
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA APLICADA

**Cultivo de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* em
bagaço de cana-de-açúcar**

Letícia Gomes de Souza

Dissertação/tese apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus de
Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Aplicada

Março

2016

Cultivo de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* em bagaço de cana-de-açúcar

Leticia Gomes de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista, Campus de Rio Claro, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
– Microbiologia Aplicada.

Rio claro

Março-2016

589.2 Souza, Leticia Gomes de
S729c Cultivo de Lentinula edodes e Pleurotus ostreatus em
bagaço de cana-de-açúcar / Leticia Gomes de Souza. - Rio
Claro, 2016
58 f. : il., figs., gráfs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Fungos. 2. Enriquecimento de bagaço de cana. 3.
Bagaço de cana termo hidrolisado. I. Título.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo ingresso e conclusão deste trabalho. Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia por ceder espaço para realização das análises do projeto. Aos colegas de laboratório, Nair, Eduardo, Lú, Inês, Marcio Ramos, Marcio Rosin, Oscar, Amanda, Mariane, Zito, que tantas vezes me ajudaram e principalmente por constituir um ambiente tão alegre e agradável de trabalho. Muito mais do que companheiros de trabalho tornaram-se amigos.

Agradeço a Profa. Dra. Dejanira por ter aberto as portas mais uma vez e ter dado uma incrível oportunidade de me tornar mestre. A sua atenção e dedicação sempre estiveram presentes ao longo desses anos. Sempre compreensiva e carinhosa. A Dilza, ou “segunda mãe”, como sempre digo, por me socorrer inúmeras vezes, sempre alegre e disposta. Uma mulher incrível que admiro muito e sigo como exemplo. Ao Eduardo Marin Morales que com toda a paciência do mundo me ensinou a fazer os ensaios que precisava e posteriormente me ajudou na interpretação dos resultados e escrita da dissertação sempre com bom humor. Seus trabalhos e personalidade certamente são uma inspiração tanto no âmbito profissional como pessoal. Ao Tácio e Luciana que me ensinaram a parte de estatística.

Aos meus pais, Elza e Mario, que me apoiaram imensamente durante essa jornada, sempre me incentivando me fazendo a creditar que dando o meu melhor é possível conquistar todos os meus sonhos. Eles são um grande exemplo em minha vida de pessoas que lutaram e conquistaram seus objetivos. Agradeço também a todos os amigos e amigas, Abigail, Lídia, Larissa e Laryssa, Luá e outros que me apoiaram nesses anos e que possibilitaram a execução deste trabalho oferecendo tanto suporte emocional quanto abrigo para que eu pudesse realizar o trabalho e as disciplinas. Sem esse apoio esse trabalho não seria possível. Ao Guilherme, que foi meu companheiro em toda essa jornada, sendo amoroso e compreensivo, dando apoio e me estimulando em todo esse percurso.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP –, da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – e do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCTI. Sem esse programa a viabilidade deste projeto não seria possível.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	1
1	OBJETIVOS	3
1.1	Objetivos gerais	3
1.2	Objetivos específicos	3
3	Revisão da Literatura	4
3.1	Produção de bagaço de cana-de-açúcar	4
3.2	Utilização do bagaço de cana-de-açúcar	5
3.3	Composição do bagaço de cana-de-açúcar	7
3.4	Produção de bagaço de cana-de-açúcar termo explodido	9
3.5	Micro-organismos lignocelulíticos	9
3.5.1	<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	12
3.5.2	<i>Pleurotus ostreatus</i> (shiimeji)	15
3.6	<i>Enterococcus zymogenes</i>	17
3.7	<i>Raphidocelis subcaptata</i>	18
3.8	<i>Daphnia similis</i>	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Material	21
4.1.1	Micro-organismos	21
4.1.2	Obtenção de bagaço de cana termo explodido	21
4.1.3	Equipamentos, vidraria e reagentes	22
4.1.4	Soluções para o teste de qualidade proteica com <i>Enterococcus zymogenes</i>	22
4.2	MÉTODOS	24
4.2.1	Manutenção de cultura dos fungos	24
4.2.2	Preparo dos substratos para a inoculação	24
4.2.3	Pesagem das amostras	25
4.2.4	Quantificação da proteína bruta	26
4.2.5	Quantificação de lipídios nas amostras	27
4.2.6	Avaliação de toxicidade	27
4.2.7	Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) 28	
4.2.8	Avaliação da qualidade proteica pelo método de <i>Enterococcus zymogenes</i>	28
4.2.9	Estatística	30
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO	31

5.1	Seleção do meio de cultivo	31
5.2	Pesagem das amostras	35
5.3	Quantificação da proteína bruta	38
5.4	Quantificação de lipídios nas amostras.....	43
5.5	Avaliação de toxicidade.....	44
5.6	Demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO).....	47
5.7	Qualidade proteica pelo método de <i>Enterococcus zymogenes</i>	48
6	CONCLUSÃO	51
7	BIBLIOGRAFIA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da distribuição da produção de cana de açúcar no território brasileiro (ÚNICA, 2012)	5
Figura 2: Estrutura química da: (A) celulose; (B) hemicelulose; (C) lignina; (D) monômeros da lignina.....	9
Figura 3: Esquema de sistema celulósico (ARO et al., 2005).....	10
Figura 4: (A) Carpóforos de <i>Lentinula edodes</i> em seu habitat natural. (B) Organização do substrato no cultivo na madeira.....	13
Figura 5: (A) <i>Pleurotus ostreatus</i> em seu habitat natural. (B) Carpóforos cultivados em sacos prontos para a colheita.....	16
Figura 6: <i>Raphidocelis subcapitata</i> (Korshikov, 1987)	18
Figura 7: <i>Daphnia similis</i>	19
Figura 8: (A) bagaço de cana termo hidrolisado sem a adição de CaCO_3 ; (B) bagaço de cana termo hidrolisado com a adição de CaCO_3 . Ambos inoculados com <i>Pleurotus ostreatus</i> e com 7 dias de incubação.	31
Figura 9: (A) bagaço de cana termo hidrolisado sem a adição de CaCO_3 ; (B) bagaço de cana termo hidrolisado com a adição de CaCO_3 . Ambos inoculados com <i>Pleurotus ostreatus</i> . e com 7 dias de incubação.	32
Figura 10: (A) 1% de inoculo;(B) 3% de inoculo; (C) 5% de inoculo de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Todos com 7 dias de incubação.....	32
Figura 11: (A) 1% de inoculo;(B) 3% de inoculo; (C) 5% de inoculo;(D) 8% de inoculo;(E) 10% de inoculo de <i>Lentinula edodes</i> , todas com 7 dias de incubação.	33
Figura 12: (A) Substrato de bagaço de cana termo hidrolisado colonizado por <i>Pleurotus ostreatus</i> durante 7 dias; (B) Substrato de bagaço de cana termo hidrolisado colonizado por <i>Pleurotus ostreatus</i> durante 45 dias; (C) Substrato de bagaço de cana termo hidrolisado colonizado por <i>Lentinula edodes</i> durante 7 dias; (D) Substrato de bagaço de cana termo hidrolisado colonizado por <i>Lentinula edodes</i> durante 45 dias:.....	34
Figura 13: Toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> dos bagaços recém produzidos pela indústria e exposto a condições ambientais por 45 dias, antes da colonização fungica.....	45
Figura 14: Análise comparativa da toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> dos bagaços recém produzidos pela indústria (novo) e exposto a condições ambientais por 45 dias (velho), por <i>Lentinula edodes</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i>	45
Figura 15: Análise de Demanda Química de Oxigênio do bagaço de cana termo hidrolisado antes da do tratamento e após a inoculação com <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Lentinula edodes</i> incubados a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	47
Figura 16: Análise de Demanda Bioquímica de Oxigênio do bagaço de cana termo hidrolisado antes do tratamento e após a inoculação com <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Lentinula edodes</i> incubados a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	47
Figura 17: Comparação da qualidade proteica pelo método de <i>Enterococcus zymogenes</i> das amostras de bagaço puro e submetidas ao tratamento comparados com a caseína.	49

RESUMO

O constante crescimento na produção de etanol acarreta em aumento da produção de bagaço de cana-de-açúcar, surgindo necessidade de desenvolver novas formas de aproveitamento deste produto. Sendo assim, o acréscimo de valor agregado no bagaço afim de que seja utilizado em ração animal pode ser uma alternativa economicamente interessante. Este trabalho utilizou *Lentinula edodes* (shiitake) e o *Pleurotus ostreatus* (shimeji) na biotransformação e enriquecimento do bagaço de cana-de-açúcar termo hidrolisado, considerando-se tempo e aditivos nutricionais, para obtenção de biomassa com melhores condições nutricionais e proteicas. Na primeira etapa do projeto foram testadas diversas combinações de meio a fim de se encontrar aquele mais adequado para o desenvolvimento fungico. Concluiu-se que o 1% carbonato de cálcio e 1% levedura seca são essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos neste substrato. Com relação à quantidade de inóculo, para *P. ostreatus* assumiu-se 3% como ideal e para *L. edodes*, assumiu-se 8% como a quantidade ideal. Foram quantificados proteína bruta, lipídios, valor nutricional relativo (VNR) pelo método com *Enterococcus zymogenes*, toxicidade aguda realizado com *Daphnia similis*, DQO e DBO das amostras. Quanto a quantidade de proteína, houve um aumento significativo quando comparado ao bagaço original passando de aproximadamente 1% para 3,43% e 3,20% para *L.edodes* e *P.ostreatus* respectivamente com 45 dias de incubação as 25+/- 2⁰C. Os valores de lipídeos foram baixos mesmo após a colonização. O valor nutricional relativo do bagaço de cana termo hidrolisado antes do tratamento microbiológico apresentava valores de 23,07% passando para 84,61% para *L.edodes* e para 73,07% para *P.ostreatus*. A toxicidade aguda apresentou uma diminuição após o desenvolvimento fúngico sendo que *L.edodes* apresentou-se mais eficiente na detoxificação. Os resultados de DQO e DBO também apontam para uma melhora na biodegradação do solubilizado do bagaço de cana para as duas espécies de fungos quando comparadas ao substrato original.

Palavras-chave: bagaço de cana termo hidrolisado, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*.

ABSTRACT

The constantly growing in ethanol production will lead to consequent increased production of sugarcane bagasse emerging need to develop new ways to use this product, Therefore the increase in value in order that residue to be used as forage for animal feed can be an economically interesting alternative. This paper used *Lentinula edodes* (shiitake) and *Pleurotus ostreatus* (shimeji) in biotransformação and enrichment of sugarcane bagasse term hydrolyzate, considering time and nutritional additives, to obtain biomass with better nutritional and protein conditions. In the first stage of the project were tested several combinations of substrate in order to find the most suitable for fungal development. It was concluded that 1% calcium carbonate and 1% dried yeast are essential for the development of microorganisms in the substrate. About the amount of inoculum, *P. ostreatus* assumed as an ideal 3% and *L. edodes*, 8% was assumed as the ideal amount. The following were quantified crude protein, lipids, nutritional value relative (NVR) by method with *Enterococcus zymogenes*, acute toxicity performed with *Daphnia similis*, COD and BOD of amostras.susstrato As the amount of protein, there was significant increase when compared to the original bagasse which has approximately 1% to 3.43% and 3.20% for *L.edodes* and *P.ostreatus* respectively 45 days incubação the 25 +/- 20C . Lipid values were low even after colonization. The nutritional value of the term hydrolyzate sugarcane bagasse before the microbiological treatment had values of 23.07% and grows to 84.61 to 73.07 for *L.edodes* and to *P.ostreat*. The acute toxicity is decreasing after fungal growth and *L.edodes* presented more efficient in the detoxification. The results of COD and BOD also point to an improvement in the biodegradation of solubilized sugarcane bagasse for the two species of fungi when compared to the original substrate.

Keywords: sugarcane bagasse term hydrolyzate; *Lentinula edodes*; *Pleurotus ostreatus*.

1. INTRODUÇÃO

A atividade industrial tem se tornado cada vez mais essencial para a sociedade moderna. No entanto, nos anos recentes tem-se dado cada vez mais enfoque as questões ambientais, principalmente no que tange à gestão dos resíduos. Tais atividades normalmente produzem resíduos industriais em geral pela ineficiência dos processos de conversão, que acabam resultando em contaminação ambiental. No Brasil, uma das mais importantes atividades industriais no presente é o plantio da cana de açúcar para produção principalmente de biocombustível e açúcar. O Brasil é o país que acumula o maior volume desse produto no mundo com produção atual de aproximadamente 590.00 milhões de toneladas por ano de cana de açúcar, sendo que para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca. Muito embora uma parcela significativa deste material seja destinada a produção de energia, servindo como combustível em usinas termoeletricas para a produção de energia a queima do material pode resultar na liberação de gases poluentes como monóxido de carbono e dióxido de carbono, além de produtos sólidos como fuligem e cinzas. Além disso, as instalações de estruturas termoeletricas demandam de um alto custo. Por esses motivos, aproximadamente 28% da massa total deste não é utilizada para esse fim. Em vista disto, empresas vêm investindo em alternativas para aproveitar o restante deste produto como a sua incorporação em ração animal, fabricação de papel, celulose e papelão, aditivos para serem agregados em polímeros sintéticos, processos fermentativos, entre outros. O Brasil sendo detentor de um grande rebanho bovino tem na geração do bagaço de cana oportunidade de alimentar os animais com mais eficiência se for associada a formulação de ração com a safra sucroalcooleira. Soma-se a isso o fato de que há coincidência entre o período de safra de cana-de-açúcar e o período de seca e de falta de alimento para ruminantes em regiões do Brasil tanto no sudeste como o nordeste. Sendo assim, o emprego do bagaço como ração é uma forma dos criadores de bovinos em áreas afetadas pela seca manterem a alimentação desses animais nestes períodos desfavoráveis. Além disso, estabelecem-se relações ambientais menos agressivas minimizando os efeitos causados pelo acúmulo deste subproduto. No entanto o bagaço é de difícil digestão devido a sua composição rica em celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente 41, 25 e 20%, prejudicando o valor

nutritivo do alimento. O bagaço *in natura* tem fibras muito resistentes e com limitações para a sua utilização na alimentação de ruminantes. Para torná-lo mais acessível o bagaço de cana pode ser tratado para liberar os seus compostos principais mediante o aquecimento sob alta pressão seguido de descompressão (*steam explosion*) e, desta forma, ser melhor aproveitado pelos ruminantes. Durante este processo ocorre a produção de compostos fenólicos, furfural, 5-hidroximetilfurfural, entre outros, que afetam o crescimento de bactérias e diminuem a atividade enzimática do rúmen. Por esse motivo para ser utilizado como ração, o bagaço termo explodido necessita de tempo de maturação e eventualmente tratamento prévio para que a digestão dos ruminantes não fique comprometida. Este trabalho propõe um tratamento microbiológico com *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus ostreatus* (shimeji) em bagaço termo explodido a fim de torná-lo menos tóxico e mais digerível para os ruminantes. A escolha desses microrganismos se deu pelo fato de serem basidiomicetos da podridão-branca e são conhecidos na literatura por produzirem eficientes enzimas lignolíticas. Tais enzimas são excelentes quanto ao seu potencial de degradação da lignina facilitando o acesso das celulasas e hemicelulasas. Desta forma o bagaço de cana-de-açúcar poderá ser melhor utilizado na alimentação de animais. Considera-se ainda que o material apresente enriquecimento proteico e que este não provém de origem animal, evitando possíveis riscos de contaminação, uma vez que há preocupação em virtude da possibilidade de transmissão de doenças de origem viral como os príons.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivos gerais

Cultivo de *Lentinula edodes* (Shiitake) e o *Pleurotus ostreatus* (shimeji) no bagaço de cana-de-açúcar termo hidrolisado e biotransformação em relação ao tempo e aditivos nutricionais, visando obter uma biomassa com melhores condições nutricionais e proteicas para melhorar a utilização de bagaço termo hidrolisado como ração para ruminantes

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar qual melhor meio de cultivo para o desenvolvimento fungico quanto:
 - tempo de cultivo
 - necessidades físico químicas (pH, umidade) e nutricionais
 - bagaço de cana recém reproduzido e armazenado em condições ambientais
- Comprovar a efetividade do enriquecimento do substrato por meio da análise de digestibilidade das proteínas e da presença de aminoácidos nas amostras
- Avaliar a toxicidade aguda no lixiviado do bagaço termohidrolisado
- Comparar a biodegradação do solubilizado do bagaço
- Avaliar o aumento da quantidade de proteína bem como a sua qualidade nutricional após a fermentação fungica.

3 Revisão da Literatura

3.1 Produção de bagaço de cana-de-açúcar

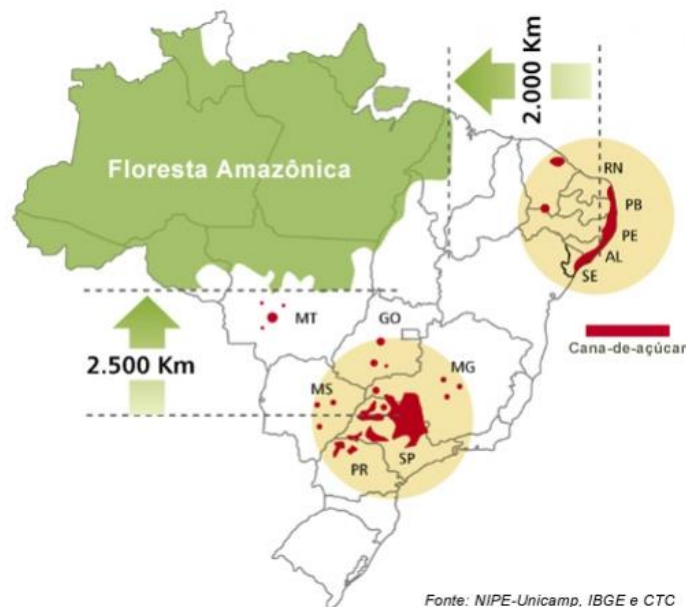
A atividade industrial tornou-se essencial para a sociedade atual, pois é por meio dela que surgiram produtos que movem a economia, melhoram a qualidade de vida e tornam-se essenciais para a população. Tais atividades normalmente produzem resíduos industriais em geral pela ineficiência dos processos de conversão, que acabam resultando em contaminação ambiental. (FREIRE, et al; 2000)

No entanto, recentemente tem-se dado cada vez mais enfoque as questões ambientais, principalmente no que tange à gestão dos resíduos. Nesse sentido o reaproveitamento dos resíduos surge como uma alternativa, pois esta prática traz benefícios ambientais, diminuindo a utilização de recursos naturais além de minimizar a poluição causada pela destinação final. (MOTA, 2006)

No Brasil, uma das mais importantes atividades atualmente desenvolvidas é o plantio da cana de açúcar para produção principalmente de biocombustível e açúcar. Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA) em conjunto com os demais sindicatos e associações de produtores da região Centro-Sul do Brasil e o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), há uma estimativa para a safra 2015/2016 de cana-de-açúcar de 590.00 milhões de toneladas, crescimento de 18,66 milhões de toneladas em relação ao total processado na safra de 2014/2015, que somou 571,34 milhões de toneladas. Com esta avaliação o Brasil assume liderança na comparação mundial de produção de cana (UNICA,2015). Os levantamentos estatísticos desta instituição estimam que do total de cana-de-açúcar a ser processada, 58,10% será destinada à produção de etanol, com aumento de 1,12% em relação ao registrado na safra 2014/2015 (56,98%). Neste biênio há uma tendência de diminuição na proporção de cana direcionada à fabricação de açúcar. Esse cenário de decréscimo da produção açucareira fundamenta-se na necessidade de liquidez por parte das unidades produtoras com problemas financeiros, na queda do preço do açúcar no mercado internacional e nas alterações que aconteceram no mercado brasileiro de etanol combustível.

Com relação às áreas de plantio de cana de açúcar no território brasileiro, cerca de 90% centraliza-se em colheitas na região Centro-Sul, sendo que o Estado de São Paulo é responsável por 60%, mas a região nordeste também possui um importante avanço na produção deste material (UNICA, 2012). **(Figura 1):**

Figura 1: Mapa da distribuição da produção de cana de açúcar no território brasileiro (UNICA, 2012)



No processo de industrialização da cana-de-açúcar o produto mais volumoso produzido tanto pela indústria de etanol quanto de açúcar é o bagaço. Este origina-se após a extração do caldo da cana que, uma vez purificado e concentrado, se obtém a sacarose. Tal material, mediante o processo de fermentação, produz etanol. Outra alternativa é o beneficiamento do açúcar para a sua comercialização direta. Para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca (SANTOS, et al, 2012). Esse mesmo montante de cana rende, em média, 118 quilos de açúcar e dez litros de álcool, produzido a partir do melaço residual.

3.2 Utilização do bagaço de cana-de-açúcar

O emprego mais comum deste material destina-se a produção de energia, servindo como combustível em termoelétricas para a produção de energia pelas próprias usinas sucroalcooleiras. Porém cerca de 28% do montante deste resíduo é utilizado para fins diversos. Entre eles pode-se citar as caldeiras das indústrias citrícas, produção de papel e celulose, utilização na alimentação animal (SILVA,et al; 2010).

Segundo a UNICA (2015) estima-se que em 2020 a produção de eletricidade deste setor poderá atingir 15% da matriz brasileira (hoje representa 3,7%), considerando uma estimativa de produção de 1 bilhão de toneladas de cana. De acordo com o Plano Nacional de Energia 2030, o maior potencial de produção de eletricidade encontra-se na região Sudeste, particularmente no Estado de São Paulo, e é estimado em 609,4 milhões de gigajoules (GJ) por ano. Na sequência estão os estados do Paraná (65,4 milhões de GJ anuais) e Minas Gerais (63,2 milhões de GJ anuais). A energia é gerada pela movimentação de turbinas pelo vapor obtido na queima do bagaço.

Ainda que a queima seja uma forma proveitosa de se utilizar o bagaço, aproximadamente 28% da massa total deste não é utilizada para esse fim. Entretanto, a queima do bagaço apresenta-se como uma atividade desfavorável ao meio ambiente, uma vez que resulta na liberação de gases poluentes como monóxido de carbono e dióxido de carbono, além de produtos sólidos como fuligem e cinzas (LORA, 2000). O alto custo para a instalação de estruturas que permitem a queima e captação de energia também são fatores limitantes desta atividade. Em vista disto que as empresas vêm investindo em alternativas para aproveitar o restante deste produto como a sua incorporação em ração animal, fabricação de papel, celulose e papelão, aditivos para serem agregados em polímeros sintéticos, processos fermentativos, entre outros.

Nos processos fermentativos estão sendo elaborados muitos esforços e razoável investimento econômico para promover a biodegradação da celulose e lignocelulose para obtenção de biocombustível.

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

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

tanto no Sudeste como o nordeste (SILVA et al; 2007). Considerando que o bagaço representa uma fonte potencial de alimento para animais ruminantes este pode ser utilizado para minimizar o problema. O emprego do bagaço como ração é uma forma dos criadores de bovinos em áreas afetadas pela seca manterem a alimentação desses animais nestes períodos desfavoráveis. Além disso, contribui para aproveitamento alternativo da matéria orgânica uma vez que em geral é obtida em solos ricos e de boas condições hídricas. Ademais, estabelecem-se relações ambientais menos agressivas minimizando os efeitos causados pelo acúmulo deste subproduto (CASTRO, et al; 2008).

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

3.3 Composição do bagaço de cana-de-açúcar

O valor nutritivo do bagaço é baixo devido a sua composição que é constituída principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente 41; 25 e 20% (Tabela1). Devido a sua composição, o material mesmo depois de fragmentado apresenta-se de difícil digestão dado a resistência das fibras (TEIXEIRA et al; 2007).

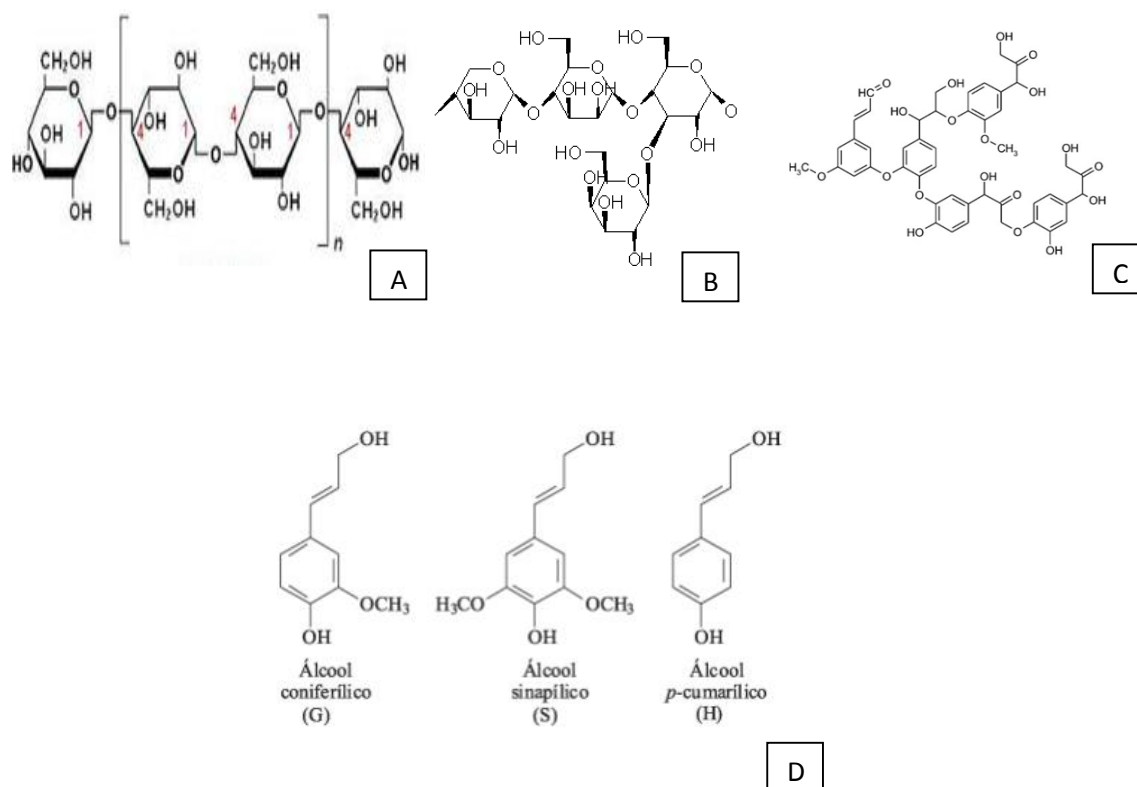
Tabela 1: Componentes principais do bagaço de cana e seus respectivos teores energéticos.

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

Fonte: SANTOS (2011)

Quimicamente a celulose (**Figura 2A**) é o composto polimérico encontrado em maior frequência no mundo. Este polímero linear é constituído essencialmente de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1-4) e apresenta grande massa molecular, insolúvel em água e pode ser representada pela fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$. Sua hidrólise completa produz o monossacarídeo glicose –D (+). A celulose constitui o principal componente das fibras vegetais formando camadas inter cruzadas longas e resistentes. Além da celulose existem as fibras de hemicelulose formada por polissacarídeos de massa molecular, apresentando entre 100 e 200 unidades glicosídicas. Esses formam uma rede de cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como D-xilose e L - arabinose, e aldo-hexoses, como D-glicose, D-manose e D-galactose. A hemicelulose é mais susceptível à hidrólise química sob condições mais brandas e está intimamente associada à celulose na estrutura da parede celular estabelecendo ligação entre a celulose e a lignina (BON et al., 2008). A lignina é composta por um polímero heterogêneo e complexo e sua fórmula química é constituída pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool trans-para-cumárico, álcool-trans-coniferílico e álcool-trans-sinapílico, também chamados de monolignóis (**Figura 2D**) (SUHAS et al; 2007). Sua estrutura é formada por unidades propano-fenólicas organizadas tridimensionalmente. A lignina envolve as fibras de celulose e hemicelulose e apresentam difícil biodegradação (CUNHA, 2003). Além disso, a lignina está presente em maior quantidade em plantas lenhosas e mais velhas, sendo depositada na parede celular, o que resulta em uma maior rigidez e resistência, pois torna a parede celular das plantas mais impermeáveis à água e protegidas contra os efeitos de possíveis patógenos (SUHAS et al, 2007)

Figura 2: Estrutura química da: (A) celulose; (B) hemicelulose; (C) lignina; (D) monômeros da lignina



Fonte: SANTOS et. al,2001 e TUZZIN,2015

3.4 Produção de bagaço de cana-de-açúcar termo explodido

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

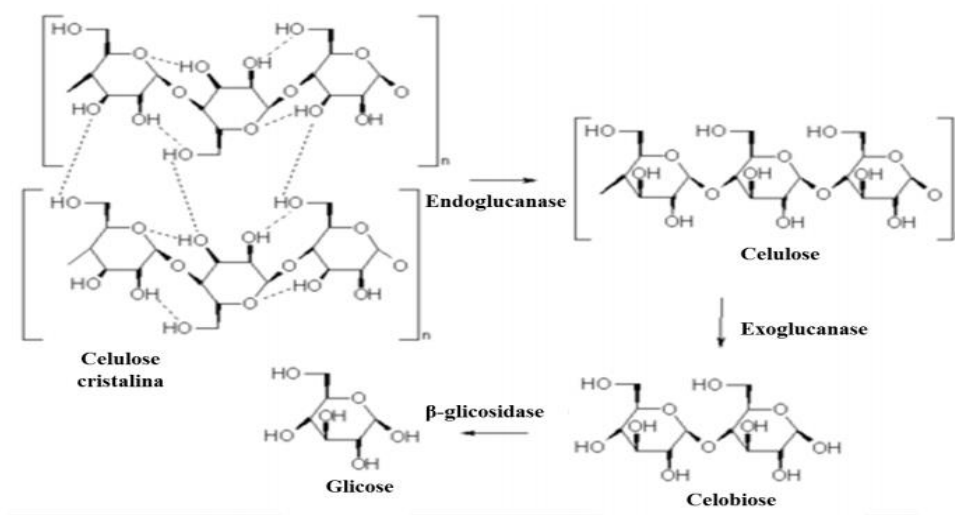
3.5 Micro-organismos lignocelulíticos

Os fungos basidiomicetos da podridão-branca são conhecidos na literatura por produzirem eficientes enzimas lignolíticas. Tais enzimas são excelentes quanto ao seu

potencial de degradação da lignina facilitando o acesso das celulases e hemicelulases, também produzidas por esses fungos, aumentando o rendimento da sacarificação. (LOMASCOLO et al., 2011). As enzimas capazes de promover a biodegradação da celulose são as pertencentes ao complexo de celulases, a hemicelulose é degradada pela xilanase e a lignina pelas lacases e peroxidases.

As celulases são capazes de realizar a completa hidrólise da celulose a glicose por meio de ação combinada de múltiplas enzimas com diferentes especificidades ao substrato. As endo-(1,4)- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam ligações internas (β -1,4), preferencialmente nas regiões amorfas que são mais suscetíveis, deste modo o grau de polimerização é menor, produzindo terminais reduzidos e não-reduzidos. Essa ação expõe as microfibrilas ao ataque subsequente de outras enzimas, e também aumenta o número de oligossacarídeos com terminações susceptíveis ao ataque das exoglucanases (FUKUDA et al., 2009). As exo-(1,4)- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91) atuam como exoglucanase ao remover monômeros ou dímeros das porções terminais das cadeias. As β -glucosidades (EC 3.2.1.21) hidrolisam celobioses e, em alguns casos, outros oligossacarídeos curtos a glicose. (**Figura 3**).

Figura 3: Esquema de sistema celulósico (ARO et al., 2005).



As hemicelulases atuam em ação sinérgica de uma variedade de enzimas hidrolíticas, conhecidas como xilanas, formando um complexo xilanolítico. Esse complexo é constituído pelas seguintes enzimas: endo-1,4- β -D-xylanases (EC 3.2.1.8) responsáveis por atacarem internamente a estrutura polissacarídica, hidrolisando as ligações β -1,4 da molécula de xilana, resultando em um decréscimo no grau de polimerização do substrato; As β -xilosidases (EC 3.2.1.37) hidrolisam xilooligossacarídeos curtos a xilose. As α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) hidrolisam os grupos α -L-arabinofuranosil terminais. As α -glucoronidasases (EC 3.2.1.1) são requeridas para a hidrólise das ligações α -1,2 glicosídicas entre xilose e ácido glicurônico ou sua ligação 4-O-metil-ester. As acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) hidrolisam as ligações entre xilose e ácido acético e ácido ferrúlico. As feruloil esterases (EC 3.1.1.73) (ácido ferúlico esterases, cinnamoil esterases, ácido cinnamico hidrolases, p-coumaroil esterases, hidroxycinnamoil esterases), apresentam um papel chave proporcionando um aumento na acessibilidade das enzimas hidrolíticas sobre as fibras de hemicelulose devido à remoção do ácido ferúlico das cadeias laterais e ligações cruzadas (FORCHIASSI, 2007).

As enzimas responsáveis pela degradação da lignina são a lacase e as peroxidases como a lignina peroxidase e a manganês peroxidase. Lacases estão dentro de um pequeno grupo de cuproproteínas, conhecidas como oxidases azuis, elas são responsáveis por catalisar a oxidação de compostos aromáticos, pois são capazes de extrair elétrons de um substrato aromático. Nos fungos elas podem ser intra e extra celulares (Duran, 2002). A lignina peroxidase possui um grupo heme, e, portanto, são heme-proteínas. São capazes de oxidar compostos fenólicos mediante a transformação dos fragmentos de lignina que foram liberados previamente pela manganês peroxidase. Esta última é uma enzima glicosilada que também possui um grupo heme e dependente do peróxido de hidrogênio e manganês como doador de elétrons. Esse composto está normalmente presente em substratos lignocelulósicos (DURAN, et al; 2000).

O bagaço de cana ao ser submetido ao processo de hidrólise, ácida ou enzimática, libera glicose, xilose e compostos fenólicos além de outros. Das pentoses a principal é a xilose a qual sob pressão e aquecimento em condições ácidas forma o furfural e metilfurfural que são indesejáveis quando o objetivo é a fermentação devido a sua toxicidade. Porém podem ser aproveitados para outros fins (NADALINI 1991).

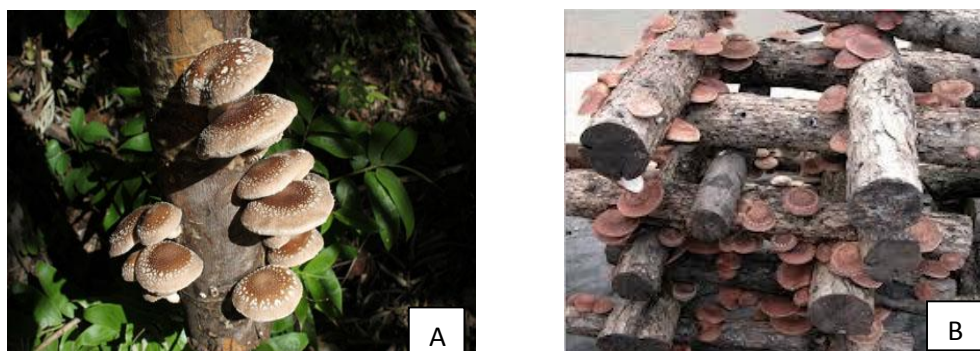
Para buscar a detoxicação do bagaço termo explodido este será tratado pelos fungos *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. Estes fungos foram escolhidos pelo fato de apresentarem a capacidade lignolítica, ou seja, que mediante enzimas hidrolíticas e oxidativas são capazes de degradar a lignina em monômeros. Além disto, soma-se o fato desses fungos serem mundialmente reconhecidos como comestíveis e em vista disto, tem possibilidade de gerar um insumo comercializável para compor não apenas um componente chamado volumoso, mas sim um ingrediente nutritivo como ração animal.

3.5.1 *Lentinula edodes* (Shiitake)

O *Lentinula edodes* (**Figura 4**) é um fungo, lignolítico, responsável pelo que se denomina podridão branca, que segue a seguinte classificação segundo Oliveira et al, 2001:

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

Figura 4:(A) Carpóforos de *Lentinula edodes* em seu habitat natural. (B) Organização do substrato no cultivo na madeira.



O valor nutricional do cogumelo está relacionado com a possibilidade de que 80% de suas proteínas são digeríveis e assimiláveis sendo que nos vegetais somente 50 ou 60% das proteínas chegam a ser aproveitadas na digestão. Muitos cogumelos são considerados saborosos e podem ser consumidos in natura ou após a cocção, complementando qualquer preparado a base de carne ou constituir o ingrediente principal de uma receita culinária (MOLENA, 1986). A produção de alguns desses cogumelos comestíveis é considerada um dos processos economicamente viáveis de bioconversão fungica de resíduos lignocelulósicos (THOMAS et al; 1998;).

Nutricionalmente, o *L. edodes* apresenta alto valor nutritivo, com minerais essenciais (zinco, cálcio, fósforo, ferro, sódio, cobre, magnésio e potássio), quantidades significativas de vitaminas como tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina, biotina, ácido ascórbico (vitamina C), ergosterol (precursor da vitamina D), ácido pantotênico (vitamina A), vitaminas E, B6 e B12, e seus precursores, além de fibras, e valor calórico baixo (OEI, 2005; CHEN, 2005). Outra vertente na produção desse fungo é o seu potencial medicinal com os anticancerígenos (lentinan o KS-2, o LAP1), e as enzimas polifenol oxidases, os antivirais (KS-2, eritadenina, lentinan, JLS e Ac2P), imunopotenciadores (EP3 e EPS4), o hipocolesterolêmico eritadenina, agente hepatoprotetor, os antibactericidas (lentinan, cortinellin e lentinamicin), e o antifúngico lentinan (HATVANI, 2001)

Seus corpos de frutificação possuem de 88 a 92% de água, baixo teor de calorias e de glicose (benéfico para os diabéticos), baixo teor de sódio, elevado teor de potássio, fósforo e de oligoelementos, incluindo o cobre e o zinco (BISEN et al., 2010). **(Tabela 2).** Também possui proteínas de elevada qualidade que pode ser representada pela

melhora no perfil de aminoácidos do bagaço de cana termo hidrolisado após a colonização com *L.edodes* (**Tabela 3**):

Tabela2: Composição química geral do *Lentinula edodes* por 100 g

Calorias	55cal
Niacina	1,5mg
Vitamina B6	0,16 mg
Folacina	20 mg
Ácido	3,5 mg
Vitamina C	0,3 mg
Cobre	0,9 mg
Magnésio	14mg
Fósforo	29mg
Potássio	2,18mg
Zinco	5,5mg
Sódio	30 mg

Fonte: BISEN et al., 2010

Tabela 3: Aminoácidograma dos tratamentos do bagaço microbiologicamente modificado com *L. edodes*.

Aminoácidos totais (mg/100g)	Bagaço de cana Puro	Bagaço + farelo aveia + <i>L. edodis</i>
Ácido aspártico	33,40	73,38
Ácido glutâmico	127,99	214,03
Serina	5,20	89,25
Glicina	25,38	116,32
Histidina	165,55	39,76
Arginina	14,97	61,08
Treonina	30,34	67,74
Alanina	72,99	123,07
Prolina	43,47	119,80
Tirosina	17,87	41,10
Valina	49,10	118,89
Metionina	ND	5,39
Cistina	6,95	ND
Isoleucina	34,04	89,07
Leucina	68,33	145,41
Fenilalanina	25,03	79,65
Fonte:	ND	54,65
SOUZA,2013Lisina		
Triptofano	ND	ND

Fonte: SOUZA (2013)

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

3.5.2 *Pleurotus ostreatus* (shiimeji)

O *Pleurotus ostreatus* é conhecido pelos orientais como Hiratake e, e no restante do mundo como Shimeji (**Figura 5**) Pode também ser chamado de cogumelo ostra, devido a sua forma. O shimeji é como um dos cogumelos comestíveis mais nutritivos e saborosos (BONONI et al., 1995; COHEN et al., 2002). Este fungo é classificado segundo Oliveira et al; 2001 da seguinte forma:

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

Figura 5:(A) *Pleurotus ostreatus* em seu habitat natural. (B) Carpóforos cultivados em sacos prontos para a colheita.



Pleurotus spp pertencem ao grupo de fungos que possuem alto valor nutricional, com diversas propriedades terapêuticas e biotecnológicas. Conhecidos como fungos da podridão branca da madeira por serem eficientes na degradação da lignina devido a sua capacidade de produzir enzimas lignocelulolíticas, principalmente lacases, Mn peroxidase e peroxidase versátil, que têm numerosas aplicações industriais. (COHEN et al; 2002)

Pleurotus até o ano de 1950, era coletado diretamente da natureza (**Figura 5A**), porém a partir de 1970 iniciou-se o seu cultivo em escala comercial. No final da década de 50, houve as primeiras tentativas de promover o cultivo empregando serragem como substrato. Porém no início da década de 60 passou-se a empregar outros substratos como palhas secas, capim, palha de arroz e palha de trigo para a produção em escala comercial

(Figura 5B). Como *Pleurotus ostreatus* tem sabor agradável e grande disponibilidade, houve possibilidade de ampliar o cultivo nestes últimos anos e em 1995 sua produção mundial ocupava o quarto lugar entre os cogumelos comestíveis (BONONI et al; 1995).

A incorporação de *P. ostreatus* na dieta alimentar pode ser considerada positiva pois, possui considerável valor nutricional em proteína, fibra, carboidrato, vitaminas e minerais, além de baixo valor calórico, gorduras e sódio (SILVEIRA, 2003). Segundo Bonatti, 2002, esse fungo possui 16,21% de proteína, 4,3% de lipídeos, 40,03% de carboidratos e 7,60% de fibras. Em termos nutricionais segundo a “Food Policy and Nutrition Division” ele é composto de 90,8% de água.

3.6 *Enterococcus zymogenes*

As bactérias do gênero *Enterococcus* são conhecidas por possuir baixa virulência quando comparado com outros cocos Gram-positivos, possuir uma alta capacidade de adaptação e sobrevivência em meios adversos e não produzem esporos. Esse termo *Enterococcus* foi estipulado para organismos que crescem entre 10 e 45⁰ C, em pH 9,6 e capazes de crescer em meio com NaCl a 6,5% e em bile-esculina. No decorrer dos anos várias espécies de *Enterococcus* foram isoladas de humanos e animais e na década de 80 com o avanço nas técnicas moleculares houve ampliação da classificação constatando-se que o *Streptococcus faecalis* subespécies *liquefaciens* e *zymogenes* eram apenas uma espécie (MURRAY,1990).

Essa bactéria é comumente utilizada para realização de ensaios biológicos. Os ensaios biológicos podem ser classificados em ensaios qualitativos, quantais e quantitativos e sua aplicação se estende desde a seleção de novos compostos químicos de interesse terapêutico até a avaliação de sua eficácia, incluindo a análise de toxicidade. Os ensaios qualitativos apontam a seleção e identificação de substâncias químicas que possuem alguma atividade biológica em substratos de tecidos vegetais ou animais, os quantais estão relacionados com aparecimento ou não de uma determinada resposta em sistemas biológicos tratados com um composto bioativo, sem, no entanto, quantificar o efeito observado, e por fim os quantitativos visam medir o efeito ou resposta desencadeada por um determinado composto bioativo frente a uma dose previamente estabelecida do mesmo, sendo a resposta biológica proporcional à dose utilizada. Seu resultado é expresso em curvas dose-resposta (TAVARES, 2004)

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

3.7 *Raphidocelis subcaptata*

A *R. subcaptata* (Figura 6) é uma alga verde unicelular que contém apenas um cloroplasto longo com presença das clorofilas a e b. Esta microalga pode formar grupos de 4 a 16 células (JANSSEN, HEIJERICK, 2003). Tem capacidade de dividirem-se uniformemente e não se aderem a superfícies, além de ciclo de vida curto, altas taxas de crescimento, facilidade de manutenção e capacidade de crescer em meios sintéticos bem definidos. Tudo isso induz facilidades para manutenção de ensaios biológicos. (VIDOTTI, ROLLEMBERG, 2004). Devido à sua sensibilidade a muitas substâncias, especialmente herbicidas e metais, esta alga é utilizada em testes ecotoxicológicos (BLAISE, FÉRARD, 2005). Embora a *R. subcaptata* seja empregada como organismo teste em alguns ensaios de toxicidade aguda, neste trabalho é utilizada como alimento para criação de *Daphnia similis*.

Figura 6: *Raphidocelis subcaptata* (Korshikov, 1987)



3.8 *Daphnia similis*

A *D. similis* (**Figura 7**) é um microcrustáceo classificado da seguinte forma:

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

Figura 7: *Daphnia similis*



A reprodução na família Daphnidae geralmente é partenogenética rara a ocorrência de machos, surgindo quando ocorrem condições ambientais não favoráveis. Podendo ocorrer então a reprodução sexuada com geração de efípios, estrutura que abriga ovos de resistência. Esses efípios são extremamente resistentes à dessecação e à temperatura e são capazes de eclodir meses ou anos após terem sido armazenados no ambiente seco ou no frio (STORER et al., 2002). Esse microcrustáceo é recomendado mundialmente em critérios para uso como organismo-teste, como por exemplo: possuem ampla distribuição nos corpos d'água, é uma espécie-chave em muitas cadeias alimentares, o ciclo de vida é curto e são partenogenéticos (estabilidade genética), são facilmente criados em laboratórios e sensíveis a vários contaminantes podendo, assim, serem considerados como bioindicadores (BEATRICI, 2001).

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

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Micro-organismos

4.1.1.1 *Lentinula edodes*

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

4.1.1.2 *Pleurotus ostreatus*

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

4.1.1.3 *Daphnia similis*

Os microcrustáceos *Daphnia similis* provenientes da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), foram criados no Laboratório de Ensino de Toxicidade de Águas, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, da UNESP – Rio Claro/SP, seguindo as diretrizes propostas pela a norma ABNT NBR 12713:2009.

4.1.1.4 *Raphidosceles subcaptata*

Proveniente da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

4.1.1.5 *Enterococcus zymogenes*

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

4.1.2 Obtenção de bagaço de cana termo explodido

O bagaço de cana termo explodido foi proveniente da Indústria Nardini-Catanduva-S.P. As amostras de bagaço foram divididas em dois grupos. Um corresponde ao bagaço de cana termo explodido recém produzido pela indústria e o outro bagaço foi armazenado ao ar livre e exposto a condições ambientais por 45 dias.

O material após recebimento foi mantido em câmara fria.

4.1.3 Equipamentos, vidraria e reagentes

Para realizar os experimentos utilizou-se estufas a 30 e 37°C, aparelho destilador de Kjeldahl, vidraria comumente utilizada em laboratório de microbiologia, carbonato de cálcio, selenito de sódio e mistura digestora (Cu_2SO_4 e K_2SO_4), moinho elétrico e reagentes comuns de laboratório.

4.1.4 Soluções para o teste de qualidade proteica com *Enterococcus zymogenes*.

Foram preparadas as seguintes soluções seguindo o protocolo de execução, descrito no trabalho de TAVANO et. al, 2004, para realização do teste de qualidade proteica com *Enterococcus zymogenes*:

4.1.4.1 Solução de minerais

Tabela 4: Relação de componentes para a solução de minerais.

Macronutrientes
KCl 0,7 g L^{-1}
KH_2PO_4 2,0 g L^{-1} ou $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,9 g L^{-1}
Na_2HPO_4 3,0 g L^{-1}
NH_4NO_3 1,0 g L^{-1}
Microingredientes (1mL L^{-1})
MgSO_4 4,0 g L^{-1} ou $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,2 g L^{-1}
FeSO_4 0,2 g L^{-1} ou $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,36 g L^{-1}
MnCl_2 0,2 g L^{-1} ou $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,31 g L^{-1}
CaCl_2 0,2 g L^{-1} ou $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,26 g L^{-1}

Dissolver os ingredientes em 1000 mL água deionizada e autoclavar a 121°C/20 min.

Fonte: TAVANO et. al, 2004

4.1.4.2 Mistura Vitamínica

Tabela 5: Relação de componentes necessários para a mistura vitamínica.

Vitamina	Quantidade
Tiamina (B1)	12,5 mg
Riboflavina (B2)	2,0 mg
Ácido Nicotínico (B3)	2,0 mg
Pantetonato de Cálcio (B5)	2,0 mg
Cloridrato de Piridoxina (B6)	2,0 mg
Biotina (B7)	10 µg
Ácido Fólico (B9)	0,2 mg
Vitamina B12	0,5 µg
Ácido p-Aminobenzóico	2,0 mg

Fonte: TAVANO et. al, 2004

4.1.4.3 Composição de meio basal para *Enterococcus zymogenes*

Tabela 6: Composição do meio basal para o crescimento de *Enterococcus zymogenes*

Componentes	Quantidade
Glicose	30,0 g
K ₂ HPO ₄	45,0 g
Ac. Cítrico	1,25 g
Acetato de sódio	6,25 g
Adenina	12,5mg
Guanina	12,5mg
Uracila	12,5mg
Xantina	12,5mg
Ácido Ascórbico	1,25 g
Mistura Vitamínica	35,0mg
Solução de minerais	25 ml
Tween80	2,5 ml
Ajustar pH para 7,2 com ácido fosfórico	
Ajustar volume total para 500 mL	

Fonte: TAVANO et. al, 2004

Pleurotus ostreatus

	<i>BE (bagaco de cana exposto por 45 dias)</i>			<i>BR (bagaco de cana recém produzido)</i>		
% de inóculo	1	3	5	1	3	5
Bagaço	+	+	+	+	+	+
Bagaço + 1% levedura seca	+	+	+	+	+	+
Bagaço + 1% CaCO ₃	+	+	+	+	+	+
Bagaço + 1% levedura seca + 1% de CaCO ₃	+	+	+	+	+	+
Bagaço controle	-	-	-	-	-	-

Todas as amostras foram mantidas em estufa a 25⁰C +/- 2⁰C e adicionados 100 mL de água destilada. Objetivando uma forma mais econômica e prática para a sua aplicação industrial não houve processo de esterilização do material. Para cada amostra foram utilizados 500g de bagaço de cana termo hidrolisado. Foram encubadas por período de 7 e 45 dias.

A inoculação foi realizada acrescentando-se a quantidade de semente desejada em cada amostra. Posteriormente fechou-se as embalagens de polipropileno com um tampão de algodão, permitindo trocas gasosas do ambiente para o interior dos sacos. Objetivando homogeneizar o inóculo as amostras foram revolvidas no interior dos sacos até completa dispersão das sementes.

Após a completa colonização, as amostras foram secas em estufa a 45 ⁰C por 24 horas e pulverizadas em moinho elétrico. Essas amostras foram submetidas as análises seguintes.

4.2.3 Pesagem das amostras

Todas as amostras foram pesadas logo após a inoculação, no início do processo de crescimento fungico, e posteriormente foram novamente pesados, ao final do tempo de incubação, afim de se verificar a taxa metabólica dos microorganismos. Efetuou-se um controle em duplicata contendo apenas bagaço, carbonato de cálcio e levedura, para que

se contabilizasse a evaporação normal de água dispensando aquela relativa ao metabolismo fungico.

4.2.4 Quantificação da proteína bruta

Empregou-se o método de Kjeldhal para quantificação de nitrogênio total que foi executado em 4 etapas:

- **Preparo da amostra e mineralização com H_2SO_4** : Colocou-se em cada tubo digestor entre 0,04 a 0,05g de amostra seca e pulverizada; cerca de 0,5g de mistura digestora $K_2SO_4 + CuSO_4 - 1:1$. Acrescentou-se cerca de 7g de cristais de selenito de sódio ($Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$); e 2 mL de ácido sulfúrico P.A. (H_2SO_4). Os tubos contendo as amostras a serem digeridas foram colocadas no Bloco Digestor (200 - 230°C) até adquirir coloração translúcida (de cor esverdeada ou azulada) e posteriormente adicionou-se cuidadosamente 10 mL de H_2O destilada em cada tubo.

- **Destilação no destilador de Kjeldahl**: Procedeu-se a destilação da amostra no aparelho de destilação de Kjeldhal, mediante a adição para neutralização da amostra com NaOH 40%, responsável pela liberação da amônia. Esta foi posteriormente aquecida até a forma de vapor e recolhida em frasco contendo solução de ácido H_2SO_4 -0,01N e indicador vermelho de metila.

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

-Cálculos:

Volume (mL) NaOH 0.01N gasto na titulação da amostra – Volume (mL) NaOH 0,01N gasto na titulação do branco = mL. de H_2SO_4 0.01N consumido na titulação

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

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

$$\% \text{ de Proteínas} = \frac{\text{Massa (mg) Proteínas. 100}}{\text{Peso da Amostra}}$$

4.2.5 Quantificação de lipídios nas amostras

As amostras foram submetidas ao processo de extração de lipídios seguindo o seguinte protocolo, descrito por Araújo (1997)

- Preparou-se um cartucho de papel filtro que foi pesado, bem como aproximadamente 2,5 g de amostra. Pesou-se também o balão do destilador, contendo cerca de 20 perolas de vidro.
- O cartucho com a amostra foi colocado no extrator de Soxhlet e submetido ao refluxo durante 4 horas com hexano P.A. A seguir parte do solvente foi destilada até uma pré-secagem.
- Os balões contendo os lipídios extraídos foram colocados em estufa a 105⁰C por 24hs para completa evaporação do hexano. Após a secagem foram transferidos para o dessecador até atingirem temperatura ambiente e pesados.
- A quantidade de lipídios contidos na amostra foi referenciada em porcentagem da amostra.

4.2.6 Avaliação de toxicidade

O ensaio de toxicidade foi realizado seguindo a norma ABNT NBR 12713:2004, utilizando-se a *Daphnia similis*, trata-se de um microcrustáceo com alta sensibilidade a diversos causadores de toxicidade em ambientes aquáticos.

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

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

Após 48 horas procedeu-se a contagem dos indivíduos imóveis ou mortos em cada amostra. Os dados foram submetidos à análise estatística no software Spearman-Kärber ICP-Program para testes de toxicidade.

4.2.7 Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

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

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

4.2.8 Avaliação da qualidade proteica pelo método de *Enterococcus zymogenes*

O teste é baseado no crescimento de *Enterococcus zymogenes*, relacionando a necessidade de aminoácidos essenciais desse micro-organismo, que é semelhante à humana. Trata-se de um meio indireto de avaliação do Valor Nutricional Relativo (VNR) das proteínas na amostra. A eficiência do crescimento bacteriano está relacionada com as enzimas utilizadas na hidrólise do material e é comparada com a proteína padrão (caseína), substância referência no teste de digestibilidade microbiológica onde o VNR desta substância é tido como 100%, FORD (1962). Apresenta vantagens quando comparados aos métodos *in vivo*, pois, necessita de menor quantidade de amostra com resposta mais simples e rápida (TAVANO et. al, 2004).

4.2.8.1 Manutenção de cultura *Enterococcus zymogenes*

A cultura de *E. zymogenes* foi mantida a -10°C em meio de manutenção de congelamento composto de meio basal (**Tabela 6**) com 10% de glicerol. Posteriormente foram colocados 3 mL de inóculo ativo com 10 mL desse meio com glicerol e levados diretamente ao freezer a -10°C antes do crescimento da cultura.

4.2.8.2 Meio de cultivo para o *E. zymogenes*

Preparou-se meio de cultivo (**Tabela 7**) para a ativação da cultura de bactéria. A cultura mantida sob refrigeração foi submetida a 2 subculturas com intervalos de 24 horas com a proporção de 1 mL de inóculo para 10 mL de meio de cultivo, mantidas a uma temperatura de 36°C .

Tabela 7: Composição do meio de cultivo para *Enterococcus zymogenes*

Meio Basal	20mL
Triptona	200mg
Água Destilada	Ajustar para 100mL
pH	Ajustar para 7,2

Fonte: TAVANO et. al, 2004

4.2.8.3 Ensaio biológico com *Enterococcus zymogenes*

O teste microbiológico com *Enterococcus zymogenes* foi realizado em 3 etapas:

- **Preparo das amostras (pré-hidrólise):** pesou-se equivalente a 100 mg de proteínas tomando como base nos valores obtidos de nitrogênio total das amostras de bagaço puro, bagaço fermentado com *L.edodes* e com *P.ostreatus*. Adicionou 40 mL solução de β glicerofosfato de sódio, Sigma G-5422 (20 g/litro) e ajustou para o pH 8,0. Quando o pH apresentou valores menores que 8 utilizou-se com hidróxido de sódio (NaOH) e quando apresentou valores maiores utilizou-se ácido fosfórico (H_3PO_4). Colocou-se em banho-maria 48°C , sob agitação lenta e constante, e acrescentou 4,0 mL de solução 1 mg/mL de pronase Sigma P-5147. Depois de 3 horas as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente e ajustou-se o pH para 7,2 novamente com H_3PO_4 ou NaOH e o volume para 100 mL. Esterilizou-se as amostras a frio através de membrana millipore de $0,22\text{ }\mu\text{m}$.

- **Ensaio:** o ensaio foi realizado em quintuplicata (4 teste + 1 branco). Em tubos de cultura esterilizados colocou-se: 2,0 mL de meio basal esterilizado com membrana millipore de 0,22 μ m + 2,0 mL da amostra + 7,0 mL de água esterilizado + 100 μ L do inóculo de *E. zymogenes*. No tubo branco colocou-se 100 μ L de inóculo inativo. Foram encubados em 37°C/ 48 horas. Um tubo contendo somente solução de pronase nas mesmas condições da hidrólise também foi preparado. Após o período de incubação os tubos foram esterilizados em autoclave (121°C por 15 minutos).
- **Titulação:** titular com NaOH 0,1N até pH 7,2. Os cálculos foram realizados descontando-se volume de NaOH gasto com branco da respectiva amostra e da pronase e foram expressos em % do volume gasto com a amostra padrão (caseína). (TAVANO et. al, 2004)

4.2.9 Estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o programa BioStat 5.9.8. Foi aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA) afim de ser verificar se houveram diferenças significativas nas amostras observadas. Nas situações em que o p-value apresentou valores inferiores a 0,05 apontando para significância dos dados, foi aplicado o teste de Tukey.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Seleção do meio de cultivo

Inicialmente procurou-se selecionar um meio de cultivo que atendesse as expectativas de bom desenvolvimento dos fungos *L. edodes* e *P. ostratus*. Comparando-se as diversas combinações de meios de cultivo, foi possível verificar que tanto a presença de CaCO_3 quanto a presença de levedura liofilizada mostraram-se essenciais para o desenvolvimento dos fungos. O valor de pH ideal para o crescimento desses fungos está entre 4,5 e 5,5 (CHANG; MILES,2004). Sendo assim, devido ao fato do bagaço de cana possuir um pH excessivamente baixo, em torno de 3, o carbonato de cálcio elevou esse valor, aproximando-se das condições ideais para o desenvolvimento fungico. A levedura liofilizada por sua vez, melhorou a disponibilidade de recursos nutricionais necessárias para o desenvolvimento das hifas uma vez que o bagaço é um material de baixo valor nutritivo. Resultados semelhantes também foram encontrados em trabalhos anteriores (SOUZA,2013).

Foram registradas por meio de fotos como ficaram as amostras após o período de incubação (**Figura 8 e 9**)

Figura 8: Cultivo de *Pleurotus ostreatus*: (A) bagaço de cana termo hidrolisado sem a adição de CaCO_3 ; (B) bagaço de cana termo hidrolisado com a adição de CaCO_3 , a com 7 dias de incubação.

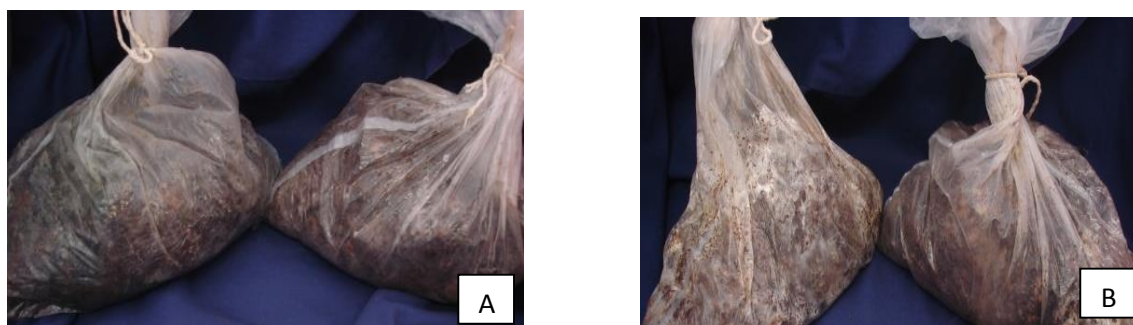


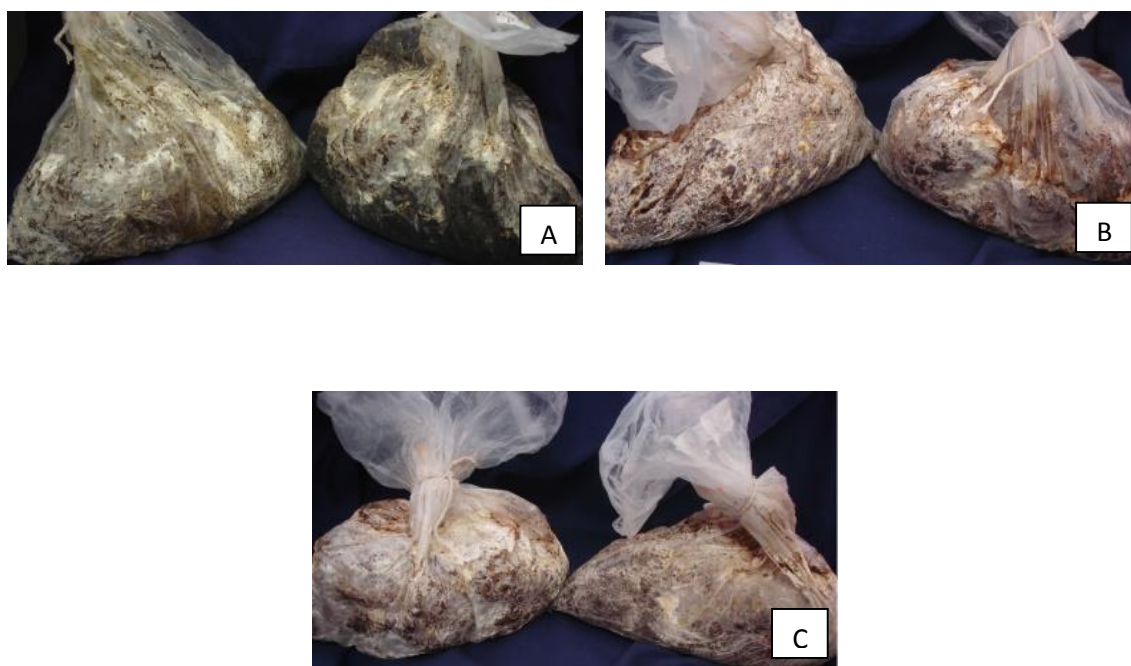
Figura 9: Cultivo de *Pleurotus ostreatus*: (A) bagaço de cana termo hidrolisado sem a adição de CaCO_3 ; (B) bagaço de cana termo hidrolisado com a adição de CaCO_3 , com 7 dias de incubação.



Outra avaliação foi feita com a finalidade de verificar a influência da quantidade de inóculo frente ao desenvolvimento da colonização

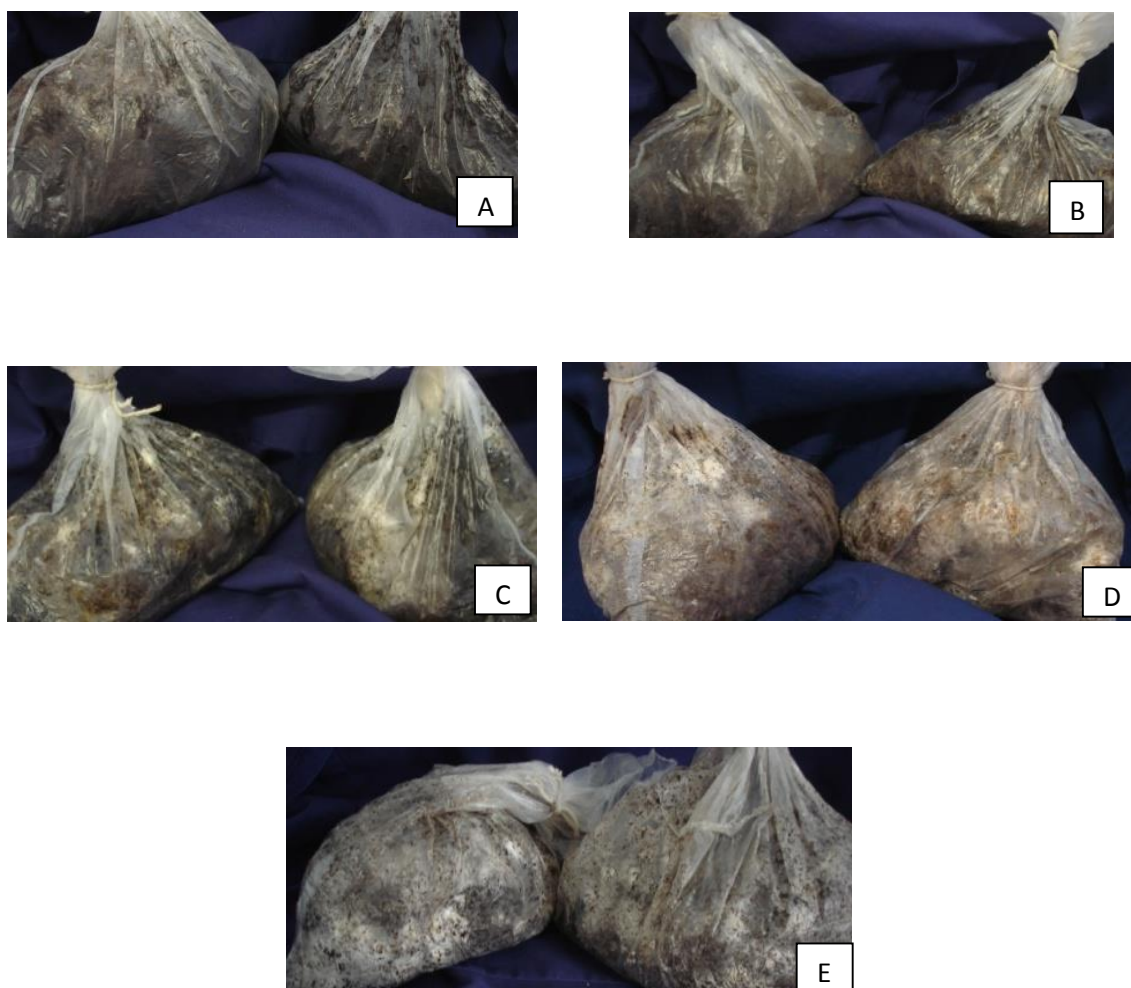
Quanto ao *Pleurotus ostreatus* foram realizados ensaio com 1; 3 e 5% de inóculo, sendo que a diferença de desenvolvimento fungico entre 3 e 5% foi praticamente imperceptível, assumindo-se como 3% a quantidade economicamente mais viável. Essa avaliação foi realizada de forma visual, pelo desenvolvimento das hifas como representado na **Figura**

Figura 10: Cultivo de *Pleurotus ostreatus*: (A) 1% de inóculo; (B) 3% de inóculo; (C) 5% de inóculo, com 7 dias de incubação.



Quanto ao *Lentinula edodes* foram realizados ensaios com 1, 3 e 5% de inóculo. Verificou-se que com 5% de inóculo o desenvolvimento fungico foi lento. Frente a esta situação aumentou-se a porcentagem do inóculo para 8 e 10%. Observou-se que após o tempo de incubação que a diferença de desenvolvimento fungico entre 8 e 10% de inóculo foi imperceptível assumindo-se como 8% a melhor porcentagem. (**Figura11**)

Figura 11: Cultivo de *Lentinula edodes*: (A) 1% de inóculo;(B) 3% de inóculo; (C) 5% de inóculo;(D) 8% de inóculo;(E) 10% de inóculo, com 7 dias de incubação.



Quanto ao tempo de incubação as amostras foram incubadas durante um período de 7 e 45 dias $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ afim de se verificar se haveria algum benefício em aumentar o tempo de incubação com relação a biodegradação, teor proteico e valor nutricional.

Foi constatado que o *P.ostreatus* apresenta crescimento mais rápido e com maior desenvolvimento das hifas quando comparado a *L.edodes* e, portanto, com apenas 7 dias de incubação foi possível constatar um desenvolvimento completo do substrato (**Figura 12 A**). Após 45 dias de incubação apresenta-se visualmente bem estabelecido, com o material branco e compactado (**Figura 12 B**). O *L.edodes* por sua vez, apresenta crescimento mais lento, verificado após 7 dias quando comparado com *P.ostreatus* (**Figura 12 C**). Seu crescimento micelial apresenta-se igualmente completo após 45 dias de incubação (**Figura 12 D**). DE Albuquerque (2013) em seu trabalho descreve essa diferença de crescimento micelial entre essas espécies, afirmando que o *P.ostreatus* possui um tempo mais curto de incubação.

Figura 12: Cultivo dos fungos em bagaço termo hidrolisado: (A) *Pleurotus ostreatus* durante 7 dias e (B) durante 45 dias; (C) *Lentinula edodes* durante 7 dias e (D) durante 45 dias:



Comparando-se o desenvolvimento fungico das duas modalidades do bagaço: um bagaço termo hidrolisado recém produzido e outro exposto a condições ambientais por

45 dias, não houve diferença no desenvolvimento das hifas tanto do *L.edodes* quanto *P.ostreatus*

5.2 Pesagem das amostras

A **Tabela 8** mostra a evaporação natural de água, avaliada em duplicata, pelo bagaço termo hidrolisado durante um período de 7 e 45 dias sem a inoculação dos fungos (controle).

Tabela 8: Quantificação percentual da diminuição da massa por evaporação hídrica do bagaço de cana termo hidrolisado nos períodos de 7 e 45 dias (controle):

Controle	Massa/g			Massa/g	
	Inicial	Após 7 dias	Diferença (%)	Após 45 dias	Perda hídrica (%)
1	912,55	911,87	0,07	848,63	7,00
2	849,55	848,28	0,15	783,9	7,72
		Média	0,11	Média	7,36

As **Tabelas 9 - 12** indicam a diferença das massas iniciais e finais das amostras após o desenvolvimento fungico descontando-se o controle (perda de massa real). A amostra completa é aquela que possui tanto o carbonato de cálcio como levedura liofilizada. A amostra pura representa aquela na qual foi inoculado o fungo em um substrato apenas umedecido. As amostras que tiveram apenas o acréscimo do carbonato de cálcio são representadas por CaCO_3 e as amostras apenas com acréscimo de levedura liofilizada são representadas pela legenda Lev. Todas as amostras foram realizadas em duplicata representadas pelos números 1 e 2.

Tabela 9: Quantificação percentual da diminuição de massa do bagaço de cana termo hidrolisado nos períodos de 7 dias após a inoculação de *Lentinula edodes*.

Amostra	Massa/g		Diferença (%)	Média (%)	Perda de Massa real (%)
	Inicial	Após 7 dias			
Completo1	925,67	912,72	1,39	1,51	1,40
Completo 2	945,53	929,94	1,64		
CaCO ₃ 1	997,22	986,51	1,07	1,06	0,95
CaCO ₃ 2	930,71	920,85	1,05		
Lev 1	878,82	872,15	0,75	0,70	0,59
Lev 2	923,90	917,87	0,65		
Puro 1	861,64	859,08	0,29	0,35	0,24
Puro 2	881,81	878,09	0,42		

Tabela 10: Quantificação percentual da diminuição de massa do bagaço de cana termo hidrolisado após 45 dias de inoculação com *Lentinula edodes*.

Amostra	Massa/g		Diferença (%)	Media (%)	Perda de Massa real (%)
	Massa inicial	Massa após 45 dias			
Completo1	925,67	778,05	15,94	15,63	8,27
Completo 2	945,53	800,61	15,32		
CaCO ₃ 1	997,22	866,84	13,07	13,81	6,45
CaCO ₃ 2	930,71	795,29	14,55		
Lev 1	878,82	771,68	12,19	11,60	4,24
Lev 2	923,9	822,00	11,02		
Puro 1	861,64	784,00	9,01	9,82	2,46
Puro 2	881,81	787,98	10,64		

Tabela 11: Quantificação percentual da diminuição de massa do bagaço de cana termo hidrolisado após 7 dias com de inoculação com *Pleurotus ostreatus*.

Amostra	Massa/g		Diferença (%)	Média (%)	Perda de Massa real (%)
	Inicial	Após 7 dias			
Completo1	897,98	881,37	1,84	1,65	1,54
Completo 2	932,58	918,94	1,46		
CaCO ₃ 1	930,65	918,66	1,28	1,17	1,06
CaCO ₃ 2	933,85	923,86	1,06		
Lev 1	930,35	925,04	0,57	-6,66	0,68
Lev 2	936,77	929,35	0,79		
Puro 1	913,82	913,37	0,04	-1,62	0,32
Puro 2	915,98	913,64	0,25		

Tabela 12: Quantificação percentual da diminuição de massa do bagaço de cana termo hidrolisado após 45 dias de inoculação com *Pleurotus ostreatus*.

Amostra	Massa/g		Diferença (%)	Media (%)	Perda de Massa real (%)
	Massa inicial	Massa após 45 dias			
Completo1	913,37	740,00	18,98	19,5	12,14
Completo 2	913,64	730,70	20,02		
CaCO ₃ 1	925,04	755,70	18,30	18,31	10,95
CaCO ₃ 2	929,35	758,94	18,33		
Lev 1	918,66	773,99	15,74	16,30	8,94
Lev 2	923,86	767,98	16,87		
Puro 1	881,37	775,42	12,02	13,7	6,34
Puro 2	918,94	777,60	15,38		

Santos et al, (2012) em seu trabalho, expõem como a atividade metabólica aeróbia em grãos de milho reflete na diminuição de matéria seca em virtude da eliminação de água e CO₂. Os fungos *P. ostreatus* e *L. edodes* são aeróbios e, portanto, em seu metabolismo absorvem O₂ atmosférico e liberam CO₂ e água. Sendo assim, quanto maior a taxa metabólica dos fungos, maior a perda em porcentagem de massa das amostras uma vez que tanto o CO₂ como a água são eliminados para a atmosfera. Ao se subtrair a evaporação natural da água, observada na tabela relativa ao controle (**tabela 8**), obtém-se a perda em massa que pode estar relacionada com a eliminação de CO₂ e água advindos do metabolismo aeróbio para a atmosfera.

As **tabelas 9 - 12** mostram que em todos os casos houve diminuição da massa das amostras. Isso é um indicativo de que houve eliminação de água e CO₂ induzida pela atividade metabólica dos fungos sobre o substrato. A maior diminuição de massa ocorreu no *P. ostreatus* indicando que a sua atividade é mais intensa quando comparado com *L. edodes* no mesmo período de incubação. Tal fato confirma a análise visual de formação de hifas apresentadas nesse trabalho desenvolvidas no substrato no mesmo período de tempo.

5.3 Quantificação da proteína bruta

A quantidade de proteína bruta em cada uma das amostras incubadas com *P.ostreatus* e *L.edodes* encontra-se nas **Tabelas 13 - 18**. As amostras completas são aquelas em que foram adicionados CaCO₃ e levedura. O bagaço puro corresponde as amostras inoculadas em substrato constituído apenas pelo bagaço termo hidrolisado. Os valores das amostras que contem 1% de levedura e as amostras completas possuem 0,038% de proteína. Esse valor foi descontado na porcentagem encontrada em cada uma destas amostras.

Tabela 13: Quantificação em porcentagem de proteína bruta em amostra de bagaço de cana termo hidrolisado recém produzido pela indústria, inoculado com *Pleurotus ostreatus* por 45 dias de incubação.

Amostra	Média de NaOH 0,01N titulado (mL)	Proteína bruta (%)*
Completo	23,9	3,106 a**
Bagaço + CaCO ₃	24,06	1,502 b
Bagaço + levedura	24,36	1,300 b
Bagaço Puro	24,5	0,989 b

*Média de três repetições.

**As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% indicadas pelo teste de Tukey.

Tabela 14: Quantificação em porcentagem de proteína bruta em amostra de bagaço de cana termo hidrolisado recém produzido pela indústria, inoculado com *Pleurotus ostreatus* por 7 dias de incubação.

Amostra	Média de NaOH 0,01N titulado (mL)	Proteína bruta (%)*
Completo	24,06	3,046 a**
Bagaço + CaCO ₃	24,26	1,485 b
Bagaço + levedura	24,46	1,077 b
Bagaço Puro	24,63	0,709 b

*Média de três repetições.

**As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% indicadas pelo teste de Tukey

Tabela 15: Quantificação em porcentagem de proteína bruta em amostra de bagaço de cana termo hidrolisado exposto a condições ambientais por 45 dias, inoculado com *Pleurotus ostreatus* durante 45 dias de incubação.

Amostra	Média de NaOH 0,01N titulado (mL)	Proteína bruta (%)*
Completo	24,06	3,200a**
Bagaço + CaCO ₃	24,6	1,738b
Bagaço + levedura	24,93	1,312b
Bagaço Puro	24,86	1,166b

*Média de três repetições.

**As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% indicadas pelo teste de Tukey

Tabela 16: Quantificação em porcentagem de proteína bruta em amostra de bagaço de cana termo hidrolisado recém produzido pela indústria, inoculado com *Lentinula edodes* durante 45 dias de incubação

Amostra	Média de NaOH 0,01N titulado (mL)	Proteína bruta (%)*
Completo	23,66	3,420a**
Bagaço + CaCO ₃	24,53	1,967b
Bagaço + levedura	24,73	1,170b
Bagaço Puro	25,06	1,025b

*Média de três repetições.

**As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% indicadas pelo teste de Tukey

Tabela 17: Quantificação em porcentagem de proteína bruta em amostra de bagaço de cana termo hidrolisado recém produzido pela indústria, inoculado com *Lentinula edodes* durante 7 dias de incubação

Amostra	Média de NaOH 0,01N titulado (mL)	Proteína bruta (%)*
Completo	24,33	2,692a**
Bagaço + CaCO ₃	25,1	1,275b
Bagaço + levedura	25,13	0,881b
Bagaço Puro	25,16	0,617b

*Média de três repetições.

**As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% indicadas pelo teste de Tukey

Tabela 18: Quantificação em porcentagem de proteína bruta em amostra de bagaço de cana termo hidrolisado exposto a condições ambientais por 45 dias, inoculado com *Lentinula edodes* durante 45 dias de incubação.

Amostra	Média de NaOH 0,01N titulado (mL)	Proteína bruta (%)*
Completo	23,8	3,430a**
Bagaço + CaCO ₃	24,7	2,028b
Bagaço + levedura	24,53	1,769b
Bagaço Puro	24,96	1,090b

*Média de três repetições.

**As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% indicadas pelo teste de Tukey

O método de Kjeldahl possibilita a determinação indireta de proteínas em várias amostras biológicas (NOGUERA, SOUZA, 2005). Nesse método o nitrogênio existente nas amostras é convertido em amônia pela introdução de ácido sulfúrico em concentrações elevadas. Posteriormente esta amostra é alcalinizada e a amônia passa a ser volátil e é destilada, sendo recolhida em solução receptora e quantificada por titulação com solução padrão. Pelos cálculos demonstrados anteriormente nesse trabalho é possível saber a porcentagem de proteína bruta na amostra de acordo com a quantidade de nitrogênio presente na mesma.

Comparando-se apenas as amostras correspondentes a *P. ostreatus*, tabelas 13,14 e 15 verificou-se que não há diferença significativa entre a quantidade de nitrogênio total das amostras de bagaço recém produzido e de bagaço exposto a condições ambientais por 45 dias. Em todos os casos o substrato completo, isto é, aquele composto por CaCO_3 e levedura liofilizada resultou em maior quantidade de proteína bruta. Com relação ao tempo de colonização, também não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nas amostras com 7 e 45 dias. Diante desse resultado, considera-se em termos de teores proteicos e econômicos não ser vantajoso aumentar o tempo de colonização do substrato.

Comparando-se as amostras de *Lentinula edodes*, tabelas 16,17 e 18, constatou-se que não houve diferença significativa entre a quantidade de nitrogênio total das amostras de bagaço recém produzidas e de bagaço exposto a condições ambientais por 45 dias. As amostras que contém o substrato completo foram as que apresentaram melhor resultado e não há diferença significativa na quantidade proteica observada nas amostras com 7 dias e 45 dias, não sendo necessário aumentar o tempo de colonização.

Com relação a comparação de quantidade de nitrogênio total entre as duas espécies de fungos, pode-se inferir que, ainda que o *L.edodes* possua crescimento menos mais lento do que *P.ostreatus*, este apresenta valores de nitrogênio total mais elevados. Carvalho e Aguiar, (2012) em seu estudo demonstraram que a quantidade de nitrogênio total de *P ostreatus* em diferentes substratos variou de 20 a 34,5%. Bonatti et al (2003), utilizando como substrato palhas de folhas de bananeira apresentaram valores de 16%, portanto inferior. Com relação a *L.edodes* , Sales et al (2013) demonstraram diferenças na quantidade de proteína bruta em diferentes substratos. Deste modo, fica evidente que o substrato influencia nos valores de proteína bruta dessas espécies, sendo que o *L.edodes* apresentou melhores resultados para o bagaço de cana termo hidrolisado.

Ao se avaliar a potencialidade de um material para tornar-se ração para ruminantes, é importante saber a quantidade de proteína bruta, uma vez que o alto teor de proteína na dieta desses animais tem por finalidade atender às exigências de nitrogênio para o crescimento microbiano no rúmen, e ainda possuir um excesso que aumentará a disponibilidade de aminoácidos para absorção no intestino dos próprios ruminantes (OLIVEIRA et al, 2015). Além disso, para se conseguir melhor eficiência no desenvolvimento de um rebanho, um dos fatores que deve ser cuidadosamente

monitorado é a nutrição, sendo a proteína um dos nutrientes de maior importância pois, possui elevado impacto no sistema produtivo, ocasionando ganhos diferenciados no desempenho animal. (SILVA, 2010). Considerando os aumentos da quantidade de nitrogênio total para as duas espécies de fungos em substrato completo pode-se inferir que a biotransformação favorece a utilização do bagaço de cana termo explodido na forma de ração para ruminantes. Resultados semelhantes também foram encontrados em trabalhos anteriores (SOUZA, 2013)

5.4 Quantificação de lipídios nas amostras

Os resultados das extrações de lipídios das amostras cultivadas nos substratos estão registrados na **tabela 19**. O bagaço novo representa aquele que foi recém produzido pela indústria e o bagaço velho representa aquele que ficou submetido a condições ambientais por 45 dias.

Tabela 19: Quantificação mediante extração de lipídios nas amostras de bagaço de cana termo hidrolisado inoculados com *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula endodes*, incubados a 25°C.

Amostra	Média (%)
Bagaço puro	0,55
<i>L.edodes</i> 45 dias bagaço novo	1,34
<i>L.edodes</i> 45 dias bagaço velho	0,93
<i>L.edodes</i> 7 dias bagaço novo	0,63
<i>P.ostreatus</i> 45 dias bagaço novo	1,01
<i>P.ostreatus</i> 45 dias bagaço velho	0,79
<i>P.ostreatus</i> 7 dias bagaço novo	0,67

Registrou-se que em todas as amostras houve aumento da quantidade de lipídios. Os resultados de *L.edodes* indicam quantidade maior de lipídios que no *P.ostreatus*, e em ambos os casos houve aumento da quantidade de lipídeos quando maior o tempo de incubação. No entanto, comparando-se o bagaço recém produzido com o mais antigo, este último apresentou decréscimo nos valores, para os dois espécimes de fungos.

Ainda que a quantidade de lipídeos tenha aumentado em todas as amostras com relação ao bagaço puro, isto é, sem ser submetido a fermentação, a porcentagem continua baixa. Isso pode ter ocorrido pelo fato desses fungos possuírem baixa quantidade de lipídeos e gorduras. Essa informação está presente em diversas literaturas como Bonatti et al, (2004) que descreveram essas duas espécies de fungos como ricas em carboidratos, vitaminas e sais minerais, porém com baixa quantidade de lipídeos. Cheung e Peter (2008) afirmam que nas espécies *L.. edodes*, *S. commune*, e *P. ostreatus*, o teor de lipídeos pode atingir apenas 2% .

Vale ressaltar que a gordura existente nos cogumelos comestíveis contém todas as classes de compostos lipídicos, incluindo ácidos graxos livres, mono-, di-, e triglicérides, esteróis (ergosterol), ésteres de esteróis e fosfolípidos (HELENO et al., 2009).

5.5 Avaliação de toxicidade

A *Daphina* é amplamente utilizada em testes ecotoxicológicos pois trata-se de um microcrustáceo com alta sensibilidade a diversos causadores de toxicidade em ambientes aquáticos.

Os resultados são expressos em Concentração Efetiva Média (CE 50), que é determinada de acordo com a imobilidade ou mortalidade de 50% dos indivíduos. Isso significa amostras que apresentam valores de (CE 50) menores, são mais tóxicos pois em pequenas concentrações são suficientemente letais ou imobilizar 50% dos indivíduos de *D.similis* do teste.

Os resultados de toxicidade aguda com *Daphinia similis* estão descritos nas figuras Figuras:13, e 14.

Figura 13: Toxicidade aguda com *Daphnia similis* dos bagaços recém produzidos pela indústria e exposto a condições ambientais por 45 dias, antes da colonização fungica

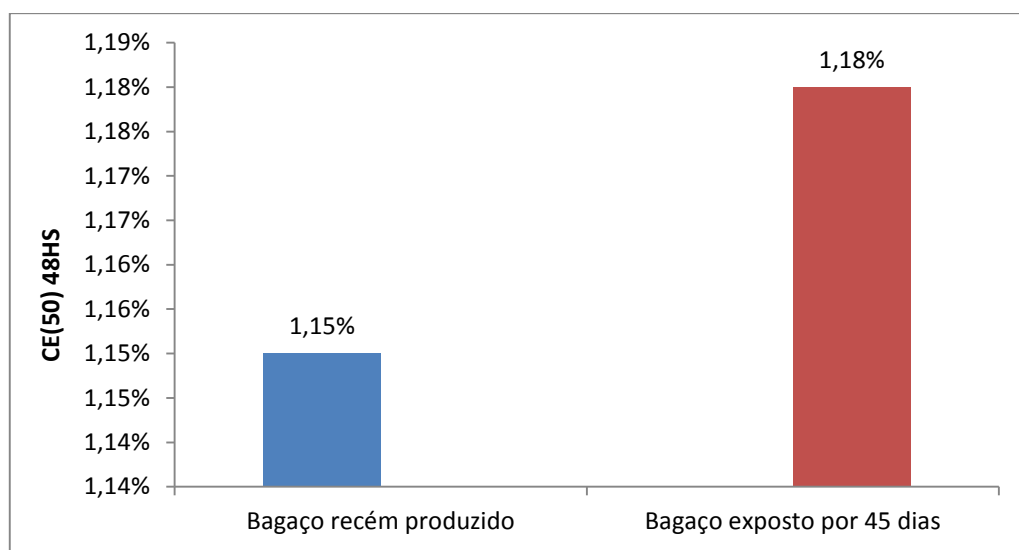
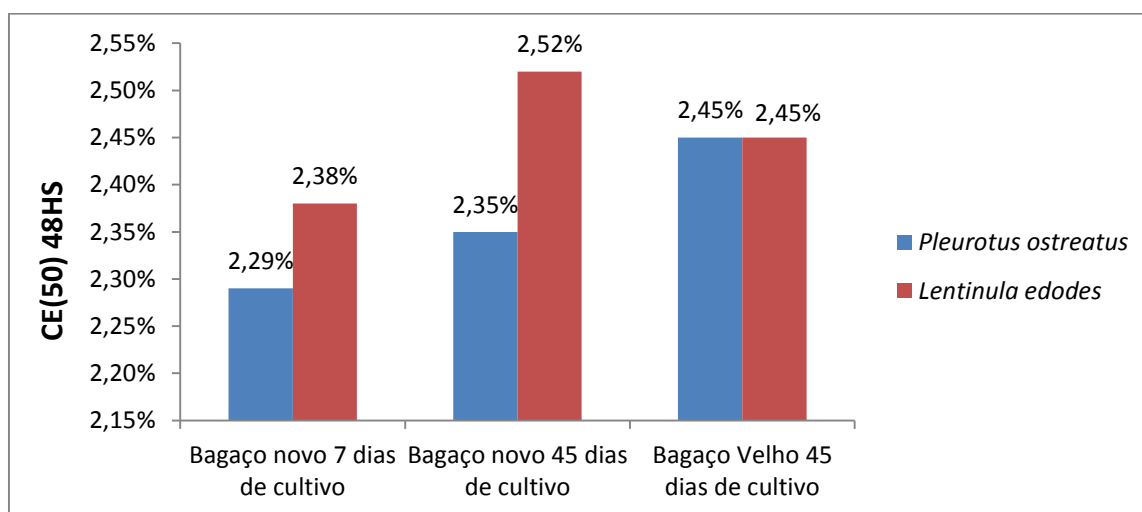


Figura 14: Análise comparativa da toxicidade aguda com *Daphnia similis* dos bagaços recém produzidos pela indústria (novo) e exposto a condições ambientais por 45 dias (velho), por *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*



A figura 13 indica que os valores de toxicidade aguda entre o bagaço recém produzido e aquele submetido a condições ambientais por 45 dias são próximos. Houve diminuição na toxicidade em todos os tratamentos comparando-os com os substratos antes de serem colonizados.

Analisando-se as espécies de fungos, é possível verificar que em ambos os casos o bagaço recém produzido mostrou valores de CE(50) menor, indicando ser material mais tóxico. O aumento do tempo de inoculação de 7 para 45 dias, permitiu uma detoxificação do material. A CE(50) inicial de 2,29% para *P.ostreatus* atingiu 2,35%; e a inicial de 2,38% para *L.edodes* atingiu a 2,52%. Lembrando que quanto menos o CE(50) mais tóxico é o material. Resultados semelhantes com utilização de *L.edodes* em bagaço termo explodido foram encontrados em trabalhos anteriores, (SOUZA,2013).

Comparando-se as espécies de fungos, os dados obtidos indicam que o *L.edodes* tem a capacidade de detoxificar o material com mais eficiência do que o *P.ostreatus* em todos os casos.

Como citado o *L.edodes* e o *P.ostreatus* são fungos da podridão branca e, portanto, produtores de lacases, que são capazes de degradar compostos fenólicos como a lignina. Devido a sua baixa especificidade de substrato estas enzimas atualmente tem sido empregadas na detoxificação de esgoto degradação de xenobióticos e biorremediação, produção de aglomerados de madeira sem agregantes tóxicos (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). Esse fato pode explicar porque as duas espécies de fungos diminuíram a taxa de toxicidade aguda nas amostras.

Apesar de terem apresentado um aumento do CE (50), este dado corresponde a uma diminuição da toxicidade aguda. Nas amostras inoculadas, esse valor foi pequeno comparando-se com os substratos sem tratamento. Esse fato pode estar relacionado com a quantidade de nitrogênio disponível no substrato. Silva, et al; (2012) em seu trabalho mostraram que a quantidade afeta a produção de lacase. Quanto menor a quantidade de nitrogênio disponível menor a quantidade de lacase produzida e consequentemente menor a biodegradação de compostos fenólicos. O substrato utilizado neste trabalho apresentou baixo teor de nitrogênio.

5.6 Demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

Os resultados de DQO e de DBO indicam aumento após o crescimento dos fungos nos substratos. Esses dados significam que o material lignocelulósico solubilizado das amostras submetidas ao tratamento passaram a ter matéria orgânica mais facilmente assimilável do que o solubilizado do bagaço termo hidrolisado puro. (Figuras 15 e 16)

Figura 15: Análise de DQO do bagaço de cana termo hidrolisado antes e após a inoculação com *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* incubados a 25°C +/- 2°C.

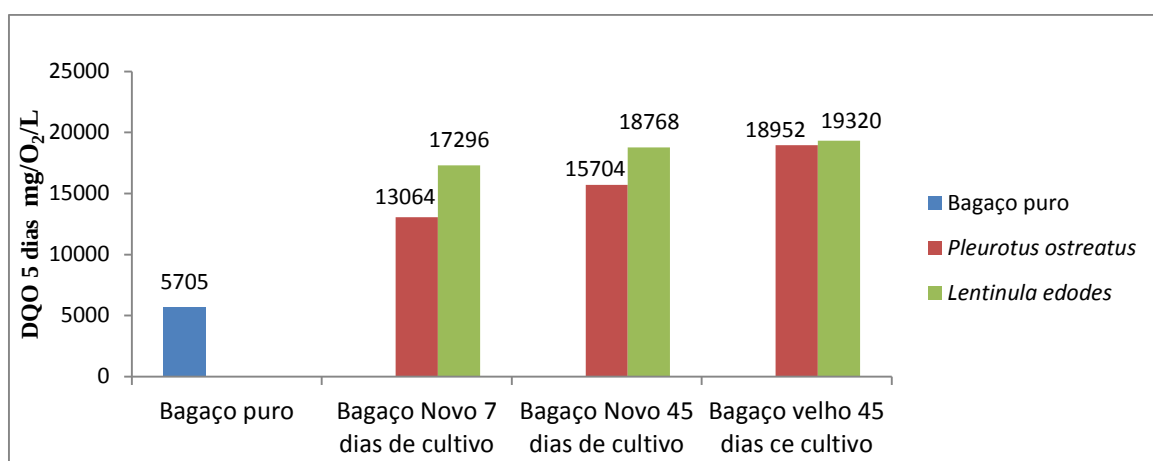
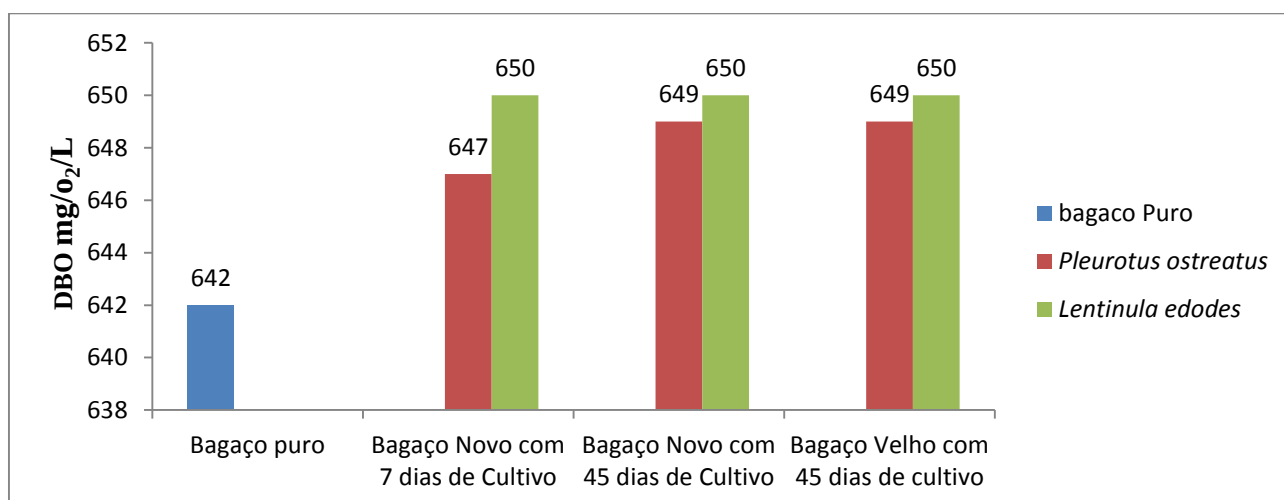


Figura 16: Análise de DBO do bagaço de cana termo hidrolisado antes e após a inoculação com *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* incubados a 25°C +/- 2°C.



Analisando-se a DQO registrou-se que a quantidade de oxigênio necessária para degradar toda a matéria orgânica aumentou, tanto para *P. ostreatus* quanto para *L.edodes*. (**Figura 15**), o que indica aumento considerável na presença de matéria orgânica solubilizada das amostras.

Quanto a DBO também houve aumento do consumo de O₂ indicando a degradação de matéria orgânica das amostras que foi solubilizada (**Figura 16**). Os valores da DBO relativamente baixos em relação a DQO, significa que ambos os fungos após período de incubação deixaram de consumir substancias que foram solubilizadas pela água

5.7 Qualidade proteica pelo método de *Enterococcus zymogenes*

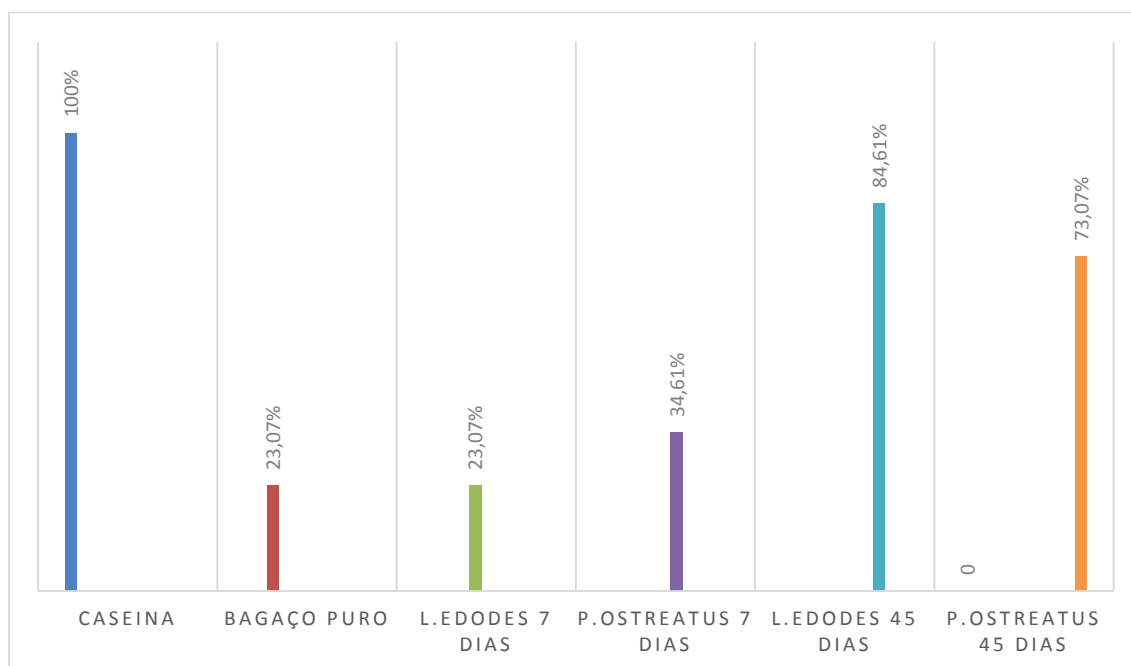
Por meio deste teste obteve-se Valor Nutricional Relativo (VNR) dos alimentos que é importante pois permite a formulação de rações que atendam às exigências nutricionais dos animais e humanos (BOSCOLO et al., 2002).

Altos teores de VNR são importantes para determinar a qualidade da proteína existente na amostra. A caseína é considerada referência, por tratar-se de uma proteína completa, portanto, determina-se em 100% o seu VNR. Quando as amostras apresentam valores mais próximos ao valor da porcentagem de VNR da caseína, melhor é a sua qualidade proteica (MORALES,2012).

Diante destas informações pode-se comparar a qualidade proteica do bagaço após a fermentação com *P. ostreatus* e *L. edodes* e o bagaço puro. O bagaço puro apresenta valor igual a 23,07%, ou seja, inferior ao que registrou-se em todas as amostras após o cultivo dos fungos neste substrato, apontando melhoria no VRN. Para *P.ostreatus*, o VRN foi de 34,61% com 7 dias e de 73,07% com 45 dias de incubação. Para *L.edodes* com 7 dias de incubação o valor foi de 23,07% atingindo 84,61% com 45 dias.. A análise comparativa das duas espécies de fungos, com 7 dias de incubação, evidenciou que as amostras de *P.ostreatus* apresentaram qualidade proteica melhor do que *L.edodes*. No entanto, após maior tempo de cultivo, as amostras com *L.edodes* passaram a apresentar percentual de VRN mais elevado (84,61%).

A **figura 17** evidencia a melhoria na qualidade proteica do bagaço de cana termo hidrolisado após a fermentação fungica. Nela também fica registrada a importância do tempo de incubação na formação de proteínas com melhor qualidade nutricional.

Figura 17: Comparação da qualidade proteica pelo método microbiológico de *Enterococcus zymogenes* das amostras de bagaço puro e submetidas ao tratamento com *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* comparados com a caseína.



Os fungos possuem uma considerável porcentagem de proteína. No entanto a qualidade proteica de um alimento é, sobretudo, determinada pelo seu valor biológico (ASTUDILLO, 2007). Sendo assim para se ter uma qualidade nutricional não basta apenas o material possuir uma alta porcentagem de proteína, mas apresentar significativo VNR

Reis (2012) considerou *P.ostreatus* como sendo não apenas uma boa fonte de proteína, mas que a sua composição em aminoácidos é comparável com a das proteínas animais. Sales et al.(2013) também afirmam que *L.edodes* possui boa qualidade proteica. Estes fatos reforçam os dados obtidos com o método microbiológico de *Enterococcus zymogenes*, uma vez que possuem não apenas uma porcentagem significativa de proteína, mas um VRN satisfatório..

Outro fator que favorece a utilização desses fungos para a incorporação do bagaço de cana termo hidrolisado na ração de ruminantes é a ausência de príons (“proteinaceous infectious particles”) no material. Os príons são proteínas anômalas, com tamanho menor que um vírus cuja disseminação no organismo provoca a rápida degeneração do sistema

nervoso. Estes são transmitidos mediante o consumo de material infectado, e não se conhece processo de cocção ou desinfecção que consiga sua inativação. Os príons possuem período de incubação que pode durar meses ou anos (LÉVI-STRAUSS, 2009; KECK, 2009). Em 1992 houve incidência epidêmica na Inglaterra, chegando a relatos de 1000 novos casos de ruminantes contaminados semanalmente com a doença, conhecida “Vaca Louca”. Posteriormente o fato foi associado à alimentação das vacas que era constituída há anos com rações “proteinadas”. Esta ração preparada a partir de *Meat and Bone Meal* (MBM), uma farinha de carne e ossos produzida com os restos de outros mamíferos com a finalidade de introduzir uma alimentação com maior teor proteico ao rebanho. Segundo DALE, 2002, os prions não são transmitidos por vírus, fungos ou bactérias. Sabe-se ainda que a sua transmissão não ocorre por matéria vegetal. Por esse motivo, uma ração constituída de bagaço de cana e fungos, não apresentaria risco de contaminação por prions aos rebanhos.

6 CONCLUSÃO

Lentinula edodes e *Pleurotus ostreatus* tem potencial de desenvolvimento em substrato de bagaço de cana termo hidrolisado.

As amostras analisadas, apontam um aumento na quantidade de proteína bruta, de até três vezes comparando-se com o substrato original.

O valor nutricional relativo (VNR) das proteínas presentes nas amostras sugere que no substrato completo o *P.ostreatus* e *L.edodes* apresentam melhoria na qualidade protéica de 84,61% para *L.edodes* e 73,07% para *P.ostreatus* quando comparado ao padrão caseína 100%. Estes dados recomendam o aproveitamento do substrato na forma microbiologicamente modificada pelos fungos *P. ostreatus* e *L. edodes*.

A análise com toxicidade aguda com *D.simlis*, apresentou diminuição da toxicidade, . Esta condição favorece tanto a biodegradação do material em condições ambientais como o desenvolvimento e atuação no rumem conferindo ao material com maior potencial de digestibilidade.

P.ostreatus e *L.edodes* cultivados em bagaço de cana termo hidrolisado mostraram potencial de tratamento e enriquecimento podendo ser aproveitado, no momento, como ingrediente de ração para ruminantes.

7 BIBLIOGRAFIA

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp- NORMA 12713, 2004.

ASTUDILLO, Y. I. H. – Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus ostreatus* spp. Apareamiento de *Neohaplontes compatibles*. México: Instituto Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de biotecnología, 2007. Tese de Mestrado.

ARAÚJO, J.M.A.; CARLOS, J.C.S.; SEDYAMA, C.S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de B-glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.17, p.137- 141, 1997.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 719–739, 2005.

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

BISEN, P. S., BAGHEL, R. K., SANODIYA, B. S., THAKUR, G. S., & PRASAD, G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. **Current Medicinal Chemistry**, India, v. 17, n. 22, p.2419-2430. 2010

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

BONATTI, M, Estudo da composição de espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* cultivados em palha de bananeira. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v4, n.1, p.1-35, jun 2002

BONATTI, M; KARNOPP, P; SOARES, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, London, v.88, n.3; p 425-428. Dec.2003.

Bonatti, M., Karnopp, P., Soares, H. M., & Furlan, S. A.. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 425-428, 2004

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT (Portugal), 2008.

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

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.539-545, 2002.

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

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

CARVALHO, S.; AGUIAR, L. Determinação Bromatológica de *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos de diferentes cultivares de bananeira. **Interciencia**, v. 37, n. 8, p. 621-626, 2012.

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

CHANG, S.T.; MILES, P.G. **Mushrooms**: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Boca Raton: CRC, 451P. 2004

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

CHEUNG, PETER C.K. – Mushrooms as a functional foods - Hong Kong: The Chinese University of Hong Kong, ISBN 978-0-470-05406-2. 2008.

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

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

COUTO, S. R.; TOCA-HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 558-569, 2007.

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

DALE, N. La Harina de Carne y Hueso: Segura y Eficiente. Indústria Avícola. Ed. Latino Americana de Poultry Internacional. V.49, n 4, p.18, 2002.

DE ALBUQUERQUE, M P; PEIL, R M N; DO NASCIMENTO, J S. Capacidade de colonização micelial de *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Lentinus sajor-caju* em diferentes substratos. **Caderno de Pesquisa**, v. 24, n. 2, p. 40-54, 2013.

DIFCO Manual, Michigan, Tenth Edition, 1984

DURAN N; ESPOSITO E, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidases-like compounds in wastewater and soil treatments : a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, Amsterdam, v 337, n 2, p. 83-99, Nov 2000

DURAN N; Applications os laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized od differets supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v31, n7, p.907-931, Dec 2002.

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

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

FORCHIASS, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodemeus* growing in solid-state fermentation. **JournalFood Engineering**, v. 81, p. 54-59, 2007.

FORD, D. K. : Culture of human genital “T-strain” pleuropneumonia-like organisms. **Journal Bacteriology**. 84: 1028-1034. 1962

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

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochem. Engineer. J.** v. 44, p. 2–12, 2009.

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

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

HELENO, S.A.; BARROS, L.; SOUSA, M.J.; MARTINS, A.; Ferreira, I.C.F.R. - Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. **Microchemical Journal**, 93, 195-199, 2009

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

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

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

KECK, F. “Conflits d’experts. Les zoonoses, entre santé animale et santé humaine” *Ethnologie Française*, tome XXXIX, janvier-mars. 2009

KORSHIKOV, O. A. The freshwater algae of the Ukranian. 1987.

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

LÉVI-STRAUSS, C.. “A lição de sabedoria das vacas loucas”. **Estudos Avançados**. Vol. 23, n. 67. 2009.

LOMASCOLO, A., UZAN-BOUKHRIS, E., HERPOËL-GIMBERT, I., SIGOILLOT, J-C., LESAGE-MEESSEN, L. Peculiarities of *Pycnoporus* species for application in biotechnology. **Applied Microbiology Biotechnology** 92: 1129-1149, 2011.

LORA, ELECTO SILVA. Controle da poluição do ar na indústria açucareira. **Itajubá: STAB**, 2000.

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

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

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

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

MOTA, S. Introdução à engenharia ambiental. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, Rio de Janeiro, 4ª edição, p. 343, 2006.

MURRAY,BE.The life and the times of the Enterococcus. **Microbiology Clinical Reviews** , 3:46-65. 1990

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

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 313p. 2005.

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

OLIVEIRA, H.C.B.; URBEN, A.F. Cultivo de *Pleurotus* sp. utilizando a técnica “Jun-Cao”. In: URBEN, A.F. Produção de cogumelos por meio da tecnologia chinesa modificada. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 151p. 2001.

OLIVEIRA, Simone Gisele et al. Valor alimentício e aspectos econômicos de dietas com variação no teor de tanino e nível protéico em bovinos de corte. **Ceres**, v. 55, n. 5, 2015.

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

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

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

REIS, F.S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I.C. - Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**. 50, 2, 191-7. 2012.

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

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

SALES-CAMPOS, C. ARAUJO, L. M., MINHONI, M. T., ANDRADE, M. C. Centesimal composition and physical-chemistry analysis of the edible mushroom *Lentinus strigosus* occurring in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1537-1544, 2013.

.SANTOS, A. F.; QUEIRÓZ, J. H. de; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, S. B., Martins, M. A., Faroni, L. R. D. A., Junior, V. R. D. B. Perda de matéria seca em grãos de milho armazenados em bolsas herméticas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 674-682, 2012.

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

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

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

SILVA, J. J., SANTANA, T. T., DE OLIVEIRA, A. C. C., DE ALMEIDA, P. H., DE

SOUZA, S. G. H., LINDE, G. A., OLIVEIRA, a. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 15(2), 191-196. 2012

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

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

SILVA, Vanessa S.; GARCIA, Carla A.; SILVA, Clandio M. O destino do bagaço da cana de açúcar: um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleira do Paraná. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. Curitiba, v.3, n.1, p. 59-76, jan.abr/2010.

SILVA, J. L. Níveis de Proteína Degradável no Rúmen em Dietas para Cordeiros. 2010. p.62. (Dissertação para Magister Scientiae). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, MG. 2010.

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

SOUZA, L.G. introdução de *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Pleurotus ostreatus* (shimeji) em bagaço de cana termo explodido para diminuição da toxicidade. UNESP-RC. 45pg. 2013.

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

SUHAS, P. J. M. C.; CARROTT, M. M. L. R. Lignin - from natural adsorbent to activated carbon: A review. **Bioresource Technology**, v.98, p.2301-2312, 2007.

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

TAVARES, L C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

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

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

TUZZIN, G. Obtenção de nanofibras de celulose a partir de resíduos da indústria fumageira. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Processos), Universidade de Caxias do Sul, 2015, 104f

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

UNICA, 2012: União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/mapa-da-producao/> Acessado em: 16/07/2015

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