



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**RESÍDUOS PRODUZIDOS NAS FEIRAS ABERTAS DA CIDADE DE MANAUS COMO
SUBSTRATO PARA O CULTIVO E PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus***

LUANA CAROLINA ROCHA MARINHO DOS SANTOS

**MANAUS
2016**

LUANA CAROLINA ROCHA MARINHO DOS SANTOS

**RESÍDUOS PRODUZIDOS NAS FEIRAS ABERTAS DA CIDADE DE MANAUS COMO
SUBSTRATO PARA O CULTIVO E PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de *mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais*.

**Orientadora: Prof Dra Érica Simpício de Souza.
Co-orientador: Prof Dr João Vicente Braga de Souza.**

**MANAUS
2016**

LUANA CAROLINA ROCHA MARINHO DOS SANTOS

**RESÍDUOS PRODUZIDOS NAS FEIRAS ABERTAS DA CIDADE DE MANAUS COMO
SUBSTRATO PARA O CULTIVO E PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Prof^ª.Dra. Erica Simplício de Souza

Prof^ª.Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

Prof^ª.Dra. Ieda Hortêncio Batista

**MANAUS
2016**

Ficha Catalográfica

S237 Santos, Luana Carolina Rocha Marinho dos
Resíduos produzidos nas feiras abertas da cidade de Manaus
como substrato para o cultivo e produção de lacase por *Pleurotus*
ostreatus . / Luana Carolina Rocha Marinho dos Santos -- Manaus:
Universidade do Estado do Amazonas, 2016.

51 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
Amazonas - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Érica Simplício de Souza

Ficha catalográfica elaborada por
Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

*Ao meu pai Luis Eduardo Amorim dos Santos e à minha mãe Ana Clary Rocha Marinho
que me ensinaram no caminho em que devia andar e me motivaram a perseguir meus sonhos.*

“Porque Deus é quem efetua em vós tanto o querer como o realizar, segundo a Sua boa vontade”.

Filipenses 2:13

AGRADECIMENTOS

À FAPEAM e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

Ao Laboratório de Microbiologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por ceder seu espaço para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Laboratório de Alimentos e Nutrição do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelas análises da composição centesimal dos resíduos.

A minha orientadora Prof^ª. Dra. Érica Simplício pela excelente orientação, por ser um exemplo como pessoa e profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. João Vicente pelo crescimento profissional que me foi proporcionado durante esses dois anos e por me receber e acompanhar em seu laboratório.

À banca examinadora do trabalho: prof^ª Dr^a Ieda Hortência Batista e prof^ª Dr^a Patrícia Melchionna Albuquerque pelas colaborações.

Agradeço a dona “Lili” pela sua sabedoria, amor e dedicação no seu trabalho e aos demais técnicos do laboratório (Alita, Juliana, seu Rai e seu Fran).

Agradeço a Walter Oliva pelo apoio na revisão do inglês do artigo, e pela disposição em ajudar e amizade.

Agradeço à Prof^ª. Msc Ana Cortez, pois você é uma profissional indescritível e a nossa mãezona do laboratório.

Agradeço aos demais colegas de trabalho que me receberam e me fizeram sentir em casa, e se tornaram amigos que vou levar pra vida toda.

Agradeço a Amanda Carolina, Hannah, Jéssica, Lucas, Matheus, Paulo e Jessé, meu grupo familiar que é a minha segunda família, sempre me apoiando e compartilhando momentos bons e ruins.

À minha mãe Ana Clary e meu pai Luís Eduardo e meus irmãos Ana Rebeca, Isaac e Valéria, pois foram meu apoio e motivação na busca desse sonho.

Meu agradecimento especial a Mariane Martins, Anna Karolina e Vitória Lopes alunas do curso de Engenharia Química da UEA com quem tive o prazer de dividir muitos bons momentos enquanto trabalhávamos neste projeto.

E a todos os demais que de alguma forma contribuíram com esse trabalho.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a viabilidade do uso de resíduos produzidos nas feiras abertas da cidade de Manaus como substrato para o cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*. Para a seleção do resíduo mais adequado para o cultivo foram realizados bioprocessos utilizando os resíduos de casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), caroço de açai (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de mandioca (*Manihot esculenta*). Os resíduos foram obtidos das feiras abertas da cidade de Manaus e secos em estufa de circulação de ar a 70°C e utilizados conjuntamente 20% de farelo de trigo como suplementação. Os resíduos foram triturados e padronizados, tendo sua umidade corrigida para 70% do peso da mistura. Um inóculo foi preparado à base de farelo de trigo e após a incubação o mesmo foi despejado nos sacos contendo resíduo. Após a incubação e frutificação os cogumelos foram colhidos e pesados para o cálculo de eficiência biológica (EB) e perda de matéria orgânica (PMO). Para a investigação da produção de lacase nos resíduos foram retiradas amostras dos sacos contendo resíduo nos dias 10,15,20,25 e 30 e foi realizada a determinação da atividade da lacase. Como resultado a casca de tucumã apresentou a produção mais alta de lacase (21766,82 U/Kg) seguida pela casca da pupunha (6161,43 U/Kg). A casca de mandioca demonstrou a maior eficiência biológica (12,82%). O resíduo de casca de pupunha foi selecionado para a etapa de otimização da produção. Para este resíduo foram avaliadas as condições mais adequadas de cultivo e produção de lacase. Utilizando planejamento fatorial e superfície de resposta foi possível determinar as melhores condições para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*. Assim, a condição excelente para a produção de lacase foi utilizando 150g de casca de pupunha e 60% de umidade onde se obteve uma produção de lacase de 3565,02 U/Kg.

Palavras-chaves: *Pleurotus ostreatus*, cogumelos comestíveis, produção de lacase, resíduos vegetais.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the feasibility of using waste produced in open fairs in the city of Manaus as a substrate for the cultivation and laccase production by *Pleurotus ostreatus*. For the selection of the more suitable waste for cultivation were performed bioprocesses using tucuma's peel (*Astrocaryum aculeatum*), cupuacu's peel (*Theobroma grandiflorum*), peach palm's peel (*Bactris gasipaes*), acai seed (*Euterpe oleracea*) and peel of the root of cassava (*Manihot esculenta*). The residues were obtained from open markets in the city of Manaus and dry in air circulation oven at 70 ° C and used with 20% wheat bran as supplementation. The residues were crushed and standardized, and its moisture corrected to 70% by weight of the mixture. An inoculum was prepared with wheat bran and after incubation it was poured in bags containing residue. After incubation and fruiting mushrooms were harvested and weighed for biological efficiency calculation (EB) and loss of organic matter (PMO). For the investigation of laccase production in the waste samples were taken from the bags containing residue 10,15,20,25 and 30 days and the activity of laccase was determined. As a result the tucuma's peel had the highest production of laccase (21766.82 U / kg) followed by the peach palm's peel (6161.43 U / kg). Peel of the root of cassava showed the highest biological efficiency (12.82%). The peach palm's peel residue was selected for the optimization step. To this residue were investigated the most appropriate conditions for the cultivation and production of laccase. Using factorial design and response surface was possible to determine the best conditions for the production of laccase by *P. ostreatus*. Thus, the excellent condition for the production of laccase was using 150g of peach palm's peel and 60% of moisture where it obtained a laccase production of 3565.02 U / Kg.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, edible mushrooms, laccase production, vegetable waste.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis e variáveis umidade e relação resíduo:farelo usados no planejamento fatorial.....	24
Tabela 2. Composição centesimal dos resíduos coletados nas feiras abertas da cidade de Manaus.....	25
Tabela 3. Eficiência Biológica e Perda de matéria orgânica dos substratos agroindustriais utilizados para a produção de cogumelos por <i>Pleurotus ostreatus</i>	26
Tabela 4. Resultado do planejamento fatorial com três repetições no ponto central para a produção de lacase por <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
Tabela 5. Efeito das variáveis testadas para produção de lacase, calculados a partir dos dados apresentados na tabela 2.....	27
Tabela 6. Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para a produção de lacase.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>): a) fruto do tucumã, b) sanduíche popular no Amazonas feito com polpa de tucumã.....	4
Figura 2 – Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i>): a) fruto do cupuaçu, b) sorvete de cupuaçu, muito popular na região norte do Brasil.....	4
Figura 3 – Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i>): a) semente de cupuaçu após a retirada da polpa, b) manteiga de cupuaçu.....	5
Figura 4 – Pupunha (<i>Bactris gasipaes</i>): a) palmeira da pupunheira, b) fruto de pupunha muito apreciado pela população amazonense.....	6
Figura 5 – Palmeira do açazeiro. Possui grande importância econômica e cultural na região norte do Brasil.....	6
Figura 6– Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>): a) fruto do açaí, b) semente de açaí, resíduo obtido após a maceração para obtenção da polpa.....	7
Figura 7-Mandioca (<i>Manihot suculenta</i>): a) resíduos gerados da utilização da mandioca (casca e entrecasca), b) fécula de mandioca.....	8
Figura 8-Morfologia do corpo de frutificação (cogumelo), mostrando o píleo, pedúnculo, estirpe e lamelas.....	9
Figura 9- Cogumelos comestíveis comumente cultivados no Brasil: a) <i>Lentinula edodes</i> , b) <i>Pleurotus ostreatus</i> , c) <i>Agaricus bisporus</i>	11
Figura 10- Cogumelo ostra (<i>Pleurotus ostreatus</i>).....	13
Figura 11- Preparo do substrato: Os resíduos são secos em estufa (1) , triturados (2) e acondicionados em sacos de polipropileno (3).....	17

Figura 12 Figura 12 - Preparo do inóculo: cultura previamente preparada de *Pleurotus ostreatus* (1) é inoculada em frascos contendo farelo de trigo (2) e após a colonização são inoculados no substrato (3).....17

Figura 13- Frutificação no substrato: a) etapa de colonização do substrato, b) frutificação nos resíduos.....18

CAPÍTULO I

Figura 1 - Cinética da produção de Lacase por *Pleurotus ostreatus* utilizando como substrato resíduos coletados nas feiras da cidade de Manaus.....25

Figura 2. Produção de corpos de frutificação de *Pleurotus ostreatus* nos resíduos: a) b) d) e) casca de mandioca, d) casca de pupunha, f) e serragem de *Pinus*.....26

Figura 3 - Superfície de resposta apresentando as informações geradas pela Equação 1, influência da Umidade (%) e da Razão Farelo/resíduo g/g (Farelo de trigo/casca de pupunha) na produção de lacase por *P. ostreatus*.....28

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Produção de resíduos nas feiras da cidade de Manaus	3
2.1.1 Casca do tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>)	3
2.1.2 Casca do Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i>)	4
2.1.3 Casca da pupunha (<i>Bactris gasipaes</i>).....	5
2.1.4 Semente do açáí (<i>Euterpe oleracea</i>)	6
1.5 Casca da Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>).....	7
2.2 Uso de resíduos em processos biotecnológicos	8
2.2.1 Produção de cogumelos comestíveis	9
Cogumelo <i>Champignon</i> de Paris	11
Cogumelo <i>Shitake</i>	12
Cogumelo <i>Shimeji</i>	13
2.2.2 Produção de Lacases.....	15
2.3 Bioprocessos utilizando resíduos vegetais utilizando o gênero <i>Pleurotus</i>	16
3. OBJETIVOS	19
3.1 Geral:	19
3.2 Específicos:	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

Nas feiras abertas da Cidade de Manaus, diariamente, são geradas toneladas de resíduos vegetais que se apresentam como um desafio do ponto de vista ambiental, pois causam poluição visual, mau cheiro e contaminação da água e do ponto de vista de gerenciamento assim como seu armazenamento, transporte e destinação. Uma alternativa para o aproveitamento desses resíduos vegetais seria a sua utilização como substrato para o cultivo e produção de lacase por cogumelos. Os cogumelos possuem valor econômico e nutricional como alimento e durante o seu desenvolvimento sobre o substrato podem vir a produzir enzimas de interesse econômico/industrial como as lacases. Pouco se conhece sobre o aproveitamento como substrato dos resíduos gerados a partir do processamento dos produtos vegetais da região norte do país, assim como sua composição química, sendo necessários trabalhos no sentido de investigar o potencial desses para produção de cogumelos e lacases (1).

Agaricus bisporus, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* são as três espécies de cogumelos comestíveis comumente cultivadas e consumidas no Brasil e apresentam-se como alimentos com características nutricionais excelentes, com alto teor de proteínas e fibras alimentares, além do baixo teor de lipídeos e fonte de fósforo (1). A investigação do cultivo de cogumelos do gênero *Pleurotus* em resíduos vegetais produzidos em feiras amazônicas possui potencial para gerar uma alternativa promissora para o aproveitamento de resíduos pela bioconversão destes resíduos em produtos de maior valor nutricional e gastronômico.

Pleurotus ostreatus, além de ser um cogumelo comestível, é um produtor de lacase. Essa enzima é capaz de extrair elétrons de compostos fenólicos atuando de forma inespecífica sobre os substratos. Devido a essa peculiaridade, essa enzima é atualmente comercializada para a produção de biocombustíveis, diagnóstico laboratorial, biorremediação, indústria têxtil e de alimentos (2). Entendendo-se que parte dos custos da produção dessa enzima estão relacionados ao bioprocessamento, incluindo custos com substrato, torna-se interessante a busca de alternativas como a utilização de resíduos.

Especificamente quanto aos resíduos, é importante salientar que nas feiras abertas e no comércio da cidade de Manaus são produzidas, aproximadamente, 35 toneladas diárias de resíduos vegetais (3). Esses resíduos, apesar do seu potencial de aproveitamento, atualmente são causa de poluição ambiental e geram custos quanto a sua disposição final. Dentre esses

resíduos deve-se citar: casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca da pupunha (*Bactris gasipaes*), semente do açaí (*Euterpe oleracea*), casca da mandioca (*Manihot esculenta*)

Diante do exposto, o presente estudo justifica-se em avaliar a viabilidade de resíduos vegetais regionais produzidos nas feiras abertas de Manaus no cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de resíduos nas feiras da cidade de Manaus

As frutas, verduras, hortaliças e peixes jogados nos lixos das feiras e mercados de Manaus alimentariam cerca de 100 mil pessoas por mês, segundo estimativa do programa Mesa Brasil. Segundo dados da secretaria municipal de limpeza (Semulsp) diariamente são recolhidas 95,4 toneladas de alimentos nas lixeiras, em 39 feiras e mercados. O total de alimentos desperdiçados por mês chega a somar 2862 toneladas. Grande parte do material descartado nas feiras é orgânico, sendo que restos de frutas e legumes não podem ser vendidos e são impróprios para o consumo. Entre os resíduos produzidos, podemos destacar: casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca da pupunha (*Bactris gasipaes*), semente do açaí (*Euterpe oleracea*), casca da mandioca (*Manihot esculenta*).

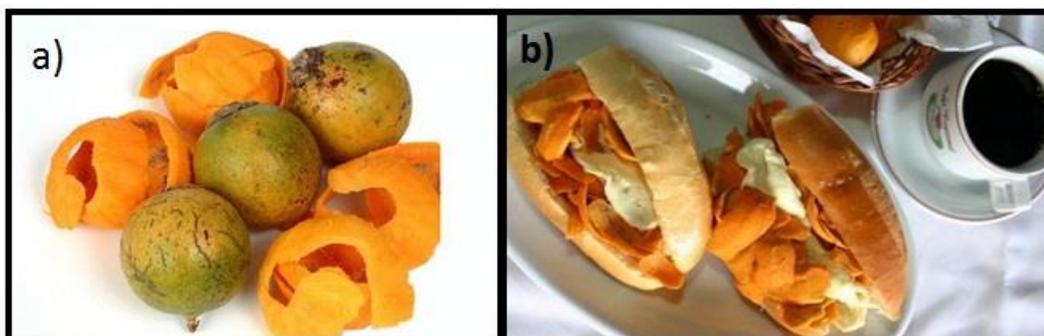
2.1.1 Casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*)

Trata-se de um resíduo amplamente produzido em feiras abertas. A espécie *Astrocaryum aculeatum* ou tucumã do Amazonas é consumida em larga escala nos estados da região norte do Brasil (4).

O gênero *Astrocaryum* possui um grande número de espécies com potencial alimentício e para produção de óleos (5). Sua importância econômica baseia-se principalmente na exploração da polpa dos frutos, que pode ser consumida ao natural ou em forma de sorvete, licor, suco ou doce. Da polpa dos frutos e das sementes podem ser extraídos diferentes tipos de óleos comestíveis, além de poderem ser utilizadas na suplementação alimentar humana e na fabricação de ração animal (6). Seus frutos são ricos em vitamina A, sendo a polpa muito apreciada pela população do Amazonas como recheio de sanduíches e tapiocas (Figura 1). A polpa do tucumã tem coloração amarelo-alaranjada, é comestível, de sabor agradável e apresenta um alto teor de lipídios (25,19%), carboidratos (19,25%), e razoáveis teores de proteínas (3,39%), que contribuem para o seu alto valor calórico (7).

A utilização da polpa do tucumã gera resíduos compostos da casca e caroço. Barbosa (2009) avaliou a produção de biodiesel etílico a partir de óleo de tucumã do Amazonas utilizando transesterificação por catálise básica e ácida observando em ambos os casos um excelente potencial para produção de biocombustíveis (8).

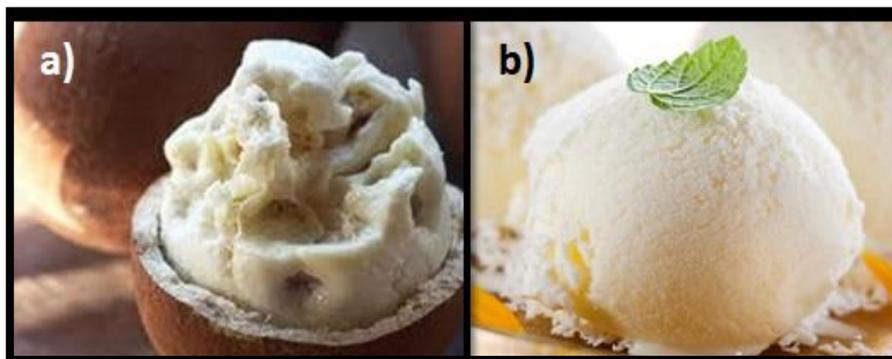
Figura 1 – Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*): a) fruto do tucumã, b) sanduíche popular no Amazonas feito com polpa de tucumã.



2.1.2 Casca do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)

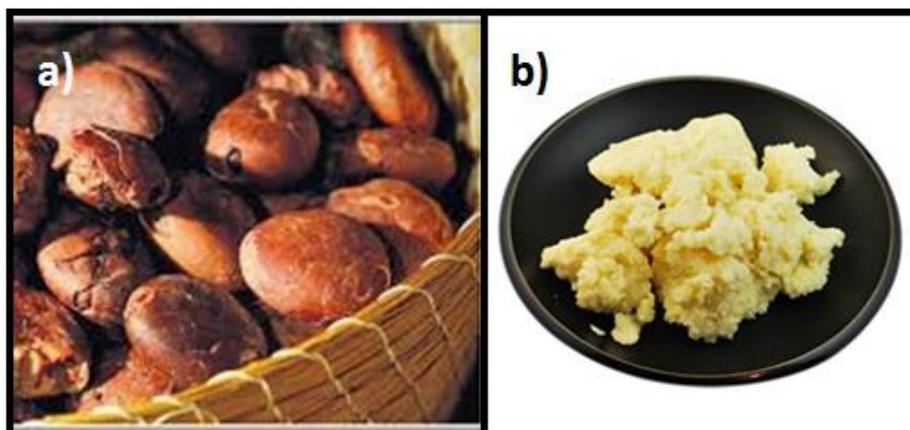
O cupuaçu é um componente tradicional na alimentação regional, seu uso na culinária registra mais de 60 modalidades de produto (9). A polpa pode ser utilizada na fabricação de sorvete, refresco, picolé, néctar, doce, geleia, licor, xarope, entre outras (Figura 2). Possui excelente potencial de mercado para exploração da polpa que é usada principalmente para a fabricação de sorvetes.

Figura 2 – Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): a) fruto do cupuaçu, b) sorvete de cupuaçu, muito popular na região norte do Brasil.



Em geral, o processamento da polpa de cupuaçu gera como subprodutos as sementes e as cascas. Das sementes é extraído o óleo para fabricação da manteiga de cupuaçu, que apresenta propriedades de interesse à indústria de cosméticos (10). A manteiga do cupuaçu é semelhante à do cacau, porém com qualidade superior e é extraída das sementes que contém 45% de óleo (Figura 3).

Figura 3 – Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): a) semente de cupuaçu após a retirada da polpa, b) manteiga de cupuaçu.



O fruto do cupuaçuzeiro mede de 12 a 25 cm de comprimento, apresentando peso de, em média, 1 kg sendo 30% de polpa e 15-20% de sementes (11). Dados de produção do cupuaçu destacam uma produção de polpa estimada para os estados do Acre, Rondônia, Pará e Amazonas em um total de 2418 a 2569 toneladas, sendo que em Manaus a estimativa de consumo de polpa de cupuaçu era de 255 toneladas em 1995 (12). A produção chegou a 32 toneladas de frutos em 2004, representando 8,2% do valor bruto da produção agrícola do estado do Pará (10). Quanto a sua composição centesimal a polpa do cupuaçu apresenta cerca de 1,1% de proteínas; 10,6% de carboidratos; 3,1% de lipídios (13).

2.1.3 Casca da pupunha (*Bactris gasipaes*)

A pupunheira *Bactris gasipaes* é uma espécie de palmeira originária de regiões tropicais com alta precipitação pluviométrica e solos de baixa fertilidade, estando adaptada a diferentes condições ecológicas nos trópicos (Figura 4). É encontrada desde o nível do mar até próximo dos 2000 m de altitude (14). Apresenta alto potencial de diversificação de produtos: raízes medicinais, estirpe e folhas utilizadas na construção civil e artesanato (15).

A palmeira possui muitos usos. Dela obtém-se alimento, bebida fermentada e não fermentada, álcool, vinagre, além de permitir a produção de biodiesel (16). O fruto é uma drupa, quando amadurece torna-se vermelho, amarelo ou alaranjado, a semente está envolvida pelo endocarpo de cor marrom ou preta (17). Após o cozimento são consumidos diretamente ou utilizados na produção de farinha. Da polpa pode ser extraído um óleo comestível e da semente outro tipo de óleo de uso na indústria de cosméticos (17). O estirpe de pupunheira possui em sua composição 2,6 % de proteínas; 81,03% de carboidratos; 38,89±0,16% de

fibras(18). A espécie apresenta elevado potencial econômico, pois é uma cultura precoce e altamente rentável em comparação com outras palmeiras (15).

Figura 4 – Pupunha (*Bactris gasipaes*): a) palmeira da pupunheira, b) fruto de pupunha muito apreciado pela população amazonense.



2.1.4 Semente do açaí (*Euterpe oleracea*)

O açaizeiro pode ser apontado como a palmeira de maior importância cultural, econômica e social da região Norte (Figura 5), sendo encontrada ao longo dos rios, igarapés e baixada em áreas muito úmidas (19). Sua maior concentração é na parte oriental da Amazônia Legal (20).

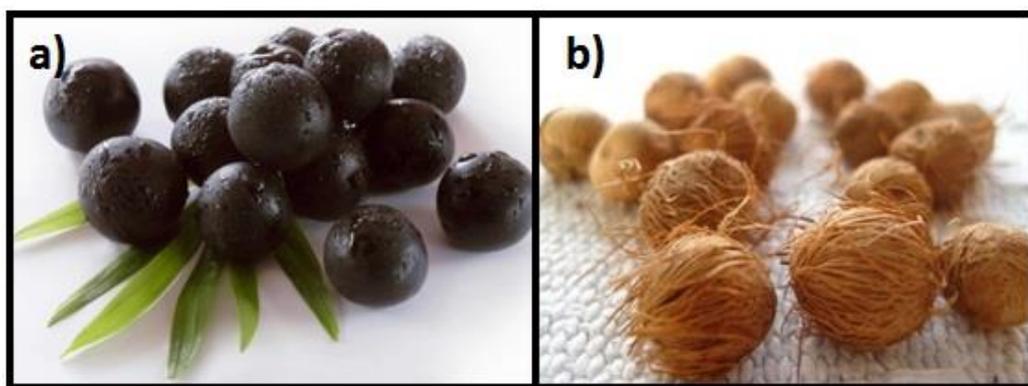
Figura 5 – Palmeira do açaizeiro. Possui grande importância econômica e cultural na região norte do Brasil.



A produção de frutos é a principal utilidade do açaí, dos quais, através de maceração manual ou mecânica da polpa, se obtém uma bebida conhecida por “açaí”, que é utilizada desde a época pré-colombiana pela população amazônica (20). As espécies de açaí existentes no Brasil importantes do ponto de vista agroindustrial são *E.oleracea*, *E. edulis* e *E. precatória* e destacam-se como fonte de matéria prima na extração de palmito e utilização dos seus frutos (20).

Os frutos medem de 1 a 1,5 cm de diâmetro. A semente conta com a maior parte do tamanho do fruto e é coberta por uma fina camada de fibras debaixo das quais se encontra uma pequena camada comestível (Figura 6). Um fruto viscoso é preparado geralmente pela maceração da polpa comestível que contém aproximadamente 2,4% de proteína e 5,9% de lipídios, sendo usado na produção de bebidas energéticas, sorvete, geleia e licor que é comumente misturado com uma variedade de outros sucos (21). Os dois produtos principais originários da espécie são usados na alimentação humana, sendo a polpa largamente utilizada na produção industrial ou artesanal de sorvetes, geleias e licores (22).

Figura 6– Açáí (*Euterpe oleracea*): a) fruto do açáí, b) semente de açáí, resíduo obtido após a maceração para obtenção da polpa.

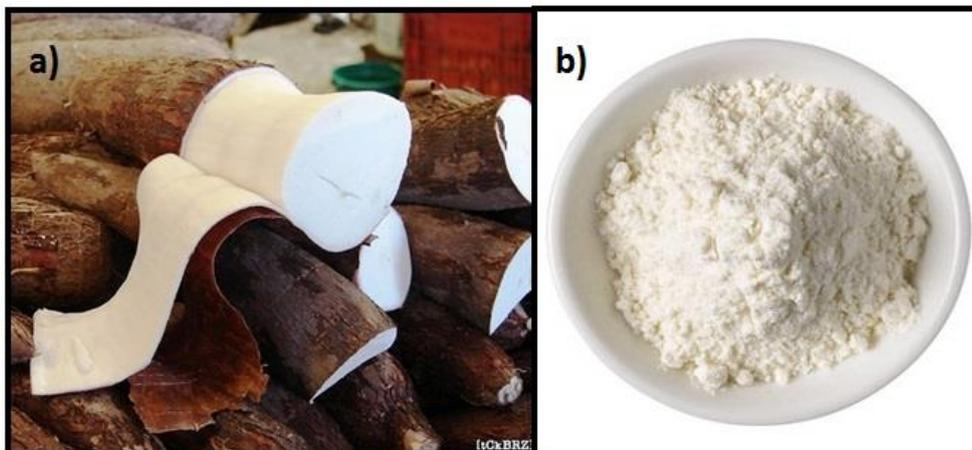


A produção de açáí somou, em 2002 e 2007, 590 toneladas. Entre os anos 2007 e 2008 houve um aumento na produção de 11,9%. Em 2008 a produção brasileira do fruto foi de quase 121 toneladas, equivalente a R\$ 133,7 milhões, tendo a região norte destacado-se na produção nacional com 92,2% da produção (10). Segundo o IBGE 2010, o Brasil produziu, em 2009, aproximadamente 119.000 toneladas de fruto de açáí, sendo que cerca de 90% deste volume corresponde aos resíduos gerados após o processamento agroindustrial do fruto.

1.5 Casca da Mandioca (*Manihot esculenta*)

A mandioca (*Manihot esculenta*) desempenha um importante papel na dieta alimentar dos brasileiros, por seu alto teor energético, sendo o Brasil um dos grandes produtores dessa cultura(23). É um alimento comum em países tropicais e semitropicais. É uma planta nativa do Brasil cultivada em grande parte do território, tendo alto potencial na alimentação animal como fonte de energia. Seus resíduos, que incluem a casca e a entrecasca, podem ser usados na alimentação animal (Figura 7) (24).

Figura 7-Mandioca (*Manihot suculenta*): a) resíduos gerados da utilização da mandioca (casca e entrecasca), b) fécula de mandioca.



O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mandioca, com a produção anual estimada em 27 milhões de toneladas. As maiores produções são registradas nos estados do Paraná, Pará, Bahia e Piauí. A indústria farinheira é a principal consumidora das raízes produzidas, utilizando aproximadamente 80% da produção brasileira de mandioca (25).

Sua produção no Brasil tem característica de ser a base alimentar, consumida *in natura*, bem como ser matéria prima para a indústria de fécula e farinha de mandioca. Considerada como cultura de subsistência e também como matéria prima industrial, a mandioca é cultivada em todas as regiões do Brasil, sendo utilizada amplamente como alimento no norte e nordeste e consumida *in natura*, sendo o Pará o principal estado produtor em 2007 (26). Quanto a sua composição centesimal a raiz da mandioca apresenta cerca de 2% de proteínas; 0,12% de lipídeos; 2,05% de carboidratos (23).

O processamento da mandioca gera resíduos poluentes quando não tratados de maneira adequada. É necessário buscar por alternativas de aproveitamento desses resíduos vegetais.

2.2 Uso de resíduos em processos biotecnológicos

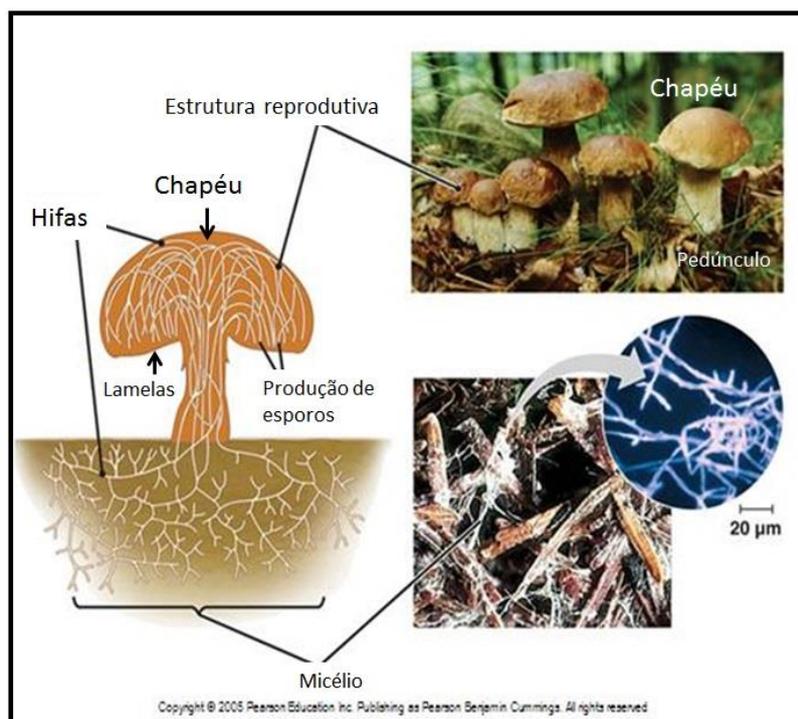
O aumento da produção pela agroindústria gera benefícios, mas produz uma grande quantidade de resíduos que podem ser reaproveitados diminuindo os custos de produção e aumentando o aproveitamento total do alimento pela utilização de cascas, sementes e bagaços que podem ser transformados em ingredientes alimentícios (10). Estudos têm sido realizados nos últimos anos buscando a utilização mais adequada para uma grande variedade de resíduos vegetais, fazendo-se necessárias novas pesquisas empregando diversos organismos e resíduos ainda não estudados (27).

Uma alternativa de uso desses resíduos seria como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis ou ainda para servirem de substrato para produção de enzimas de interesse industrial como as lacases. A utilização de resíduos como substrato é uma alternativa para redução dos custos desses produtos (28).

2.2.1 Produção de cogumelos comestíveis

Um cogumelo consiste em um píleo (ou chapéu) que se assenta sobre um pedúnculo ou estirpe e as lamelas são estruturas radiadas encontradas na superfície inferior do píleo (Figura 8) (29). Podem ser saprófitos, simbiontes ou parasitas de diferentes plantas. Todos necessitam de matéria orgânica para desenvolver-se, sendo que os mais comumente utilizados para produção controlada são saprófitos. Secretam enzimas para degradar grande parte de gêneros alimentícios e obter seus nutrientes da matéria orgânica sendo que o uso de substratos ou composto de crescimento, uma mistura de palha, bagaço de milho, farelo de algodão e suplementos nitrogenados, podem influenciar a composição química dos cogumelos cultivados (30). O micélio do corpo de frutificação (fase vegetativa) é importante no ecossistema por sua capacidade de biodegradação de substratos e, conseqüentemente, o uso na degradação de resíduos vegetais (31). Tem atraído maior atenção, inclusive, atuando como alimentos funcionais no tratamento de doenças crônicas relacionadas à idade (32).

Figura 8-Morfologia do corpo de frutificação (cogumelo), mostrando o píleo, pedúnculo, estirpe e lamelas.



Estudos destacam um crescimento no consumo de cogumelos comestíveis no Brasil, assim como em sua produção e comercialização (33). Entre esses, o gênero *Pleurotus* se destaca por ser o terceiro cogumelo mais consumido (34). O crescente aumento do consumo de cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) é, em grande parte, devido ao seu sabor, propriedades medicinais e nutricionais (35). Convencionalmente, os cogumelos desse gênero são produzidos em madeira e resíduos de madeira tais como serragem, no entanto, é possível cultivá-los também em resíduos de origem agroflorestral (34,36–38). Furlani (33) avaliou a composição dos cogumelos *Agaricus bisporus* (champignon), *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Pleurotus* (shimeji), as três espécies mais comumente cultivadas e consumidas no Brasil, que mostraram alto teor de proteínas e fibras alimentares, apresentando-se como alimento de excelente valor nutricional.

O gênero *Pleurotus* se destaca pelo número de espécies (cerca de 40 espécies comestíveis) e destaca-se por possuir um complexo enzimático lignocelulolítico com as enzimas celulase, hemicelulase, ligninase, celobiase e lacase que permitem a degradação de uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos. Cogumelos do gênero *Pleurotus* representam um alimento de custo baixo com teor elevado de proteínas, aminoácidos essenciais, proporção elevada de ácidos graxos insaturados, diversas vitaminas e minerais, além de teores baixos de gorduras, ácidos nucleicos, açúcares e calorias (39). Possui grande valor nutricional e pode ser cultivado a baixo custo pela utilização de resíduos lignocelulósicos como substrato. O cultivo de *Pleurotus* em novos substratos tem sido investigado, pois fungos desse gênero são facilmente produzidos em resíduos vegetais (9).

Fungos basidiomicetos são os organismos degradadores de lignina mais eficientes que produzem lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase (1). *Pleurotus ostreatus* é um basidiomiceto de degradação branca que pertence à subclasse de microrganismos lignocelulolíticos que produzem lacase (42). Essas enzimas apresentam um mecanismo biocatalítico não específico e têm sido utilizadas em processos de biorremediação devido a sua habilidade de degradar corantes (1).

Apesar de o cultivo de fungos basidiomicetos ocorrer primariamente utilizando-se o bagaço de cana, é de extrema importância que se busque novas alternativas de substratos para cultivo de cogumelos no Brasil, priorizando os recursos disponíveis na própria região (11).

Já foram utilizados no cultivo de basidiomicetos os substratos de palha de feijão, palha de milho e casca de café (28). Destacam-se ainda estudos realizados utilizando como substrato casca de mandioca, resíduos de bananeira e serragens não convencionais (34–38,45).

Levando-se em consideração que a fonte de carbono representa cerca de 40-60% do custo de produção alcança-se uma melhor condição utilizando-se preferencialmente resíduos, os quais se encontram disponíveis e abundantes no ambiente (46). O cultivo de cogumelos sobre esses resíduos/subprodutos resulta no aumento da digestibilidade dos mesmos e pode ser uma das soluções para a transformação destes resíduos não comestíveis em biomassa comestível aceita de alto valor de mercado, pois podem potencialmente ser usados como um suplemento alimentar animal, fornecendo recursos adicionais para alimentação animal (2,6).

Mais de 2000 espécies de cogumelos são existentes na natureza, mas apenas 22 espécies são cultivadas de forma mais intensa, para fins comerciais, usando solo ou madeira utilizando condições ambientais e nutricionais particulares (31). Dentre estas, destacam-se o cultivo de *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus* sp.

Cogumelo *Champignon* de Paris

No Brasil, o consumo de cogumelos comestíveis vem crescendo significativamente devido ao seu alto valor nutritivo e ao aumento da oferta, tornando o produto popular e acessível, sendo os principais cogumelos cultivados *Agaricus bisporus* (*champignon*), *Lentinula edodes* (*shitake*) e espécies do gênero *Pleurotus* (47) (Figura 9). A melhor compreensão da natureza biológica e o desenvolvimento de técnicas avançadas têm contribuído para a diminuição do preço e aumento da produtividade.

Figura 9- Cogumelos comestíveis comumente cultivados no Brasil: a) *Lentinula edodes*, b) *Pleurotus ostreatus*, c) *Agaricus bisporus*



Agaricus bisporus (*A.bisporus*) é um cogumelo comestível mundialmente conhecido, sendo o mais extensivamente cultivado com rendimento de 70% dos fungos comestíveis. *A.bisporus* é uma excelente fonte de proteínas, muitos aminoácidos essenciais, vitaminas (B2, niacina), polifenóis e elementos minerais (potássio, fósforo, selênio, zinco e cobre) (48). Cogumelos de *A.bisporus* colhidos em diferentes estágios de maturação apresentaram 38,3-

48,9% de carboidratos e 21,3-27% de proteína bruta, 17,3-23,3% de fibras. No entanto, o cogumelo apresenta curta vida de prateleira de 1-3 dias, seu valor comercial decresce em poucos dias, devido a sua grande quantidade de água (aproximadamente 90%), alto nível de atividade enzimática e a microflora presente, sendo o método de congelamento o mais adequado para preservação do mesmo (46,47).

O cultivo de *A.bisporus* iniciou-se no sudeste do Brasil. Como fungo saprófita ele é produzido em um substrato preparado por processo de compostagem, a partir de resíduos vegetais de baixo valor comercial e esterco. Por ser sujeito a contaminações, deve passar por processo de descontaminação antes da sementeira, que geralmente é feita por processo de pasteurização(50). *A.bisporus* já foi cultivado em palha de arroz (51), palha de trigo (50), palha de trigo e bagaço de cana de açúcar (52) sendo que nesta última obteve um cultivo em 70 dias e eficiência biológica entre 40-95%.

Cogumelo *Shitake*

Lentinula edodes (também conhecido por seu nome em japonês *Shitake*) é um dos quatro cogumelos comestíveis mais cultivados do mundo, sendo particularmente popular na China, Japão e outras localidades da Ásia. É uma fonte de proteínas, vitamina D, assim como vitaminas do complexo B e minerais. É um dos cogumelos mais bem conhecidos e bem caracterizados, tendo sido usado na medicina por muitos anos (53). No Brasil, seu cultivo iniciou-se há duas décadas e vem aumentando significativamente, em virtude de ser cultivado em pequenas áreas e por constituir uma boa fonte alternativa de renda (54). Muitos compostos importantes incluindo polissacarídeos bioativos, fibra alimentar, ergosterol, vitamina B1, B2 e C, e minerais tem sido isolados do corpo de frutificação, micélio e meios de cultivo do cogumelo (55).

Cogumelos comestíveis como o cogumelo shitake possuem propriedades funcionais como riqueza em vitaminas do complexo B, vitamina D e atividades antitumorais, anticancerígenas e antivirais devido ao lentinan, um polissacarídeo antitumoral isolado do corpo de frutificação do cogumelo shitake. Quanto a sua composição, o cogumelo apresenta teor de carboidratos de $69,58 \pm 2,05$, teor de proteínas de $18,98 \pm 1,16$, teor de lipídios de $4,39 \pm 1,30$, teor de cinzas de $7,04 \pm 1,24$ e teor de fósforo de $89,4 \pm 23,7$ (57). A composição centesimal do cogumelo mostra que o mesmo é um alimento com características nutricionais excelentes, com alto teor de proteínas e fibras alimentares, além do baixo teor de lipídios e fonte considerável de fósforo. O cogumelo shitake já foi cultivado em bagaço de cana, obtendo eficiência biológica de 130-133% (57-58), palha de eucalipto (58) e resíduos de algodão (59).

Quanto ao seu cultivo no Brasil, na maioria das vezes é feito em pequenas propriedades e de maneira rudimentar utilizando instalações existentes e adaptadas. Estima-se que sua produção corresponda a 12% do total de cogumelos produzidos *in natura*. Pode ser dividido em duas categorias: uma forma de cultivo rudimentar realizada em toras de madeira e o cultivo em substratos sintéticos, que requer mais tecnologia. É tradicionalmente cultivado em cepas de eucalipto, mas o cultivo axênico a base de diversos resíduos agrícolas é uma alternativa rentável em sua produção, uma vez que a colheita acontece mais rapidamente e a eficiência biológica do fungo é bastante elevada (54).

Cogumelo *Shimeji*

Pleurotus ostreatus, também conhecido como *Shimeji* ou cogumelo ostra ocupa a terceira posição na produção de cogumelos comestíveis (Figura 10), entre os gêneros *Agaricus* e *Lentinula*. O gênero *Pleurotus* é encontrado em florestas úmidas tropicais e subtropicais e pode ser artificialmente cultivado devido à sua capacidade de colonizar e degradar uma variedade de substratos contendo celulose, hemicelulose e lignina durante seu desenvolvimento (60). Sendo o terceiro mais largamente comercializado, é apreciado devido ao seu delicioso sabor, alta quantidade de vitaminas, proteínas, carboidratos e minerais e baixo nível de gordura, sendo conhecidos por sua capacidade de degradar uma variedade de componentes insolúveis de materiais lignocelulolíticos desempenhando um papel significativo na sua bioconversão em suplementos alimentares (61). Quanto a sua produção, os cogumelos do gênero *Pleurotus* ocupam 25% da produção mundial e 16% dos cogumelos produzidos *in natura* no Brasil

Figura 10- Cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*).



Sabendo que uma grande quantidade de resíduos vegetais lignocelulolíticos é gerada durante todo o ano e que não há uso direto desses resíduos como alimento, uma alternativa de

uso desses resíduos seria sua bioconversão através do cultivo de cogumelos comestíveis (62). Sendo assim *P.ostreatus* torna-se uma fonte valorosa de alimento rico em proteínas e um organismo que pode ser utilizado devido à sua habilidade de bioconversão de uma variedade de resíduos lignocelulolíticos (63).

Em geral, seu cultivo é realizado em palha suplementada com farelo de trigo ou farelo de arroz (63), sendo observadas outras fontes de substratos tais como palha de milho e bagaço de cana (64), palha e farelo de aveia (65), grão de cerveja (63), folhas de avelã, palha de trigo, serragem (66), resíduos de papel (59,66), palha de arroz e de trigo (67), palha de banana(68), resíduo de feccularia (69), entre outros.

Há muitas razões pelas quais o gênero *Pleurotus* tem sido intensamente estudado em diferentes partes do mundo, principalmente devido ao seu valor nutricional, pela sua capacidade de degradar uma variedade de resíduos lignocelulolíticos, pelo seu tempo de desenvolvimento ser menor que outros cogumelos comestíveis, por poderem ser cultivados por meios fáceis e baratos (70). Quanto a sua composição centesimal, apresenta uma porcentagem de carboidratos de $75,74\pm 0,29\%$, proteínas $16,19\pm 0,38\%$, lipídios $2,46\pm 0,02\%$, fibra alimentar $51,25\pm 2,17\%$, cinzas $5,61\pm 0,05\%$, fósforo $45,4\pm 3,4\%$ (57).

O cultivo de cogumelos representa um eficiente caminho de reciclagem de resíduos convertendo-os em alimento com conteúdo protéico de até 40% em base de peso seco e grande valor nutricional e medicinal. Tradicionalmente, o cultivo de cogumelos do gênero *Pleurotus* é realizado em resíduos agrícolas acompanhado dos processos de compostagem e pasteurização (71).

Dentre os resíduos mais utilizados, o bagaço de cana se destaca como um importante resíduo da agricultura brasileira, sendo abundante e amplamente empregado na produção de compostos fertilizantes e na produção de cogumelos, principalmente os cogumelos do gênero *Pleurotus* (18). Contendo mais de 70% de celulose em sua matéria seca, o resíduo de bagaço de cana possui baixa digestibilidade pela grande quantidade de lignina. O bagaço de cana já foi utilizado no cultivo de *Oudemansiella canarii* (40), *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* (72) e *Pleurotus ostreatus* (37) sendo que este último trabalho utilizou resíduos de serragem assim como resíduos vegetais de bagaço de cana e estirpe de pupunheira, apresentando alta eficiência biológica e alto aproveitamento dos resíduos utilizados.

A Amazônia apresenta inúmeras espécies nativas de plantas frutíferas que apresentam potencial econômico, tecnológico e nutricional, que vem despertando o interesse de estudos científicos. Diariamente nas feiras de Manaus são produzidas toneladas de resíduos vegetais com potencial para uso biotecnológico. Se não forem tratados da forma adequada, esses

resíduos trazem malefícios à sociedade e ao ambiente. A utilização destes subprodutos diminui os custos da produção, aumenta o aproveitamento total do alimento e reduz o impacto ambiental (10). O cultivo de cogumelos sobre esses resíduos/subprodutos resulta no aumento da digestibilidade dos mesmos e pode ser uma das soluções para a transformação destes resíduos não comestíveis em biomassa comestível aceita de alto valor de mercado (2,6).

2.2.2 Produção de Lacases

Fungos como *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*, são cogumelos comestíveis produtores de lacase (73). Fungos basidiomicetos usam a celulose e hemicelulose como substrato para o seu crescimento e a degradação da lignina ocorre durante o metabolismo secundário quando há escassez de nutrientes ou situações de estresse (74).

Lignina é um composto recalcitrante ligado covalentemente com a hemicelulose, com a qual forma uma barreira física na degradação da celulose. Trata-se de um heteropolímero aromático de alto peso molecular que confere rigidez aos tecidos vegetais (74). É um composto recalcitrante, covalentemente ligado à celulose, formando uma barreira física na hidrólise desse carboidrato. A enzima lacase realiza uma degradação prévia da lignina a fim de aumentar a exposição da celulose às celulases fúngicas (73).

Lacase é uma fenoloxidase característica de fungos basidiomicetos causadores de podridão branca (75). As lacases são cobre polifenol oxidases que oxidam compostos fenólicos, enquanto reduzem oxigênio molecular à água, sua baixa especificidade a substratos permite sua aplicação em várias áreas como indústria têxtil, de alimentos e biorremediação. A lacase apresenta baixa especificidade por substratos, permitindo sua atuação em uma grande variedade de compostos o que a torna uma enzima versátil e com potencial para ser utilizada em várias aplicações biotecnológicas e industriais (74). O uso da lacase para degradação de compostos lignocelulósicos pode aumentar a biodisponibilidade de carbono para alimentação animal e em processos de sucessão microbiana para a produção de biocompostos como enzimas e/ou biocombustíveis (76). Já foram utilizados na produção de lacase os resíduos de casca de café e fungos do gênero *Lentinula* e *Pleurotus* (74), fibras de soja, farelo de trigo e farelo de arroz por *Pleurotus ostreatus* (76) e resíduos de pupunha por *Aspergillus niger* (77).

Na produção de lacase por fungos basidiomicetos os diferentes biocompostos produzidos pelos fungos podem ser extraídos diretamente do micélio, este processo pode viabilizar economicamente a produção desses biocompostos, pois diminui o tempo e o custo

do processo de produção, além de aumentar o grau de controle sobre o produto obtido, sendo que a produção de enzimas e biomassa é afetada pelas propriedades físicas do meio de cultivo como a natureza cristalina e amorfa e a porosidade (76).

Por fim, a atividade da lacase é determinada em fermentação em estado sólido através da extração mecânica do extrato enzimático com solução tampão de acetato de sódio (76). A determinação da atividade da lacase pode ser realizada através da oxidação de diversos substratos tais como ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazol-6-sulfonato), orto-dianisidina e siringaldazina (76), acompanhando-se o aumento da absorvância (73).

2.3 Bioprocessos utilizando resíduos vegetais utilizando o gênero *Pleurotus*

Pleurotus é facilmente cultivado em resíduos vegetais, o corpo de frutificação possui grande quantidade de proteínas e aparece geralmente entre 20 a 25 dias após a inoculação. O fungo possui notável habilidade em colonizar substratos de palha de trigo esterilizados através de pasteurização (60°C a 90°C) (78). A metodologia para o preparo do substrato consiste na compostagem dos resíduos vegetais seguida de pasteurização que pode ser feita de várias formas, sendo o mais comum o uso de vapor de água em câmaras ou túneis onde o substrato é empacotado, sendo que o tempo de esterilização varia em função da temperatura (79).

Substratos preparados a partir de resíduos vegetais necessitam ser esterilizados para a eliminação de possíveis organismos competidores. A etapa de esterilização depende do sistema de cultivo que pode ser em toras ou substratos sintéticos (54). Quanto aos substratos sintéticos, por se tratarem de resíduos vegetais geralmente possuem grande quantidade de lignina e celulose o que lhes confere durabilidade, sendo utilizados para cultivos de ciclo longo, apresentando estrutura física vantajosa proporcionando alta porosidade, alta retenção de umidade e ainda a vantagem de serem biodegradáveis (80).

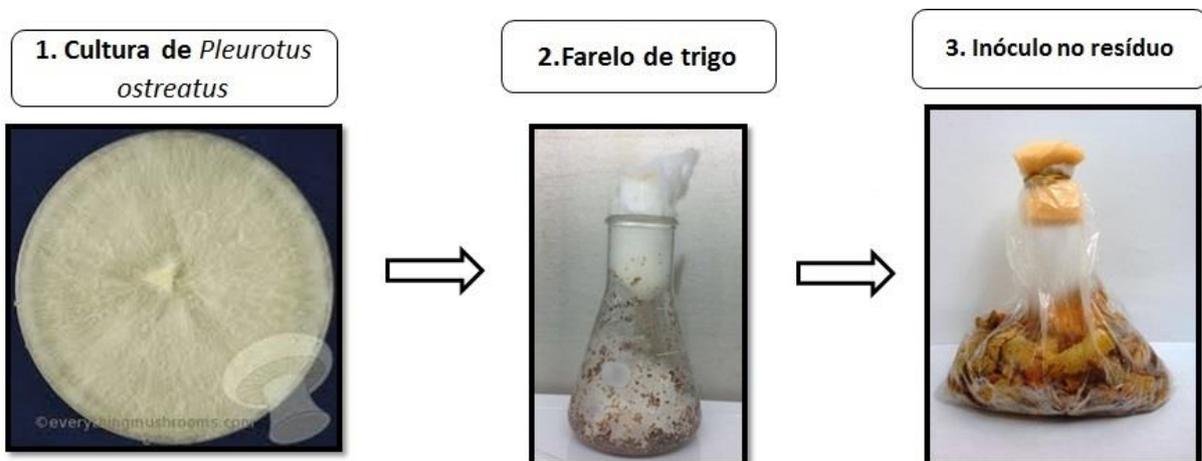
Os resíduos são secos em estufa e após serem triturados para melhor colonização pelo fungo tem a umidade corrigida para cerca de 60% que pode ser feito através de sua imersão em água ou adicionando-se água à mistura de substrato até a umidade desejada. Após a correção da umidade o substrato é armazenado em pacotes de polipropileno resistente a altas temperaturas e é pasteurizado ou esterilizado para redução ou eliminação de microrganismos indesejáveis, que competem por alimento ou atacam diretamente o cogumelo (73,74). O tempo de esterilização varia em função da temperatura, sendo padronizado 120°C por 30 min (Figura 11) (78).

Figura 11- Preparo do substrato: Os resíduos são secos em estufa (1), triturados (2) e acondicionados em sacos de polipropileno (3).



O cogumelo desejado deve ser capaz de colonizar o substrato antes de outros fungos e bactérias, para realizar tal processo, o micélio pré-cultivado do cogumelo é inoculado no substrato esterilizado, chamado de “semente”(29). Essa semente é inoculada nos substratos previamente esterilizados na quantidade de 3% de inóculo com relação ao peso fresco dos substratos (Figura 12) (81).

Figura 12 - Preparo do inóculo: cultura previamente preparada de *Pleurotus ostreatus* (1) é inoculada em frascos contendo farelo de trigo (2) e após a colonização são inoculados no substrato (3).

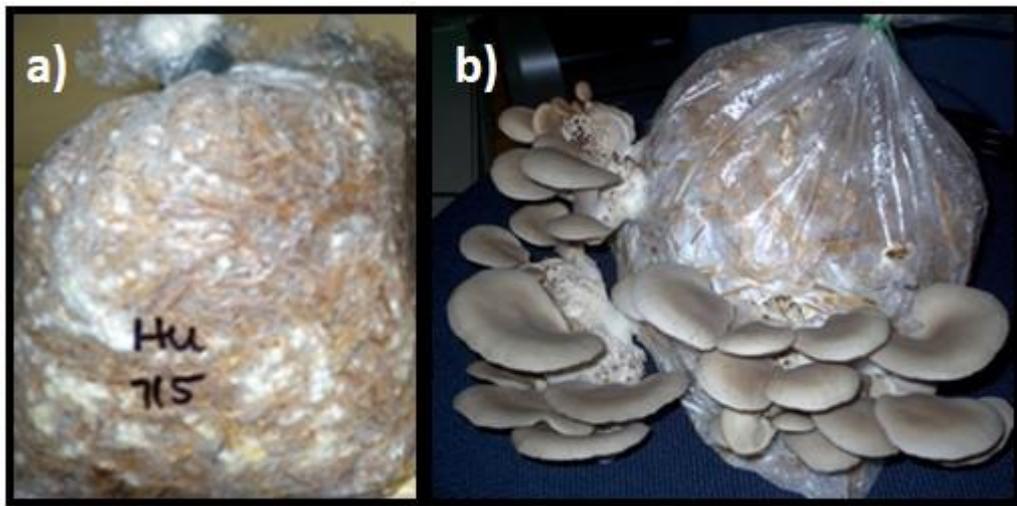


A inoculação é a transferência do grão colonizado para o composto preparado para que o fungo se desenvolva e colonize (29). Após a inoculação segue-se o período de incubação de duração de 20 a 30 dias (75). A temperatura no período de incubação deve ser mantida a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, e a umidade relativa em torno de 80-85% (81).

Em condições ambientais favoráveis o micélio cresce através de aberturas nos sacos (Figura 13), nessa fase ocorre mudança na cor do substrato, e ocorre o desenvolvimento de

corpos de frutificação (29). Nessa fase, a temperatura deve ser reduzida para $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ para induzir a frutificação, com umidade relativa de 90% (81). O período entre o surgimento do primórdio e a maturação do corpo de frutificação varia de acordo com a linhagem e as condições ambientais (29), sendo observado um período de 55 dias para o corpo de frutificação em *Pleurotus sajor caju* (78), e 100 dias em *Pleurotus ostreatus* (81). Após a colheita os cogumelos são secos e pesados a fim de se calcular as medidas de eficiência biológica e perda de matéria orgânica.

Figura 13- Frutificação no substrato: a) etapa de colonização do substrato, b) frutificação nos resíduos.



Durante o cultivo podem ser analisadas as variáveis de eficiência biológica (EB), perda de matéria orgânica (PMO) e rendimento. A eficiência biológica (EB) expressa a produtividade ou produção da biomassa e é caracterizada pela conversão dos resíduos lignocelulolíticos em cogumelos. A perda da matéria orgânica (PMO) é o índice que avalia a decomposição do substrato pelo fungo, tal índice é baseado na perda da matéria orgânica decomposta pelo fungo que é determinada pela diferença entre a massa seca do substrato inicial e a massa seca do substrato final (83).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Investigar a viabilidade do uso de resíduos produzidos nas feiras abertas da cidade de Manaus como substrato para o cultivo e produção de lacase de *Pleurotus ostreatus*.

3.2 Específicos:

-Caracterizar quanto à composição centesimal os resíduos: casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de mandioca (*Manihot esculenta*).

-Avaliar qual desses resíduos é mais adequado como substrato para o cultivo e produção de lacase por *P. ostreatus*.

-Investigar quais as condições ótimas de cultivo e produção de lacase por *P. ostreatus* utilizando o resíduo selecionado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais e métodos, resultados e discussão da presente dissertação serão apresentados em formato de artigo que será encaminhado para a revista *Process Biochemistry*

Cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos das feiras abertas da cidade de Manaus como substrato.

Cultivo e Produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos produzidos nas feiras abertas de Manaus como substrato

Luana Carolina R. M. dos Santos^a, Mariane Caroline Martins^b, Anna Karolina G. Rodrigues^b, Vitória Elizabeth S. Lopes^b, Walter Oliva Pinto Filho Segundo^d, João Paulo Alves da Silva^c, João Vicente Braga de Souza^d, Érica Simplício de Souza^{a,b}

^aPrograma de pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Av. Carvalho Leal 1777, CEP 69065-001, Manaus-AM, Brasil

^bEscola Superior de Tecnologia (EST), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Av. Darcy Vargas 1200, CEP 69050-020, Manaus-AM, Brasil.

^cEscola de Engenharia de Lorena (EEL), Universidade de São Paulo (USP), estrada Municipal do Campinho, s/nº, CEP 12602-810, Lorena-SP, Brazil.

^dInstituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS), Av. André Araújo 2936, CEP 69060-001

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar a viabilidade do uso de resíduos produzidos nas feiras abertas da cidade de Manaus como substrato para o cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*. Foram utilizados os resíduos de casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca de mandioca (*Manihot esculenta*). Foram realizados experimentos avaliando qual dos resíduos da feira foi mais adequado para o cultivo e produção de lacase. As condições mais adequadas de cultivo e produção de lacase foram investigadas no resíduo selecionado. A casca de tucumã apresentou valores mais altos para a produção de lacase (21766,82 U/Kg) seguida pela casca da pupunha (6161,43 U/Kg). A casca de mandioca demonstrou a maior eficiência biológica (12,82%). O resíduo de casca de pupunha foi selecionado para a etapa de otimização da produção. Utilizando planejamento fatorial e superfície resposta foi possível determinar as melhores condições para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*. Assim, a condição excelente para a produção de lacase foi utilizando casca de pupunha sem nenhuma suplementação de farelo de trigo e 60% de umidade onde se obteve uma produção de lacase de 3565,02 U/Kg.

Palavras-chave: cogumelos comestíveis, planejamento fatorial, bioprocessamento de resíduos agroindustriais, inóculo.

1 Introdução

Nas feiras abertas da Cidade de Manaus, diariamente, são geradas toneladas de resíduos vegetais que se apresentam como um desafio do ponto de vista ambiental (poluição visual, mal cheiro e contaminação da água) e do ponto de vista de gerenciamento (armazenamento, transporte e destinação). Uma alternativa para o aproveitamento desses resíduos vegetais seria a sua utilização como substrato para o cultivo e produção de lacase por cogumelos. Os cogumelos possuem valor econômico e nutricional como alimento e durante o seu desenvolvimento sobre o substrato esses podem vir a produzir enzimas de interesse econômico/industrial como as lacases. Pouco se conhece sobre a o aproveitamento como substrato dos resíduos gerados a partir do processamento dos produtos vegetais da região

norte do país, sendo necessário o desenvolvimento de trabalhos no sentido de investigar o potencial desses para produção de cogumelos e lacases [1].

O cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* é rico em proteínas e vitaminas e apresenta um baixo teor de gorduras [2], sendo um decompositor primário de madeira e resíduos vegetais. No cultivo de *Pleurotus ostreatus* já foi utilizado palha de bananeira [2], bagaço de cana-de-açúcar e estirpe de pupunheira [3], grãos de cerveja [4], entre outros substratos. A investigação do cultivo de cogumelos do gênero *Pleurotus* em resíduos vegetais produzidos em feiras amazônicas possui potencial para gerar uma alternativa promissora para o aproveitamento de resíduos pela bioconversão destes em produtos de maior valor nutricional e gastronômico.

Pleurotus ostreatus, além de ser um cogumelo comestível, é um produtor de lacase. Essa enzima é capaz de extrair elétrons de compostos fenólicos atuando de forma inespecífica sobre os substratos. Devido a essa peculiaridade, essa enzima é atualmente comercializada para a produção de biocombustíveis, diagnóstico laboratorial, biorremediação, indústria têxtil e de alimentos [5]. Entendendo-se que parte dos custos da produção dessa enzima estão relacionadas ao bioprocessamento, incluindo custos com substrato, torna-se interessante a busca de alternativas como a utilização de resíduos.

Especificamente quanto aos resíduos, é importante salientar que nas feiras abertas e no comércio da cidade de Manaus são produzidas aproximadamente 35 toneladas diárias de resíduos vegetais [6]. Esses resíduos, apesar do seu potencial de aproveitamento, atualmente são causa de poluição ambiental e geram custos quanto a sua disposição final. Dentre esses deve-se citar: casca de pupunha, casca de tucumã, casca de cupuaçu, semente de açaí despolpada e casca de mandioca.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de resíduos vegetais regionais produzidos nas feiras abertas de Manaus no cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Microrganismo

Foi utilizada neste estudo uma linhagem de *Pleurotus ostreatus* 154 foi adquirida do site <http://cogumelohobby.com>. Essa foi mantida em meio ágar sabouraud (dextrose-40g, peptona-10g, ágar-15g) à 27°C.

2.2 Resíduos

Os resíduos agroindustriais selecionados para serem utilizados como substrato para o cultivo do fungo *Pleurotus ostreatus* foram casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), semente de açaí (*Euterpe oleracea*) despolpada e casca de mandioca (*Manihot succulenta*) que foram obtidos das feiras abertas e comércio da cidade de Manaus. Foram obtidos 20 kg de cada um desses resíduos, no período do mês de abril de 2015 e esses foram armazenados a -20 °C.

2.3 Caracterização Centesimal dos resíduos

A composição dos resíduos foi determinada segundo a metodologia recomendada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC,1997). A determinação da umidade foi fundamentada na perda de peso e substâncias voláteis em estufa regulada à 100°C, até a obtenção de peso constante. O resíduo mineral fixo (Cinzas) foi determinado pela incineração da amostra, previamente desidratada, em mufla à 550°C. A fração de proteína foi determinada pela determinação de nitrogênio, obtido por meio do processo de digestão ácida pelo método Micro-Kjeldal. Foi utilizado o fator 6,25 na conversão do nitrogênio. A fração extrato etéreo foi determinada pela extração contínua em aparelho Soxhlet por seis horas, usando éter etílico como solvente e posterior evaporação em estufa a 105°C por duas horas. Os teores de carboidratos totais foram obtidos pela diferença das demais frações.

2.4 Seleção do melhor resíduo para o cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*

2.4.1 Produção de cogumelos

Foi realizado segundo a metodologia descrita por Obadai [7]. Foi utilizado 1 Kg de cada um dos resíduos secos (70°C por 3 dias). Os resíduos foram triturados e padronizados tendo a umidade corrigida para 70%. Foi realizado um controle utilizando serragem de *Pinus* que foi preparado da mesma maneira que os demais resíduos. Os resíduos foram suplementados com 20% de farelo de trigo.

Os substratos foram acondicionados em pacotes de polipropileno de alta densidade e conduzidos a esterilização a 121°C por 3 dias consecutivos. Para o inóculo foi utilizado 6g de farelo de trigo acondicionados em erlenmeyers de 125 ml e adicionado 14 ml de água. Os frascos foram inoculados com 6 fragmentos (5 mm) obtidos de uma cultura previamente desenvolvida (5 dias) em ágar sabouraud.

Após 144h de incubação o conteúdo dos erlenmeyers foi inoculado nos pacotes contendo resíduo. Os pacotes de resíduo foram incubados a 25°C até a colonização completa do substrato. Após a colonização completa os pacotes foram transferidos para a câmara de incubação e a temperatura foi reduzida e a umidade aumentada (22,2°C e 90% de umidade) até a frutificação. A luminosidade foi mantida em 2000 Lux, com fotoperíodo de 12h. Após a frutificação, os cogumelos foram colhidos e pesados quando maduros e depois secos em estufa de circulação de ar (70°C) para determinação da massa seca.

2.4.2 Determinação da atividade da lacase

Para avaliar a atividade enzimática da lacase foram retiradas amostras do substrato nos períodos de 10, 15, 20, 25 e 30 dias. Foi retirado cerca de 1g do conteúdo dos sacos e seguiu-se à extração mecânica do extrato enzimático adicionando-se 9 ml de água e levando à agitação a 100 rpm por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi recolhido e centrifugado e 1000 rpm por 3 minutos.

Para a quantificação da Lacase foi preparada a seguinte reação: 0,7ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 a 0,5M, 0,1 mL de orto-dianisidina (1 mM) e 0,1 mL do sobrenadante contendo a enzima. A oxidação da orto-dianisidina foi acompanhada pelo aumento da

absorbância a 525 nm ($525 = 65,000M \cdot 1cm \cdot 1$). O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adicionou a solução de orto-dianisidina, sendo realizada a medida da absorbância de 10 em 10 segundos durante 2 minutos [8].

2.4.3 Determinação do crescimento de *Pleurotus ostreatus*

O processo foi realizado como descrito por Campos (2010) [9]:

- Eficiência biológica (EB) (g/g): demonstra quanto substrato foi bioconvertido pelo fungo em corpos de frutificação ($EB = \frac{\text{Massa fresca de cogumelos em g}}{\text{Massa seca de substrato em g}} \times 100$).
- Perda de matéria orgânica (PMO) (g/g): mostra a massa perdida de substrato durante o crescimento fúngico ($PMO = \frac{\text{Massa seca do substrato residual em g}}{\text{Massa seca do substrato inicial em g}} \times 100$).

2.5 Otimização das condições de cultivo e produção de lacase

A influência dos fatores umidade e farelo no cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* foi investigada utilizando planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central. Assim, 4 experimentos foram realizados com 3 repetições no ponto central, totalizando 7 experimentos.

O substrato definido na tabela 1 foi preparado e esterilizado por 15 minutos a 121°C durante 3 dias consecutivos. Para o inóculo foi utilizado 6g de farelo de trigo acondicionados em erlenmeyers de 125 ml e adicionado 14 ml de água. Os frascos foram inoculados com 6 fragmentos (5 mm) obtidos de uma cultura previamente desenvolvida (5 dias) em ágar sabouraud. Após 144h de incubação os 7 sacos contendo substrato foram inoculados com o conteúdo dos erlenmeyers. Após 20 dias de incubação foram retiradas amostras do meio de cultivo para a determinação da atividade da lacase.

Tabela 1. Níveis e variáveis umidade e relação resíduo:farelo usados no planejamento fatorial.

Variáveis	Níveis	
	+1	-1
Umidade (%)	40	60
Porcentagem de farelo de trigo (%)	0	0,5

2.6 Análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram calculadas a média e o desvio padrão para cada uma das determinações realizadas. Quando necessário comparar variâncias foi utilizado teste de ANOVA suplementado pelo teste paramétrico “t”, com intervalo de confiança de 95%. A análise da influência de variáveis sobre a produção de lacase foi desenvolvida utilizando o software profissional STRATGRAPHICS PLUS v. 4.1

3 Resultados

3.1 Composição Centesimal dos resíduos

No intuito de conhecer sobre a composição dos resíduos estudados esses foram avaliados quanto a sua composição. Na Tabela 2 observa-se composição centesimal dos resíduos de casca de cupuaçu, casca da raiz de mandioca, casca de pupunha, casca de tucumã e semente de açaí. A casca de tucumã apresentou o maior teor de proteínas (9,83%) e a semente de açaí apresentou maior teor de carboidratos (83,32%).

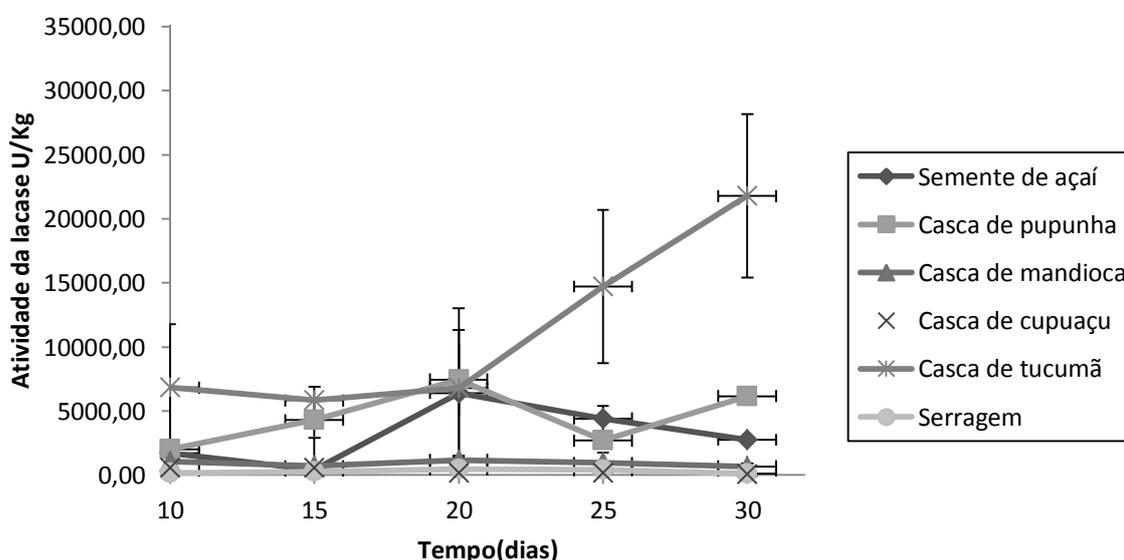
Tabela 2. Composição centesimal dos resíduos (casca de cupuaçu, casca da raiz de mandioca, casca de pupunha, casca de tucumã e semente de açaí) coletados nas feiras abertas da cidade de Manaus.

Parâmetro	Casca de Cupuaçu	Casca de Mandioca	Casca de Pupunha	Casca de Tucumã	Semente de Açaí
Umidade (%)	65.95 ± 0.01	70.15 ± 0.04	37.2 ± 0.6	57.19 ± 0.01	9.64 ± 0.01
Cinzas (%)	2.2 ± 0.1	11.6 ± 0.6	2.48 ± 0.07	4.87 ± 0.05	1.56 ± 0.03
Lipídeos (%)	0.7 ± 0.1	0.72 ± 0.03	34.3 ± 0.4	22.6 ± 0.4	0.20 ± 0.01
Proteínas (%)	4.7 ± 0.1	6.32 ± 0.01	6.3 ± 0.1	9.83 ± 0.06	5.26 ± 0.07
Carboidrato (%)	26.5 ± 0.1	11.5 ± 0.6	19.7 ± 0.4	5.4 ± 0.4	83.30 ± 0.03

3.2 Produção de lacase

Bioprocessos foram realizados para investigar a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* utilizando os resíduos como substrato. Essa enzima foi determinada nos dias 10, 15, 20, 25 e 30 de cultivo. A Figura 1 mostra a cinética da produção de lacase nos resíduos estudados. A casca de tucumã foi o substrato destacado para a produção de lacase (21766,82 U/Kg).

Fig.1. Cinética da produção de Lacase por *Pleurotus ostreatus* utilizando como substrato resíduos coletados nas feiras da cidade de Manaus (casca de cupuaçu, casca da raiz de mandioca, casca de pupunha, casca de tucumã e semente de açaí).



3.3 Produção de Cogumelos

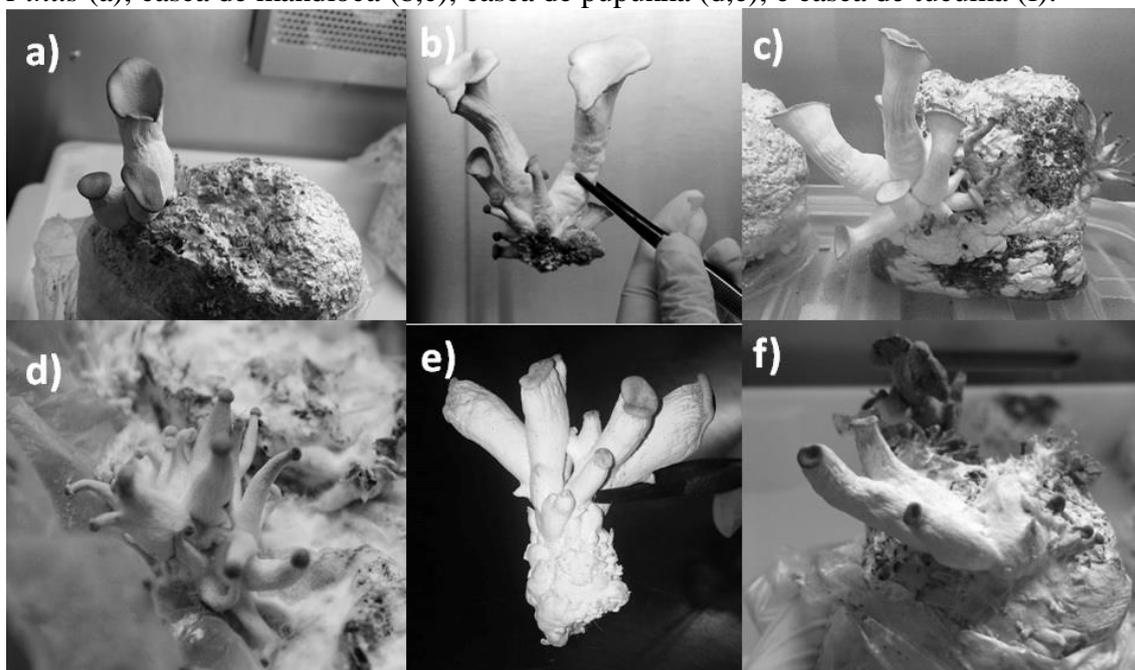
Para avaliar qual dos resíduos de feira era o mais adequado para o cultivo e produção de cogumelos por *Pleurotus ostreatus* foram utilizados os índices de eficiência biológica e perda de matéria orgânica. Na Tabela 3 é observada a eficiência biológica e a perda de matéria orgânica calculadas durante o cultivo de *Pleurotus ostreatus* nos resíduos. A casca de mandioca se destacou na produção de cogumelos (Figura 2) obtendo uma eficiência biológica de 12,82% e a casca da pupunha apresentou a maior perda de matéria orgânica (78,9%).

Tabela 3. Eficiência Biológica e Perda de matéria orgânica dos substratos agroindustriais utilizados para a produção de cogumelos por *Pleurotus ostreatus*

Substrato	Eficiência biológica (g/g) (%)	Perda da matéria orgânica (g/g) (%)
Casca de tucumã	1.5%	68.3%
Casca de pupunha	4.8%	78.9%
Semente de açaí	NF	74.1%
Casca de mandioca	12.8%	73.6%
Casca de cupuaçu	NF	70.8%
Serragem	1.2%	41%

Legenda “SF”: não houve frutificação

Fig.2. Produção de corpos de frutificação de *Pleurotus ostreatus* nos resíduos: serragem de *Pinus* (a), casca de mandioca (b,c), casca de pupunha (d,e), e casca de tucumã (f).



3.4 Planejamento Fatorial e Superfície de resposta

Com a finalidade de investigar a influência das condições de cultivo na produção de lacase, bioprocessos foram realizados investigando os fatores concentração de umidade e de farelo por meio da metodologia de planejamento fatorial e superfície de resposta, com três repetições no ponto central. Os resultados do planejamento fatorial (Tabela 4) mostraram uma produção de lacase que variou de 995 U/Kg a 3565 U/Kg demonstrando a importância dos fatores investigados.

Tabela 4. Resultado do planejamento fatorial com três repetições no ponto central para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em casca de pupunha.

Experimento	Umidade (%)	Porcentagem de farelo de trigo (%)	Lacase (UI/Kg)
1	40.0	0	2448
2	60.0	0	3565
3	50.0	25	2582
4	50.0	25	2440
5	60.0	50	995
6	40.0	50	1237
7	50.0	25	2400

Os efeitos principais e suas respectivas interações calculadas a partir dos dados da tabela 4 são apresentados na tabela 5. Os erros padrão (σ) dos efeitos foram calculados a partir das replicadas do ponto central (tabela 4). Segundo Barros Neto et al., ao nível de 95% de confiança, somente são considerados significativos os efeitos, em módulo, cujos valores forem maiores que " $t_v \times \sigma$ ", onde t_v é o valor do teste t para v graus de liberdade. O valor do teste t para 2 graus de liberdade (t_2), ao nível de 95% de confiança é 4,313.

Tabela 5. Efeito dos fatores umidade e porcentagem de farelo de trigo na produção de lacase, calculados a partir dos dados apresentados na Tabela 4.

Efeitos estimados	Lacase UI/Kg
Média	2238 ± 36
A: Umidade*	438 ± 96
B: Porcentagem de farelo de trigo*	-1891 ± 96
AB*	-680 ± 96

Os erros padrão em um erro puro com 2 graus de liberdade
 *Efeitos com significado estatístico ao nível de 95% de confiança.

Quanto a produção de lacase, nas condições experimentais, os fatores Umidade e Porcentagem de Farelo de trigo e a interação desses apresentaram significância estatística. Considerando-se esses efeitos estatisticamente significativos, um modelo linear foi ajustado com os dados da Tab. 4 e esse é descrito a seguir:

Equação 1

$$\text{Lacase (U/Kg)} = 390,893 + 55,85 \cdot \text{Umidade} + 3014,0 \cdot \text{Porcentagem de Farelo de trigo} - 135,9 \cdot \text{Umidade} \cdot \text{Porcentagem de Farelo de trigo}$$

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para validação do modelo matemático descrito na Equação 1 (Tab. 5). Esse modelo matemático apresentou regressão significativa (93,1%), seus fatores apresentaram significado estatístico e falta de ajuste insignificativo ($p > 0,05$).

Tabela 6. Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para a produção de lacase.

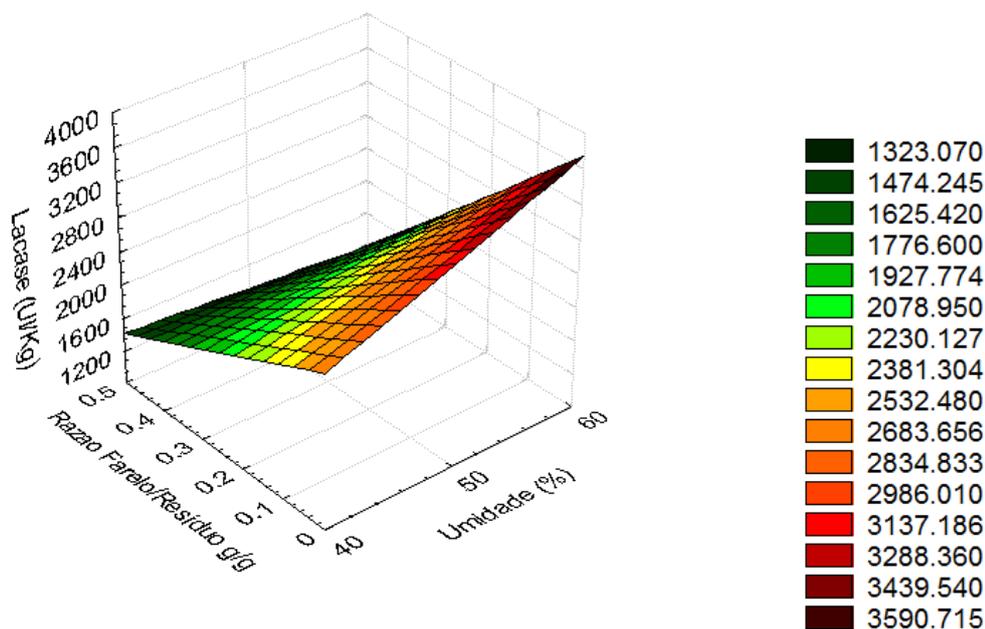
Fonte	Soma dos Quadrados	Gl	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
A: Umidade	191406.0	1	191406.0	20.92	0.0446
B: porcentagem de farelo de trigo	3.57399×10^6	1	3.57399×10^6	390.69	0.0025
AB	461720.0	1	461720.0	50.47	0.0192
Falta de ajuste	292050.0	1	292050.0	31.93	0.0299
Erro	18296.0	2	9148.0		
Total (corr.)	4.53746×10^6	6			

R-quadrado = 93,1604 por cento

R-quadrado (ajustado para d.f.) = 86,3207 por cento

Para representar a estimativa de Lacase produzida foram feitas superfícies de resposta (Fig. 3) a partir dos dados gerados pelo modelo avaliado (Fig. 1). A superfície de resposta construída demonstrou que as condições mais adequadas para a máxima produção da lacase foram: 60 % de umidade e nenhuma suplementação com farelo de trigo.

Fig.3. Superfície de resposta apresentando as informações geradas pela Equação 1, influência da Umidade (%) e da Razão Farelo/resíduo g/g (Farelo de trigo/casca de pupunha) na produção de lacase por *P. ostreatus*.



4 Discussão

Cogumelos comestíveis são alimentos de importância econômica e nutricional e podem ser cultivados utilizando resíduos como substrato. O uso de resíduos no cultivo desses cogumelos possibilita o seu aproveitamento na obtenção de cogumelos comestíveis e de lacase que é uma enzima de valor econômico sendo utilizada na indústria têxtil e de alimentos. No presente trabalho foi demonstrado ser possível produzir cogumelos e lacase utilizando como substrato resíduos obtidos em feiras abertas. O resíduo casca de pupunha demonstrou ser adequado para o crescimento do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* e possibilitou a produção da enzima lacase em durante seu crescimento nesse resíduo sendo selecionado para a etapa de otimização.

Comparando-se com substratos já utilizados no cultivo de *Pleurotus ostreatus* quanto aos teores de carbono e nitrogênio os resíduos de casca de pupunha e casca de tucumã apresentaram teores de proteínas mais altos do que os resíduos convencionalmente utilizados (6,34% e 9,83%). Campos (2010) [9] avaliou a composição dos substratos de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e farelo de arroz obtendo no bagaço de cana de açúcar teor de proteínas de 2,56% e para o farelo de trigo de 16,25%. Para o teor de carboidratos dos resíduos a casca do cupuaçu e a casca da pupunha se destacaram entre os demais resíduos (26,45% e 19,65% respectivamente). Quando comparados aos teores de carboidratos do resíduo de bagaço de cana de açúcar obtidos no trabalho de Campos (2010) os resíduos de cupuaçu e mandioca se apresentaram inferiores. Sabe-se, entretanto, que este baixo teor de carboidratos no substrato pode ser corrigida pela adição de suplementos [10].

Durante o cultivo nos resíduos regionais a casca de tucumã e a casca da pupunha se destacaram demonstrando altas taxas de produção de lacase (21766,82 U/Kg e 6161,43 U/Kg). Silva (2012) cultivou *Pleurotus ostreatus* em cascas de café utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio obtendo uma produção de lacase de 20 U/ml [11]. Alexandrino (2007) obteve valores de lacase de 73 U/ml utilizando resíduo de bagaço de laranja sem qualquer suplementação, proporcionando a obtenção de elevada atividade enzimática com potencial para uso industrial [12]. Menezes (2009) utilizou bagaço de cana de açúcar para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* e obteve valor de 6,23 U/l para a enzima lacase [13]. Regina (2012) cultivou *Pleurotus ostreatus* em sabugo de milho e alcançou valores de lacase de 1,2 U/l em meio líquido e 2,8 U/Kg em meio sólido [14]. Melo (2011) utilizou solução Manachini suplementada com CuSO₄ e glicose tendo seus sais dissolvidos em água de imersão de palha de bananeira obtendo uma produção de lacase de 3,132 U/l. Os trabalhos citados apresentaram taxas de produção de lacase inferiores às obtidas neste trabalho demonstrando que os resíduos de regionais de casca de tucumã e a casca de pupunha são substratos adequados para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* visando a produção de lacase.

A figura 2 mostra a produção de corpos de frutificação para o resíduo de casca de mandioca obtendo eficiência biológica de 12,82%. Holtz (2009) utilizou resíduo de algodão da indústria têxtil sem adição de suplemento no cultivo de *Pleurotus ostreatus* obtendo eficiência biológica de 5% [15]. Marino (2008) cultivou em casca de coco suplementada com farelo de trigo ou arroz e obteve eficiência biológica de 5,9% [16]. Estes valores demonstraram que a casca de mandioca se mostrou mais eficaz no cultivo de *Pleurotus ostreatus* do que os resíduos citados. Dias (2003) [17] utilizou os substratos de palha de feijão pura no cultivo de *Pleurotus sajor caju* e obteve eficiência biológica de 85,7% [18]. Esse valor foi superior ao encontrado na casca de mandioca e pode ser devido ao alto teor de proteínas (91,25%) presente no substrato de palha de feijão. A palha de milho quando utilizada juntamente com o farelo de trigo no cultivo de *Pleurotus* também obteve valores elevados de eficiência biológica (83,4%) [18]. Campos (2010) utilizou serragem de marupá e pau-de-balsa provenientes da indústria madeireira e obteve eficiência biológica de 94% e 64,60% [10].

Entretanto, o resíduo de casca de mandioca se mostrou eficiente na produção da enzima lacase, sendo que a deficiência no teor de proteínas do mesmo pode ser corrigida utilizando a suplementação com farelos.

Algumas limitações encontradas nesta pesquisa, uma delas é a necessidade de uma análise físico-química e composição nutricional tanto dos corpos de frutificação obtidos, quanto dos substratos pós-cultivo no sentido de investigar o incremento de energia e proteína nos mesmos provocada pelo metabolismo do fungo durante o cultivo e sua possível utilização como adubo orgânico ou em biorremediação. Assim, estudos futuros podem incluir a análise físico-química e a composição nutricional tanto dos cogumelos obtidos quanto dos substratos pós-cultivo.

Os objetivos alcançados neste estudo foram interessantes no sentido de investigar o aproveitamento de resíduos gerados nas feiras abertas de Manaus. Os resíduos de casca de mandioca, casca de tucumã e casca de pupunha demonstraram serem viáveis tanto para o cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* como para a produção de lacase, sendo necessárias novas pesquisas no sentido de avaliar os cogumelos obtidos quanto às suas características nutricionais. Este estudo pretende contribuir para a pesquisa de substratos regionais no cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* buscando seu melhor aproveitamento.

5 Conclusões

Utilizando resíduos das feiras abertas da cidade de Manaus foi possível cultivar o cogumelo *Pleurotus ostreatus* e obter a produção de lacase durante esse processo nos resíduos de casca de mandioca, casca de tucumã e casca de pupunha. Dentre os resíduos estudados o resíduo de casca de pupunha foi o mais adequado para a produção de cogumelos e de lacase.

Quando investigadas as condições ideais de produção de lacase para o resíduo de casca de pupunha foram 60% de umidade sem adição de farelo de trigo.

Agradecimentos

Ao laboratório de alimentos e nutrição do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela caracterização centesimal dos resíduos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

- [1] E. GOMES, A.P. AGUIAR, C.C. CARVALHO, M.R.B. BONFÁ, R. SILVA, M. BOSCOLO, Lignases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes, Brazilian J. Microbiol. (2009) 31–39.
- [2] M. BONATTI, P. KARNOPP, H.M. SOARES, S.A. FURLAN, Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes, Food Chem. 88 (2004) 425–428. doi:10.1016/j.foodchem.2004.01.050.
- [3] C. SALES-CAMPOS, Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazonia, Interciencia. 35 (2010) 198–201.
- [4] D. WANG, A. SAKODA, M. SUZUKI, Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain, Bioresour. Technol. 78 (2001) 293–300.
- [5] P. BALDRIAN, J. GABRIEL, Copper and cadmium increase laccase activity in

- Pleurotus ostreatus, FEMS Microbiol. Lett. 206 (2002) 69–74. doi:10.1016/S0378-1097(01)00519-5.
- [6] C. MANHÃ, Comida jogada no lixo em Manaus daria para alimentar 100 mil pessoas, J. D24AM Online. (2014). <http://new.d24am.com/noticias/amazonas/comida-jogada-no-lixo-em-manau-daria-para-alimentar-100-mil-pessoas/103598>.
- [7] M. OBADAI, J. CLELAND-OKINE, K. a VOWOTOR, Comparative study on the growth and yield of Pleurotus ostreatus mushroom on different lignocellulosic by-products., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30 (2003) 146–9. doi:10.1007/s10295-002-0021-1.
- [8] F. ZADRA, Microbiology and Biotechnology Influence of Ammonium Nitrate and Organic Supplements on the Yield of Pleurotus sajor ca / u (Fr .) Sing, Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 (1980) 31–35.
- [9] C. SALES-CAMPOS, M.T. de A. MINHONI, M.C.N. ANDRADE, Produtividade de Pleurotus ostreatus em resíduos da Amazônia, Interciencia. 35 (2010) 198–201.
- [10] C. SALES-CAMPOS, L.M. ARAUJO, M. TEIXEIRA, D.A. MINHONI, M.C.N. ANDRADE, Análise físico-química e composição nutricional da matéria prima e de substratos pré e pós cultivo de Pleurotus ostreatus, Interciencia. 35 (2010) 70–76.
- [11] S. SOUZA, H. De SOUZA, G.A. LINDE, N.B. COLAUTO, J. SILVEIRA, Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café, Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR. 15 (2012) 191–196.
- [12] A.M. ALEXANDRINO, H.G. De FARIA, C.G.M. SOUZA, R.M. PERALTA, Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por Pleurotus ostreatus (Jack:Fr), Ciência E Tecnol. Aliment. 27 (2007) 364–368. doi:10.1590/S0101-20612007000200026.
- [13] C.R. MENEZES, I.S. Silva, L.R. DURRANT, Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas, Estud. Tecnológicos Em Eng. 5 (2009) 68–78. doi:10.4013/ete.2009.51.05.
- [14] M. REGINA, L.D. PACCOLA-MEIRELLES, A.D.M. BARBOSA, I.R. AMADOR, G.M. ANDRADE-NOBREGA, D.C. MASCHIARE, Sabugo de milho e carvão ativado na produção de Lacase e Basidiomas de Pleurotus sp, Semin. Ciências Agrárias. 33 (2012) 39–48. doi:10.5433/1679-0359.2012v33n1p39.
- [15] M. HOLTZ, G.M. BORGES, S.A. FURLAN, E. WISBECK, Cultivo de Pleurotus ostreatus utilizando resíduo de algodão da indústria têxtil, Rev. Ciências Ambient. 3 (2009) 37–51.
- [16] R.H. MARINO, L.D. De ABREU, J.B. MESQUITA, G.T. RIBEIRO, Crescimento e cultivo de diferentes isolados de Pleurotus ostreatus (JACQ:FR.) KUMMER em serragem da casca de coco, Arq. Inst. Biol., São Paulo. 75 (2008) 29–36.
- [17] C.C. de M. GONÇALVES, P.C.A. PAIVA, E.S. DIAS, F.G. SIQUEIRA, F. HENRIQUE, Avaliação do cultivo de Pleurotus sajor-caju (Fries) Sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal, Ciênc.agrotec.,Lavras. 34 (2010) 220–225.
- [18] E.S. DIAS, É.M.S. KOSHIKUMO, R.F. SCHWAN, R. SILVA, Cultivo do cogumelo Pleurotus sajor-caju em diferentes resíduos agrícolas, Ciênc.agrotec.,Lavras. 27 (2003) 1363–1369.

5. CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou que é possível utilizar resíduos produzidos nas feiras abertas de Manaus como substrato para o cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*;
- Os substratos de casca de tucumã, casca de pupunha e casca de mandioca se mostraram viáveis tanto para o cultivo quanto para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*;
- Dentre os resíduos estudados o resíduo de casca de pupunha foi o mais adequado para a produção de cogumelos e de lacase e quando investigadas as condições ideais de produção de lacase encontradas foram 60% de umidade sem suplementação com farelo de trigo;
- Este estudo pretende contribuir com o melhor aproveitamento dos resíduos gerados nas feiras abertas de Manaus, pois demonstrou ser possível seu uso biotecnológico;

6. REFERÊNCIAS

1. GOMES E, AGUIAR AP, CARVALHO CC, BONFÁ MRB, SILVA R, BOSCOLO M. Lignases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian J Microbiol.* 2009;31–9.
2. BALDRIAN P, GABRIEL J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;206:69–74.
3. MANHÃ C. Comida jogada no lixo em Manaus daria para alimentar 100 mil pessoas. *jornal D24AM online* [Internet]. 2014; Available from: <http://new.d24am.com/noticias/amazonas/comida-jogada-no-lixo-em-manau-daria-para-alimentar-100-mil-pessoas/103598>
4. BACELAR-LIMA CG, MENDONÇA MS De, BARBOSA TCTS. Morfologia Floral de uma População de Tucumã , *Astrocaryum aculeatum* G . Mey . (*Arecaceae*) na Amazônia Central. *Acta Amaz.* 2006;36(092):407–12.
5. RODRIGUES PHV, FERREIRA FF, AMBROSANO GMB, GATO AMG. Propagação in vitro de tucumã do Amazonas. *Ciênc Rural.* 2013;1–5.
6. GENTIL DFDO, FERREIRA SA do N. Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (*Arecaceae*). *Acta Amaz.* 2005;35(3):337–42.
7. LEITÃO AM. Caracterização morfológica e físico-química de frutos e sementes de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (*Aracaceae*), de uma floresta secundária. Tese doutorado - *Biol Trop.* 2008;
8. BARBOSA BS, KOOLEN HHF, BARRETO AC, SILVA JD Da, FIGLIUOLO R, NUNOMURA SM. Aproveitamento do Óleo das Amêndoas de Tucumã do Amazonas na Produção de Biodiesel. *Acta Amaz.* 2009;39(2):371–6.
9. SANTOS-SILVA E. Beneficiamento local e cooperativo da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum .) em uma comunidade da RDS TUPÉ , Manaus-AM. *Biotupé Meio Físico, Divers Biológica e Sociocult do Baixo Rio Negro, Amaz Cent.* 2009;2.
10. RODRIGUES BS. Resíduos da agroindústria como fonte de fibras para elaboração de pães integrais. *Diss - Esc Super Agric Luis Queiroz, Piracicaba.* 2010;96P.
11. FERREIRA M das G, NOGUEIRA AE, FILHO CFD. Estudo morfológico de folhas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). *Bol Pesqui e desenvolvimento, Embrapa.* 2006;12p.
12. SOUZA AGC, SANTOS ÁF. Workshop sobre as culturas de cupuaçu e pupunha na amazônia. *EMBRAPA-CPAA.* 1996;173p.
13. PUGLIESE AG. Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate : Composição e possíveis benefícios. *Diss Mestr - Programa Pós-graduação em Ciência dos Aliment São Paulo.* 2010;
14. MARQUES PA, COELHO RD. Estudo da viabilidade econômica da irrigação da pupunheira (*Bactris Gasipaes* H.B.K.) para Ilha Solteira - SP, Brasil. *Ciênc Rural.* 2003;33:291–7.
15. TRACZ AL, WENDLING I, FILHO ANK, SANTOS ÁF, QUOIRIN GG. Enraizamento de Perfilhos de Pupunheira (*Bactris gasipaes*). *Pesqui Florest Bras.*

- 2009;58:67–73.
16. NETO BA de M, BATISTA AF, SANTOS TC, ROCHA TJO, SOARES CP, CARVALHO EA, et al. Reaproveitamento do resíduo do fruto da pupunheira (*Bactris gasipae*, Kunth) para a produção de celulases por fermentação em estado sólido. I Simpósio Bras da Pupunheira. 2011;
 17. CARVALHO JEU, MULLER CH. Níveis de tolerância e letal de umidade em sementes de pupunheira, *Bactris gasipae*s. Rev Bras Frutic. 1998;20:283–9.
 18. SALES-CAMPOS C, ARAUJO LM, TEIXEIRA M, MINHONI DA, ANDRADE MCN. Análise físico-química e composição nutricional da matéria prima e de substratos pré e pós cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Interciencia. 2010;35:70–6.
 19. QUEIROZ JAL, JÚNIOR NJM. Efeito do tamanho do recipiente sobre o desenvolvimento de mudas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Rev Bras Frutic. 2001;23:460–2.
 20. COSTA MR, OLIVEIRA M do SP, MOURA EF. Variabilidade genética em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). Biotecnol Ciência e Desenvolv. 2001;21.
 21. POZO-INSFRAN D del, BRENES CH, TALCOTT ST. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). J Agric Food Chem. 2004;52:1539–45.
 22. NASCIMENTO WMO. Açaí, *Euterpe oleracea*. Inf técnico rede sementes da Amaz. 2008;18.
 23. FENIMAN CM. Caracterização das raízes de mandioca (*Manihot sculenta* Crantz) do cultivar IAC 576-70 quanto à cocção, composição química e propriedades do amido em duas épocas de colheita. Diss Mestr - Esc Super Agric São Paulo. 2004;83 p.
 24. BOSCOLO WR, HAYASHI C, MEURER F. Farinha de Varredura de Mandioca (*Manihot esculenta*) na Alimentação de Alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) Cassava by-Product Meal (*Manihot esculenta*) on Feeding of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Fingerlings. Rev Bras Frutic. 2002;31:546–51.
 25. ZEOULA LM, NETO SFC, BRANCO AF, PRADO IN do, SANTOS GT, KASSIES M, et al. Mandioca e resíduos das farinhas na alimentação de ruminantes: digestibilidade total e parcial. Rev Bras Zootec. 2002;31(6):1582–93.
 26. FELIPE FI, RIZATO M, WANDALSEN JV. Potencial econômico dos resíduos de mandioca provenientes de fecularias do Brasil. Soc Bras Econ Adm e Sociol Rural. 2009;
 27. ALBUQUERQUE P. Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã. Diss Mestr - Pós-graduação em Eng Aliment Florianópolis, SC. 2003;
 28. DIAS ES, KOSHIKUMO ÉMS, SCHWAN RF, SILVA R da. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. Ciênc.agrotec,Lavras. 2003;27:1363–9.
 29. SILVA MM. Cultivo de cogumelos comestíveis pela técnica jun-caio. Monogr - Curso Pós-graduação em Microbiol Belo Horiz. 2011;41 p.
 30. MANZI P, GAMBELLI L, MARCONI S, VIVANTI V, PIZZOFERRATO L. Nutrients in edible mushrooms : an inter-species comparative study. Food Chem. 1999;65:1–6.
 31. MANZI P, AGUZZI A, PIZZOFERRATO L. Nutritional value of mushrooms widely

- consumed in Italy. *Food Chem.* 2001;73:321–5.
32. GUNAWARDENA D, BENNET L, SHANMUGAM K, KING K, WILLIAMS R, ZABARAS D, et al. Anti-inflammatory effects of five commercially available mushroom species determined in lipopolysaccharide and interferon- γ activated murine macrophages. *Food Chem. Elsevier Ltd*; 2014;148:92–6.
 33. PRADO R, FURLANI Z, GODOY HT. Valor nutricional de cogumelos comestíveis
Nutritional value of edible mushrooms. *Cienc Tecnol Aliment.* 2007;27(1):154–7.
 34. IUROMA A, NDUKA. Comparison of sawdust and rice husk as casing materials for *Pleurotus pulmonarius* propagation on cassava peel substrate. *Agric Biol J N Am.* 2013;4(5):552–4.
 35. OBADAI M, CLELAND-OKINE J, VOWOTOR K a. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2003 Mar;30(3):146–9.
 36. ONUOHA CI, UCHECHI U, ONUOHA BC. Cultivation of *Pleurotus pulmonarius* (mushroom) using some agrowaste materials. *Agric J.* 2009;4(2):109–12.
 37. SALES-CAMPOS C. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazonia. *Interciencia.* 2010;35(3):198–201.
 38. ADEBAYO GJ, OMOLARA BN, TOYIN AE. Evaluation of yield of oyster mushroom (*Pleurotus pulmonarius*) grown on cotton waste and cassava peel. *African J Biotechnol.* 2009;8(2):215–8.
 39. RAMPINELLI JR, SILVEIRA MLL, GERN RMM, FURLAN SA, NINOW JL, WISBECK E. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. *AlimNutrAraraquara.* 2010;21:197–202.
 40. RUEGGER MJS, CAPELARI M, TORNISIELO SMT, BONONI VLR. Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (JUNGH.) HÖHN. in lignocellulosic substrates. *Brazilian J Microbiol.* 2001;32:211–4.
 41. GONÇALVES CC de M, PAIVA PCA, DIAS ES, SIQUEIRA FG, HENRIQUE F. Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Fries) Sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal. *Ciênc.agrotec,Lavras.* 2010;34:220–5.
 42. PALMIERI G, BIANCO C, CENNAMO G, GIARDINA P, MARINO G, MONTI M, et al. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Jun 1;67(6):2754–9.
 43. SILVA CEV. Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar. *Diss Mestr - Esc Super Agric Luiz Queiroz Piracicaba.* 2008;52 p.
 44. DIAS ES, KOSHIKUMO ÉMS, SCHWAN RF, SILVA R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. *Ciênc.agrotec,Lavras.* 2003;27(6):1363–9.
 45. MEMBRILLO I, SÁNCHEZ C, MENESES M, FAVELA E, LOERA O. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresour Technol. Elsevier Ltd*; 2011 Jan;102(2):1581–6.
 46. BÔAS SGV. Conversão do bagaço de maçã por *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus* visando a produção de suplemento para ração animal. *Diss Mestr - Pós-graduação em*

- Biotechnol Florianópolis, SC. 2001;126 P.
47. SHIBATA CKR, DEMIATE IM. Cultivo e análise da composição química do cogumelo do Sol (*Agaricus blazei* Murril). Publ UEPG CiBiolSaúde. 2003;9(2):21–32.
 48. LIU Y, HUANG F, YANG H, IBRAHIM SA, WANG Y, HUANG W. Effects of preservation methods on amino acids and 5 0 -nucleotides of *Agaricus bisporus* mushrooms. Food Chem. Elsevier Ltd; 2014;149:221–5.
 49. TSAI S, WU T, HUANG S, MAU J. Nonvolatile taste components of *Agaricus bisporus* harvested at different stages of maturity. Food Chem. 2007;103:1457–64.
 50. PEIL RM, ROSSETO EA, ROCHA MTR. Rendimento do cogumelo *Agaricus bisporus* (LANGE) IMBACH em três formulações de compostos. RevBras de Agrociência. 1995;1(3):163–6.
 51. PEIL RM, ROSSETO EA, PIEROBOM CR, ROCHA MT. Desinfestação de composto para cultivo de cogumelo *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. RevBras de Agrociência. 1996;2(3):159–64.
 52. SALMONES D, HERNANDÉZ HB, ZULUETA R, MATA G. Determinación de las características productivas de cepas mexicanas silvestres de *Agaricus bisporus*, para su potencial uso comercial. Rev Mex Micol. 2012;36:9–15.
 53. LLORENTE-MIRANDES T, BARBERO M, RUBIO R, LÓPEZ-SÁNCHEZ JF. Occurrence of inorganic arsenic in edible Shiitake (*Lentinula edodes*) products. FOOD Chem. Elsevier Ltd; 2014;158:207–15.
 54. CAYETANO-CATARINO M, BERNABÉ-GONZALÉZ T. Cultivo de *Pleurotus* sobre residuos de las cosechas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y plátano (*Musa paradisiaca*). Rev Mex Micol. 2008;26:57–60.
 55. CHOI Y, LEE SM, CHUN J, LEE HB, LEE J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. Food Chem. 2006;99:381–7.
 56. FURLANI RPZ, GODOY HT. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. Cienc Tecnol Aliment. 2007;27(1):154–7.
 57. ANDRADE MCN, SILVA JH, MINHONI MTA, ZIED DC. Mycelial growth of two *Lentinula edodes* strains in culture media prepared with sawdust extracts from seven eucalyptus species and three eucalyptus clones. Acta SciAgron. 2008;30(3):333–7.
 58. GOMES-DA-COSTA SM, COIMBRA LB, SILVA ES. Crescimento micelial de dois isolados de *Lentinula edodes* (Berk .) Pegler , em resíduos ligninocelulósicos. Acta SciBiolSci. 2008;30(2):191–6.
 59. FERNANDES Â, BARROS L, MARTINS A, HERBERT P, FERREIRA ICFR. Nutritional characterisation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq . ex Fr .) P . Kumm . produced using paper scraps as substrate. Food Chem. 2015;169:396–400.
 60. GUPTA A, SHARMA S, SAHA S, WALIA S. Yield and nutritional content of *Pleurotus sajor caju* on wheat straw supplemented with raw and detoxified mahua cake. Food Chem. Elsevier Ltd; 2013;141(4):4231–9.
 61. BISARIA R, MADAN M, BISARIA VS. Biologicefficiency and nutritive value of *Pleurotus sajor-caju* cultivated on different agro-wastes. Biol wastes. 1987;19:239–55.
 62. WANG D, SAKODA A, SUZUKI M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. Bioresour Technol. 2001;78:293–

- 300.
63. RAGUNATHAN R, GURUSAMY R, PALANISWAMY M, SWAMINATHAN K. Cultivation of *Pleurotus* spp . on various agro-residues. *Food Chem.* 1996;55(2):139–44.
 64. SOTO-CRUZ O, SAUCEDO-CASTAÑEDA G, PABLOS-HACH JL, GUTÍERREZ-ROJAS M, FAVELA-TORRES E. Effect of substrate composition on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* . An analysis by mixture and response surface methodologies. *Process Biochem.* 1999;35:127–33.
 65. YILDIZ CU, GEZER ED, TEMIZ A, YILDIZ S. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochem.* 2002;38:301–6.
 66. ZHANG R, LI X, FADEL JG. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. *Bioresour Technol.* 2002;82:277–84.
 67. LIBARD N, PATRÍCIO GN, GERN RMM, WISBECK E, FURLAN SA. Cultivo integrado dos cogumelos do gênero *Pleurotus ostreatus* e *Agaricus blazei*. *Soc Bras Ecol.* 2004;2–3.
 68. ASSI L, STANGARLIN JR, ZANELLA AL, CARRÉ V, BECKER A, SHIKDA SARL, et al. Desenvolvimento de substratos alternativos para o cultivo de cogumelos comestíveis e medicinal. *Sci Agrar Parana.* 2007;3(1/2):41–51.
 69. BONATTI M, KARNOPP P, SOARES HM, FURLAN SA. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chem.* 2004;88:425–8.
 70. MODA EM. Produção de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana-de-açúcar lavado e o uso de aditivos visando sua conservação “in natura.” Diss Mestr - Esc Super Agric Luiz Queiroz Piracicaba. 2003;84 p.
 71. RAMÍREZ LAG, RAVE A de JG. Determinación de proteína total de *Candida utilis* y *Sacharomyces cerevisiae* en bagazo de caña. *Rev lasallista Investig.* 2008;5(1):61–4.
 72. AGOSTINI ÉCD, MANTOVANNI TRD, VALLE JS, PACCOLA-MEIRELLES LD, COLAUTO NB, LINDE GA. Low carbon / nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *SciAgric (Piracicaba, Braz).* 2011;68(3):295–300.
 73. SOUZA S, SOUZA H De, LINDE GA, COLAUTO NB, SILVEIRA J. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. *Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR.* 2012;15:191–6.
 74. SCHMIDT P, WECHSLER FS, NASCIMENTO JS, JUNIOR FMV. Tratamento do Feno de Braquiária pelo Fungo *Pleurotus ostreatus*. *Rev Bras Zootec.* 2003;32(6):1866–71.
 75. MANTOVANI TRDA, MEIRELLES LDP, VALLE JS, LINDE GA, COLAUTO NB. Formulação de substratos na produção de biomassa micelial e de lacase de *Pleurotus ostreatus*. *Semin Agrar.* 2012;33(5):1681–92.
 76. FRANCO M, NETO BAM, SANTOS TC, BATISTA AF, SOARES CP, ROCHA TJO, et al. Produção de lacase por fermentação em estado sólido do resíduo de pupunha (*Bactris gasipaes*, Kunth). I Simpósio Bras da Pupunheira. 2010;50–3.
 77. ZADRA F. Microbiology and Biotechnology Influence of Ammonium Nitrate and Organic Supplements on the Yield of *Pleurotus sajor ca / u* (Fr .) Sing. *Appl Microbiol*

- Biotechnol. 1980;35:31–5.
78. MODA EM, HORII J, SPOTO MHF. Edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. *SciAgric (Piracicaba, Braz)*. 2005;62(2):127–32.
 79. MARINO RH, ABREU LD De, MESQUITA JB, RIBEIRO GT. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (JACQ:FR.) KUMMER em serragem da casca de coco. *Arq Inst Biol, São Paulo*. 2008;75:29–36.
 80. SALES-CAMPOS C, MINHONI MT de A, ANDRADE MCN. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. *Interciencia*. 2010;35:198–201.
 81. BERNARDI E, DONINI LP, MINOTTO E, NASCIMENTO JS. Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado. *Bragantia, Campinas*. 2009;68(4):901–7.
 82. SALES-CAMPOS C, ANDRADE MCN. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amaz*. 2011;41(1):1–8.