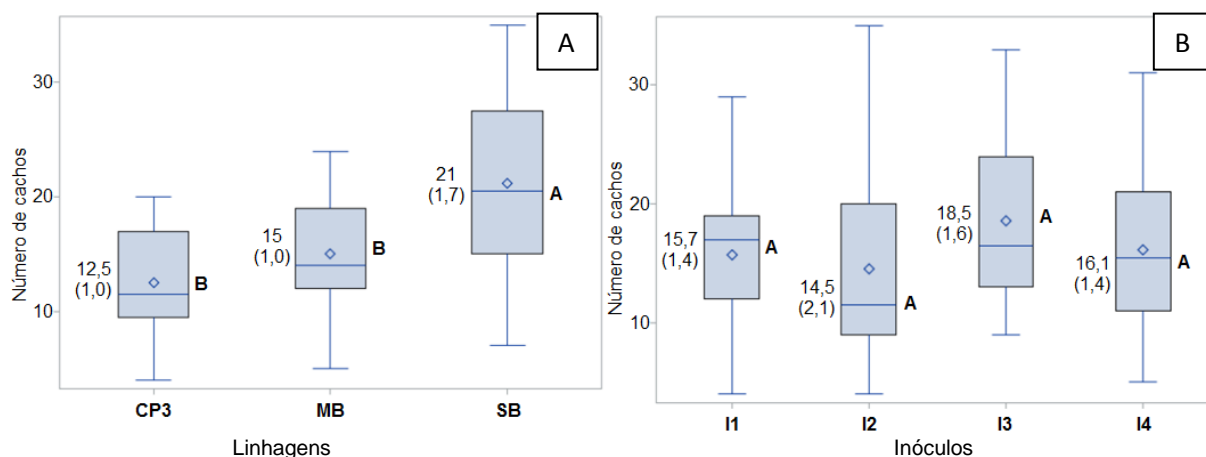
Figura 15 – Massa total média (g) de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) Segundo linhagens; (B) Segundo inóculos.



CP3, MB, SB= Linhagens de *Pleurotus ostreatus*; I1, I2, I3, I4= Inóculos; Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de 5% de significância.

Quanto ao número total médio de cachos por unidade (Figura 16), a linhagem SB obteve o valor de 21 cachos por unidade, diferindo estatisticamente das linhagens MB e CP3, que obtiveram valores de 15 e 12,5 cachos, respectivamente. Não houve diferença significativa entre inóculos, com valores de 15,7 para o I1, 14,5 para o I2, 18,5 para o I3 e 16,1 para o I4. Não houve interação significativa entre linhagem e inóculo.

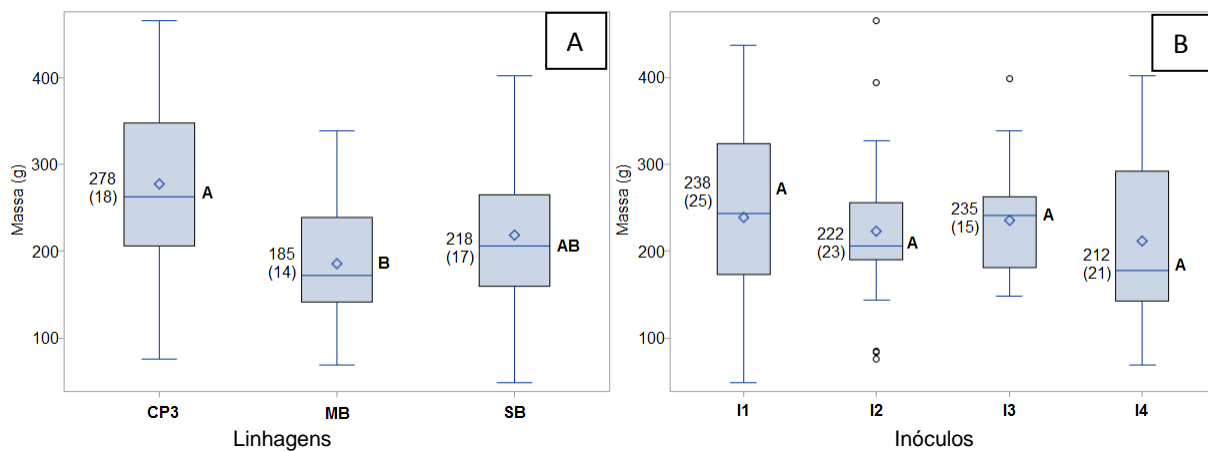
Figura 16 – Número total médio de cachos de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) Segundo linhagens; (B) Segundo inóculos.



CP3, MB, SB= Linhagens de *Pleurotus ostreatus*; I1, I2, I3, I4= Inóculos; Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de 5% de significância.

Quanto à massa média (g) por cacho por unidade (Figura 17), houve diferenças significativas entre linhagens, sendo que a linhagem CP3 apresentou os maiores cogumelos, com um valor de 278 g por cacho, seguida da linhagem SB, com um valor de 218 g por cacho, não diferindo da linhagem CP3, e a linhagem MB apresentou os menores cogumelos, com um valor de 185 g por cacho, não diferindo da linhagem SB, mas diferindo da linhagem CP3. Os valores de massa média (g) por cacho segundo inóculos não diferiram estatisticamente entre si, com o valor de 238 g por cacho para o I1, 222 g para o I2, 235 g para o I3 e 212 g para o I4, sugerindo que as repicagens sucessivas não afetam o tamanho dos cachos. Não houve interação significativa entre linhagem e inóculo.

Figura 17 – Massa média (g) por cacho de cogumelos. Erro padrão da média entre parênteses. (A) Segundo linhagens; (B) Segundo inóculos.



CP3, MB, SB= Linhagens de *Pleurotus ostreatus*; I1, I2, I3, I4= Inóculos; Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de 5% de significância.

A diferença de produtividade entre linhagens da mesma espécie é bem documentada na literatura. Na espécie *Pleurotus ostreatus*, Curvetto et al. (2002) constatou diferenças de produtividade entre cinco linhagens, fato também observado por MoonMoon et al. (2010) em três linhagens de *Pleurotus eryngii* e por Zharare et al. (2010) em duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju*, pois cada linhagem possui características genéticas próprias (CHANG e MILES, 2004).

Marino (2008) avaliou a produtividade do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing após repicagens sucessivas em placas em diferentes meios de cultura enriquecidos e constatou que não houveram diferenças de produtividade em função do meio de cultura utilizado e das repicagens, embora as repicagens sucessivas e meio enriquecido tenham favorecido o crescimento do micélio nas placas. Tais resultados contrastam com os do presente estudo, pois constatou-se impacto na produtividade. Todavia, a espécie utilizada neste estudo, *Pleurotus ostreatus*, é diferente da utilizada pelo referido autor, ainda que pertencente ao mesmo gênero, bem como as repicagens sucessivas do presente estudo não foram realizadas em placas, mas em grãos.

De acordo com Pereira (2015), as repicagens sucessivas acarretam em uma perda de vigor e eventual inviabilização do fungo em função da falta de recombinação genética e crescimento exponencial do micélio. O mesmo afirma que, embora o número de repicagens máximo seja diferente para cada espécie, recomenda-se um limite de dez repicagens em placa para fins comerciais, sobretudo

nas espécies *Morchella esculenta*, *Lentinula edodes* e *Stropharia rugosoannulata*, pois acima deste número as espécies passam a apresentar mutações, afetando a produtividade, sendo necessário confeccionar novamente as matrizes a partir do cogumelo fresco. Por esta lógica, a queda na produtividade no presente estudo pode estar relacionada com possíveis mutações, sendo necessários estudos empregando técnicas moleculares para avaliar a ocorrência de alterações no genoma das linhagens utilizadas.

Camelini (2010) reforça o argumento de que as repicagens sucessivas de fungos propiciam mutações e perda de vigor, e sugere que outras técnicas sejam utilizadas para a manutenção de uma matriz, como o armazenamento em água esterilizada ou óleo mineral. A autora complementa que, além da perda de vigor, as frequentes manipulações relacionadas às repicagens sucessivas aumentam as chances de contaminação.

Estes estudos, porém, foram realizados em placas, a literatura carece de estudos de repicagens sucessivas em substrato, sobretudo com a espécie *Pleurotus ostreatus*.

5.1.3 Caracterização química dos substratos

Os resultados da caracterização química dos substratos inicial e final estão representados nas Tabelas 2 e 3. O aumento no teor de nitrogênio observado na maioria dos tratamentos pode ser decorrente da produção de ácidos orgânicos pelo fungo (CHANG e MILES, 2004). O fungo degrada a matéria orgânica do substrato por meio da ação enzimática, resultando em energia para o seu desenvolvimento, CO₂ e água, portanto a diminuição no teor de matéria orgânica e de carbono é explicada pela liberação de CO₂ (ZANON, 2015).

O aumento da umidade pode estar relacionado com o processo de pasteurização, pois utiliza-se calor úmido, parte da umidade pode ter sido absorvida pelo substrato durante este processo. Segundo Chang e Miles (2004), ocorrem alterações no valor médio do pH durante o cultivo devido à produção de metabólitos fúngicos, que alteram a concentração de íons de hidrogênio. A relação C/N ao final da fase II para substratos compostos de resíduos agroindustriais como palhas, após compostagem e pasteurização, deve ser em torno de 25/1 a 50/1, que deve cair para

em torno de 16/1 a 17/1 após o empacotamento do substrato (EIRA, 2003). Os valores da relação C/N do presente experimento estão de acordo com a literatura.

Tabela 2 - Caracterização química do substrato inicial, médias de duas repetições. Erro padrão entre parênteses.

Fases	N (%)	MO (%)	C (%)	C/N	Umidade (%)	pH
Fase I	0,15 (0,03)	22,5 (0,50)	12,5 (0,28)	84/1 (16/1)	74 (0,58)	7,0 (0,16)
Fase II	0,52 (0,19)	26,7 (4,67)	14,8 (2,52)	30/1 (6/1)	67 (6,99)	7,8 (0,00)

N(%)= porcentagem de nitrogênio; MO(%)= porcentagem de matéria orgânica; C(%)= porcentagem de carbono; C/N= relação entre carbono e nitrogênio.

Tabela 3 - Caracterização química dos substratos exauridos, médias de duas repetições. Erro padrão entre parênteses.

Linagem	Inóculo	N (%)	MO (%)	C (%)	C/N	U (%)	pH
CP3	I1	0,69 (0,03)	19,9 (0,23)	11,0 (0,13)	16/1 (1/1)	70,2 (1,23)	6,1 (0,3)
		I2	0,47 (0,09)	14,7 (2,28)	8,1 (1,26)	17/1 (1/1)	78,1 (2,75)
	I3	0,52 (0,01)	18,6 (1,58)	10,3 (0,88)	19,5/1 (1,5/1)	72,8 (2,12)	8,7 (0,0)
		I4	0,61 (0,08)	15,8 (1,45)	8,8 (0,80)	15/1 (0)	75,6 (2,98)
SB	I1	0,66 (0,05)	17,8 (0,77)	9,9 (0,43)	14,5/1 (0,5/1)	70,7 (1,75)	7,9 (0,7)
		I2	0,39 (0,00)	13,0 (0,29)	7,2 (0,16)	18/1 (0)	78,0 (0,30)
	I3	0,47 (0,04)	15,9 (1,66)	8,8 (0,92)	19/1 (0)	74,7 (2,63)	8,5 (0,0)
		I4	0,58 (0,04)	18,3 (1,34)	10,1 (0,74)	17/1 (0)	69,1 (2,52)
MB	I1	0,52 (0,04)	15,6 (0,62)	8,6 (0,34)	16,5/1 (0,5/1)	74,8 (0,60)	8,7 (0,1)
		I2	0,46 (0,01)	14,6 (0,00)	8,1 (0,00)	17,5/1 (0,5/1)	76,3 (0,38)
	I3	0,50 (0,00)	16,2 (0,07)	9,0 (0,03)	18/1 (0)	73,4 (0,55)	8,9 (0,0)
		I4	0,60 (0,01)	17,5 (0,52)	9,7 (0,29)	15,5/1 (0,5/1)	70,7 (0,39)

CP3, MB, SB= Linhagens; I1, I2, I3, I4= Inóculos; N(%)= porcentagem de nitrogênio; MO(%)= porcentagem de matéria orgânica; C(%)= porcentagem de carbono; C/N= relação entre carbono e nitrogênio; U (%) = umidade.

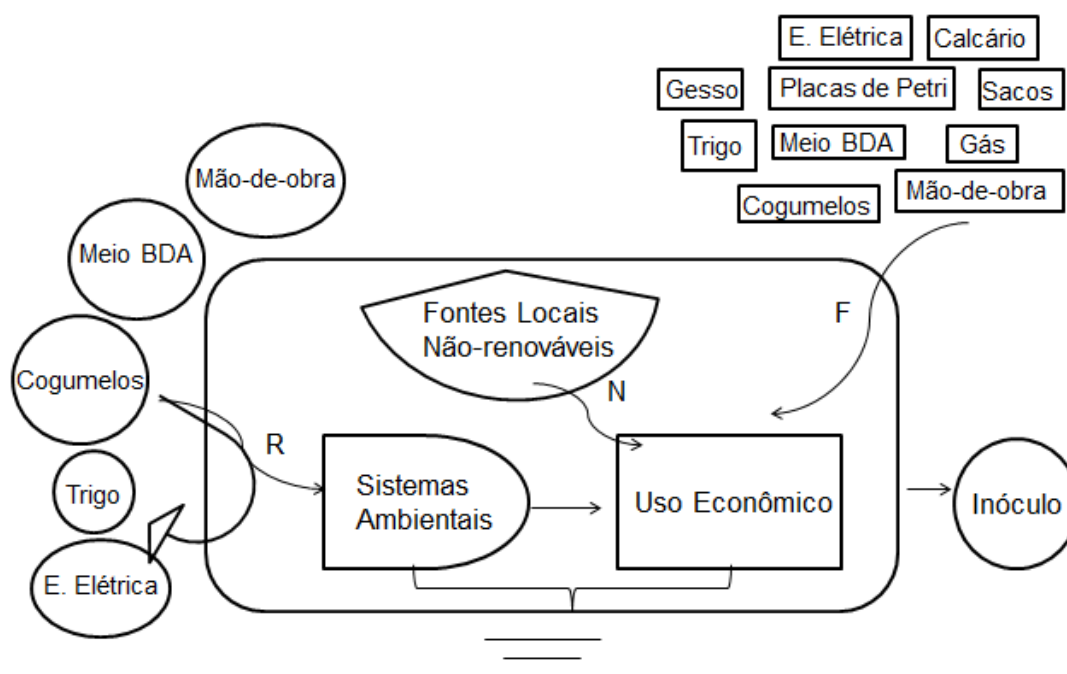
Observa-se nos valores referentes à caracterização química dos substratos exauridos que todos os tratamentos apresentaram comportamento semelhante no substrato, portanto os dados sugerem que as repicagens sucessivas não influenciam este comportamento.

Zanon (2015) avaliou a produtividade de duas linhagens de *P. ostreatus* em substrato padrão (palha de cana-de-açúcar suplementada com farelo de trigo) em diferentes tempos de compostagem (2, 4 e 6 dias), onde observou diferenças na produtividade e na caracterização química do substrato, tanto em função da linhagem quanto em função do tempo de compostagem.

5.2 Análise emergética

A partir do itinerário técnico, foi elaborado o diagrama de fluxos do sistema produtivo (Figura 18) e o cálculo dos fluxos de energia (Tabela 4).

Figura 18 – Diagrama de fluxos energéticos do sistema de produção de inóculo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo Barrella (2004), os diagramas, confeccionados com simbologia própria da metodologia emergética, representam os fluxos de entrada e saída e tem

a função de ajudar na compreensão dos fluxos energéticos e de suas relações com o meio ambiente e a economia.

Tabela 4 - Cálculo dos fluxos de energia.

Nota	Item	Valor numerico	Unidade*	Transformidade (seJ/Unidade)**	Fluxo de energia solar equivalente (E+15 seJ/ano)	Em\$/ano
1	Cogumelos (R)	1,97E+06	J/ano	7,12E+06	1,40E+13	4,36E+00
2	Cogumelos (F)	9,56	U\$/ano	3,22E+12	3,08E+13	9,56E+00
3	Meio BDA (R)	13763568	J/ano	4186	5,76E+10	1,79E-02
4	Meio BDA (F)	73,90	U\$/ano	3,22E+12	2,38E+14	7,39E+01
5	Placas de Petri (N)	1,8	Kg/ano	4,30E+12	7,74E+12	2,40E+00
6	Placas de petri (F)	18,68	U\$/ano	3,22E+12	6,01E+13	1,87E+01
7	Grãos de trigo (R)	1,15E+08	J/ano	68000	7,84E+12	2,43E+00
8	Grãos de trigo (F)	1.603,35	U\$/ano	3,22E+12	5,16E+15	1,60E+03
9	Calcário dolomítico (N)	64,35	Kg/ano	1,00E+12	6,44E+13	2,00E+01
10	Calcário dolomítico (F)	19,93	U\$/ano	3,22E+12	6,42E+13	1,99E+01
11	Gesso (N)	154,44	Kg/ano	3,29E+11	5,08E+13	1,58E+01
12	Gesso (F)	39,54	U\$/ano	3,22E+12	1,27E+14	3,95E+01
13	Sacos de poliprop. (N)	87,48	Kg/ano	4,30E+12	3,76E+14	1,17E+02
14	Sacos de poliprop. (F)	1.549,99	U\$/ano	3,22E+12	4,99E+15	1,55E+03
15	Energia elétrica (R)	3,17E+08	J/ano	165000	5,23E+13	1,62E+01
16	Energia elétrica (F)	9.251,31	U\$/ano	3,22E+12	2,98E+16	9,25E+03
17	Gás (N)	4,55E+11	Kg/ano	48000	2,18E+16	6,78E+03
18	Gás (F)	18.976,23	U\$/ano	3,22E+12	6,11E+16	1,90E+04
19	Mão-de-obra (F)	69.268,40	U\$/ano	3,22E+12	2,23E+17	6,93E+04
20	Mão-de-obra (R)	3,51E+08	J/ano	4,00E+05	1,40E+14	4,36E+01
21	Maquinário	266,3	Kg/ano	6,70E+12; 4,30E+12	1,76E+15	5,48E+02
	Total				3,49E+17	1,08E+05
	Fluxos de Saída					
22	Inóculo (R)	243000	Kg/ano	1,48E+12	3,60E+17	1,12E+05
23	Inóculo (F)	3,02E+05	U\$/ano	3,22E+12	9,71E+17	3,02E+05
	Total				1,33E+18	4,13E+05

*Para valores em dólar, foi adotada a cotação do dia 25/01/2019 do Banco Central.

** Valores das transformidades obtidos em:

1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 – Emergy Society Database (2019).

3, 20 – Calculado a partir do Manual de Cálculo de Emergia (ORTEGA et al., 2002)

5, 7, 9, 13, 15, 17, 19, 21 – Tabela de Transformidades do Manual de Cálculo de Emergia (Ortega et al., 2002).

11 – Pulselli et al, 2007.

Em relação aos índices emergéticos, obteve-se um rendimento emergético (EYR) de 1,30. Segundo Barrella (2004), valores de EYR menores que 2 representam produtos de consumo ou etapas de transformação de energia. Considerando que o inóculo será utilizado posteriormente no cultivo de cogumelos, o valor encontrado está de acordo com o descrito pelo autor. O valor obtido de investimento emergético (EIR) foi de 3,37, o que indica um alto investimento de entradas pagas, sendo considerados altos os valores acima de 1. O valor obtido para carga ambiental (ELR) foi de 3,67, sendo que valores entre 3 e 10 são interpretados como sendo uma atividade de impacto ambiental moderado (BARRELLA, 2004).

O valor de índice de sustentabilidade (SI) foi de 0,35, indicativo de um processo não sustentável segundo Barrella (2004). Porém, Ortega et al. (2002) argumentam que as despesas emergéticas em relação a inoculantes são pequenas quando comparadas aos benefícios que trarão ao sistema produtivo. Por se tratar de uma etapa altamente industrializada do cultivo de cogumelos, obtém-se valores baixos de sustentabilidade, sendo recomendadas futuras análises envolvendo todas as etapas do cultivo. Zhang et al. (2012) compararam emergeticamente quatro sistemas de produção agrícolas: cultivo de milho, piscicultura em lagoa, criação de patos e cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus*. Os autores obtiveram um índice de sustentabilidade de 0,38 para o cultivo deste cogumelo, acima da criação de patos (0,11), porém abaixo da plantação de milho (0,45) e da piscicultura (3,98).

A sustentabilidade envolve aspectos ambientais, sociais e econômicos. Ronchesel (2017) avaliou a adoção do marketing verde e de práticas socioambientais pelos produtores de cogumelos do Estado de São Paulo, constatando um crescente interesse por parte dos fungicultores em práticas de responsabilidade socioambiental, como a certificação orgânica, reuso da água, redução do uso de energia, utilização de embalagens recicláveis, entre outros.

Quanto ao aspecto econômico, o cultivo de cogumelos pode ser muito rentável. Lima (2017) avaliou a viabilidade econômica do cultivo do cogumelo *Agaricus blazei*, obtendo um índice de lucratividade de 87,54%, uma razão benefício/custo de 8,03 e lucro operacional de R\$ 637.779,87/ano, sendo a ótima viabilidade econômica deste produto em função do preço de venda do mesmo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sugerem que até a quinta repicagem do micélio de *P. ostreatus* (tratamentos I3 de todas as linhagens), não há perda significativa na produtividade, segundo os parâmetros de perda de matéria orgânica, eficiência biológica, massa do basidima fresco e número de cachos, sendo as diferenças de produtividade relacionadas às linhagens. A linhagem SB mostrou os melhores resultados de produtividade em massa (g), as linhagens MB e CP3 não diferiram quanto à produtividade. A linhagem CP3 resultou em cogumelos maiores que as demais.

Os dados de atividade enzimática e caracterização química do substrato exaurido sugerem que os inóculos apresentaram comportamento semelhante no substrato, independentemente do número de repicagens.

Novos estudos devem ser realizados, com um número maior de repicagens sucessivas e de linhagens, para a confirmação do número possível de repicagens sucessivas viáveis em termos de produtividade.

Os resultados da análise emergética indicam que a etapa de produção de inóculo de cogumelos não tem um índice alto de sustentabilidade, sendo recomendadas futuras análises envolvendo todas as etapas do cultivo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, S. M.; HAMID, H. A.; FADEL, M. Edible mushrooms: a green biotechnology and great nutritional value for improving human health. **EPH-International Journal of Science And Engineering**, v. 1, n. 8, p. 01-17, 2015.
- AHLAWAT, O. P.; RAI, R. D; VERMA, R.N. Management of bacterial contamination of spawn by physic-chemical methods. **Mushroom Research**, v. 6, n. 1, p. 15-20, 1997.
- AHMED, S. A.; KADAM, J. A.; MANE, V. P.; PATIL, S. S.; BAIG, M. M. V. Biological efficiency and nutritional contents of *Pleurotus florida* (Mont.) Singer cultivs. **Nature and science**, v. 7, n. 1, p. 44-48, 2009.
- AKINFEMI, A.; ADU, O. A.; DOHERTY, F. Conversion of sorghum stover into animal feed with white-rot fungi: *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 11, p. 1706-1712, 2010.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, 2007.
- AMBALIKA, G.; PRASHANT, S. Comparative study of different grains on spawn development of *Pleurotus sajor caju* (Fr.) Singer. **International Journal of Plant Sciences (Muzaffarnagar)**, v. 9, n. 1, p. 190-192, 2014.
- ANPC. ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE COGUMELOS. **Cogumelos**. Disponível em: <<https://www.anpccogumelos.org/cogumelos>>. Acesso em: 22 Dez. 2018.
- BALDRIAN, P. et al. Small-scale distribution of extracellular enzymes, fungal, and bacterial biomass in *Quercus petraea* forest topsoil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 7, p. 717-726, 2010.
- BARRELLA, F. A. **Ferramenta gráfica para análise emergética: avaliação ambiental etomada de decisão**. 2004. 134 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Paulista – UNIP, São Paulo, 2004.
- BELLETTINI, M. B.; FIORDA, F. A.; MAIEVES, H. A.; TEIXEIRA, G. L.; ÁVILA, S.; HORNUNG, P. S.; MACCARI JÚNIOR, A.; RIBANI, R. H. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2016.
- BERNARDI, E.; DONINI, L. P.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Utilização de diferentes substratos para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 38, n. 1, 2007.

BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Aproveitamento de resíduo de curtume como suplemento do cultivo de *Pleurotus ostreatus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 2, p. 243-256, 2008.

BERTALANFFY, L. V. The theory of open systems in physics and biology. **Science**, v. 111, n. 2872, p. 23-29, 1950.

BONOMINI, F. M.; WISBECK, E.; GERN, R. M. M. Produção de enzimas por *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus djamor*. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 7, n. 14, 2017.

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, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAMELINI, C. M. **Produção de biomassa do fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólidos e submerso para obtenção de polissacarídeos bioativos**. 2010. 215 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CAMPBELL, D. E. Emergy baseline for the Earth: A historical review of the science and a new calculation. **Ecological Modelling**, v. 339, p. 96-125, 2016.

CHANG, S. T. **Training manual on mushroom cultivation technology**. United Nations-Asian And Pacific Centre For Agricultural Engineering And Machinery (UN-APCAEM), Beijing, China, 2009.

CHANG, S. T.; MILES, G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2a Ed., Boca Raton: CRC press, 2004, 480 p.

CHATTERJEE, S.; SARMA, M. K.; DEB, U.; STEINHAUSER, G.; WALTHER, C.; GUPTA, D. K. Mushrooms: from nutrition to mycoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 24, p. 19480-19493, 2017.

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

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 3, p. 263-8, 1991.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource technology**, v. 112, p. 270-274, 2012.

CURVETTO, N. R.; FIGLAS, D.; DEVALIS, R.; DELMASTRO, S. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls

supplemented with N–NH₄⁺ and/or Mn (II). **Bioresource Technology**, v. 84, n. 2, p. 171-176, 2002.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 795-803, 2010.

EIRA, A.F. **Cultivo do "cogumelo-do-sol" (*Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 203p.

EMERGY SOCIETY DATABASE. **Access to the Emergy Society's Database**. Disponível em: <<http://www.emergysociety.com/emergy-society-database/>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

ERKEL, E. I. The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **J Food Agric Environ**, v. 7, p. 841-844, 2009.

FANADZO, M.; ZIREVA, D. T.; DUBE, E.; MASHINGAIDZE, A. B. Evaluation of various substrates and supplements for biological efficiency of *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 19, p. 2756-2761, 2010.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Sistema FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 08 Jan 2019.

FERRAZ, J. M. G. **As dimensões da sustentabilidade e seus indicadores**. Embrapa Meio Ambiente- Capítulo em livro científico (ALICE), 2003.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOMES, D. et al. Censo paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2016.

GOYAL, M.; SONI, G. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 10, p. 1131-1136, 2011.

IANDOLO, D. et al. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 40-51, 2011.

IOSSI, M. R.; COBOS, J. D. V.; ALEGRIA, F. J. G.; ZIED, D. C. *Pleurotus* spp. cultivation on *Brachiaria* sp. straw treatment with alkaline water. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 64-67, 2018.

KALAČ, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 2, p. 209-218, 2013.

KUMAR, S. **Evaluation of substrates for quality spawn production of mushrooms**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura – Patologia de Plantas) – SKUAST – Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology of Jammu, Chatha, Jammu, 2015.

LIMA, F. S. **Custo de produção e lucratividade do cogumelo *Agaricus blazei* nos padrões da agricultura sustentável: estudo de caso**. 2017. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2017.

LIU, S. R.; ZHANG, W. R.; KUANG, Y. B. Production of stalk spawn of an edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in liquid culture as a suitable substitute for stick spawn in mushroom cultivation. **Scientia Horticulturae**, v. 240, p. 572-577, 2018.

MARIANO, M. V. et al. Avaliação em emergia como ferramenta de gestão nos parques urbanos de São Paulo. **Gestão & Produção**, São Carlos, v. 22, n. 2, p. 443-458, 2015.

MARINO, R. H. Produtividade do *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. em função dos métodos de isolamento e produção de inoculantes. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 4, n. 1, p. 2, 2008.

MARINO, R. H.; ABREU, L. D.; MESQUITA, J. B.; RIBEIRO, G. T. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arq. Inst. Biol**, v. 75, n. 1, p. 29-36, 2008.

MATIJE, V. M.; SCHEIDT, G. M.; CANGUSSU, A. R.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; AGUIAR, R. W. S.; PORTELLA, A. C. F. Use of rice husk supplemented with watermelon residue for the production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus*. **International Journal of Development Research**, v. 7, n. 11, 2017.

MATUTE, R. G.; FIGLAS, D.; CURVETTO, N. *Agaricus blazei* production on non-composted substrates based on sunflower seed hulls and spent oyster mushroom substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1331-1339, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos**. Brasília – DF, 2007, 220 p.

MOONMOON, M.; UDDIN, N.; AHMED, S.; SHELLY, N. J.; KHAN, A. Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh. **Saudi journal of biological sciences**, v. 17, n. 4, p. 341-345, 2010.

MUSTAFA, A. M.; POULSEN, T. G.; SHENG, K. Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 180, p. 661-671, 2016.

NARAIAN, R.; SAHU, R. K.; KUMAR, S.; GARG, S. K.; SINGH, C. S.; KANAUIA, R. S. Influence of different nitrogen rich supplements during cultivation of *Pleurotus florida* on corn cob substrate. **The Environmentalist**, v. 29, n. 1, p. 1, 2009.

NARH, D. L. et al. The efficacy of sorghum and millet grains in spawn production and carpophore formation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr) Kummer. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 3, p. 1092-1097, 2011.

NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. W. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society Series A**, v. 135, n. 3, p. 370–384, 1972..

ODUM, H.T. **Environmental Accounting** – EMERGY and Environmental Decision Making. Ed. John Wiley & Sons Ltd., 1996, 370p.

ORTEGA, E. **Aplicação do Conceito de Emergia na Contabilidade de Gestão Ambiental**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CUSTOS, 17, 2010, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: ABCustos, 2010. p. 1 - 15.

ORTEGA, E. **Contabilidade e diagnóstico de sistemas usando os valores dos recursos expressos em emergia**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia de Alimentos, 2002.

ORTEGA, E; MILLER, M; ANAMI, H; CCOPA, E; BESKOW, P.R; MARGARIDO. L.A; GUIMARÃES, A.K. **Manual de Cálculo de Emergia**. Laboratório de Engenharia Ecológica e Informática Aplicada. FEA, Unicamp. Campinas, SP Brasil. Colaboração: UFSCAR – DTAISER – ARARAS, 2002. Disponível em: <
<http://www.unicamp.br/fea/ortega/curso/manual.htm>>. Acesso em: 01 Ago. 2017.

ORTIZ, G.; COLAVOLPE, M. B.; ALBERTO, E. Artificial spawn generation based on alginate encapsulated mycelium as inoculum for mushroom cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 34, p. 1776-1783, 2017.

PEREIRA, D. M. **Obtenção e avaliação de linhagens híbridas e desenvolvimento dos processos de inóculos líquidos para cultivo axênico de *Lentinula edodes* (berk.) pegler**. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; ZERVAKIS, G. Monitoring of mycelium growth and fructification of *Lentinula edodes* on several agricultural residues. **Mushroom biology and mushroom products. UAEM, Cuernavaca**, p. 279-287, 2002.

PULSELLI, R. M.; SIMONCINI, E.; PULSELLI, F. M.; BASTIANONI, S. Emergy analysis of building manufacturing, maintenance and use: Em-building indices to evaluate housing sustainability. **Energy and buildings**, v. 39, n. 5, p. 620-628, 2007.

RAJARATHNAM, S.; BANO Z. *Pleurotus* Mushrooms; part 3: Biotransformation of natural lignocellulosic waste: commercial applications and implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n 1, p. 31-113, 1989.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 93, 2018.

REIS, F. S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 191-197, 2012.

RONCHESEL, M. **Marketing verde e práticas socioambientais de produtores de cogumelos no estado de São Paulo**. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2017.

ROSSI, I. H. et al. Supplementation of sugarcane bagasse with rice bran and sugarcane molasses for shiitake (*Lentinula edodes*) spawn production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 61-65, 2003.

ROYSE, D. J. 2003. **Cultivation of Oyster Mushrooms**. Pennsylvania State University Press, Pennsylvania.

SALES-CAMPOS, C.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. **Interciencia**, v. 35, n. 3, 2010.

SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1321-1337, 2010.

SHARMA, S.; YADAV, R. K. P.; POKHREL, C. P. Growth and yield of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates. **Journal on New Biological Reports**, v. 2, n. 1, p. 03-08, 2013.

SILVEIRA, M. L. L.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 858-862, 2008.

SNEDECOR, G. W. E.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1972.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

TAVARES, A. C. D. **Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* INPA 1467: Produção, composição centesimal e mineral**. 2015. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

TISDALE, T. E.; MIYASAKA, S. C.; HEMMES, D. E. Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on wood substrates in Hawaii. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 201, 2006.

TÜRKEKUL, İ.; GÜLMEZ, Y. Propolis: An Enrichment Material for Mycelium Development of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Natural Resources**, v. 7, n. 03, p. 103, 2016.

VALADARES, F. L. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico**. 2013. 122 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. **International journal of microbiology**, v. 2015, 2015.

VARGAS, H.; MARTINS, J. **Introdução ao Conceito de Energia**. Anais Eletrônico IX EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar Nov. 2015, n. 9, p. 4-8. Disponível em: <http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2015/anais/Jennifer_Martins_Waldhelm.pdf>. Acesso em: 01 Ago. 2017.

VENTURA, M. M. O estudo de caso como modalidade de pesquisa. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 20, n. 5, p. 383-386, 2007.

VIANA, S. R. F. **Influência de diferentes condições de preparo do spawn na capacidade de aumento de produtividade de *Pleurotus ostreatus***. 2018. 65 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018.

VIEIRA, F. R.; ANDRADE, M. C. N. Optimization of substrate preparation for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation by studying different raw materials and substrate preparation conditions (composting: phases I and II). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 190, 2016.

WESTFALL, P. H.; TOBIAS, R. D.; WOLFINGER, R. D. **Multiple comparisons and multiple tests using SAS**. SAS Institute, 1999, 416 p.

YOUNG, L. S. et al. Cultivable mushroom growth-promoting bacteria and their impact on *Agaricus blazei* productivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 6, p. 636-644, 2013.

ZANON, A. R. **Influência da fase I de compostagem e da esterilização do composto no cultivo de duas linhagens do *Pleurotus ostreatus* var. florida**. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Energia na Agricultura) –

Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2015.

ZHANG, L. X.; SONG, B.; CHEN, B. Emergy-based analysis of four farming systems: insight into agricultural diversification in rural China. **Journal of Cleaner Production**, v. 28, p. 33-44, 2012.

ZHARARE, G. E.; KABANDA, S. M.; POKU, J. Z. Effects of temperature and hydrogen peroxide on mycelial growth of eight *Pleurotus* strains. **Scientia horticulturae**, v. 125, n. 2, p. 95-102, 2010.