



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

KÁTIA DOS SANTOS MORAIS

**SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA DO ÓLEO DE PALMA (DENDÊ):
PRODUÇÃO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS E INSUMOS PARA RAÇÃO
DE PEIXES**

Vitória da Conquista, BA.

2016

KÁTIA DOS SANTOS MORAIS

**SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA DO ÓLEO DE PALMA (DENDÊ):
PRODUÇÃO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS E INSUMOS PARA RAÇÃO
DE PEIXES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Dr. Félix Gonçalves de Siqueira

EMBRAPA Agroenergia

Co-orientadores:

Dra. Simone Mendonça

EMBRAPA Agroenergia

Dr. Marcos Enê Chaves Oliveira

EMBRAPA Amazônia Oriental

Vitória da Conquista, BA.

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que
citada a fonte

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira, UFBA.

Morais, Kátia dos Santos.

Subprodutos da agroindústria do óleo de palma (dendê): produção de cogumelos comestíveis e insumos para ração de peixes. Kátia dos Santos Moraes - 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016.

122f.

Orientador: Dr. Félix Gonçalves de Siqueira.

Co-orientadores: Dra Simone Mendonça e Dr. Marcos Enê Chaves Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2016.

1. Basidiomicetos 2. Dendeicultura 3. Enzimas Oxidativas
4. Resíduos Agroindustriais 5. Palma de óleo. I.
Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação
em Biociências. II. Título

CDD

KÁTIA DOS SANTOS MORAIS

**SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA DE ÓLEO DE PALMA (DENDÊ):
PRODUÇÃO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS E INSUMOS PARA RAÇÃO
DE PEIXES**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 12 de dezembro de 2016.

Dr. Félix Gonçalves de Siqueira
Embrapa Agroenergia

Profª Dra. Patrícia Belini Nishiyama
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter dado força e perseverança.

À minha família, pelo amor e compreensão durante a minha ausência; em especial a minha mãe Lenita, meu irmão Charles e minha sobrinha Sofia por me oferecer o ombro todas as vezes que pensei em desistir.

Ao meu orientador Félix, por me acompanhar desde a iniciação científica, pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e por acreditar que eu poderia conseguir.

Aos meus co-orientadores Simone Mendonça e em especial a Marcos Enê pelo acolhimento durante os experimentos no Pará.

Às minhas amigas, Bruna Menezes, Mahala Correia, Patrícia Nolasco, Percília Oliveira, Nami Yokoyama, Maysa Barbosa pelos conselhos, pelas idéias e principalmente pela amizade.

À Universidade Federal da Bahia pela oportunidade de ingresso no ensino superior.

À Embrapa e a Denpasa por me oferecerem a estrutura física para realização dos experimentos.

Ao CNPQ pela ajuda financeira para realização deste trabalho.

“Se eu consegui enxergar mais longe foi porque estava apoiado em ombros de gigantes”.

Sir Isaac Newton

RESUMO

MORAIS, Kátia dos Santos. **Subprodutos da agroindústria de óleo de palma (dendê): produção de cogumelos comestíveis e insumos para ração de peixes.** 125f. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016.

A palma de óleo ou dendê (*Elaeis guineenses* ou *Elais oleifera*) é uma palmeira que tem sido explorada comercialmente para obtenção de óleos (óleo de palma). O cultivo agrônomico e beneficiamento da palma nas agroindústrias geram subprodutos sólidos e líquidos. O manejo das palmeiras nas fazendas de cultivo geram resíduos lignocelulósicos como folhas e troncos que são resultantes de podas programadas para facilitar o trânsito de máquinas agrícolas e trabalhadores. Há também os subprodutos do beneficiamento dos frutos de palma de óleo na agroindústria como cacho vazio, fibra da prensagem dos frutos, casquilho (coco), fibra ou torta de prensagem da amêndoa (semente/castanha), borra do óleo (processo de decantação). O resíduo líquido na agroindústria é denominado de POME, sigla em inglês para *Palm Oil Milk Effluent*, que pode ser traduzido livremente como água de lavagem do processo de prensagem. Estes coprodutos têm sido pouco explorados comercialmente de forma a gerar outras receitas ao setor, além da preocupação ambiental constante, sobre onde armazenar estes materiais quando não é possível o retorno dos mesmos as fazendas na forma de adubação. Deste modo, o reaproveitamento dos subprodutos da agroindústria do óleo de palma (dendê) é um grande desafio do setor em função dos impactos ambientais e econômicos. Uma alternativa a melhor uso destes subprodutos lignocelulósicos é por meio do tratamento biológico, por exemplo, destas biomassas. O conceito de biorrefinaria poderia se encaixar no setor da dendecultura, por se tratar do reaproveitamento dos resíduos ou coprodutos de agroindústria, por exemplo, na geração de outros produtos de valor agregado comercialmente, como cogumelos comestíveis e insumos para nutrição de animais (peixe). Este trabalho mostrou de forma pioneira que possível estabelecer o reaproveitamento dos subprodutos da agroindústria do dendê por meio do cultivo de cogumelos comestíveis e insumos para criação de peixe. Os resultados apontaram a possibilidade da integração entre a produção de cogumelos comestíveis e insumos de criação animal, acoplados ao sistema de beneficiamento dos cachos com frutos do dendê é possível, desde que ocorram os ajustes necessários par tal.

Neste estudo foi utilizado como modelo, a produção do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* CC389 (coleção de microrganismos da Embrapa). Este fungo foi escolhido pelo crescimento rápido em variadas formulações de substratos lignocelulósicos e rusticidade quanto à variação de temperatura e contaminação. As condições de preparo dos substratos variaram para encontrar a melhor forma de adaptação aos equipamentos e processos utilizados na agroindústria, de modo a não interferir na rotina previamente estabelecida. A temperatura e pressão das autoclaves utilizadas no processamento dos cachos com frutos do dendê foram de aproximadamente 145°C e 4 atm de pressão, respectivamente, por uma hora. Estas condições de esterilização foram mais que suficiente para o preparo dos substratos

para cultivo dos *Pleurotus*. No entanto, as sacolas de polipropileno não resistiram a esta temperatura, uma vez que o ponto de fusão da maioria dos materiais disponíveis no mercado é por volta de 125°C. Assim, os substratos foram armazenados em sacos de pano de algodão e posteriormente alocados nas sacolas de polipropileno (esterilizadas em autoclave comum), dentro da câmara de fluxo laminar no momento da inoculação micelial. A contaminação por fungos do gênero *Trichoderma*, por exemplo, foi um dos fatores importantes, não permitindo atingir maiores índices de produtividade dos cogumelos durante a colheita. No entanto, este problema poderá ser sanado com a utilização de recipientes individuais para os substratos, tipo sacolas e/ou potes constituídos de polímeros capazes de suportar a temperatura e pressão dos autoclaves industriais, utilizados na agroindústria de dendê. O SMS da formulação de substratos com maior produtividade foram utilizados como insumos na nutrição e digestibilidade de alevinos de tambacu (híbrido do tambaqui e pacu). Os índices de digestibilidade dos animais não apresentaram diferenças significativas quando alimentados com rações contendo SMS de *Pleurotus ostreatus* cultivado em substratos a base de cacho vazio, fibra de dendê e torta de palmiste, quando comparados com formulação de ração comercial. Os alevinos não recusaram a formulação da ração contendo o SMS (*Spent Mushroom Substrate*), ou seja, a palatabilidade do formulado não foi fator de recusa dos animais durante a alimentação. Deste modo, este trabalho apresentou resultados inéditos quanto a busca de geração de novos produtos junto a agroindústria do dendê, mostrando que é possível aproveitar os coprodutos do setor para gerar alimentos humanos (cogumelos), insumos para nutrição animal (peixes) e até mesmo enzimas com aplicações biotecnológicas como desconstrução da parede celular vegetal, dentro dos preceitos preconizados nos modelos de biorrefinaria.

Palavras-chave: Basidiomicetos, Dendeicultura, Enzimas Oxidativas Resíduos Agroindustriais, Palma de óleo.

• INTRODUÇÃO

A palma de óleo (*Elaeis guineensis*, Jacq) tem se destacado em várias partes de mundo, principalmente na Malásia e Indonésia, pela sua grande quantidade de resíduos gerados e pelo alto potencial destes. Esta palmeira também conhecida no

Brasil como dendê uma oleaginosa de cultivo perene, adaptada ao clima tropical e maior produtora de óleo vegetal do mercado mundial (ALVES, 2011).

O fruto do dendezeiro é fonte de obtenção do óleo de palma (dendê, Brasil), proveniente da polpa, enquanto que o óleo de palmiste é obtido a partir da prensagem da amêndoa que posteriormente são utilizados na indústria de alimentos, indústria química e cosmética (TELES, 2014; SANTANA *et al.*, 2013). No Brasil, a cultura da palma se desenvolve principalmente nos estados da Bahia e do Pará, sendo este último, em 2010 foi responsável por mais de 80% da produção brasileira de cachos de frutos frescos (PINTO *et al.*, 2005; CARVALHO, 2012).

Na dendeicultura, durante o ciclo de vida de uma palmeira, somente 10% é convertido em óleo e 90% em resíduos (ATNAW, *et al.*, 2014). O Brasil no ano de 2011 produziu 1.301.192 toneladas de cachos de frutos frescos de dendê (IBGE, 2016). Sendo que a cada tonelada de cachos de frutos frescos produzida, 70% são resíduos.

Esses resíduos são gerados a partir do processamento dos cachos de frutos frescos (FFB) e delessão produzidos os cachos vazios (EFB- Empty Fruit Bunches), fibra prensada (PPF-Palm Pressed Fibres), torta de palmiste (Kernel Shells), além das folhas (OPF - Oil Palm Fronds), tronco (OPT -Oil Palm Trunks) e do efluente líquido (POME- Palm Oil Mill Effluent) (SUDIRMAN *et al.*, 2011; MOHAMMAD *et al.*, 2012; RAZAK, 2013).

Alguns desses resíduos, como a borra e torta de palmiste, já são utilizados para alimentação animal na região Norte do Brasil, porém; a maior parte dos resíduos ainda são pouco utilizados. Estes subprodutos lignocelulósicos são fontes de minerais e matéria orgânica e assim tem sido utilizado em compostagem, principalmente o cacho vazio (FURLAN JÚNIOR *et al.*, 2006). Esses subprodutos poderia ser utilizados como insumo para nutrição animal, desde que sejam pre-tratados, e assim reduzindo a recalcitrância estrutural da parede celular vegetal, que poderia ocorrer por meio fermentação por microrganismos, por exemplo.

A degradação dos resíduos lignocelulósicos se dá pela ação de um conjunto de enzimas liberadas pelos fungos da podridão branca (inglês, White Rot Fungi - WRF) que agem nas porções de celulose, hemicelulose e lignina da parede celular. As enzimas oxidativas são capazes de degradar os componentes fenólicos presentes nos materiais lignocelulósicos (FIGUEIRÓ, 2009); podendo ser classificadas como

ligninases, ou seja, enzimas que degradam a lignina (DASHTBAN *et al.*, 2009).

A fungicultura é realizada por meio de formulações de substratos lignocelulósicos, de modo a proporcionar um balanço de nutrientes adequados a cada espécie. Estes fungos, que podem ser chamados de macrofungos (formadores de cogumelos) possuem um arsenal enzimático que é capaz de desconstruir a parede celular vegetal e assim metabolizar os nutrientes. A espécie *Pleurotus ostreatus*, aqui utilizada, é uma das mais produzidas por requerer condições simples de cultivo e se desenvolver numa grande quantidade de resíduos como palhas e resíduos madeireiros (DIAS, 2010). Embora os produtores de cogumelo utilizem as palhas de arroz e trigo como fonte de carbono para preparar o substrato de cultivo para o *Pleurotus ostreatus*; outras variedades de substratos podem ser usadas como fonte de polissacarídicas que serão convertidas em moléculas menores e assimiladas como nutrientes (SOUZA e ROZADO, 2009). Após a colheita do cogumelo, ocorre o descarte da biomassa pós-cultivo, chamada em inglês de spent mushroom substrate (SMS).

O SMS normalmente é relegado ao lixo ou colocado como cobertura de solo por parte da maioria dos fungicultores. No entanto, este material ainda pode ser utilizado para obtenção de outros produtos de valor agregado, como tem ocorrido nos países asiáticos, como a China, maior produtor e consumidor de cogumelos comestíveis do mundo.

O SMS pode ser utilizado como ração para animais ruminantes por conta do seu alto teor de fibras presentes no composto podendo servir como o material volumoso da ração (PARK *et al.*, 2012). No entanto, este material também poderia ser utilizado para nutrição de monogástricos, dependendo da concentração a ser adicionada no formulado. A piscicultura pode ser um setor que venha a fazer uso deste aditivo, uma vez que necessita de formulações com fontes de fibras. Mas as fibras devem ser adicionadas de em condições que permita digestibilidade no trato digestivo dos peixes.

O Estado do Pará é o maior produtor de óleo de dendê do Brasil e possui na piscicultura uma das principais fontes de obtenção de proteína animal, talvez em função de apresentar a segunda colônia japonesa no Brasil. Considerando estes fatores e a infraestrutura tecnológica da agroindústria do dendê como modelo de biorrefinaria; os objetivos deste trabalho foram: (i) cultivar a espécie de *Pleurotus ostreatus* CC389 em subprodutos da agroindústria de palma (dendê) para obtenção de

cogumelos para alimentação humana e (ii) utilizar a biomassa pós-colheita de cogumelo (SMS) como aditivo a ração de alevinos de Tambacú, fazendo uso das estruturas da agroindústria de dendê, instaladas na região metropolitana de Belém.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Palma de Óleo Africana e Americana

A palma de óleo (*Elaeis guineensis*) é uma das principais culturas agrícolas de algumas regiões tropicais do mundo, em função da extração dos óleos derivados das amêndoas e casca dos frutos. O óleo de palma (*Palm Oil*) está no centro da economia agrícola de vários países do continente africano (CONAB, 2006). A dendeicultura, no Brasil, está ligada à região Norte, principalmente no Pará, e também na região Nordeste, no estado da Bahia (BARCELOS *et al.*, 2015; CONAB, 2006).

O gênero *Elaeis* está classificado como uma monocotiledônea da família Arecaceae e compreende duas espécies bem definidas taxonomicamente. *Elaeis guineensis* que foi descrita em 1763 pelo botânico Nicholas Joseph Jacquin, sendo denominada popularmente como palma de óleo africana e *Elaeis oleifera*, conhecida como palma de óleo americana. Estas espécies possuem parentesco filogenético mais próximo com a palmeira *Cocos nucifera* (coco verde), que também é uma cultura agrônômica em países tropicais (BARCELOS *et al.*, 2015). O autor ainda discute que a diversidade genética natural do gênero *Elaeis* sugere que as populações selvagens poderiam ter sido separadas em três grupos, nas regiões de oeste da África, África Equatorial e na Ilha de Madagascar.

A planta da palma de óleo africana pode alcançar de 25 a 30 metros de altura com aproximadamente 30 a 45 folhas de 5 a 7 metros de comprimento. A palma de óleo é uma espécie monoica que produz inflorescências unissexuais macho e fêmea (Figura 1) em uma alternância de ciclo (CHIA, 2008). Assim, a polinização cruzada é o mecanismo de diversificação que garante o aumento da produtividade comercial, onde os pólenes são colhidos e espalhados em diferentes plantas.



Figura 1. Planta de palma de óleo. Visualiza-se: o estipe, a disposição das folhas, as inflorescências masculina e feminina, seu cacho e frutos. A - Estipe; B - Inflorescência masculina; C - Espata; D - Inflorescência feminina; E - Cacho. Fonte: Soissons (2012), citada por Borges *et al.*, (2016).

O cacho é formado por diversos frutos que são os fornecedores de óleo na planta (CORLEY; TINKER, 2003). O cacho de palma de óleo tem forma ovóide e seu peso médio pode variar de 15 kg e 20 kg, na idade adulta, em plantações industriais. O peso do cacho aumenta com a idade da planta, podendo alcançar mais de 25 kg aos 15

anos (CONCEIÇÃO e MÜLLER, 2000; CORLEY e TINKER, 2003, CUNHA *et al.*, 2007, citados por BORGES *et al.*, 2016). O número médio de frutos por cacho é cerca de 1.500, representando 60% a 70% do peso do cacho. O fruto é uma drupa séssil de forma bastante variável que mede de dois (02) a cinco (05) cm de comprimento e pesa de 3 a 30 g (BORGES *et al.*, 2016).

A palma de óleo africana tem diferentes colorações do exocarpo, produzindo frutos do tipo *nigrescens* ou *virescens*. O tipo *nigrescens* acumula maiores quantidades de antocianinas resultando na aparência da cor violeta escura (Figura 2), enquanto que os frutos *virescens* têm tonalidades verde-laranja devido ao acúmulo de carotenoides e clorofilas relacionados com o amadurecimento (BARCELOS *et al.*, (2015)).



Figura 2. a) Frutos individuais da palma de óleo com as características *nigrescens* (Nig), nas formas imaturas, intermediárias e maduras. b) Frutos individuais de palma de óleo com as características *virescens* (Vir), nas formas imaturas (verdes), intermediárias (verde-amarelo) e maduras (laranjas). c) Cachos de frutos *nigrescens* e *virescens*. Fonte: Singh *et al.*, 2014 (The oil palm *Virescens* gene controls fruit colour and encodes a R2R3-MYB). Nature communications. DOI: 10.138/ncomms5106.

A palma de óleo americana (*Elaeis oleifera*) é uma espécie nativa e espalhada na América Central e norte da América do Sul. Esta palmeira é menor que a africana e a maior densidade plantas estão longo das margens dos rios, tolerando sombreamento

e enchentes, indicando adaptabilidade ambiental, quando comparada a africana (CORLEY e TINKER, 2003).

As principais diferenças entre a palma de óleo americana em relação a africana está no fato de serem menores e troncos inclinados, conhecidos popularmente como palma que anda. Deste modo a parte basal morre, mas raízes brotam do tronco ao entrar em contato com o solo, e assim reinicia o crescimento (BARCELOS et al., (2015)). Outra característica de distinção entre as duas palmas de óleo está relacionado a proporção de frutos paternocarpos, podendo ser superior a 90% dos frutos do cacho. Comercialmente é uma desvantagem, pois geralmente estes frutos são abortados e assim diminui o rendimento de óleo (BARCELOS *et al.*, (2015); BORGES *et al.*, 2016). A posição das folhas também são diferentes entre as duas espécies (CORLEY e TINKER, 2003) e a polinização de *E. oleífera* ocorre somente por meio dos insetos (BARCELOS et al., (2015)). Barcelos *et al.*, (2015) apresenta algumas fotos enfatizando as principais diferenças entre as duas espécies (Figura 3).



Figura 3. *E. guineensis* e *E. Oleifera*. (A) Palma de óleo africana denominada de tenera, resultante do cruzamento das variedades *dura* Deli x *pisifera* Nigeria. Árvore com 5 anos de idade e frutos do tipo *nigrescens* (destaque). (B) Plantação de 26 anos de idade de tenera (Deli x Ghana), com árvores entre 7-8 metros de altura. (C) Colheita do cacho. O trabalhador utiliza um tipo de foice ligado a um cabo comprido. Os cachos são colhidos de acordo com o número de frutos maduros que estão no chão. (D) *E. oleifera*. Uma planta selvagem com mais de trinta anos de idade (Manicoré, Amazonas, Brasil). (E) Planta que anda. A mesma planta (D), ilustrada com foto de outro ângulo assinalando a inclinação da planta (linha pontilhada). (F) Inflorescência masculina da palma de óleo africana (setas). (G) Base ou raquis do cacho que sustenta os frutos, com três meses de idade da palma de óleo americana (base curta – seta). (H) Coleta de cacho de *E. oleifera*, que requer habilidades do trabalhador, mesmo quando não são altas. (I) Espessura do cacho do *E. oleifera* colhido (H), que é composto por tecido muito fibroso e que requer muita força física para realizar o corte. Fonte: Barcelos E, Rios SdA, Cunha RNV, et al. (2015) Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. *Frontiers in Plant Science*.

As duas espécies de palma de óleo são compatíveis sexualmente, permitindo assim a formação de híbridos. O híbrido F1 do cruzamento entre a africana e americana apresenta maior vigor vegetativo e incremento no crescimento no caule (CORLEY e TINKER, 2003, citado por BARCELOS *et al.*, 2015). Barcelos *et al.*, (2015) apresentaram fotos com as características interespecíficas do híbrido F1 (*E. oleifera* x *E. guineensis*) desenvolvido pela Embrapa (estação do Rio Urubu, Amazonas, Brasil) (Figura 4).



Figura 4. *E. oleifera* x *E. guineensis* híbrido interespecífico realizado pela Embrapa (Estação Rio Urubu, Amazonas, Brasil). (A) Polinização controlada. Trabalhador esta removendo a parte reprodutiva do *E. oleifera* (árvore a três metros de altura – utilizando os equipamentos de proteção individual). (B) Cachos maduros. Três cachos em diferentes estágios de amadurecimento. (C) F1 híbrido interespecífico

em plantação comercial. Arvore de 4 anos de idade, que tem duas vezes menor o tamanho, quando comparada com a palma africana. Os cachos maduros (laranja intenso) são facilmente visualizados na plantação. (D) Frutos partenocarpos no cacho maduro do híbrido interespecífico. No detalhe, alguns frutos cortados transversalmente. Frutos a direita com sementes normais, com formação da amêndoa. Os frutos da esquerda partenocarpos com formação residual da amêndoa e sem casquilho (coco). (E) Inflorescência feminina do F1 híbrido na antesis. A inflorescência ainda está protegida no receptáculo, similar com que ocorre com o parental E. oleífera. (F) Flores femininas. (G) Inflorescência masculina do F1 híbrido na antesis. (H) Inflorescência andromorfica. Arvore de 15 anos de idade desenvolveu cinco inflorescência andromorfica. (I) Andromorfismo parcial. (J) Alguns frutos são abortados e morrem neste tipo de inflorescência. (H) Frutos totalmente desenvolvidos na inflorescência andromorfica. Fonte: Barcelos E, Rios SdA, Cunha RNV, et al. (2015) *Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. Frontiers in Plant Science*

Barcelos et al., (2015) defendem que o conhecimento genômico destas culturas, de forma a contribuir com maiores benefícios a exploração comercial da palma de óleo. Deste modo o grupo tem envidado esforços para o maior conhecimento das duas espécies e do híbrido de modo a buscar característica que promovam maior rendimento de óleo de palma.

2.2 Produção de óleo de palma e aplicações.

A agroindústria de palma de óleo geram dois tipos de óleos, que são: óleo de palma, extraído do mesocarpo dos frutos; e, óleo de palmiste obtido da amêndoa (ABDULLAH e WAHID, 2010; MBA et al., 2015). Logo após a colheita, os cachos devem ser transportados o quanto antes para agroindústria, evitando o processo de acidificação dos óleos, com consequente perda no valor comercial (KURNIA et al., 2016). Estes autores apresentaram um fluxograma dos processos envolvidos na agroindústria após a chegada dos cachos para processamento (Figura 5).

A primeira etapa de processamento dos cachos é a esterilização por calor e pressão (autoclaves industriais a 140°C e 3 Atm) (Figura 5). Ao saírem da esterilização, os cachos são transportados para um tambor debulhador, onde são separados o cacho (raquis) e os frutos. O cacho vazio é o primeiro resíduo lignocelulósico do processo, que pode ser utilizado para queima (vapor), depositado em área de descarte ou devolvido para as fazendas como fertilizantes (a depender da distância). Os frutos serão “digeridos” (casca retiradas) e prensados para obtenção do óleo de palma (mesocarpo), resultando a fibra de prensagem (segundo resíduo lignocelulósico). O óleo bruto será clarificado por decantação, para remoção dos sólidos e posteriormente armazenado. O sólido residual, borra do óleo decantado, é

separado tornando assim o terceiro resíduo. O passo seguinte corresponde a quebradas amêndoas para obtenção do óleo de palmiste. Os casquilhos (amêndoas quebradas) é o quarto resíduo lignocelulósico, que pode ser usado para queima (vapor). O embrião segue para prensagem e obtenção do óleo de palmiste, e este resíduo sólido é chamado de torta do palmiste (quinto resíduo). A água residual do processamento é chamado pela sigla POME (inglês, *Palm Oil Mill Effluent*).

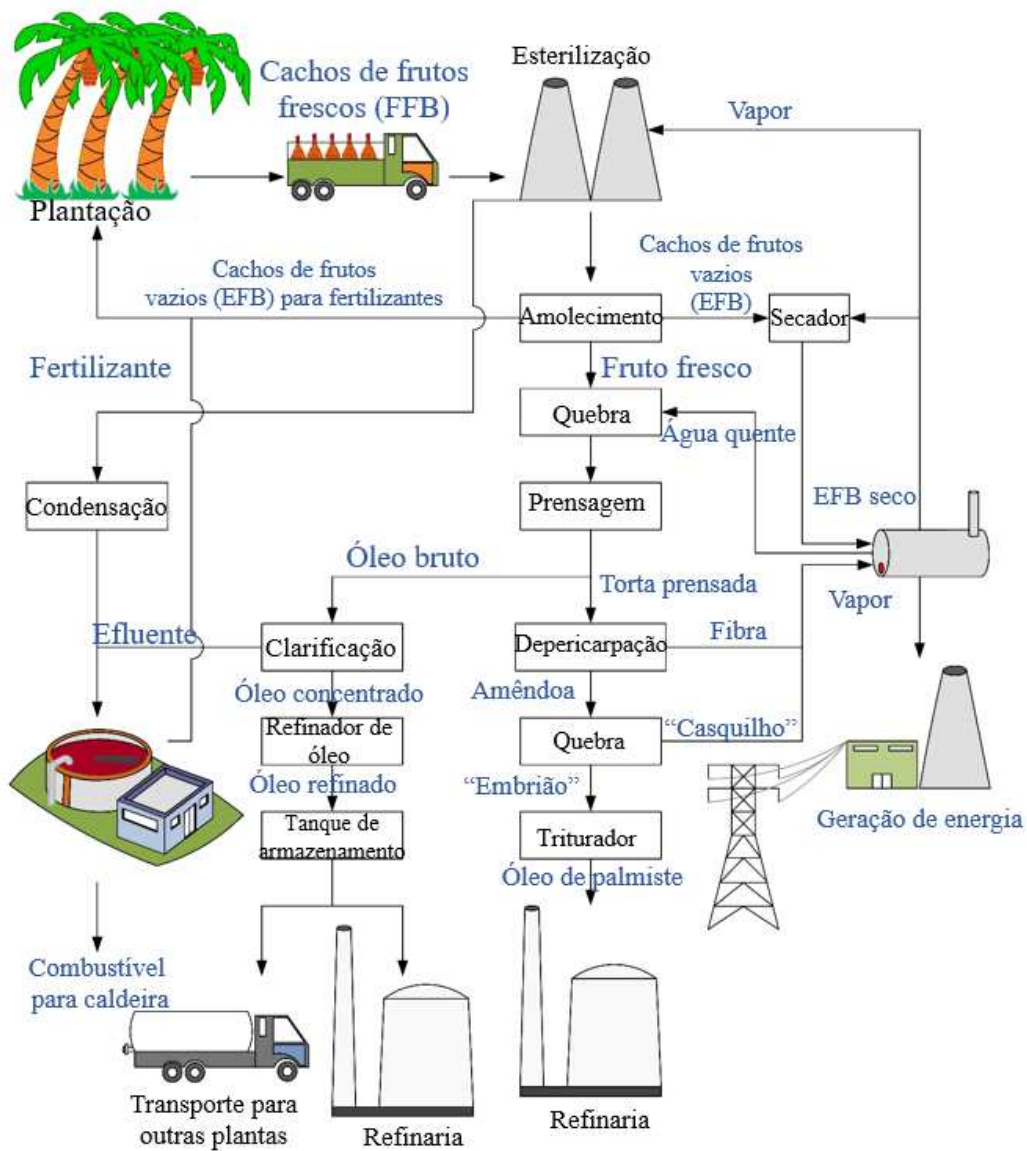


Figura 5. Fluxograma dos processos envolvidos para obtenção de óleo de palma e palmiste. O modelo

ilustra uma agroindústria que gera energia elétrica (queima de subprodutos lignocelulósicos) e o refinamento do óleo. Fonte: Kurnia *et al.* (2016).

O óleo de palma tem aplicações diversas em indústrias alimentícias, cosméticos e biocombustíveis (GILBERT, 2012). O CPO (inglês, *Crude Palm Oil*) é o mais importante óleo vegetal do mundo, por ser o mais produzido e consumido, com diversas aplicações industriais (TEOH, 2010; NORHAIZAN *et al.*, 2013).

A produção de CPO em 2013 no mundo foi de 54,3 milhões de toneladas, deste total o continente asiático, produziu 48,4 (FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016), representando 89% do mercado produtor deste óleo vegetal (Figura 6). A Malásia e Indonésia são os maiores produtores desta cultura. Estes países juntos alcançaram mais de 43 milhões de toneladas deste produto em 2013 (FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016) (Figura 6). A Colômbia é o país das Américas com maior representatividade neste setor; em 2013 produziu mais de 1 milhão toneladas, ficando ranqueada entre os maiores produtores no mundo. O Brasil neste mesmo período produziu 340 mil toneladas, tendo maior representatividade no Estado do Pará, e com produção crescente desde 1993 (Figura 6).

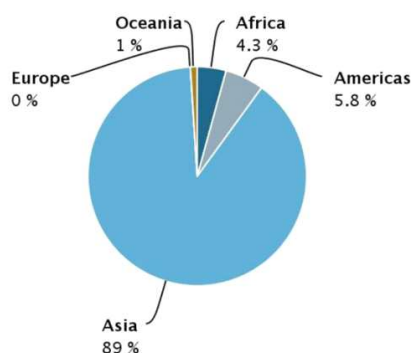


Figura 6. Produção mundial de óleo de palma, classificação percentual por continentes. Fonte: FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016.

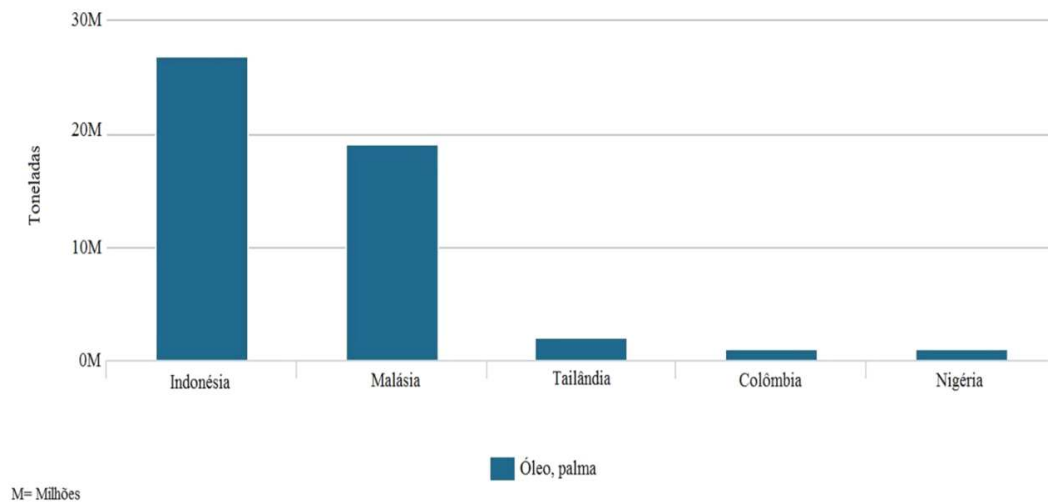


Figura 7. Os países com maior produção de óleo de palma. Fonte: FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016.M. milhões.

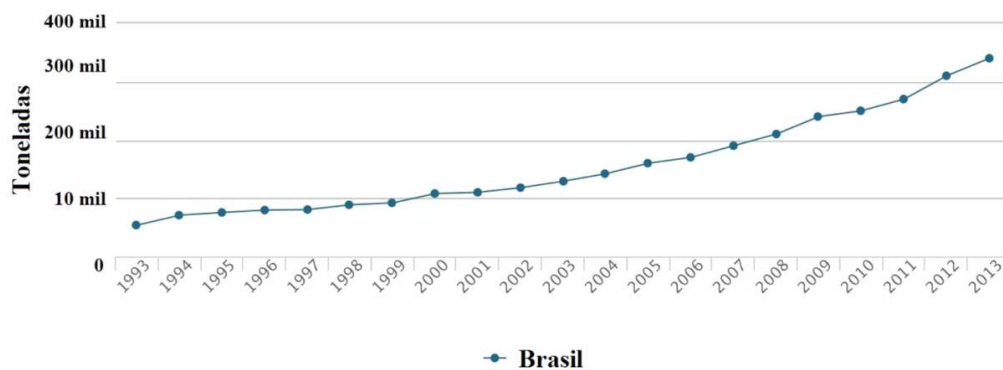


Figura 8. Produção de óleo de palma no Brasil entre 1993 e 2013. Fonte: FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016.

A palma de óleo é a mais produtiva dentre as plantas oleaginosas cultivadas, chegando a render 10 vezes mais óleo por hectare do que a soja, por exemplo, gerando assim mais lucratividade aos produtores (SANTANA *et al.*, 2013). Outro fator que

promove a dianteira desta oleaginosa em relação às demais está amparada na maior resistência a desastres naturais ou mudanças climáticas (ANDRIANI *et al.*, 2011).

No entanto, o preço do CPO é regulado por demandas internacionais, ou seja, uma *commodity*, e assim o preço pode variar de acordo com mercado. Mas, a contribuição da palma de óleo na economia global ocupa um cargo relevante, elevando as economias de países como os do sudeste asiático e da África Tropical e Central. Por outro lado, o cultivo desta palmácea tem sido criticado por ambientalistas ambientalmente por gerar impactos ambientais negativos, como perdas de biodiversidade, por trocar florestas tropicais por florestas de monoculturas, como também preocupações de ordem sociais por conta do beneficiamento dos frutos até a obtenção dos produtos e os resíduos agroindustriais gerados. (OBIDZINSKI *et al.* 2012; MOTEL *et al.*, 2009).

Entre os principais produtos do fruto da palma de óleo (dendê) estão os óleos de palma e de palmiste (Figura 9). O óleo de palma é extraído da polpa do fruto (mesocarpo-parte amarela do fruto) e o óleo de palmiste é extraído da amêndoa (endosperma) (NORHAIZAN *et al.*, 2013). Segundo Alves (2011), a importância dos óleos extraído dessa palmeira se dá pelo seu amplo uso na indústria de alimentos. O óleo de palma utilizado para a fabricação de chocolates, sorvetes e biscoitos e o óleo de palmiste serve como matéria prima para produção de lubrificantes, sabonetes, shampoos e condicionadores (NORHAIZAN *et al.*, 2013). Esta palmeira se destaca como uma das maiores produtoras de matéria prima e maior fonte de obtenção desses óleos (NORHAIZAN *et al.*, 2013).



Figura 9. O óleo de palma (*Crude Palm Oil*) é extraído do endocarpo do fruto, onde encontra-se a predominância do ácido palmítico, tendo a coloração laranja-vermelho como predominante, que apresenta a abundância de carotenoides, fitoesteróis e vitamina E. O óleo de palmiste (*Palm Kernl Oil*) é extraído da amêndoa, tendo maiores concentrações de ácidos láurico e mirístico, sendo a coloração amarela-branco. Fontes: Sites de agroindústria de palma de óleo. *Norhaizan et al., (2013). Palm oil: features and applications. Lipid Technology. Vol. 25, n°2.*

A maior demandante do óleo de palma é a indústria alimentícia, e, portanto fomenta o crescimento do setor. Esta indústria participa ativamente da economia de muitos países, que são geradores de commodities, e com ela surgem novas fontes de obtenção de produtos que possam suprir essa demanda (NORHAIZAN *et al.*, 2013). Segundo Lima *et al.* (2002), o mercado brasileiro, por exemplo, absorve o óleo de palma para produção, principalmente, de margarina e cremes vegetais, pois o óleo desta palmeira possui consistência semissólida, o que descarta o processo de hidrogenação que acarretaria em maior custo de produção.

2.3 Óleo de palma no Brasil (dendê)

A palma de óleo africana (dendezeiro) chegou ao Brasil por volta do século XVI, trazida da África pelos escravos que inicialmente desembarcaram no litoral da Bahia, onde esta planta se adaptou ao solo e clima favoráveis do recôncavo, propiciando seu desenvolvimento (TELES, 2014). Da Bahia, o dendezeiro foi levado para o Estado do Pará, onde encontrou um clima tropical úmido, com chuvas regulares. O início da dendeicultura no Pará se deu nos anos de 1966 a 1968, através da parceria entre o setor público, Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia (SUDAM) e um instituto francês (CASTRO JÚNIOR, 2012) e posteriormente se espalhou pelo Amapá e Amazonas.

No cenário mundial, o Brasil ocupa o décimo lugar em produção de óleo de palma, atrás da Indonésia e Malásia (TELES, 2014). De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2012) o país produziu 1.340.000 toneladas de frutos de dendê. No ano de 2014 o mesmo produziu 1.393.873 toneladas de cachos de dendê (IBGE, 2016). Em relação ao consumo, está em décimo terceiro lugar ficando atrás de países que não produzem o óleo de palma (Programa de Ações Estratégicas para Amazônia Brasileira, 2002). Apesar do bom patamar de produtor, o Brasil produz somente metade do óleo de palma que consome (INSTITUTO OBSERVATÓRIO SOCIAL, 2013).

Nacionalmente somente os Estados da Bahia, Amazonas e Pará realizam a dendeicultura, sendo este último o maior produtor de dendê do país, responsável por 90% da produção brasileira. Mesmo assim, a área plantada ainda é pequena comparando com a disponibilidade de áreas aptas para plantio, em torno de 31,8 milhões de hectares (INSTITUTO OBSERVATÓRIO SOCIAL, 2013; MONTEIRO, 2013).

A área de plantio do dendezeiro teve uma redução se for levada em conta a resolução do zoneamento agrícola, onde ficou proibido o plantio de palma em áreas nativas; por outro lado o plantio pode aumentar consideravelmente pelo aproveitamento de áreas desmatadas e abandonada, aptas ao plantio de dendê na Amazônia (LIMA *et al.*, 2002). O dendezeiro africano é uma planta perene, possui ciclo de vida de até 25 anos com produção de frutos a partir do terceiro ano, garantindo uma produção de quatro a seis toneladas de óleo por ano (CHIA *et al.*, 2009).

Depois do óleo de soja, o óleo de palma é o mais produzido no Brasil. Em outros países como Malásia e Indonésia, ele chega a ser o mais produzido e responsável por grande parte da produção mundial (MOHAMMAD *et al.*, 2012). No âmbito nacional essa monocultura ocupa cerca de 140.000 hectares onde a produção está dividida entre os grandes produtores (agroindústrias), os médios proprietários que produzem numa quantidade menor e posteriormente vendem os cachos com frutos às agroindústrias para processamento e por fim, os agricultores familiares que participam de cooperativas e estas vendem os cachos a uma empresa associada (MONTEIRO, 2013; TELES, 2014).

Por essa grande demanda de processamento de cachos de frutos de dendê, as usinas estão localizadas próximas às plantações para que o processamento do fruto não ultrapasse 48 horas, sendo que o aumento desse tempo acarreta em maior acidez ao óleo e diminuição da produção (CASTRO JÚNIOR, 2012).

No Pará, as grandes empresas possuem usinas de beneficiamento próximas ao centro comercial de Belém para facilitar o escoamento da produção. Entre elas, se destacam em área plantada: Agropalma, Biopalma, Yossan, Denpasa, Marborges, Dentauá entre outras que em 2020 poderá chegar a 329 mil hectares de área plantada (INSTITUTO OBSERVATÓRIO SOCIAL, 2013).

Diante do aumento do consumo de óleo de palma, principalmente pela indústria alimentícia que consome até 80% da produção (MONTEIRO, 2013), é necessário que ocorra o investimento em tecnologia no cultivo de dendê, principalmente no que diz respeito ao controle de fitossanidade.

Os dendezais do Pará enfrentam vários problemas fitossanitários e áreas já foram dizimadas ou tiveram sua produção diminuída. De acordo com Castro Júnior (2012), o amarelecimento fatal (AF), doença caracterizada pelo amarelecimento dos folíolos basais das folhas e posterior necrose nas extremidades dos folíolos que causam seca total das folhas, é o principal risco ao cultivo do dendê (CHIA, *et al.*, 2009).

O AF ainda tem causa desconhecida, mas acredita-se que sejam causadas por fitopatógenos, além de fatores abióticos como desequilíbrio nutricional da planta (LIMA, 2011). Uma das ferramentas para erradicação do AF é o desenvolvimento de cultivares mais resistentes às pragas aliadas ao aumento de produtividade de óleo (CHIA *et al.*, 2009).

No Brasil são produzidas três variedades de planta do dendezeiro, a *E. guineensis*, variedade dura de origem africana; *E. oleifera*, variedade psífera originária da Amazônia, denominada caiaué, e tenera, híbrido interespecífico resultado do cruzamento da variedade dura com psífera (*E. guineensis* x *E. oleifera*), que é resistente a fusariose e AF, sendo também ótima produtora de cachos e melhor qualidade do óleo produzido (TELES, 2014; ALVES *et al.*, 2013; ALVES, 2011; LIMA *et al.*, 2002).

Estas variedades são classificadas pela espessura do endocarpo dos frutos. De acordo com Ferreira *et al.* (2012), plantas do tipo Dura, com genótipo (sh+sh+), possuem endocarpo espesso; plantas do tipo Psífera, com genótipo (sh⁻sh⁻), não possuem endocarpo e estes são abortados; e as plantas do tipo Tenera, com genótipo (sh⁺sh), apresentam endocarpo fino e maior quantidade de polpa em relação a variedade Dura, sendo mais produtiva em óleo.

Por conta do melhoramento genético, a dendeicultura obteve um destaque no cenário mundial, colocando o Brasil entre os maiores produtores de palma de óleo e o Pará, concentrando a maior produção nacional. Esta agroindústria gera alguns subprodutos que podem ser utilizadas como alternativa alimentar para outras culturas, por exemplo, para a piscicultura em alguns períodos críticos (COSTA *et al.*, 2010).

2.4 Subprodutos e resíduos da Agroindústria da palma de óleo (dendê)

Os resíduos agrofloretais ou agroindustriais têm sido apontados como um dos mecanismos que podem ajudar a minimizar impactos ambientais na geração de energia ou podem ser utilizados na nutrição animal, por exemplo; por meio do reaproveitamento de nutrientes presentes nos processos que geram tais subprodutos. As aplicações destes resíduos podem ocorrer de maneiras distintas, tais como: energia elétrica (queima ou calor), produção de biocombustíveis (bioetanol, biogás, biodiesel), insumos para construção civil (fibras e compostos), plásticos (polímeros), ração animal (proteínas, lipídios e carboidratos), adubo (minerais), entre outros usos. (IEA, 2012; AEBIOM, 2012; OECD/FAO, 2013).

Os resíduos ou subprodutos agroindústrias em sua grande maioria são

provenientes de fontes lignocelulósicas, que são predominantemente compostos por celulose, hemicelulose e lignina (MAMIRO eMAMIRO, 2011; RODRIGUES, 2011). Diversos estudos e modelos de uso dos resíduos lignocelulósicos têm sido avaliados, tanto por rotas bioquímicas como termoquímicas nos cenários desenhados por plataformas de biorrefinaria, por exemplo, buscando a geração zero de resíduos nas fazendas/indústrias por meio de ações integradas (em inglês: *Integrated Zero Waste Farming – IZWF*).

A agroindústria de óleo de palma gera uma quantidade imensa de resíduos lignocelulósicos e efluentes. Durante o ciclo de vida dessa palmeira, apenas 10% é convertida em óleos de palma e palmiste; o restante, 90% são resíduos gerados durante o processamento (ATNAW *et al.*, 2014; KURNIA *et al.*, 2016), que podem ser matéria-prima para outras aplicações (Figura 10). No processamento dos cachos de frutos frescos (FFB) são processados os cachos vazios (EFB- *Empty Fruit Bunches*), fibra prensada (PPF-*Palm Pressed Fibres*), torta de palmiste (*Kernel Shells*), além das folhas (OPF - *Oil Palm Fronds*), tronco (OPT - *Oil Palm Trunks*) e do efluente líquido (POME- *Palm Oil Mill Effluent*) (SUDIRMAN *et al.*, 2011; MOHAMMAD *et al.*, 2012; RAZAK, 2013).



Figura 10. Esquema simplificado dos resíduos lignocelulósicos e efluente obtidos no processamento dos óleos de palma (dendê) e palmiste.
 Fonte: <https://biomassenergymicet.files.wordpress.com/2014/12/biomass11jpg.jpg>

2.4.1 Cachos Vazios

O cacho vazio e a fibra de prensagem são os mais abundantes dentre os resíduos lignocelulósicos produzidos numa indústria produtora de óleo de palma (CHIEJINA e OSIBE, 2015). Os cachos vazios (EFB) são formados após entrada de cachos de frutos frescos no debulhador, no qual os frutos são desprendidos e o restante sai como resíduo sólido e posteriormente pode ser utilizado na caldeira por incineração (FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS, 2003; KURNIA *et al.*, 2016).



Figura 11. Cacho vazio de palma de óleo dispersos no pátio da agroindústria, após a separação dos frutos para obtenção dos óleos.



Figura 12. Figura ilustrativa de uma agroindústria de palma de óleo e a emissão de gases poluentes.

Este resíduo representa cerca de 20 a 25% dos cachos frescos processados contendo nutrientes como potássio, nitrogênio, magnésio, ferro, cobre e zinco,

podendo ser amplamente utilizado como fertilizante na lavoura de dendê (FURLAN JÚNIOR, 2006). No entanto, através da incineração, partículas de gases e fuligem são lançadas na atmosfera (Figura 12) e se os cachos são descartados no solo, aumenta a emissão de gás metano na atmosfera (MOHAMMAD *et al.*, 2012).

2.4.2 Fibra de Prensagem

A fibra de prensagem ou fibra do mesocarpo é a massa formada através da extração do óleo de palma na prensa eletromecânica e corresponde a aproximadamente 24% da tonelada de cacho processado (FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS, 2003).

De acordo com Furlan Júnior (2006), a fibra de prensagem (Figura 13) representa um total de 12% dos cachos de frutos frescos processados, contendo umidade ente 15 e 30% e percentual de óleo variando de 8 a 18%. Porém, esse resíduo ainda é pouco utilizado na agroindústria de dendê.



Figura 13. Fibra de prensagem obtida a partir da extração do óleo do mesocarpo do fruto da palma de óleo.

2.4.3 Torta de Palmiste

Outro resíduo da agroindústria de palma de óleo, não menos importante, é a torta de palmiste (Figura 14), onde a cada tonelada de cacho de frutos frescos, em média são produzidos cerca de 150 kg de torta. É produzida a partir das nozes onde são retiradas as cascas, trituradas e posteriormente prensadas até obter o óleo de palmiste e a torta (OLIVEIRA, 2015). A casca do côco (casquilho) ainda pode ser utilizada para pavimentação asfáltica e torta é amplamente utilizada na alimentação animal por conter altos conteúdos de fibra, proteína e óleo de palmiste (TELES, 2014; FURLAN JÚNIOR, 2006).

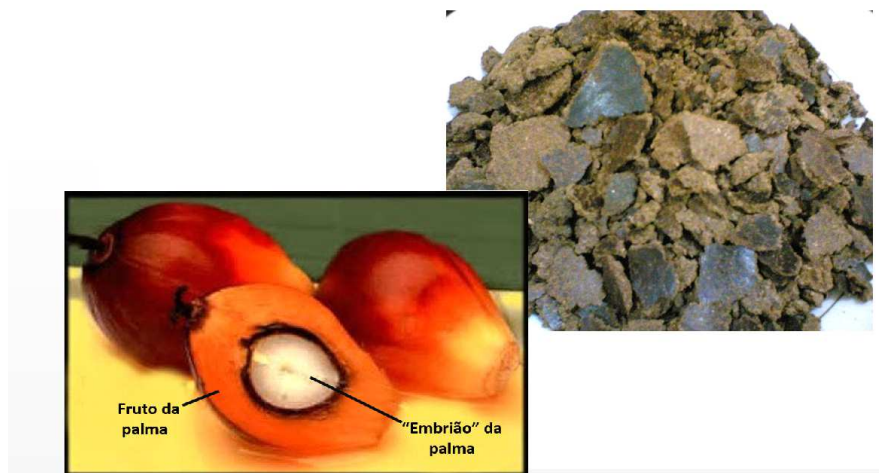


Figura 14. Torta de palmiste obtida a partir da prensagem da amêndoa/semente do dendê para obtenção do óleo de palmiste.

2.4.4 POME

O POME (*Palm Oil Mill Effluent*) é o resíduo líquido produzido durante a extração do óleo de palma. A cada milhão de toneladas de cachos de frutos frescos processados são gerados aproximadamente 65.000 toneladas de POME (SUDIRMAN *et al.*, 2011) se tornando um dos maiores problemas nas indústrias deste setor (Figura 15).



Figura15: Lagoa estacionária de efluentes gerandos no processamento e obtenção do óleo de palma (POME – *Palm Oil Mill Effluent*).

O POME é uma mistura de água, fibra, gorduras e grande quantidade de óleo resultante do processo e quando fresco é um colóide de cor amarronzada com óleo e sólidos finos em suspensão (MADAKI e SENG, 2013).

Esse resíduo tem gerado grandes problemas nas indústrias por conta do grande volume produzido. Em alguns casos, são usados como fertilizantes (FURLAN JÚNIOR, 2006), porém Madaki e Seng (2013) relatam que este resíduo vem causando problemas nos cursos d'água pela diminuição dos níveis de oxigênio nos rios, levando a condições de anaerobiose e formação de gases tóxicos como sulfeto de hidrogênio.

Diante da grande quantidade de resíduos de palma de óleo e da sua constituição heterogênea, ou seja, material insolúvel em água constituído de celulose (40 a 50 %), hemicelulose (25 a 35%) e lignina (25 a 35%) e dada sua grande quantidade de macro e micronutrientes, estes tem se mostrado promissor no uso como substrato para cultivo de cogumelos comestíveis (CHIEJINA e OSIBE, 2015;

MOHAMMAD *et al.*, 2012).

Como o cacho vazio, a fibra de prensagem, a torta de palmiste e o POME possuem grande quantidade de carboidratos insolúveis e que na maioria das vezes são resistentes a diversos tratamentos; os fungos da classe dos basidiomicetos possuem arsenal enzimático para degradar esses materiais através da quebra dos polissacarídeos a monômeros, retirando nutrientes para seu metabolismo e desenvolvimento do corpo de frutificação (CHIEJINA e OSIBE, 2015), possibilitando o uso destes por diversas indústrias, inclusive para nutrição animal.

2.5 Resíduos da agroindústria de palma de óleo no cenário de biorrefinaria.

O conceito de biorrefinaria é análogo a uma refinaria petroquímica tradicional, em que vários produtos são produzidos a partir do petróleo bruto. De acordo com o Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL), uma biorrefinaria é uma instalação que integra processos de conversão de biomassa e equipamentos para produzir combustíveis, energia e produtos químicos a partir da biomassa (EMBRAPA, 2011).

A evolução gradual das APOs (Agroindústrias de Palma de Óleo) em biorrefinarias é apresentada como uma oportunidade não só para cumprir com as novas exigências ambientais, mas também na possibilidade de obtenção de uma maior rentabilidade, por meio da criação de novos produtos (CHEW e BHATIA, 2008; GARCIA-NUNEZ *et al.*, 2016; RODRIGUES, 2011). A seleção do modelo de biorrefinaria para cada setor requer uma análise aprofundada do impacto dos conceitos estudados como indicadores de sustentabilidade (GARCIA-NUNEZ *et al.*, 2016). Alguns modelos focam em aspectos ambientais e sociais (STICHNOTHE, 2011; AZAPAGIC, 2014) e análise de custos, pois as metodologias não estão totalmente estabelecidas (RODRIGUES, 2011).

O reconhecimento dos potenciais impactos sociais e ambientais na produção e processamento de palma de óleo ajudou, a partir de 2003, no surgimento de fóruns que discutem e publicam guias sobre ações que possibilitem a sustentabilidade do setor (COLOMBIAN - ROUNDTABLE ON SUSTENABLE PALM OIL - RSPO,

2016). Assim, algumas empresas e lavouras de palma de óleo têm buscado ajustar seus processos, seguindo as recomendações destes comitês - RSPO (GARCIA-NUNEZ *et al.*, 2016).

O óleo de palma bruto (CPO) foi o óleo vegetal mais produzido em 2014, alcançando a produção de 59.2 milhões de toneladas; o que correspondeu a 30% de todo óleo produzido no mundo. Enquanto isso, os óleos de soja e canola tiveram produção de 45.1 e 27.2 milhões de toneladas no mesmo período (FEDEPALMA, 2015; citado por GARCIA-NUNEZ *et al.*, 2016). Garcia-Nunez *et al.* (2016) alertam que a biomassa sólida residual gerada na agroindústria de palma de óleo (APO) é cerca de duas vezes ao CPO produzido. De acordo com estes autores estas biomassas residuais são geradas e estão disponíveis nas APOs durante todo ano, gerando preocupações econômicas e ambientais, quanto à destinação destes resíduos ou subprodutos. No entanto, estas biomassas têm ganhado atenção e diferentes propostas de aplicações (Figura 16) (STICHNOTHE, 2011; YOSHIZAKI *et al.*, 2013; CHEW e BHATIA, 2008; CHIEW *et al.*, 2013).

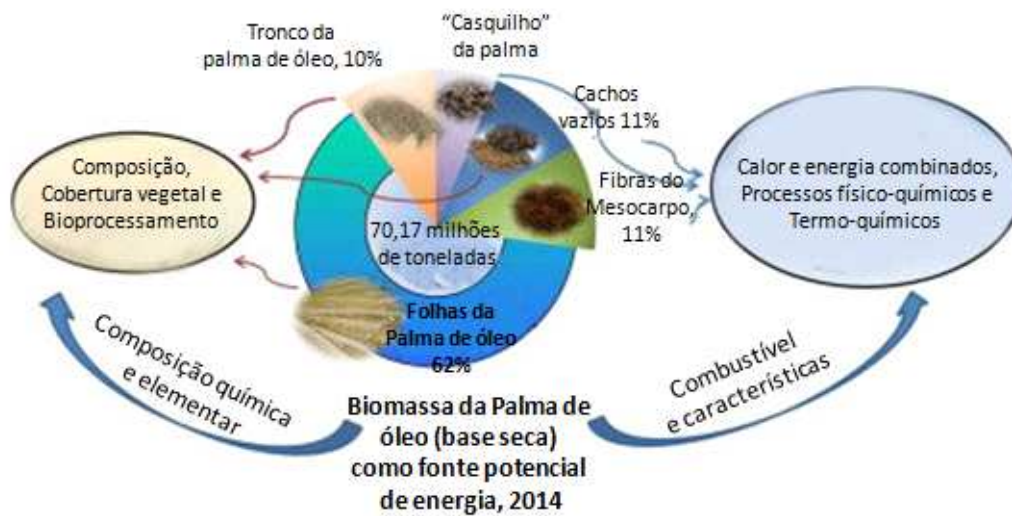


Figura 16. Biomassas residuais da agroindústria de palma de óleo, instaladas na Malásia, como fonte potencial para geração de energia renovável. Fonte: Loh (2016). *The potential of the Malaysian oil palm biomass as a renewable energy source.*

Garcia-Nunez *et al.* (2016) avaliaram seis alternativas para evolução das agroindústrias de palma de óleo da Colômbia no cenário de biorrefinarias. As alternativas estudadas pelos autores foram: 1) produção de biogás utilizando POME; 2) compostagem de cachos vazios e fibra de prensagem; 3) combustão de biomassas vegetais para produção de vapor de alta pressão combinado com energia; 4) produção de pellets; 5) Produção de biochar (bio-carvão); 6) produção de biochar e bio-oil (bio-óleo). Estes autores relataram que as simulações apresentaram taxas de retorno interno variaram entre 3% e 56%, e que o período de retorno financeiro seria entre 3 e 8 anos; e que a alternativa biorrefinaria de pellets foi a simulação com maior preferência.

Kurnia *et al.* (2016) apontaram alguns desafios no cenário da utilização de

alguns resíduos e subprodutos da agroindústria de palma de óleo, tais como: troncos e folhas em função da localização das plantações em áreas remotas; lagoas de digestão (POME) muito grandes, dificultando a produção de biogás, por exemplo. No entanto, estes autores relatam algumas alternativas para produção de energia e biocombustíveis, por exemplo, por meio da utilização dos resíduos sólidos do setor (Figura 17).

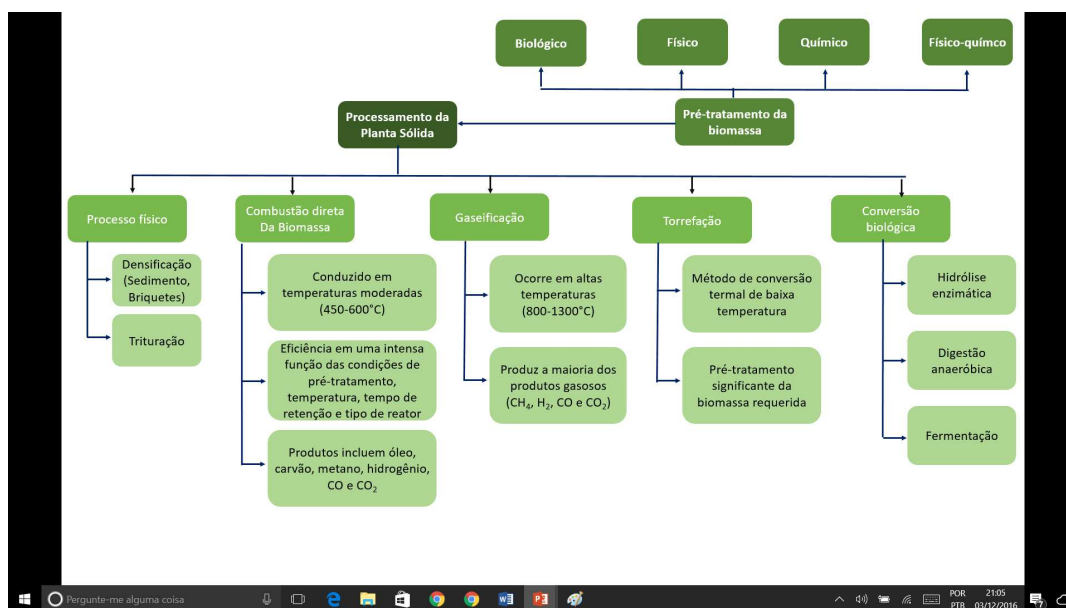


Figura 17. Possibilidades de tecnologias de processamento dos resíduos sólidos da agroindústria de palma de óleo (APO). Fonte: Kurnia *et al.*, (2016).

A conversão biológica da biomassa abordado por Kurnia *et al.*, (2016) e representado na figura 17, pode ocorrer por meio da fermentação (bactéria e fungos), principalmente por fungos de podridão branca (cogumelos ou macrofungos).

- **Macrofungos: aplicações biotecnológica e alimentícia**

2.6.1 Macrofungos

Os fungos constituem um reino megadiverso. Existem pelo menos 1,5 milhões espécies, mas estima-se que este número seja entre 3 a 5 milhões; das quais apenas cerca de 100.000 foram descritas formalmente (BLACKWELL 2011, SCHEFFERS *et al.*, 2012). Alguns são unicelulares, mas a maioria formam micélios. Estes microrganismos variam em tamanho de alguns milímetros aos maiores organismos do planeta; como por exemplo, “fungos de mel” [*Armillaria* spp.], cuja massa micelial pode ocupar muitos hectares dos solos de florestas (HEILMANN-CLAUSEN *et al.*, 2014).

A maioria dos fungos está escondida dos olhos humanos, crescendo nos substratos que conseguem metabolizar em diversos tipos de habitats. Alguns formam corpos de frutificação (cogumelos), outros podem causar sintomas visíveis em plantas hospedeiras. Os lichens (fungos associados a microalgas) são visíveis durante a maior parte do seu ciclo de vida.

Um dos papéis ecológicos mais importantes desempenhados pelos fungos nos ecossistemas terrestres é o de reciclador de matéria orgânica vegetal. Os fungos são capazes de deconstruir as estruturas básicas da parede celular vegetal, tais como celulose, hemicelulose e lignina, liberando nutrientes vitais para desenvolvimento da vida microbiana, fauna e flora do ecossistema local. Como tal, pode-se dizer que toda a vida terrestre depende da presença de fungos para reciclar os compostos químicos básicos (blocos químicos construtores) necessários para o crescimento e sobrevivência (DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016).

A classificação taxonômica de um fungo é baseada em morfologias convergentes. Entretanto, a incorporação de dados moleculares tem mudado profundamente a sistemática dos fungos, sendo sugerida a criação de novas classes, subclasses, ordens, famílias, gêneros e espécies (SCHOCH *et al.*, 2006; HIBBERT *et al.*, 2007; GHERBAWY e VOIGT 2010; ERTZ *et al.*, 2013; HYDE *et al.* 2013a; WIJAYAWARDENE *et al.* 2014; MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2015; SENANAYAKE *et al.*, 2015). A classificação proposta por Hibbert *et al.* (2007) é uma das mais citadas na literatura. Esta classificação foi alterada em todos os níveis desde

sua publicação (por exemplo: BINDER *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 2011; BAUER *et al.*, 2015), entretanto a sua estrutura fundamental permanece a mesma, constando um reino, um sub-reino, sete filos e dez subfilos (Tabela 1).

Tabela 1: Tabela de classificação dos fungos baseada em análises filogenéticas (Hibbett *et al.*, 2007)

Reino	Subreino	Filo	Subfilo
Fungi	Dikarya	Ascomycota	Taphrinomycotina Saccharomycotina Peizizomycotina
		Basidiomycota	Pucciniomycotina Ustilaginomycotina Agaricomycotina
		Blastocladiomycota	
		Chytridiomycota	
		Glomeromycota	
		Microsporida	
		Neocalimastigomycota	
		Subfilo <i>Incertae sedis</i>	Mucoromycotina Kickxellomycotina Zoopagomycotina Entomophthoromycotina

Os basidiomicetos são espécies saprófitas e cosmopolita, que além de serem grandes decompositores de matéria orgânica, participam ativamente da reciclagem de carbono nos ecossistemas (INÁCIO *et al.*, 2015).

Os basidiomicetos historicamente foram classificados dentro de gêneros, famílias e ordens usando características morfológicas tais como forma do basídio/cor (empregação em folha), estruturas de septos, entre outras (MCLAUGHLIN *et al.*, 1995). Entretanto, de acordo com Jayasiri *et al.*, (2015) somente estas características não estão sendo suficientes para classificar os fungos, em função das recentes descobertas dos genes codificadores de proteínas, tais como: *rpb1*, *rpb2* e *tef1* (MATHENY *et al.*, 2007). Estas informações tem desempenhado um papel crucial para o aumento da caracterização dos basidiomicetos (JAYASIRI *et al.*, 2015).

Diferentes tipos de basidiomicetos evoluíram para degradar/decompor tipos específicos de compostos orgânicos ou gêneros/espécies de madeira. Tradicionalmente, estes fungos são divididos em duas categorias: fungos de podridão castanha/marron (inglês: *Brown-Rot Fungi* – BRF) e fungos de podridão branca (inglês: *White-Rot Fungi* – WRF). Os BRF (Figura 20) desconstroem principalmente a celulose presente na madeira, por meio de enzimas celulolíticas e oxidativas, sem remover a lignina, deixando a madeira marrom-colorida. Os WRF (Figura 20) são capazes de degradar completamente a lignina (ligninases) antes de degradar enzimaticamente a celulose (RILEY *et al.*, 2014), deixando madeira uma aparência de branca, sem a cor marrom predominante dos compostos fenolicos da lignina.



Figura18. *Serpula lacrymans* uma espécie classificada com Brown-Rot Fungi (Fungos de podridão Marrom). Habitat de crescimento de *Serpula lacrymans*. (A) Corpo de frutificação e micélio de uma variedade lacrymans numa construção. (B) Rhizomorphs/ cordão de hifas de uma variedade lacrymans. (C) Frutificação de uma variedade lacrymans na natureza na República Checa. (D) Frutificação de uma variedade shantensis na natureza. (E) Substrato típico da variedade shantensis em Mount Lassen, Califórnia. Fonte: Kauserud et al. (2012). *Evolutionary origin, worldwide dispersal, and population genetics of the dry rot fungus Serpula lacrymans*.



Figura 19. Corpo de frutificação ou cogumelos de espécies classificadas como White-Rot fungi ou fungos de podridão branca. (A) *Armillariella mellea* (Vahl) P. Karst., (B) *Collybia velutipes* (Curtis) P. Kumm., (C) *Cryptoporus volvatus* (Peck) Shear, (D) *Ganoderma australe* (Fr.) Pat., (E) *Oudemansiella mucida* (Schrad.) Höhn., (F) *Ganoderma sinense* J.D. Zhao, L.W. Hseu & X.Q. Zhang, (G.) *Pleurotus rudis* (Fr.) Pilát, (H) *Schizophyllum commune* Fr., (I) *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Fonte: Tian et al., (2012). Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis.

Os basidiomicetos além de alimentos (cogumelos comestíveis) são potenciais agentes biológicos para uma variedade de aplicações biotecnológicas e ambientais, particularmente na produção de enzimas, suplementos para dietas nutricionais, compostos bioativos fisiologicamente e biorremediação (ASATIANI et al., 2008).

Os basidiomicetos compreendem a maioria dos cogumelos comestíveis e tem se tornado cada vez mais importantes não somente por suas características nutricionais, mas por suas propriedades medicinais e nutracêuticas, por parte de bioativos e carboidratos (beta-glucanas) (AVINet *et al.*, 2012). De modo geral os cogumelos comestíveis são excelente fonte de nutrientes, baixa quantidade de calorias e gorduras (livre de colesterol), proteínas, vitaminas, fibras e minerais, tais como potássio, ferro e fósforo (DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016). O consumo de cogumelos ocorre desde o império romano, que reverenciavam como "alimento divino", acreditando que eles eram o resultado de relâmpagos enviados por Júpiter (MANZI, 1999).

2.6.2 Fungicultura

Há milhares de espécies de cogumelos que são considerados como comestíveis em todo o mundo. Entretanto, apenas cerca de 25 espécies são cultivadas e apenas 10 são comercializadas (DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016).

Os basidiomicetos são cultivados em substratos formulados com ingredientes lignocelulósicos e outros resíduos orgânicos (SIQUEIRA *et al.*, 2012). A indústria da fungicultura pode ser considerada como a única indústria conhecida que atende simultaneamente dois dos principais desafios de uma população em crescimento: a oferta de alimentos com alto valor nutricional e redução poluição da ambiental (DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016). Tanto que tem sido considerada como um dos modelos de biorrefinaria (zero de resíduos), pois os subprodutos da fungicultura como SMS (*Spent Mushroom Substrate*) podem ser utilizado para obtenção bioprodutos (Figura 20) (PHANe SABARATNAM, 2012).

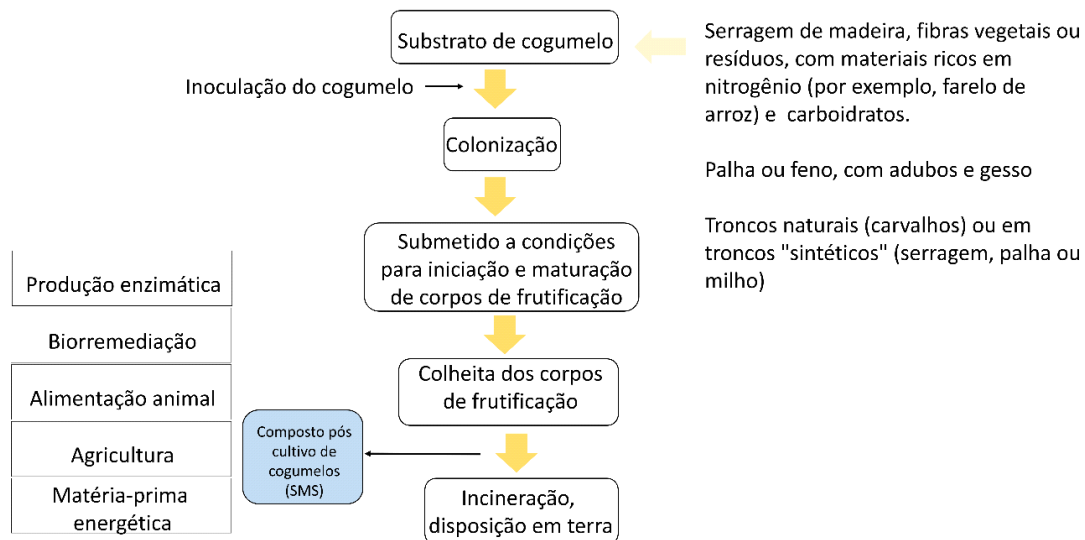


Figura 20. Fluxograma do preparo de substratos para cultivo de cogumelos comestíveis e possíveis aplicações das biomassas pós-colheita (Inglês: *Spent Mushroom Substrate – SMS*). Fonte: *Phan e Sabaratnam, 2012*.

O consumo de cogumelos comestíveis aumentou de forma constante durante a segunda metade do século XX, com a expansão da produção comercial (DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016). Este crescimento tem aumentado de forma considerável, chegando a praticamente 10 milhões de toneladas em 2014 (FAOESTAT, 2016. Consulta em 26/11/2016) (Figura 21), tendo a Ásia como a principal região produtora e consumidora, seguido pela Europa (Figura 22).

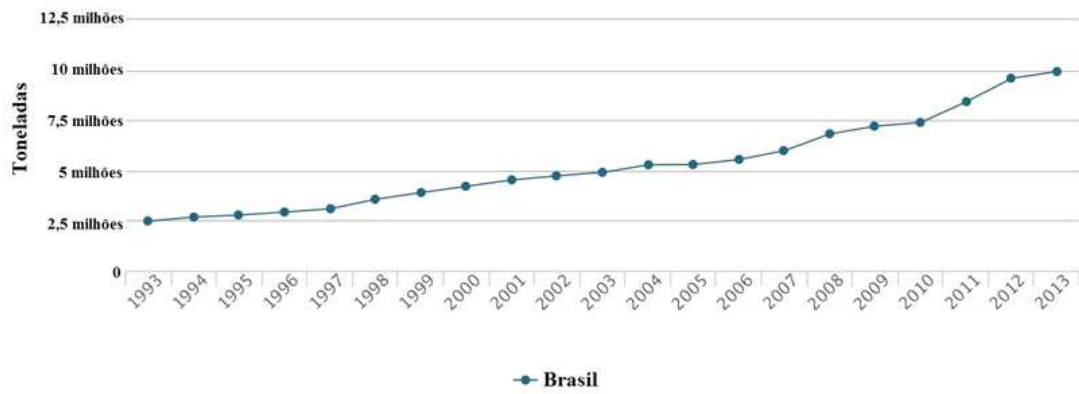


Figura 21. Produção de cogumelos e trufas no mundo. Fonte: FAOESTAT consulta em 26/11/2016.

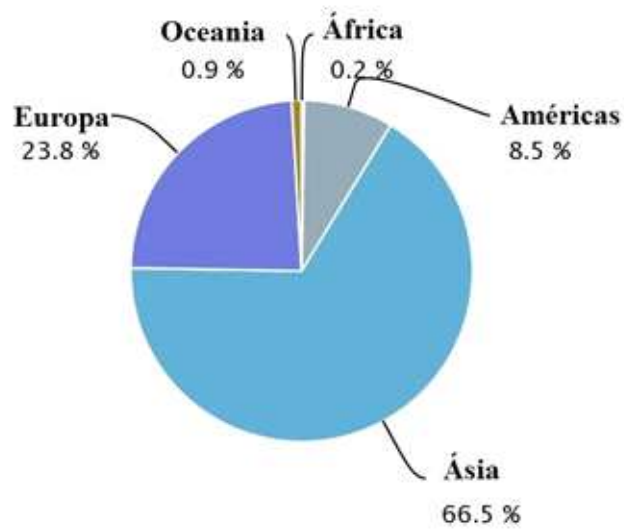


Figura 22. Produção de cogumelos e trufas por continentes. Fonte: FAOESTAT consulta em 26/11/2016.

A produção brasileira de cogumelos não é mencionada nos dados FAOSTAT,

pois a produção é insipiente e praticamente apenas no Estado de São Paulo. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) não realiza levantamento de dados desta cultura, tendo apenas registro no IEA/SP (Instituto Economia Agrícola do Estado São Paulo).

O Brasil não ocupa posição confortável como produtor de cogumelo. Isso se deve à falta de contabilização dos dados oficiais sobre a produção (TARGHETTA, 2015). No entanto, o consumo cresce a cada ano devido a informações em relação aos benefícios ligados ao consumo de cogumelo (DIAS *et al.*, 2010). Com o aumento do consumo aumenta também o número de produtores, que de acordo com a ANPC (Associação Nacional de Produtores de Cogumelos - <http://www.anpccogumelos.org/>), no ano de 2013 existiam cerca de 300 produtores mais concentrados no estado de São Paulo.

Um estudo realizado por Gomes *et al.* (2016) mostrou que o Estado de São Paulo têm mais de 500 produtores de cogumelos. Sendo que este número pode ser ainda maior, pois não foi considerada produção inferior a 50 kg mensal. De acordo com o mesmo autor, a quantidade de cogumelo produzida durante o levantamento ficou em torno de 1.062.008 toneladas/mês e gera mais de 5.000 empregos. Isso mostra que a fungicultura tem ganhado mercado, aumentando a receita dos fungicultores e conseqüentemente gerando empregos com 3.000 vagas contabilizadas em 2013 (ANPC).

No Brasil o consumo ainda é insipiente comparado a outros países produtores. A utilização de cogumelos comestíveis no país é em torno de 160 g por pessoa; ao passo que em países europeus o consumo é de 2,0 kg e em países asiáticos o consumo chega a 8 kg *per capita* (ANPC) (2013). Dias (2010) aponta alguns dos fatores que deixa o Brasil aquém dos grandes *players* da fungicultura internacional, tais como: 1) falta de cultura do consumo, efeito da colonização portuguesa que naquele período tinha pouco ou nenhum interesse no setor; 2) abundância de outras fontes proteicas (animais e vegetais) – clima de trópicos; 3) pouca divulgação sobre os benefícios do consumo dos cogumelos, tais como fontes de proteína, vitaminas, bioativos, entre outros; 4) pouca ou nenhuma ação no cenário de políticas públicas, para o desenvolvimento da fungicultura; apesar do país possuir grandes volumes de biomassa vegetal (subprodutos ou resíduos agroindustriais/agroflorestais) que nos diferencia de boa parte dos outros países produtores/consumidores.

2.6.3 Cogumelos comestíveis: principais espécies cultivadas

Os cogumelos comestíveis se tornam alimentos de grande interesse a vários países por serem fontes nutricionais de proteínas, aminoácidos, vitaminas, carboidratos, fibras e numerosos minerais (CHOI *et al.*, 2007), como também por suas propriedades nutracêuticas e medicinais. Os cogumelos classificados dentro do filo *Basidiomycota* são predominantes entre os mais cultivados e comercializados no mundo. Royse (2014) relata que cinco gêneros de cogumelos correspondem a mais de 85% da produção mundial (figurs 25), que são: 1) *Agaricus* (primeiramente *A. bisporus* e *A. brasiliensis*) é o maior gênero, contribuindo com 30% deste montante; 2) *Pleurotus* (com até seis espécies) 27%; 3) *Leninula edodes* (shiitake) contribui com 17%; 4 e 5) *Auricularia* e *Flammulina* que são responsáveis por 6% e 5%, respectivamente.



Figura 23. Percentual estimado da produção mundial de cogumelos comestíveis por gêneros. Fonte: Royse (2014) on *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8) 2014*.

Classificação de isolados e espécies de Basidiomycetes, (especialmente membros do gênero *Pleurotus*) e as relações taxonômicas/filogenéticas são normalmente baseadas exclusivamente em traços morfológicos, que geralmente conduzem a erros de identificação e conclusões taxonômicas (AVINet *et al.*, 2012), além da diferença na tradução de nomes populares regionais para outras regiões com idiomas e cultura diferentes. O gênero *Pleurotus*, por exemplo, pode receber nomes diferentes como Hiratake (Japão), Oyster mushroom (Estados Unidos) e Shimeji (Brasil), no entanto Shimeji no Japão é a espécie *Lyphillum shijemi*, enquanto que na Europa são cogumelos do gênero *Hypsizygus*. Deste modo, Avin *et al.* (2012) realizou um trabalho de classificação das principais espécies comerciais por meio de técnicas de identificação molecular (Figura 26), de modo a mostrar o quão estas espécies comerciais são próximas filogeneticamente, e assim facilitar programas de melhoramento genéticos destas espécies comerciais.

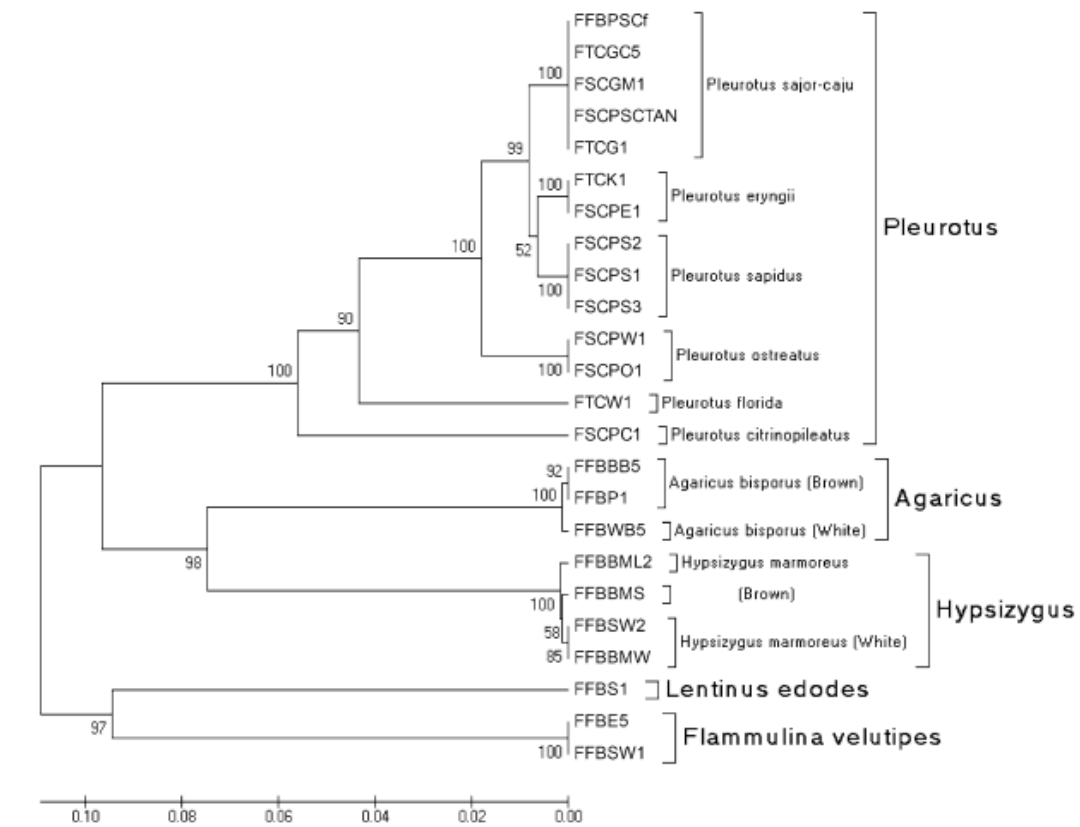


Figura 24. Arvore filogenética obtida pelas regiões ITS 1 e 2 de sequencias de cogumelos comestíveis do filo basidiomycota) utilizando o método UPGMA. Fonte: Avin *et al.*, (2012).

Os cultivos destes cogumelos comestíveis ocorrem por meio do preparo de substratos lignocelulósicos, que podem ser resíduos agroindustriais ou agroflorestais, aditivados com resíduos orgânicos de animais, como fonte de nitrogênio, a exemplo de cama de frango, para cultivo de *A. bisporus* (Champignon de Paris).

2.6.4 *Pleurotus ostreatus*

O *Pleurotus ostreatus*, conhecido como “Shimeji” (Brasil) ou “Hiratake” (Japão), é a terceira espécie de cogumelo mais produzida no mundo ficando atrás apenas de “Champignon de Paris” (*Agaricus bisporus*) e do “Shiitake” (*Lentinula edodes*). O *Pleurotus ostreatus* é o típico representante da família Pleurotaceae, e este é amplamente produzido pelo alto índice protéico, alcançando cerca de 15 a 35 % em peso seco; pela grande quantidade de vitaminas C e B₃, produzindo até 144 mg/100g e 109 mg/100g de peso seco respectivamente, além alta produtividade, característica que favorece o cultivo da espécie (DA SILVA, 2016).

De acordo com Dias (2010), além de serem cogumelos com alto valor nutritivo, possuem crescimento rápido em substratos brutos como restos de madeira e palhas, não precisam de adubo para o cultivo como outras espécies. Como não apresentam exigências quanto ao substrato a ser colonizado, se desenvolvendo em resíduos madeireiros, algumas das espécies de *Pleurotus* ainda são produzidas artesanalmente por pequenos produtores (PEDROSO, 2003). No entanto, para obter uma boa produtividade, deve-se observar a relação carbono/nitrogênio, extremamente importante para o desenvolvimento da espécie.

A escolha das fontes de carbono e nitrogênio é essencial para o desenvolvimento do metabolismo fúngico, pois a partir desses componentes, os fungos retiram açúcares que serão assimilados para fornecer energia e também retira nitrogênio, importante precursor de aminoácidos e proteínas (VIEIRA, 2012).

As espécies de *Pleurotus* se desenvolvem bem em resíduos agroindustriais como serragens, palhas trigo e milho e principalmente em resíduos ricos em material lignocelulósicos como restos de árvore; sendo que seu cultivo se iniciou primeiramente em palha de trigo na Europa (FIGUEIRÓ, 2009).

No geral não é preciso adição de suplementos para que as condições de cultivo se tornem próximas do ideal, como no caso do *Agaricus bisporus* (DIAS, 2010); pois *Pleurotus* se desenvolve bem em resíduos lignocelulósicos que possuem baixa quantidade de nitrogênio e a relação carbono/ nitrogênio é em torno de 80 e 100:1, sendo suficiente para alcançar alta eficiência biológica (DA SILVA, 2016).

No Brasil são cultivadas duas cepas de *Pleurotus ostreatus*, caracterizadas por duas cores diferentes. A primeira estirpe produz cogumelos acinzentados, a segunda possui coloração branca e se caracteriza pela fase do corpo de frutificação: o Shimeji branco é colhido na fase de primórdios, ou seja, no início da frutificação e o Hiratake é colhido com píleo mais desenvolvido (DIAS *et al.*, 2010).

A maioria das espécies de *Pleurotus* é encontrada em zonas temperadas, pois estas alcançam melhor produtividade em regiões frias. *Pleurotus ostreatus* possui ótima temperatura de crescimento que varia de 15 a 17°C e no Brasil é mais produzido no inverno (KOHARI, 2000), a não ser que o produtor possua maquinário tecnológico para controle de temperatura que propicie o seu cultivo durante todo o ano (DIAS *et al.*, 2010). Entretanto, o gênero *Pleurotus* tem a capacidade de se reproduzir numa amplitude térmica maior, sendo possível seu cultivo em qualquer região do Brasil; porém, outras características como umidade e tipo de resíduo também devem ser levadas em conta (FIGUEIRÓ, 2009).

- **Biomassa pós-colheita dos cogumelos comestíveis (SMS)**

Após a degradação dos resíduos lignocelulósicos pelos cogumelos, através das ligninases e da sua colheita, ainda sobra um resíduo pós-cultivo/colheita, que é chamado de SMS (Inglês: *Spent Mushroom Substrate*). Em países com grande tradição na produção de cogumelos como a China, esse resíduo tem gerado grande preocupação, pois após a colheita ainda permanecem blocos contendo celulose, hemicelulose e lignina além de hidratos de carbono que estão se tornando um passivo ambiental (ZHU *et al.*, 2015).

A grande quantidade de cogumelos produzidas no mundo tem gerado grandes quantidades de SMS (Figura 25). Somente na produção de *Agaricus bisporus* são produzidas 10 milhões de toneladas SMS por ano que se não forem encaminhados para outro destino, podem causar poluição ambiental (ROY *et al.*, 2015).

Figura 25. Produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus* no Distrito Federal, Brasil, e a biomassa pós-cultivo cogumelos (SMS). Fonte. Embrapa Agronegócios.

As discussões sobre a composição do SMS têm fomentado diversas pesquisas sobre sua aplicabilidade como fertilizantes e como aditivo em rações para animais ruminantes (KADIRI e MUSTAPHA, 2010; PARK *et al.*, 2012).

Phan e Sabaratnam, 2012 apresentaram um fluxograma (figura 20) apontando cinco possíveis áreas de aplicações do SMS, como: fontes de enzimas (oxidativas e lignolíticas), insumos para nutrição animal (ruminantes e monogástricos), biorremediação (indústria têxtil), biofertilizantes (substratos para cultivos de plantas), e fontes de biocombustíveis (etanol celulósico e biogás). Royet *al.*, (2015) afirmaram que o SMS pode ser utilizado como fertilizante para plantas pela quantidade de carbono, nitrogênio, sendo que essa relação fica entre 9 a 15:1, além de outros elementos essenciais para o desenvolvimento dos vegetais.

Também chamado de composto exaurido, por alguns pesquisadores, o SMS também tem sido utilizado como um dos ingredientes (aditivo) ao substrato para cultivo de outros cogumelos, por ainda conter celulose, hemicelulose e lignina remanescentes das fontes lignocelulósicas não metabolizadas pelo primeiro fungo cultivado (KADIRI e MUSTAPHA, 2010).

O SMS de espécies como *Pleurotus* sp. pode ser utilizado como ração para animais ruminantes, por exemplo, por conta do seu alto teor de fibras presentes no composto podendo servir como o material volumoso da ração, que terá menor concentração de lignina, em função dos ataques enzimáticos por parte das ligninases (PARK *et al.*, 2012). No entanto, as propriedades básicas do composto pós-cultivo dependem necessariamente das características dos substratos utilizados para o cultivo dos cogumelos (KULSHRESHTHA e SHARMA, 2014).

Em outros países, os resíduos gerados na dendecultura têm sido utilizados para cultivo de cogumelos e o SMS é usado para geração de outros produtos. Na Malásia, por exemplo, por incentivo governamental, tem sido intensificada a produção de cogumelos comestíveis fazendo uso principalmente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais das principais culturas agrícolas, tais como: borracha (seringueira),

palma de óleo (dendê), cacao, arroz e coco verde (ROSMIZA *et al.*, 2016). Pois a maioria destes resíduos tem sido abandonada sobre o solo (70%), enquanto que 27% é utilizado para indústria de madeira (compensado) e outras indústrias manufatureiras. O governo Malaio tem encorajado as empresas, na última década, a fazer uso destes em atividades que possam gerar menos impacto ambiental e produtos biotecnológicos de valor agregado ou alimentos, como os cogumelos (BEETZ e KUSTUDIZ, 2004).

Na Tanzânia, por exemplo, os resíduos lignocelulósicos mais comumente utilizados para produção de cogumelos são: palha de arroz, folhas/engaxos de bananeira, palha de feijão, resíduos da colheita do milho (caule, palha, sabugo), resíduos da colheita de algodão e tortas (MAMIRO e MAMIRO, 2011; ROSMIZA *et al.*, 2016).

Os países asiáticos, como China e Coreia do Sul, que são grandes produtores e consumidores de cogumelos, tem feito uso de biomassas pós-colheita de cogumelos (SMS) como matéria-prima para obtenção de biochar e bio-óleo, por meio de pirólise. Jiang *et al.*, (2016) investigaram o uso de SMS combinando com gás de xisto de Hunadian, copirólise, onde os resultados indicaram que a presença de SMS teve influência significativa na distribuição dos componentes químicos. Chen *et al.*, (2016) apresentaram resultados em que é possível fazer uso dos coprodutos do exocarpo da semente de algodão, que é rica em lignina; e, SMS de cultivo de cogumelos em coprodutos da cadeia de algodão, para obtenção de produtos via termoquímica-pirólise (Figura 28).

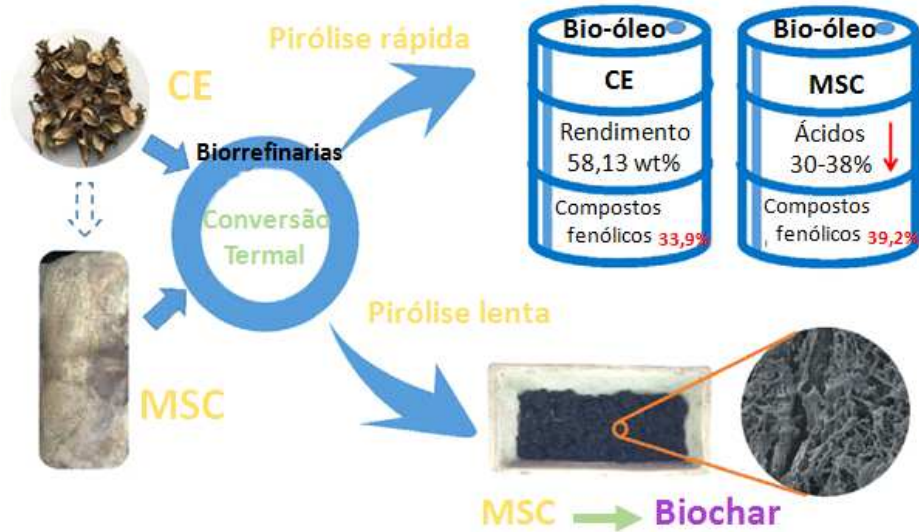


Figura 26. Modelo de biorrefinaria via conversão termoquímica por pirólise, utilizando exocarpo de caroço de algodão (CE) e biomassa pós-cultivo de cogumelos (MSC). Fonte: *Chen et al., Lignin-rich biomass of cotton by-products for biorefineries via pyrolysis. Bioresource Technology.*

2.8 Macrofungos e biomassas lignocelulósicas para nutrição animal

Os resíduos agroindustriais ou agrofloretais abrangem biomassas vegetais que não são normalmente utilizados após colheita ou beneficiamento, sendo alguns destes problemáticos para o setor. Estas biomassas lignocelulósicas incluem as palhas das plantas de grãos e cereais, as cascas após o processamento dos grãos, os bagaços das frutas e os resíduos madeireiros e florestais que são gerados durante o desbaste das plantações, por exemplo. (VIRMOND *et al.*, 2013).

As biomassas lignocelulósicas residuais têm sido utilizadas para obtenção de bioprodutos, dentro de cenário de biorrefinaria, como já fora mencionado anteriormente. Castro (2010) aponta que o Brasil apresenta vantagens quanto ao cenário de aproveitamento destas biomassas, uma vez que tem vocação natural na geração destas matérias-primas industriais ou florestais. A constituição estrutural das

biomassas lignocelulósicas de carboidratos (celulose e hemicelulose), proteínas, lipídeos, lignina e minerais podem ser utilizados como meio de cultivo microbiano para obtenção de bioprodutos, tais como enzimas, açúcares solúveis, blocos de compostos químicos (compostos fenólicos, por exemplo), bioativos, antioxidantes e insumos para ração animal, entre outros.

Os macrofungos, tais como os fungos de podridão branca (WRF) selvagens ou domesticados, como os cogumelos comestíveis, estão entre os poucos organismos conhecidos que apresentam eficiência na degradação de lignina e assim podem ser utilizados em processos de pré-tratamento biológico de biomassas como ingredientes para nutrição de ruminantes (VAN KUIJK *et al.*, 2015). Entretanto, o uso de macrofungos no pré-tratamento biológico de biomassas para nutrição animal podem apresentar dificuldades no que tange o escalonamento industrial (CHATURVEDI e VERMA, 2013), em função da dificuldade de esterilização da biomassa, longo tempo de preparo e redução nos teores de celulose e hemicelulose em detrimento do metabolismo fungico. Outros autores, tais como Van Kuijk *et al.* (2015) e Saha *et al.*, (2016) relatam que estas desvantagens podem ser contornadas e que os benefícios do tratamento biológico destas biomassas para nutrição animal traz mais vantagens que desvantagens. Estes autores argumentam que buscar espécies mais seletivas para deslignificação e fazer uso das expertises dos fungicultores, pois o setor faz uso constantemente de equipamentos, técnicas de esterilização e inoculação para cultivo em larga escala, seria a melhor forma de aproveitar os macrofungos.

A biomassa lignocelulósica pré-tratada por macrofungos pode ser utilizada para diferentes propósitos biotecnológicos, tais como ingredientes para nutrição animal, bioetanol (segunda geração), produção de metano (biogás) e químicos finos (blocos construtores). Dentre todas estas aplicações a maior deslignificação e mínima redução de celulose é fator limitante ao sucesso do empreendimento. Van Kuijk *et al.* (2015) elenca uma série de biomassas lignocelulósicas que podem ser pré-tratadas biologicamente por macrofungos para uso em nutrição de ruminantes, tais como resíduos lignocelulósicos da colheita de trigo, arroz, milho, palma de óleo, cacão, bambu, bagaço de cana, serragens (eucaliptos, pinho e madeira em geral), entre outros. Rahman *et al.* (2011) e Hassim *et al.* (2012) descrevem nos respectivos trabalhos que o macrofungo *Phebia brevistipitata* foi cultivado em troncos de palma de óleo para avaliar parâmetros de digestibilidade e assim ser utilizado como insumo

para nutrição animal. A revisão de Van Kuijk *et al.* (2015) citam pelo menos 35 macrofungos que já foram utilizados no pré-tratamento biológico de diferentes tipos de biomassas vegetais (tabela 2).

Tabela 2. Espécies de macrofungos para deslignificação e degradabilidade de substratos lignocelulósicos usados como biomassas para nutrição animal citados por*Van Kuijk *et al.*(2015).

<p><i>Bjerkandera adusta</i> — Palma de óleo¹⁸, trigo²⁶</p> <p><i>Ceriporiopsis subvermispora</i> — bambu¹⁷, cedro¹⁶, milho²⁷, palma de óleo^{11, 18, 27}, arroz^{20, 27}, cana-de-açúcar²⁷, trigo²⁶</p> <p><i>Corpinus fimetarius</i> — arroz¹⁹</p> <p><i>Cyathus stercoreus</i> — trigo²</p> <p><i>Daedalea guercina</i> — trigo¹³</p> <p><i>Dichomitus squalens</i> — cedro¹⁶, trigo²</p> <p><i>Ganoderma lucidum</i> — palma de óleo^{11, 18}, trigo^{22, 26}</p> <p><i>Hericium clathroides</i> — trigo¹³</p> <p><i>Inonotus andersonii</i> — trigo¹³</p> <p><i>Inonotus dryophylus</i> — trigo¹³</p> <p><i>Inonotus obliquus</i> — trigo¹³</p> <p><i>Laccaria amethystine</i> — trigo²⁸</p> <p><i>Lentinus tigrinus</i> — trigo^{12, 13}</p>	<p><i>Lentinula edodes</i> — cedro¹⁶, milho²⁷, palma de óleo^{11, 18, 27}, arroz²⁷, cana-de-açúcar²⁷, trigo²⁶</p> <p><i>Lyophyllum ulmarium</i> — trigo¹³</p> <p><i>Phanerochaete chrysosporium</i> — videoeiro⁶, palma de óleo¹⁸, arroz^{14, 20}, árvore de pinheiro⁶, trigo^{2, 26, 28}</p> <p><i>Phellinus laevigatus</i> — trigo¹³</p> <p><i>Phlebia brevispora</i> — palma de óleo^{11, 18}, arroz²⁰, trigo^{4, 5, 26}</p> <p><i>Phlebia fascicularia</i> — arroz²⁰, trigo⁴</p> <p><i>Phlebia floridensis</i> — arroz²⁰, trigo⁴</p> <p><i>Phlebia radiata</i> — arroz²⁰, trigo⁴</p> <p><i>Pholiota nameko</i> — cedro¹⁶</p> <p><i>Pleurotus citrinopileatus</i> — jacinto de água¹⁵</p> <p><i>Pleurotus eryngii</i> — milho²⁷, palma de óleo^{11, 18, 27}, arroz²⁷, cana-de-açúcar²⁷, trigo^{26, 28}</p>	<p><i>Pleurotus milhoucopiae</i> — trigo²⁵</p> <p><i>Pleurotus florida</i> — jacinto de água¹⁵</p> <p><i>Pleurotus ostreatus</i> — cedro¹⁶, cocoa³, milho²⁷, palma de óleo^{18, 27}, arroz²⁷, cana-de-açúcar²⁷, trigo^{1, 7, 10, 13, 21, 23, 24, 25, 26, 28}</p> <p><i>Pleurotus sajor-caju</i> — videoeiro⁶, arroz⁸, árvore de pinheiro⁶, trigo^{8, 9, 25}</p> <p><i>Pleurotus sapidus</i> — trigo²⁵</p> <p><i>Polyporus brumalis</i> — trigo¹³</p> <p><i>Polyporus ciliates</i> — trigo^{12, 13}</p> <p><i>Schizophyllum commune</i> — palma de óleo¹⁸, trigo²⁶</p> <p><i>Trametes gibbosa</i> — trigo¹³</p> <p><i>Trametes versicolor</i> — videoeiro⁶, palma de óleo¹⁸, árvore de pinheiro⁶, trigo^{21, 26, 28}</p> <p><i>Volvariella volvacea</i> — trigo²</p>
---	---	--

*VAN KUIJK, S. J. A. *et al.* Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnology Advances, Holanda*, v. 33, p. 191-202, 2015.

A composição da parede celular de cada espécie vegetal possui uma composição única, assim a melhor forma de comparar a eficiência do pré-tratamento biológico é utilizar a mesma biomassa vegetal para diferentes macrofungos. A palha de trigo é um dos resíduos lignocelulósicos mais utilizados para estudos de pré-tratamento biológico com macrofungos para nutrição animal (VAN KUIJK *et al.* (2015) (Tabela 2). Estes autores apresentam referências de que os macrofungos com maiores taxas de deslignificação e menor perda de celulose são *Ceriporiopsis subvermispora*, *Lentinula edodes*, *Hericium clathroides*, *Pleurotus ostreatus*, e *Pleurotus eryngii*.

A correlação de dados apresentados por diferentes autores é dificultada em função da variação dos dados e métodos aplicados para mensurar a degradabilidade de celulose e lignina (VAN KUIJK *et al.*, 2015). Buscando resultados práticos mais significativos, estes autores analisaram estatisticamente os dados de cinco sobre a degradabilidade de lignina e celulose em relação a palha de trigo *in natura* e

constatarem variações significativas nos resultados quanto a seletividade a lignina e degradação da celulose (Figura 26)

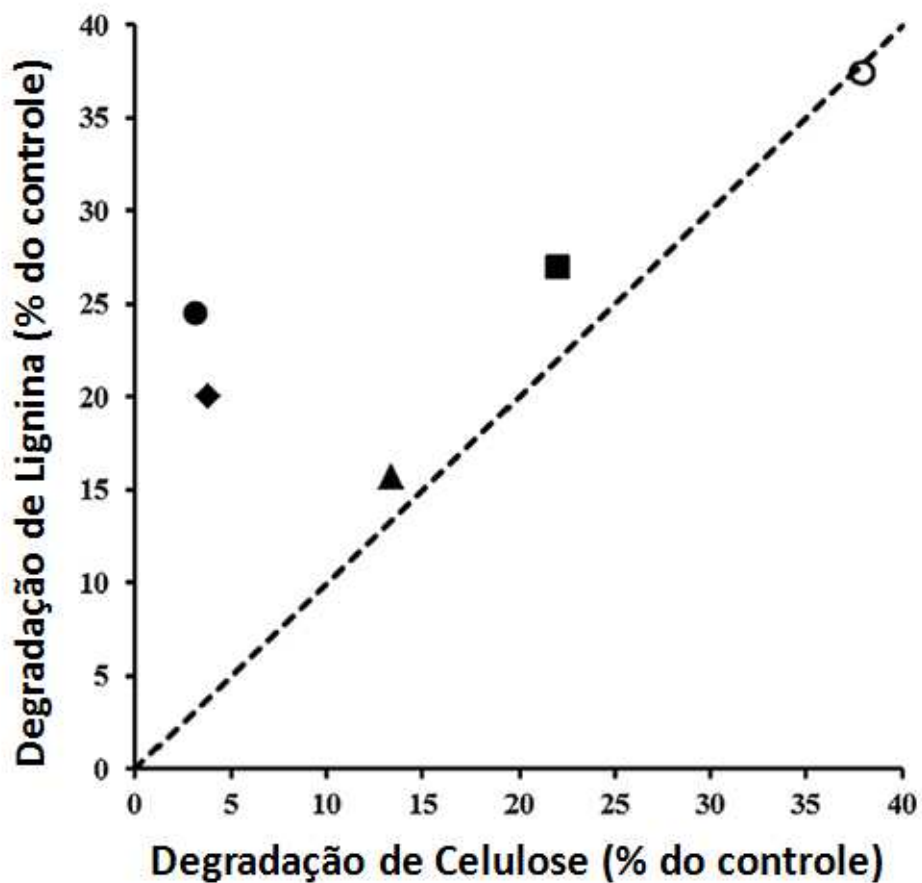


Figura 27. Degradação da lignina e celulose em palha de trigo por *Pleurotus ostreatus* apresentando a redução percentual da matéria seca quando comparada com a biomassa in natura. Fonte: Van Kuijk et al. (2015). Referencias utilizadas pelos autores: Dashed line: line of unity. From: ♦ Adamovic et al.

(1998), ▲ *Jalc et al. (1998)*, ■ *Salvachua et al. (2011)*, ○ *Shrivastava et al. (2011)* and ● *Tuyen et al. (2012)*.

Tanemura *et al.* (2014) apresentaram resultados interessantes quando utilizaram três macrofungos (*Trametes coccinea*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju*) para aumentar o valor nutritivo de ingredientes vegetais para nutrição da truta arco-íris (rainbow trout). De acordo com estes autores o pré-tratamento biológico com os macrofungos nos farelos de girassol, soja e algas (macroalgas) utilizados nas formulações de rações para peixe pode ser uma abordagem rentável para aumentar o valor nutritivo e diminuir a carga ambiental para este setor.

2.9 Arsenal enzimático dos macrofungos

Os macrofungos secretam uma quantidade de enzimas oxidativas capazes de degradar os componentes fenólicos presentes nos materiais lignocelulósicos (FIGUEIRÓ, 2009). Estas enzimas também são chamadas de ligninases, termo utilizado para designar enzimas que degradam a lignina (DASHTBAN *et al.*, 2009). As atividades das enzimas lignolíticas nem sempre estão correlacionadas com a degradação da lignina, demonstrando que a função do complexo enzimático lignolítico ainda não é totalmente compreendida (ISROI *et al.*, 2011; SHRIVASTAVA *et al.*, 2011, VAN KUIJK *et al.*, 2015). Estas enzimas se dividem em dois grupos: enzimas da classe das oxidases e enzimas da classe das peroxidases. Os dois grupos realizam reações de oxidorredução; no entanto, a diferença está no composto que media a reação (SOUZA e ROZADO, 2009).

Estas enzimas incluem lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase e são capazes de degradar a lignina de forma seletiva e não seletiva (SOUZA e ROSADO, 2009). Enquanto as lacases oxidam uma variedade de compostos fenólicos presentes na molécula de lignina, a lignina peroxidase e manganês peroxidase oxidam compostos não fenólicos (KARINGAR, 2011; ISROI *et al.*, 2011).

As lacases ou fenol oxidases são enzimas da classe das oxidoredutases que complexam o cobre, possuindo aproximadamente três átomos de cobre em sua

estrutura (NETO, 2010), sendo também denominada de oxidase azul multicobre (KARP *et al.*, 2014).

Lacases participam da hidrólise da lignina, expondo-a e assim facilitando o acesso das celulasas (MANTOVANI *et al.*, 2012). Somente os compostos fenólicos presentes na molécula de lignina são degradados (DE LA RUBIA *et al.*, 2002). No entanto, a mesma autora relata que outros compostos não fenólicos também são oxidados por conta do aumento da quantidade dos substratos que os mediadores da reação podem se ligar. Entre eles estão compostos aromáticos contendo grupos hidroxilas e grupos amino (NETO, 2010). Por conta da versatilidade e por serem secretadas por vários macrofungos, as lacases tem amplo potencial para serem utilizadas em muitas indústrias, inclusive de ração animal.

A enzima lignina peroxidase pertence ao grupo das ligninases e catalisam reações nos compostos fenólicos presentes na molécula de lignina na presença de peróxido de hidrogênio (KARINGAR, 2011). Lignina peroxidase é uma glicoproteína contendo o grupo heme (íons ferro como grupo prostético) com aproximadamente 38 a 45 KDa, com 343 resíduos de aminoácidos e 370 moléculas de água além de quatro carboidratos e íons cálcio (POLLEGIONE *et al.*, 2015; PLÁCIDO e CAPAREDA, 2015). A lignina peroxidase é amplamente utilizada em diversas indústrias têxteis para o tratamento de efluente líquido contendo corantes sintéticos (SOUZA e ROSADO, 2009).

Manganês peroxidase (Mn (II): hidrogênio-peróxido oxidoreductase; CE 1.11.1.13), assim como a lignina peroxidase é um heme proteína glicosilada com peso médio de 45 KDa, contendo 350 resíduos de aminoácido e também realiza sua catálise na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (BIBBINS-MARTINÉZ *et al.*, 2014; PLÁCIDO e CAPAREDA *et al.*, 2015; SOUZA e ROSADO, 2009).

Manganês peroxidase realiza oxidação de Mn (II) a Mn (III) e posteriormente este é quelado por ácidos orgânicos, como malato e oxalato formando um composto estável (POLLEGIONE *et al.*, 2015). Manganês peroxidase tem se mostrado eficiente na descoloração de corantes em indústria têxtil pelo fato de serem secretadas por quase todos os fungos de podridão branca (DASHTBAN *et al.*, 2010; NETO, 2010).

2.10 Piscicultura na Região Norte do Brasil

O Brasil é um país que possui condições para o desenvolvimento de pescados, tanto em águas doces ou salgadas. A disponibilidade hídrica, clima favorável e ocorrência natural de espécies aquáticas que compatibilizam interesse zootécnico e mercadológico são fatores favoráveis para o desenvolvimento deste setor (BRABO *et al.*, 2016). Os mesmos autores citam dados da FAO, de 2014, em que a produção aquícola nacional ainda apresenta números incipientes se comparada a dos maiores produtores mundiais, como a China, a Índia, o Vietnã e a Indonésia. Eles ainda descrevem o cenário atual da produção de pescado, dando ênfase na aquicultura; dizendo que o setor ainda carece de incrementos para produção aquícola, uma vez que o consumo *per capita* de pescado no Brasil foi de apenas 11,1 kg em 2011, valor inferior à média mundial e ao consumo das carnes de frango, bovino e suíno no país; gerando um déficit da balança comercial em 2015 e que foram importados pescados da China, Argentina, Chile, Noruega e Portugal.

No Brasil, todas as regiões produzem pescado. Entretanto, os dados do relatório anual de Produção Pecuária Municipal (PPM) do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e divulgados na Revista Globo Rural; a produção brasileira de peixes em cativeiro é liderada pela região Centro-Oeste (26,8%), seguida pelas regiões Sul (22,4%), Nordeste (19,5%), Norte (18,6%) e Sudeste (12,8%). O Estado do Mato Grosso lidera o ranking para este tipo de criação com 19,3%, seguido pelo Paraná (13%), Ceará (7,8%), São Paulo (6,8%) e Rondônia (6,4%) (figura 30)(Globo Rural, Abril 2015. Consulta realizada em 29/11/2016 ao site <http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Peixe/noticia/2015/04/veja-os-dados-da-piscicultura-no-brasil.html>).

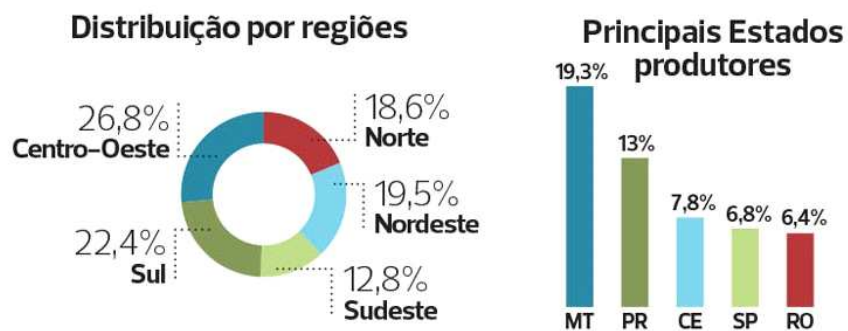


Figura 28. Produção brasileira de peixes em cativeiro. Dados do relatório anual da Produção da Pecuária Municipal (PPM), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de acordo com divulgação da Revista Globo Rural (Abril de 2015). Consulta realizada 29/11/2016: <http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Peixe/noticia/2015/04/veja-os-dados-da-piscicultura-no-brasil.html>

De acordo com publicação da revista Globo Rural (Reportagem de Teresa R. Bastos, 2015) a tilápia caiu no gosto popular e recebeu o nome de “saint peter”. Este peixe representa 41% da piscicultura nacional (Figura 29), em função da facilidade de adaptação as diferentes condições de temperatura, por exemplo.

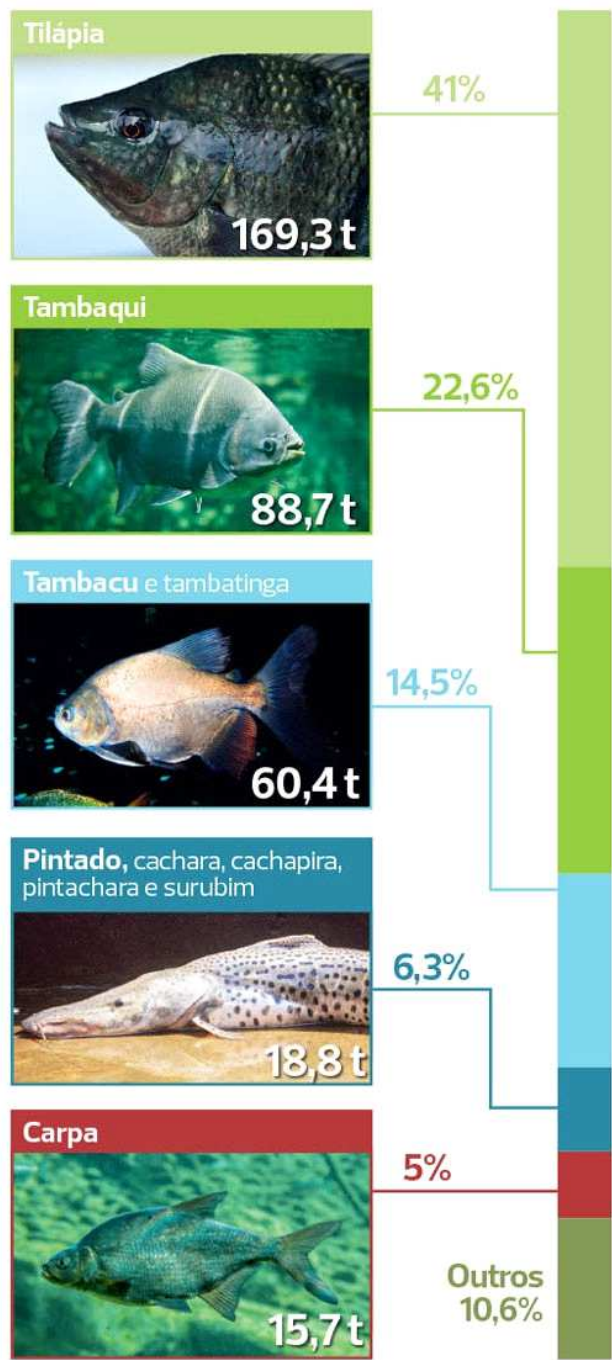


Figura 29. Infográfico representando as principais espécies de peixe criados em cativeiro no Brasil. Dados do relatório anual da Produção da Pecuária Municipal (PPM), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de acordo com divulgação da Revista Globo Rural (Abril de 2015) Consulta realizada 29/11/2016:
<http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Peixe/noticia/2015/04/veja-os-dados-da-piscicultura-no-brasil.html>.

A região Norte do Brasil possui uma das maiores bacias hidrográfica d'água doce do mundo, e por consequência o consumo de proteína da carne de peixe figura-se na cultura local. Na região há mais de 2.000 espécies de peixes, incluindo quase todas as ordens de peixes de água doce, representando quase 75% de todas as espécies de peixes de água doce brasileira e 30% da fauna de peixes do mundo (ROUBACH *et al*, 2003).

Brabo *et al.*, (2016) relataram que a região Norte a criação de peixes em sua maioria é realizada em açudes e viveiros escavados. As espécies de peixes que se destacam nesta região são os redondos (Figura 30), tais como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o tambacu (híbrido formado pela fêmea de tambaqui x macho do pacu - *Piaractus mesopotamicus*) produzidos em Rondônia e Roraima. O pirarucu (*Arapaima gigas*), o matrinhã (*Brycon amazonicus*) e o curimatã (*Prochilodus spp.*) são produzidos em menor escala.



Figura 30. Peixes redondos mais aceitos e comercializados na Região Norte. Tambaqui (A), pacu (B), tambacu (C), pirapitinga (D). Fonte: Silva (2010). *Perfil da Piscicultura na Região Sudeste do Estado do Pará (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará).*

O tambacu é um híbrido obtido pelo cruzamento entre o macho pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e a fêmea de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Apresenta hábito alimentar onívoro, boa adaptação a baixas temperaturas, aliando a necessidade de pouca infraestrutura do pacu e o crescimento rápido do tambaqui (BRAGA, *et al.* 2014). Além da carne branca, sabor e textura, o tambacu se adequa a vários níveis de produção e é bastante resistente a mudanças climáticas, apresentando desempenho satisfatório quando comparado a outros peixes redondos de água doce (MARTINS, 2014).

Silva (2010) apresentou um estudo sobre o perfil da piscicultura na Região Sudeste do Estado Pará. O estudo fora feito por meio de entrevistas e aplicação de questionários aos pequenos produtores de 12 municípios do Sudeste do Pará. Nesta pesquisa o autor constatou um sistema de cultivo extensivo, com aquisição de alevinos de outros Estados. Ainda de acordo com este autor, a piscicultura é a

principal atividade aquícola, com produtores desde o cultivo restrito a subsistência a grandes produtores voltados à exportação. Os principais pólos de piscicultura estão localizados na vizinhança de Belém (bacia do Rio Tocantins; Lago de Tucuruí; Santarém e municípios nos arredores). Estas regiões se destacam em função da melhor infraestrutura, tais como as estradas para comercialização e abastecimento de insumos como ração bem como de alevinos. Também foi observado que as rações têm um peso significativo no orçamento (podendo alcançar 60% do custo de produção).

A produção da ração na própria região seria uma forma de reduzir o custo de criação dos peixes. O uso de subprodutos das agroindústrias regionais pode ser uma alternativa para formulações de rações, desde que mantenham as características nutricionais de forma a garantir a melhor absorção, diminuindo a perda dos nutrientes e consequentemente aumentando o desempenho do animal (GONÇALVES, 2009, citada por SILVA, 2010).

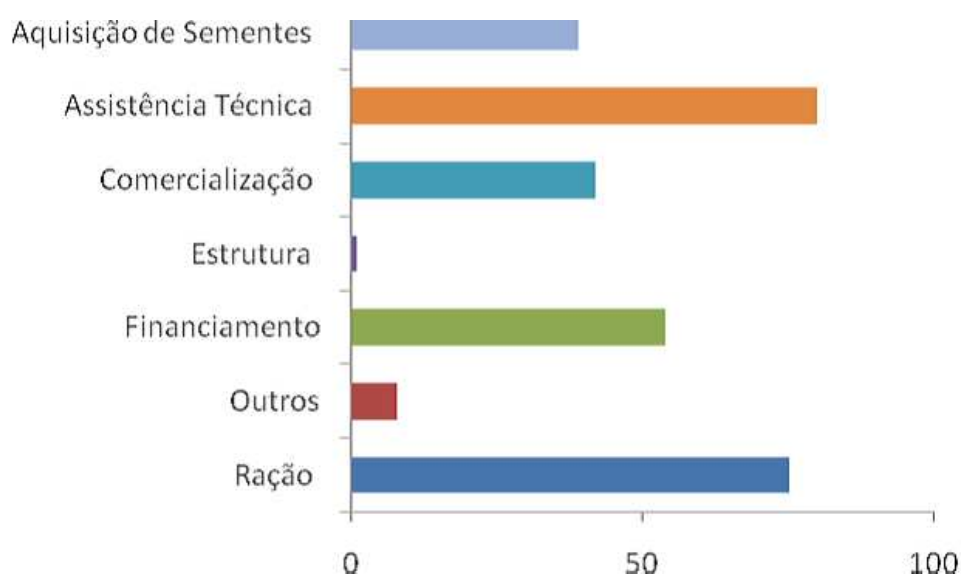


Figura 31. Principais dificuldades relatadas por criadores de peixe na Região Sudeste do Pará. Fonte: Silva (2010).

- **JUSTIFICATIVA**

A abordagem do presente trabalho está voltada para o aproveitamento dos resíduos das agroindústrias do óleo de palma para esta finalidade. O objetivo é quebrar a recalcitrância dos constituintes lignocelulósicos da parede celular de tais biomassas vegetais (utilizada para o crescimento de macrofungos) e disponibilizar os carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas para nutrição dos peixes é feita por macrofungos. A espécie *Pleurotus ostreatus* está entre as espécies dos basidiomicetos com tal capacidade, além da possibilidade de produzir os cogumelos, que são amplamente conhecidos e apreciados pela culinária ocidental e oriental.

Homma (2007) relata em seu livro “A imigração japonesa na Amazonia” que a segunda colônia de população japonesa instalada no Brasil está localizada no Pará, ficando atrás apenas do Estado de São Paulo. Os japoneses têm culturas e costumes alimentares marcantes como consumo de cogumelos, tanto que boa parte dos cogumelos comercializados em diversas partes recebem nomes japoneses, tais como Shimeji, Shiitake, Hiratake, entre outros. Deste modo, fazer uso de biomassas vegetais residuais da agroindústria de palma de óleo (dendê) para cultivar cogumelos (*Pleurotus/Hiratake* e outros) para alimentação humana e utilizar biomassa pós-colheita dos cogumelos (SMS) para nutrição peixes permite a geração de novos nichos de negócios (cogumelos e ração para peixe) e ativos financeiros para agroindústria do dendê por meio da comercialização das biomassas vegetais, que são passivos ambientais.

-

- **OBJETIVO GERAL**

Utilizar os resíduos lignocelulósicos da agroindústria de óleo de palma, instaladas no Pará, para cultivar cogumelos comestíveis (*Pleurotus ostreatus*) e insumo para nutrição de peixes.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a produtividade e eficiência biológica de *Pleurotus ostratus* CC389 em formulações com biomassas lignocelulósicas da agroindústria de óleo de palma;
- Analisar as características bromatológicas das biomassas pós-cultivo cogumelos;
- Avaliar as atividades enzimáticas lignocelulolíticas nas biomassas pós-cultivo dos cogumelos;
- Utilizar biomassa pós-cultivo dos cogumelos na formulação de ração para alevinos de tambacu, avaliando o coeficiente de digestibilidade aparente.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Local e biomassas

As biomassas lignocelulósicas utilizadas nas formulações dos substratos para o cultivo do macrofungo foram obtidas a partir do processamento dos cachos de frutos frescos de palma africana na agroindústria Denpasa (Dendê do Pará S/A), localizada em Santo Antônio do Tauá – Pará.

As formulações foram feitas com cachos vazios (EFB - *Empty Fruit Bunches*), fibra de prensagem do endocarpo (PPF - *Palm Pressed Fibres*), torta de palmiste (PKC - *Palm Kernel Cake*), borra do Tridecânter ou dencatador de óleo (DCPO - *decanter cake palm oil mill*), cinzas da fibra de prensagem utilizada para caldeira (APPF - *Ash PPF*) e o efluente (POME - *Palm Oil Mill Effluent*).

6.2 Macrofungos e inoculo

As espécies utilizadas nos experimentos foram *Pleurotus ostreatus* CC-389, *Pleurotus albidus* CC111 e *Pleurotus ferulae* CC028, que pertence a Coleção de

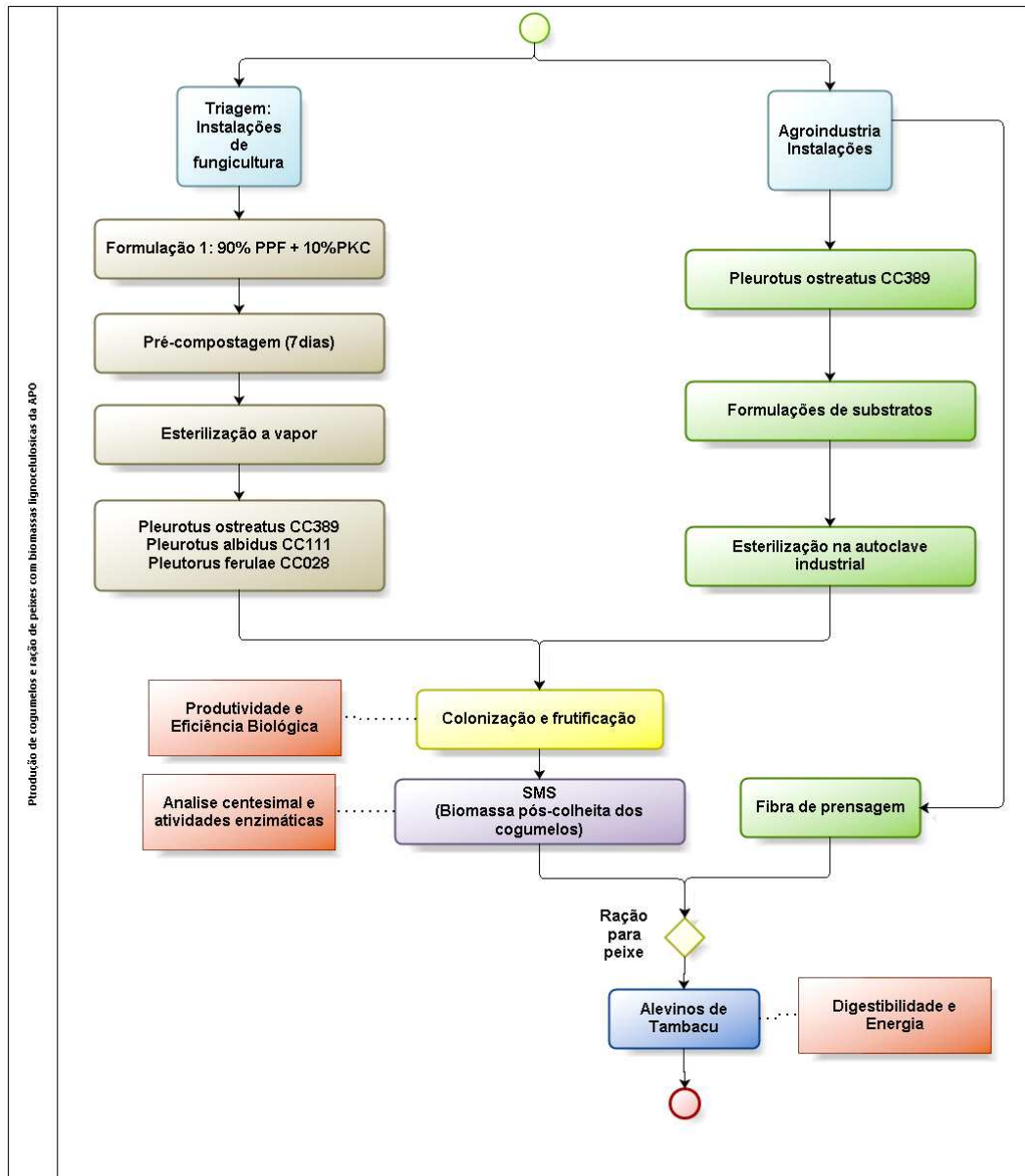
Microorganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinaria da Embrapa Agroenergia. Estas espécies apresentam temperaturas de frutificação e colheita diferentes.

As cepas estavam mantidas em meio de cultura tipo batata-dextrose-ágar – BDA (PDA – *Potato Dextrose Agar*, em inglês) e foram repicados em placas contendo BDA. Após a colonização total do meio de cultura, a massa micelial foi transferida para um segundo meio de cultura a base de arroz com casca, que foi utilizado como inoculo.

O meio de cultivo utilizado como inoculo foi feito com arroz em casca suplementado com 10% de farelo de trigo, com umidade ajustada a 65%. A mistura foi acondicionada em frascos de vidro com tampa de metal e membrana *micropore* (0,22µm) na tampa, para realização das trocas gasosas. Os frascos foram esterilizados em autoclave por 40 minutos a 121°C. O micélio dos macrofungos foi inoculado nos meios estéril e armazenado em estufas ventiladas com temperatura de 28°C, por 30 dias.

6.3 Formulação dos substratos e sistemas de cultivos

Os experimentos para o cultivo do gênero *Pleurotus* e nutrição dos alevinos de tambacu com SMS estão resumidos no fluxograma 1.



Fluxograma 1: Etapas experimentais realizadas para cultivo dos cogumelos do gênero *Pleurotus* com resíduos lignocelulósicos de APOs e a nutrição de alevinos de tambacu.

6.4 Experimento 1: pré-compostagem e pasteurização a vapor dos substratos

O processo de pré compostagem e pasteurização foram feitos conforme Siqueira *et al.*, (2012) com algumas modificações. As três espécies de *Pleurotus* foram primeiramente triadas quanto a capacidade de crescimento e frutificação em formulação de substrato (massa seca) contendo 90% fibra de prensagem do endocarpo (PPF) enriquecidas com 10% torta de palmiste (PKC). Os substratos foram preparados por meio de pré-compostagem (7 dias) e esterilização a vapor. A pré-compostagem foi feita por meio da mistura dos substratos que posteriormente foi colocada em caixa metálica com orifícios, com volume 0,8 m³. Após serem empilhados os substratos foram umedecidos com água corrente. A homogeneização e oxigenação das pilhas foram feitas por reviragem a cada dois dias. Os substratos pré-compostados por 7 dias foram transferidos para sacolas de polipropileno com filtros (0,22µm). As sacolas receberam 1,5 kg substrato úmido. A esterilização das 150 sacolas com substratos pré-compostados foi realizada utilizando-se vapor de água canalizado para ambiente fechado (sala de 2x2x2 m) por 12 horas, com temperatura de 110°C ± 4°C. Após a esterilização os substratos foram armazenados em câmara fria (± 4°C) por 12 horas. A inoculação foi executada em câmara de fluxo laminar com 5% de inóculo dos respectivos fungos. Para cada espécie de *Pleurotus* foram feitos 50 repetições. A incubação para colonização dos substratos ocorreu em estufa escura sem controle de temperatura e umidade e a frutificação, em estufas com ventilação, temperatura e umidade controlada.

6.5 Experimento 2: Esterilização em autoclave industrial (Agroindústria)

O *Pleurotus ostreatus* CC389 foi escolhido para realizar os experimentos de cultivo fazendo uso das instalações da agroindústria de palma de óleo. O substrato foi preparado por meio das misturas de cachos vazios (EFB), torta de palmiste (PKC), borra do tridecâter (DCPO), cinzas da fibra de prensagem utilizada aquecimento da caldeira (APPG) e o efluente (POME) para ajuste da umidade entre 65 e 70% (Tabela 1).

As biomassas e efluente (POME) foram misturados em betoneiras (equipamento de construção civil) para melhor homogeneização dos substratos. Para avaliar o efeito da contaminação por outros fungos utilizou-se diferentes estratégias de esterilização, uma vez que as sacolas de polietileno de alta densidade (PEAD), normalmente

utilizadas pela fungicultura, tem ponto de fusão abaixo das condições de temperatura/pressão programadas nas autoclaves industriais deste tipo de agroindústria.

Tabela 1. Formulação dos substratos lignocelulósicos e efluentes da agroindústria de palma de óleo (dendê) para o cultivo do *Pleurotus ostreatus* CC389 (Experimento 2).

Formulação: Biomassas e Efluente	Quantidade (Kg)	Massa Seca (%)
Cacho vazio (EFB)*	28,00	28%
Torta de Palmiste (PKC)	20,00	20%
Borra do Tridecâter (DCPO)	50,00	50%
Cinza da Caldeira (APPG)	2,00	2%
Efluente (POME)	50,00	-

*Os cachos vazios foram triturados.

O primeiro lote (L1) de substrato, previamente misturado, foi acondicionado em sacolas PEAD (2 kg de massa úmida) e esterilizados em autoclave comercial (tipo laboratório) por uma hora a 121°C e 1 Atm de pressão. Os lotes de substratos dois (L2) e três (L3) são provenientes do processo de esterilização em autoclave industrial (agroindústria do dendê). Para isso os substratos foram transferidos para sacos de algodão cru (50x80 cm) e colocados nos vagonetes utilizados para esterilização juntos com os cachos com frutos frescos. Esta etapa ocorreu conforme a agenda de trabalho da linha de processamento APO. Os autoclaves industriais tem a programação ajustada para 145°C e aproximadamente 3 Atm de pressão por 90 minutos.

Após a esterilização “industrial” os sacos de panos com substratos foram transferidos para uma sala com ar-condicionado a 15°C, onde permaneceram por 12 horas. Após o resfriamento os substratos foram acondicionados em sacolas PEAD (2 kg de massa úmida) e foram divididos em dois lotes (L2 e L3). O L2 refere-se às sacolas com substratos resubmetidos a esterilização, fazendo uso de autoclave comercial (conforme fora feito com L1). Enquanto que as sacolas com o L3 representam o substrato esterilizado nas condições industriais, ou seja, esterilização única. Os três lotes foram manipulados em sala limpa, fechada e refrigerada a 15°C.

Um quarto lote (L4) foi feito como os substratos (sacolas com 2 kg, úmidos) utilizando amostras do processo de mistura, sem nenhum procedimento de esterilização (testemunho). O número de repetições foi de 20 sacolas/substratos por lote (L1, L2, L3 e L4).

6.6 Inoculação e Colonização Micelial

A inoculação dos substratos com a massa micelial fúngica foi feita da mesma maneira nos dois experimentos. Os substratos receberam 2% (massa inoculo/massa úmida de substrato) de inoculo de cada fungo (Experimento 1) e *Pleurotus ostreatus* CC-389 (Experimento 2).

Após inoculação, em ambos os experimentos, as sacolas foram transferidas para sala de colonização escura, ventilação por exaustor e temperatura ambiente (33 a 38° C).

O crescimento micelial foi verificado periodicamente para avaliação da contaminação por fungos “verdes”, tais como os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e outros, como fora feito para as sacolas testemunhas (L4 do experimento 2, por exemplo). O tempo de colonização (dias) também foi registrado até o surgimento dos primórdios, que sinaliza o momento de transferência para sala de frutificação.

6.7 Frutificação, Produtividade e Eficiência Biológica

Após o surgimento dos primórdios os lotes (L1, L2 e L3) foram colocados na sala de frutificação. As sacolas PEAD foram perfuradas com lâmina (estéril) em diferentes partes, de modo a proporcionar o crescimento dos cogumelos. A temperatura da sala foi ajustada para 16°C por 48 horas e o restante do processo a 25°C. O ambiente teve a umidade ajustada a aproximadamente 90%, fazendo uso de vaporizadores. A ventilação ocorreu por meio de exaustores e iluminação por foto períodos a cada 12 horas.

A colheita ocorreu manualmente, durante quatro semanas, onde foram contabilizados três fluxos (Fx-1, Fx2 e Fx3). A maioria dos cogumelos foram colhidos quando o píleo atingia o máximo de tamanho (antes da abertura das lamelas). A produtividade da colheita foi determinado pela relação da massa de cogumelos

frescos colhidos (g) pelo massa úmida dos substratos, conforme equação 1 (Siqueira *et al.*, 2012).

Equação 1:

Onde:

- P = rendimento. MCF (Massa Cogumelos Frescos em g) e MSU (Massa Substrato Úmido, determinado no início do processo).

A eficiência biológica (EB) foi estabelecida por meio da equação 2 (Siqueira *et al.*, 2012), onde foi feito a relação entre a massa de cogumelos frescos pela massa de substrato inicial em massa seca (g).

Equação 2:

Onde:

- EB = Eficiência Biológica. MCF (Massa Cogumelos Frescos em g) e MSS (Massa Substrato Seca, determinado no início do processo).

6.8 Atividades Enzimáticas: substratos colonizados pelos *Pleurotus* (Experimento 1)

Para obtenção do extrato enzimático bruto, pesou-se 25 g dos substratos totalmente colonizados pelos *Pleurotus* no experimento 1. Adicionou-se 50 mL de água destilada (1:4) em erlenmeyer de 150 mL e solução de triton X-100, como surfactante para ajudar na dessorção das enzimas ligadas aos substratos sólidos. A mistura foi então homogeneizada em shaker (agitação mecânica) durante 40 min a 5° C. O sobrenadante foi filtrado em funil de buchner com papel de filtro e auxílio de bomba de vácuo, para obtenção do extrato bruto enzimático (enzimas extracelulares).

Para evitar contaminações foi adicionado azida sódica junto ao extrato (0,01 mL de solução 1% para cada 50mL de extrato).

6.9 Determinação dos Açúcares Redutores - DNS

Para a determinação dos açúcares redutores liberados após reações enzimáticas, utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), originalmente proposto por Miller (1959), com modificações de acordo com protocolo da Embrapa Agroenergia. O método do DNS baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, concomitantemente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Após aquecimento, a solução torna-se avermelhada, sendo lida em espectrofotômetro a 540 nm. O preparo da solução de DNS seguiu o método de Ghose (1987).

6.10 Determinação das atividades de holocelulases

Os ensaios enzimáticos para determinação de CMCase (endoglicanase), xilanase, pectinase e mananase presentes no extrato bruto enzimático obtido dos substratos colonizados pelos *Pleurotus* foram realizados utilizando 50 µL de enzima (extrato bruto) e 100 µL de substrato (carboximetilcelulose, xilana, pectina cítrica ou galactomanana), sendo os três primeiros ensaios com solução de 1% do substrato e 0,5% para o último ensaio, que reagiram por 30 minutos a 50°C. Após este tempo foram adicionados 300 µL de DNS (preparado de acordo com 4.12) e os tubos com os ensaios foram fervidos por 10 minutos. Adicionou-se 1,5 mL de água para leitura do ensaio no espectrofotômetro a 540 nm. Para o ensaio de FPase (celulase total) foi utilizado como substrato papel Whatman número 1 em forma de tiras de 1x6 cm, com aproximadamente 50 mg de massa, e 150 µL de enzimas (extrato bruto), que foram incubadas por 1 h a 50°C. Os ensaios de FPase foram interrompidos e analisados como descrito acima para outras holocelulases.

Para determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos foram construídas as curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as cadeias principais dos respectivos polissacarídeos. Para calibração foi utilizado uma solução estoque de 2 mg/mL para cada açúcar redutor quantificado pelo

método DNS, conforme descrito anteriormente (glicose, xilose, manose e ácido galacturônico). Variando a concentração do açúcar redutor com água destilada, assim foram construídos 5 pontos do gráfico de regressão linear, e a partir da equação da reta obtida pelo método DNS. Para todos os ensaios enzimáticos foi utilizado $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ como unidade de açúcar redutor liberada durante todo o tempo do ensaio enzimático. Unidade internacional (UI) representa a quantidade que a enzima necessita para liberar $1\ \mu\text{mol}$ de açúcar redutor por minuto.

6.11 Atividades de proteases

O método de determinação das atividades proteásicas foi realizado de acordo com o protocolo de Charney e Tomarelli (1946) com adaptações. Os ensaios para proteases presentes nos substratos colonizados ocorreram em tubos de centrifuga tipo falcon de 15 mL. Foram adicionados $500\ \mu\text{L}$ do filtrado (extrato bruto enzimático), $500\ \mu\text{L}$ de azocaseína, incubados em banho-maria a 37°C por 40 min. Após o término de incubação (40 min) a reação foi paralisada com TCA (ácido tricloroacético). No preparo do branco da amostra para que não haja reação enzimática o TCA é adicionado antes do extrato enzimático. Para o branco do aparelho adicionou $500\ \mu\text{L}$ de azocaseína, $500\ \mu\text{L}$ de tampão acetato de sódio pH 5. As amostras foram a 6000 rpm, por 10 min a 4°C . Os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos, então adicionou-se 1 mL de KOH 0,5 M. A leitura em espectrofotômetro foi a 430 nm.

Para o cálculo da atividade de protease não foi usada curva padrão como a metodologia usando DNS, mas sim uma fórmula, descrita abaixo:

Onde:

- Abs = Absorbância ensaio - Absorbância branco
- t = tempo em minutos no banho-maria;
- V = volume
- EC = ensaio colorimétrico

6.12 Determinação das atividades enzimáticas de oxi-redutases

A determinação das atividades enzimáticas de oxi-redutases dos substratos colonizados de *Pleurotus* seguiu protocolo sugerido por Neto (2010). Para a obtenção do extrato, o substrato foi homogeneizado na proporção de 1:5, ou seja, para cada 1 g do meio colonizado, adicionou-se 5 mL de água destilada. Após a homogeneização, o material foi mantido em banho de gelo por 1 hora com agitação manual a cada 15 minutos e em seguida, filtrado com o auxílio de bomba a vácuo.

Para a determinação das atividades de ligninases foi utilizada a equação derivada da Lei de Beer-Lambert:

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = coeficiente de extinção da enzima (absortividade molar $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

R = volume (mL) do sobrenadante;

T = Tempo de reação (min).

Todas as atividades enzimáticas foram expressas em unidade internacional por mL ($\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$), definidas como número de μmol liberado do produto por mL, por minuto, nas condições do teste.

6.13 Lacases

A atividade de lacases foi determinada com o uso do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). A mistura reacional para ABTS continha 0,45 mM do ABTS, 90 mM de tampão acetato de sódio pH 5,0, e 1 mL de amostra diluída 10 vezes com água destilada. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 90 segundos a 25°C (WOLFENDEN e WILSON, 1982).

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = Lacase: 36000 L.mol⁻¹cm⁻¹;

R = volume (mL) do sobrenadante

T = Tempo de reação (min).

6.14 Atividade de lignina peroxidase

A atividade de LiP foi determinada pela oxidação de álcool veratrílico na presença de peróxido de hidrogênio, segundo Tien e Kirk (1984). O meio reacional foi composto de 500 μL de sobrenadante do extrato enzimático centrifugado, 200 μL de álcool veratrílico (2 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M; pH 3,0) e 200 μL de peróxido de hidrogênio (2 mM). A formação de aldeído veratrílico foi acompanhada pela leitura da absorbância a 310 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP-2000 UV) por 5 minutos, com registros a cada 10 segundos.

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = LiP: 9300 L.mol⁻¹cm⁻¹;

R = volume (mL) do sobrenadante;

T = Tempo de reação (min).

6.15 Manganês peroxidases

A atividade de manganês peroxidases foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional consistiu de 50 mg.mL⁻¹ de vermelho de fenol, 50 mM de sulfato de manganês, 50 mM de H₂O₂, 12,5 mM de lactato de sódio, 500 mg.mL⁻¹ de albumina bovina e tampão succinato de sódio pH 4,5, sendo adicionados 0,5 mL de amostra (extrato bruto enzimático). Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40 mL de NaOH, 2M. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância (610 nm).

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = MnP: $460\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

R = volume (mL) do sobrenadante;

T = Tempo de reação (min).

6.16 Atividade de fitase

Os ensaios enzimáticos de fitases foram mensurados pela quantidade de fósforo inorgânico liberado, seguindo o protocolo sugerido pela Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com). Foram incubados $500\mu\text{L}$ de fitato de sódio e $25\mu\text{L}$ do extrato enzimático durante 30 minutos na temperatura de 37°C . A reação foi então paralisada pela adição de 4mL da solução “color reagent” (molibdato de amônio 10mM , ácido sulfúrico 5N e acetona na proporção 1:1:2. Uma unidade de fitase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar $1\mu\text{mol}$ de fosfato inorgânico por minuto a partir de fitato de sódio a 37°C em pH 2,5.

6.17 Análises bromatológicas

Todas as amostras foram trituradas no moinho tipo Willey com peneira de 60 mesh. O teor de matéria seca foi determinado em estufa a 105°C por 12 h, e a matéria mineral (cinzas) em forno tipo mufla a 600°C por 3h.

Para a determinação do teor de proteína bruta (PB) foi utilizado o equipamento destilador de nitrogênio Kjeldahl, e o fator de conversão foi de 6,25 (NOGUEIRA, 2005).

O extrato etéreo foi determinado através do extrator de óleo Ankon (Modelo XT-15). As análises das frações de FDN e FDA foram feitas através do equipamento Ankon (Modelo A220) e a lignina determinada com a adição de ácido sulfúrico 72% no resíduo insolúvel da determinação da FDA (VAN SOEST, 1994).

O teor dos carboidratos não fibrosos foi determinado através da fórmula: $CNF = 100 - [Fibra\ em\ Detergente\ Neutro + Proteína\ Bruta + Cinzas + Extrato\ Etéreo]$. O teor de Hemicelulose através do FDN menos o FDA.

6.18 Análise elementar (CHN)

A determinação do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio nos substratos foi realizada em um analisador elementar (CHN/S 2400 series II, Perkin Elmer, EUA). As amostras foram pesadas (1,5 – 2,5 mg) em cápsulas de estanho em balança analítica com precisão de 0,1 mg. Os elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio foram analisados simultaneamente, mediante curva analítica obtida com padrões secos e de alta pureza, com tempo de queima de 600 segundos, entre temperatura de 926-1000°C e fluxo de gás hélio. As análises foram realizadas em duplicata. Em cada análise obtiveram-se os valores percentuais de C, H e N presentes em cada amostra.

6.19 Juvenis de tambacu

Os alevinos de tambacu foram adquiridos em lojas de piscicultura na cidade de Belém, Pará, apresentando o tamanho médio de cinco centímetros. Os alevinos foram transportados, seguindo as recomendações da empresa quanto ao tipo de recipiente para transporte, qualidade da água, oxigenação e tempo de descolamento até os tanques de recria, para minimizar o estresse e mortalidade dos animais.

Os alevinos foram transferidos para tanques de aclimação existentes na Embrapa Amazônia Oriental, Belém/PA, por 20 dias. Durante este período os animais foram nutridos com ração padrão até chegarem a fase juvenil.

6.20 Preparo das rações e nutrição dos juvenis de tambacu

A Estação de Piscicultura da Embrapa Amazônia Oriental foi o local onde foram preparadas as rações e o experimento para avaliação da digestibilidade por parte dos juvenis de tambacu.

Três tipos de rações foram preparadas para a realização do experimento de digestibilidade. A tabela 2 descreve a formulação para ração controle (RC), ração com a adição de torta de palmiste (RTP) e a terceira, a ração com adição do substrato do cultivo do cogumelo (SMS). O SMS e a torta do palmiste foram secos a 105°C por 24 horas e triturados em moinhos de faca (Maqtron B-611) (Figura 4).

Tabela 2. Proporção dos ingredientes nas formulações para rações dos juvenis de Tambacu. Ração Controle (RC), Ração com Torta de Palmiste (RT) e na Ração com SMS (RSMS).

INGREDIENTE	RC	RT	RSMS
	-----%-----		
Farelo de Soja	37.90	26.50	26.50
Farelo de Milho	34.20	23.94	23.94
Farelo de Trigo	10.00	7.00	7.00
Farinha de Peixe	10.00	7.00	7.00
Óleo de Soja	4.10	2.87	2.87
Fosfato Bicálcico	2.50	1.75	1.75
Premix Mineral	0.75	0.525	0.525
Metionina	0.25	0.175	0.175
Lisina	0.20	0.14	0.14
Óxido de Cromo III	0.10	0.10	0.10
Torta de Palmiste	-	30.00	-
SMS*	-	-	30.00
Total	100.0	100.0	100.0

*SMS de *Pleurotus ostreatus* CC389 do experimento 2, Lote 3.

Figura 4. Preparado do SMS para adição na formulação da ração para os juvenis de Tambacu. A) SMS; B) Triturador; C) SMS triturado e pronto para ser adicionado na ração.

Foram preparados 10 kg para cada tipo de formulação básica que foi utilizado no preparo das rações. Os ingredientes foram levados a um misturador de rações (marca G. Paniz, modelo AM 25), foram adicionados 1,5 L de água na ração I e 3,0L nas rações II e III, com o objetivo de ajustar a umidade da dieta. As rações foram misturadas por aproximadamente 30 minutos e posteriormente seguiram para o processo de peletização (Figura 5). Depois de peletizadas as rações foram secas por 12

horas a 60° C. Após secagem as rações foram embaladas e guardadas em freezer a -22 °C.



Figura 5. Imagens do preparo das rações para nutrição dos juvenis da Tambacu. A) Mistura dos ingredientes da ração; B) Peletização; C) Secagem dos pellets. D) Rações pelletizadas: RC= Ração Controle; RSMS= Ração com SMS; Ração com Torta de Dendê.

Utilizou-se um marcador externo nas três dietas, o óxido de cromo III, que adicionado a um alimento ou dieta permite calcular o coeficiente de digestibilidade (ANDRIGUETTO *et al*, 1988).

Após aclimação os juvenis de tambacu foram divididos em três grupos, contendo 30 peixes em cada grupo (Figura 6). Os animais foram colocados em basquetas acopladas a um sistema de recirculação contínua de água, com filtro físico e biológico e aeração durante 24 horas.



Figura 6. Sistema de acondicionamento dos juvenis de tambacu que antecederam os experimentos para avaliação da digestibilidade aparente.

6.21 Coleta e tratamento das amostras fecais dos juvenis de tambacu

Os dois grupos que não tiveram coleta de fezes foram alimentados *ad libitum* (à vontade) três vezes durante o dia.

O grupo que seguiu para a coleta das fezes foi alimentado quatro vezes ao dia: às 9:00h, 15:00h, 16:00h e 17:00h. Às 18:00h os peixes foram levados à garrafas pet acopladas com tubos Falcon de 50 mL (incubadoras adaptadas ao sistema Guelph) e permaneceram até manhã seguinte (6:00h). Esse sistema também foi acoplado à caixas de isopor com gelo para preservação das amostras. Depois da retirada dos tubos

com as amostras, os animais foram levados às basquetas para descanso. Essa rotina foi feita para os grupos subsequentes. O pH da água foi determinado diariamente para controle da qualidade da água.

Depois de coletadas, as amostras foram centrifugadas (CELM, modelo LS – 3 Plus), por 10 minutos, a 3.000 rpm. Separada a parte líquida da sólida, as fezes foram pesadas em balança analítica (SHIMADZU – modelo - AUY220) e, posteriormente, secas em estufa (Nova Ética), por 12 horas, a 60 °C. Depois foram novamente pesadas e guardadas em freezer a -22 °C, para posterior análise de composição. Foram coletadas 5g de fezes por grupo e o experimento durou 32 dias.

6.22 Digestibilidade aparente dos ingredientes das rações pelos peixes

Para o cálculo do coeficiente de digestibilidade aparente das rações, foi utilizada a fórmula citada por Ramirez (2005). Também foi calculado o índice de recuperação do cromo (Cr₂O₃) através da equação descrita por Lobo Junior *et al.* (2001).

Calculo da Digestibilidade Aparente (CDA)

Índice de Recuperação do Cromo nas Fezes

• CAPIÍTULO 1

Subprodutos da agroindústria do óleo de palma (dendê) para cultivo de cogumelos comestíveis e nutrição de peixes

Kátia dos Santos Morais¹; Agenor Fontoura Marquez²; Taísa Godoy Gomes²; Antony Enis Virginio Machado³; Marivane Lemos¹; Marcos Ene Chaves Oliveira⁴; Heitor Martins Junior⁴; Simone Mendonça²; Felix Gonçalves de Siqueira^{2*}.

¹Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia.

²Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal.

³Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, Tocantins.

⁴Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará.

E-mail correspondente: felix.siqueira@embrapa.br

Resumo

Este trabalho teve por objetivos fazer uso dos subprodutos lignocelulósicos da Agroindústria da Palma de Óleo(APO) como substratos para cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* CC389 e utilizar a biomassa pós-colheita ou SMS (inglês: *spent mushroom substrate*) do *P. ostreatus* CC389 como um dos ingredientes para formulação de ração para nutrição de alevinos de tambacu. As APOs são estruturadas com uma série de equipamentos e logística que são favoráveis para o cultivo de cogumelos ou pré-tratamento biológico das biomassas vegetais por macrofungos e geração de bioprodutos para aplicação em formulações de ração animal, por exemplo. As autoclaves industriais utilizados nas APOs favorecem a esterilização dos substratos para inoculação do micélio dos macrofungos, assim não necessitando de investimento estrutural para esterilização dos substratos. Aqui também foram utilizados a estratégia de pré-compostagem (7 dias) e esterilização a vapor de uma formulação de substrato para escolha da espécie de *Pleurotus*. Os resultados quanto ao processo de esterilização dos substratos mostraram a necessidade de buscar embalagens (sacolas) confeccionadas com material plástico que suporte temperaturas acima de 140°C e 3 Atm, pois as sacolas de polietileno tradicionalmente utilizada para autoclave com 1 Atm de pressão e 121°C não suportaram e derreteram. As contaminações por fungos “verdes” dos gêneros *Trichoderma* foram um dos principais problemas, como também o controle da temperatura das salas de cultivo (sem ar-condicionado). Mesmo diante destas adversidades, os resultados da produtividade do *Pleurotus ostreatus* CC389 foram satisfatórios para a maioria das

formulações. As atividades enzimáticas do SMS também foram avaliadas, sendo lacase como predominante. A análise centesimal das formulações e SMS também foram avaliados para compor os ingredientes para nutrição dos alevinos de tambacu. A ração formulada com SMS do cultivo de *Pleurotus* foi aceita pelos alevinos, que mostraram resultados de digestibilidade semelhantes a ração controle. Deste modo, a agroindústria de palma de óleo apresentam características favoráveis para produção de cogumelos do tipo *Pleurotus* e insumos para nutrição de peixes (SMS), em função das estruturas físicas, equipamentos e disponibilidade de biomassas lignocelulósicas e proteicas/lipídicas.

Palavras-chaves: Biorrefinaria, Agroindústria Palma de óleo, Macrofungos, cogumelos, Nutrição de peixes.

Abstract

This work aimed to make use of the lignocellulosic sub products of the POA (Palm Oil Agroindustry), such as empty bunches, pressing fibers, palm kernel cake and palm kernel sludge from the decanter as substrates for edible mushroom cultivation *Pleurotus ostreatus* CC389. Also how to use post-harvest biomass or SMS (Spent Mushroom Substrate) of *P. ostreatus* CC389 as one of the ingredients for formulating ration and nutrition of tambacu fingerlings. The POAs are structured with a series of equipment and logistics that are favorable for the cultivation of mushrooms or biological pre-treatment of the vegetal biomasses by macrofungi and generation of bioproducts for application in formulations of animal feed for example. Industrial autoclaves used in POAs favor to sterilize substrates for inoculation of the mycelium of macrofungi, and thus do not require structural investment for sterilization of substrates. However, the pre-composting strategy (7 days) and steam sterilization of a substrate formulation were also used to select *Pleurotus species*. The results regarding the process of sterilization of the substrates showed the need to look for packages (bags) made with plastic material that supports temperatures above 140°C and 3 Atm, because the polyethylene bags traditionally used for autoclaving with 1 Atm of pressure and 121°C did not support the stress and melted. The contamination by "green" fungi of the *Trichoderma* genus was one of the main problems, as well as the temperature control of the growing rooms (without air conditioning). But, even in the face of these adversities, the productivity results of *Pleurotus ostreatus* CC389 were satisfactory for most formulations. The enzymatic activities of SMS were also evaluated, with laccase being predominant. The centesimal analysis of the formulations and SMS were also evaluated to compose the ingredients for nutrition of tambacu fingerlings. The feed formulated with SMS of *Pleurotus* cultivation was accepted by the fingerlings, which showed digestibility results similar to the control ration. In this way, the palm oil agroindustry presents favorable characteristics for the production of *Pleurotus* mushrooms and fish nutrition inputs (SMS), in function of

the physical structures, equipment and availability of lignocellulosic and proteic / lipid biomasses.

Key words: Biorefinery, Palm Oil Mill, Macrofungi, Mushroom, Fish Feed

Introdução

A agroindústria de palma de óleo (APO) geram dois tipos de óleos, que são: óleo de palma, extraído do mesocarpo dos frutos, e o óleo de palmiste obtido da amêndoa (ABDULLAH eWAHID, 2010; MBA *et al.*, 2015). Logo após a colheita, os cachos devem ser transportados o quanto antes para agroindústria, evitando o processo de acidificação dos óleos, com consequente perda no valor comercial (KURNIA *et al.*, 2016).

O óleo de palma tem aplicações diversas em indústrias alimentícias, cosméticos e biocombustíveis (GILBERT, 2012). O CPO (inglês, crude palm oil) é o mais importante óleo vegetal do mundo, por ser o mais produzido e consumido, com diversas aplicações industriais (TEOH, 2010; NORHAIZAN *et al.*, 2013).

A produção de CPO em 2013 no mundo foi de 54,3 milhões de toneladas, deste total a continente asiático, produziu 48,4 (FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016), representando 89% do mercado produtor deste óleo vegetal (Figura 1). A Malásia e Indonésia são os maiores produtores desta cultura, sendo produzido que estes países juntos alcançaram mais de 43 milhões de toneladas deste produto em 2013 (FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016) (Figura 2). A Colômbia é país das Américas com maior representatividade neste setor, que em 2013 produziu mais de 1 milhão toneladas, ficando ranqueada entre os maiores produtores no mundo. O Brasil neste mesmo período produziu 340 mil toneladas, tendo maior representatividade no Estado do Pará, e com produção crescente desde 1993 (Figura 3).

No Brasil são produzidas três variedades de planta do dendezeiro, a *E. guineensis*, variedade dura de origem africana; *E. oleifera*, variedade pisífera originária da Amazônia, denominada caiaué, e tenera, híbrido interespecífico resultado do cruzamento da variedade dura com psífera (*E. guineensis* x *E. oleifera*), resistente a fusariose e AF, sendo também ótima produtora de cachos e melhor

qualidade do óleo produzido (TELES, 2014; ALVES *et al.*, 2013; ALVES, 2011; LIMA *et al.*, 2002). Os resultados de programas de melhoramento genético elevou a importância do Brasil junto a cultura da palma de óleo (COSTA *et al.*, 2010), em função da obtenção de híbridos do cruzamentos entre palma de óleo africana (*E. guineenses*) X americana (*Elaeis oleífera*), com característica positivas como estatura e menor ao longo tempo de espera no pátio de processamento (Barcelos et al., (2015)

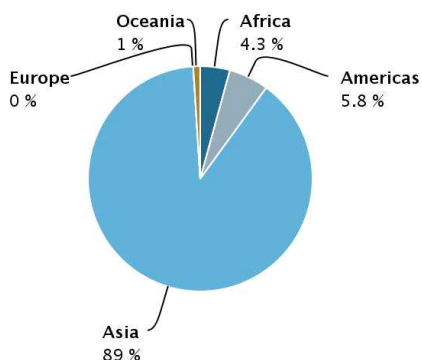


Figura 1. Produção mundial de óleo de palma, classificação percentual por continentes. Fonte: FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016.

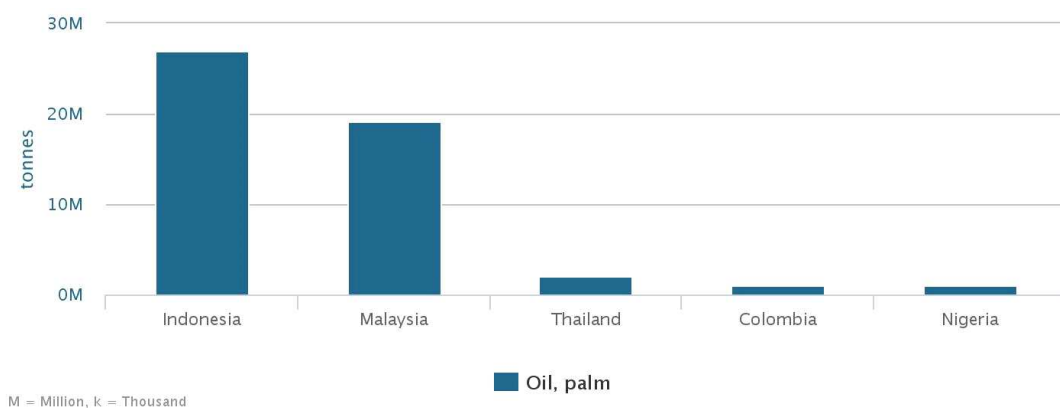


Figura 2. Os países com maior produção de óleo de palma. Fonte: FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016. M. milhões; K. mil.

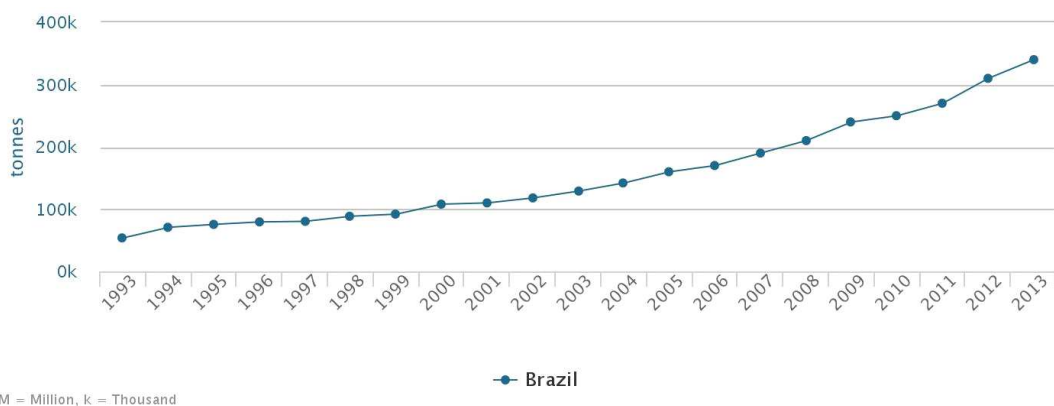


Figura 3. Produção de óleo de palma no Brasil entre 1993 e 2013. Fonte: FAOSTAT, 2016, consulta realizada 29/10/2016. Legenda: M. milhões; K. mil.

O cultivo e a agroindústria de óleo de palma geram imensas quantidades de resíduos lignocelulósicos e efluente. Durante o ciclo de vida dessa palmeira, apenas 10% é convertida em óleos de palma e palmiste; o restante, 90% são resíduos gerados durante o manejo e processamento (ATNAW *et al.*, 2014; KURNIA *et al.*, 2016), que podem ser matéria-prima para outras aplicações. O manejo das plantas nas fazendas geram folhas (OPF - Oil Palm Fronds) e troncos (OPT - Oil Palm Trunks). Enquanto que o beneficiamento dos cachos de frutos frescos (FFB) nas APOs geram biomassas lignocelulósicas residuais, tais como cachos vazios (EFB- Empty Fruit Bunches), fibra do endocarpo prensada (PPF- Palm Pressed Fibres), torta de palmiste (Kernel Shells) e o efluente líquido (POME- Palm Oil Mill Effluent) (SUDIRMAN *et al.*, 2011; MOHAMMAD *et al.*, 2012; RAZAK, 2013).

Garcia-Nunez *et al.* (2016) alertam que a biomassa sólida residual geradas na agroindústria de palma de óleo (APO) é cerca de duas vezes ao CPO produzido. De acordo com estes autores estas biomassas residuais estão disponíveis e geradas nas APOs durante todo ano, gerando preocupações econômicas e ambientais, quanto a destinação destes resíduos ou subprodutos. No entanto, estas biomassas têm ganhado atenção e diferentes propostas de aplicações, principalmente em cenários de biorrefinarias (STICHNOTHE *et al.*, 2011; YOSHIZAKI *et al.*, 2013; CHEW e BHATIA, 2008; CHIEW *et al.*, 2013; PRASERTSAN *et al.*, 2006; CHANG, 2014).

Garcia-Nunez *et al.* (2016) avaliaram seis alternativas para evolução das agroindústrias de palma de óleo da Colômbia no cenário de biorrefinarias. As alternativas estudadas pelos autores foram: 1) produção de biogás utilizando POME; 2) compostagem de cachos vazios e fibra de prensagem; 3) combustão de biomassas

vegetais para produção combinada vapor de alta pressão combinado com energia; 4) produção de pellets; 5) Produção de biochar (bio-carvão); 6) produção de biochar e bio-oil (bio-óleo). Zahari *et al.*, (2015) realizou um estudo de caso para viabilidade econômica utilizando os troncos de palma de óleo para obtenção de açúcares (xarope não-alimentício) para fermentação microbiana e obtenção de bioplásticos e poli-(3-hidroxibutirato), dentro do conceito de biorrefinaria. Financie *et al.* (2016) apontou a possibilidade de obtenção de compostos de celulose por meio da hidrólise enzimática de biomassas vegetais de APO após pré-tratamentos por líquidos iônicos.

Temu *et al.*, (2016) argumentaram as vantagens da produção integrada de cogumelos comestíveis (basidiomicetos) e biogás utilizando resíduos da produção da APOs na Nigéria. Os autores relatam a possibilidade de geração de alimentos e energia utilizando fontes disponíveis em abundância nas regiões produtoras de óleo de palma, e por consequência reduzindo impactos ambientais.

Diferentes tipos de macrofungos do filo Basidiomycota evoluíram degradando tipos específicos de compostos orgânicos ou gêneros/espécies de madeira. Tradicionalmente, estes fungos são divididos em duas categorias: fungos de podridão castanha/marrom (inglês: *Brown-Rot Fungi* – BRF) e fungos de podridão branca (inglês: *White-Rot Fungi* – WRF). Os BRF desconstruem principalmente a celulose presente na madeira, por meio de enzimas celulolíticas e oxidativas, sem remover a lignina, deixando a madeira marrom-colorida. Os WRF são capazes de degradar completamente a lignina (ligninases) antes de degradar enzimaticamente a celulose (RILEY *et al.*, 2014), deixando madeira uma aparência de branca, sem a cor marrom predominante dos compostos fenólicos da lignina

Os basidiomicetos compreende a maioria dos cogumelos comestíveis e tem se tornado cada vez mais importante não somente por suas características nutricionais, mas por suas propriedades medicinais e nutracêuticas, por parte de bioativos e carboidratos (beta-glucanas) (AVINet *et al.*, 2012). De modo geral os cogumelos comestíveis são excelente fonte de nutrientes, sendo baixa caloria e gorduras (livre de colesterol), proteínas, vitaminas, fibras e minerais, tais como potássio, ferro e fósforo (DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016).

Royse (2014) relata que cinco gêneros de cogumelos correspondem a mais de 85% da produção mundial, que são: 1) *Agaricus* (primeiramente *A. bisporus* e *A. brasiliensis*) é o maior gênero, contribuindo com 30% deste montante; 2) *Pleurotus*

(com até seis espécies) 27%; 3) *Leninula edodes* (shiitake) contribui com 17%; 4 e 5) *Auricularia* e *Flammulina* que são responsáveis por 6% e 5%, respectivamente.

O *Pleurotus ostreatus* é o típico representante da família Pleurotaceae, e este é amplamente produzido pelo alto índice proteico, alcançando cerca de 15 a 35 % em peso seco; pela grande quantidade de vitaminas C e B3, produzindo até 144 mg/100g e 109 mg/100g de peso seco respectivamente, além alta produtividade, característica que favorece o cultivo da espécie (DA SILVA, 2016).

As espécies de *Pleurotus* se desenvolvem bem em resíduos agroindustriais como serragens, palhas trigo e milho e principalmente em resíduos ricos em material lignocelulósicos como restos de árvore; sendo que seu cultivo se iniciou primeiramente em palha de trigo na Europa (FIGUEIRÓ, 2009). A escolha das fontes de carbono e nitrogênio são essenciais para o desenvolvimento do metabolismo fúngico, pois a partir desses componentes, os fungos retiram açúcares que serão assimilados para fornecer energia e também retira nitrogênio, importante precursor de aminoácidos e proteínas (VIEIRA, 2012). O gênero *Pleurotus*, normalmente é o primeiro tipo de cogumelo a ser produzido por pequenos produtores, em função da facilidade do crescimento em ampla variedade de substratos lignocelulósicos e sistema de esterilização. As fontes podem ser resíduos agroindustriais/florestais ou plantas verdes, como eucaliptos verdes (cortado e sepilhado).

Após a colheita dos cogumelos, que irão para o comércio, sobra a chamada biomassa pós-cultivo (mistura de massa micelial e parede celular vegetal parcialmente degradada) que é chamado de SMS (Inglês: *Spent Mushroom Substrate*). Em países com grande tradição na produção de cogumelos como a China, esse resíduo tem gerado grande preocupação, pois após a colheita há quantidades significativas de celulose, hemicelulose e lignina, além de hidratos de carbono que estão se tornando um passivo ambiental (ZHU *et al.*, 2015).

A aplicabilidade de SMS para geração de outros produtos, tais como fertilizantes no solo e o aumento da melhoria do solo e produtividade de alguns vegetais ou aditivos em rações para animais ruminantes (KADIRI e MUSTAPHA, 2010; PARK *et al.*, 2012), tem sido assunto discutido recorrentemente na literatura. Phan e Sabaratnam (2012) apresentaram um fluxograma apontando cinco possíveis áreas de aplicações do SMS, como: fontes de enzimas (oxidativas e lignolíticas), insumos para nutrição animal (ruminantes e monogástricos), biorremediação

(indústria têxtil), biofertilizantes (substratos para cultivos de plantas), e fontes de biocombustíveis (etanol celulósico e biogás). Royet *al.*(2015) afirmaram que o SMS pode ser utilizado como fertilizante para plantas pela quantidade de carbono e nitrogênio, sendo que essa relação fica entre 9 a 15:1, além de outros elementos essenciais para o desenvolvimentos dos vegetais. O SMS de espécies como *Pleurotus* sp. pode ser utilizado como ração para animais ruminantes por conta do seu alto teor de fibras presentes no composto podendo servir como o material volumoso da ração, que terá menor concentração de lignina, em função dos ataques enzimáticos por parte das ligninases (PARK *et al.*, 2012). No entanto, as propriedades básicas do composto pós-cultivo dependem necessariamente das características dos substratos utilizados para o cultivo dos cogumelos (KULSHRESHTHA e SHARMA, 2014).

Tanemura *et al.*, (2014) realizaram um estudo com três macrofungos (*Trametes coccinea*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju*) para aumentar o valor nutritivo de ingredientes vegetais para nutrição da truta arco-íris (rainbow trout). Eles observaram que o pré-tratamento biológico com os macrofungos nos farelos de girassol, soja e algas (macroalgas) utilizados nas formulações de rações para peixe pode ser uma abordagem rentável para aumentar o valor nutritivo e diminuir a carga ambiental para este setor.

A busca de fontes de proteína para nutrição humana é um das principais demandas globais, pois a população é crescente e com projeções ainda maiores para as próximas décadas. A exigência nutricional tem crescido em função do aumento da educação e da busca por melhor qualidade de vida. Deste modo, diversos países têm se esforçado na obtenção de proteína animal, como peixes. A aquicultura é um dos principais cenários para a manutenção dos estoques de proteínas animais, uma vez que o globo é coberto principalmente por água marinha. No entanto, para a manutenção do cultivo destes animais aquáticos se faz necessário desenvolver dietas nutricionais com ingredientes com taxas de conversão alimentar significativa para o melhor desempenho animal.

O Brasil é um país que possui condições para o desenvolvimento de pescados, tanto em águas doces como salgada. A disponibilidade hídrica, clima favorável e ocorrência natural de espécies aquáticas que compatibilizam interesse zootécnico e mercadológico são fatores favoráveis para o desenvolvimento deste setor (Brabo *et al.*, 2016). Brabo *et al.*, (2016) relatam dados da FAO (2014) que apontam a produção

aquícola nacional com números incipientes se comparada a dos maiores produtores mundiais, como a China, a Índia, o Vietnã e a Indonésia.

Segundo dados do relatório anual de Produção Pecuária Municipal (PPM) do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e divulgados na Revista Globo Rural; a produção brasileira de peixes em cativeiro é liderada pela região Centro-Oeste (26,8%), seguida pelas regiões Sul (22,4%), Nordeste (19,5%), Norte (18,6%) e Sudeste (12,8%).

Brabo *et al.*, (2016) relatam que na região Norte a criação de peixes em sua maioria é realizada em açudes e viveiros escavados. As espécies de peixes que se destacam nesta região são os redondos, tais como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o tambacu (híbrido formado pela fêmea de tambaqui x macho do pacu - *Piaractus mesopotamicus*) produzidos em Rondônia e Roraima. O pirarucu (*Arapaima gigas*), o matrinchã (*Brycon amazonicus*) e o curimatã (*Prochilodus spp.*) são produzidos em menor escala.

Silva (2010) relata em sua revisão de literatura que no estado do Pará, a piscicultura é a principal atividade aquícola, com produtores desde o cultivo restrito a subsistência, a grandes produtores voltados à exportação. Os principais polos de piscicultura estão localizados na vizinhança de Belém (bacia do Rio Tocantins; Lago de Tucuruí; Santarém e municípios nos arredores). Esta região se destaca em função da melhor infraestrutura, tais como as estradas propícias para comercialização e abastecimento de insumos como ração, bem como a fácil obtenção de alevinos. Entretanto, algumas dificuldades são listadas para os piscicultores da região, tais como assistência técnica e custo com ração, pois os ingredientes são oriundos de outros estados brasileiros.

Deste modo este trabalho teve como objetivos o aproveitamento dos resíduos das APOs como substratos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* CC389, fazendo uso da estrutura da agroindústria, modelo biorrefinaria e utilizar o SMS como insumo para nutrição de alevinos/juvenis de tambacu.

Materiais e Métodos

Local e biomassas

As biomassas lignocelulósicas utilizadas nas formulações dos substratos para o cultivo do macrofungo foram obtidas a partir do processamento dos cachos de frutos frescos de palma africana na agroindústria Denpasa (Dendê do Pará S/A), localizada em Santo Antônio do Tauá – Pará.

As formulações foram feitas com cachos vazios (EFB - *Empty Fruit Bunches*), fibra de prensagem do endocarpo (PPF - *Palm Pressed Fibres*), torta de palmiste (PKC - *Palm Kernel Cake*), borra do Tridecânter ou dencatador de óleo (DCPO - *decanter cake palm oil mill*), cinzas da fibra de prensagem utilizada para caldeira (APPF - *Ash PPF*) e o efluente (POME - *Palm Oil Mill Effluent*).

Macrofungos e inoculo

As espécies utilizadas nos experimentos foram *Pleurotus ostreatus* CC-389, *Pleurotus albidus* CC111 e *Pleurotus ferulae* CC028, que pertence a Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinaria da Embrapa Agroenergia. Estas espécies apresentam temperaturas de frutificação e colheita diferentes.

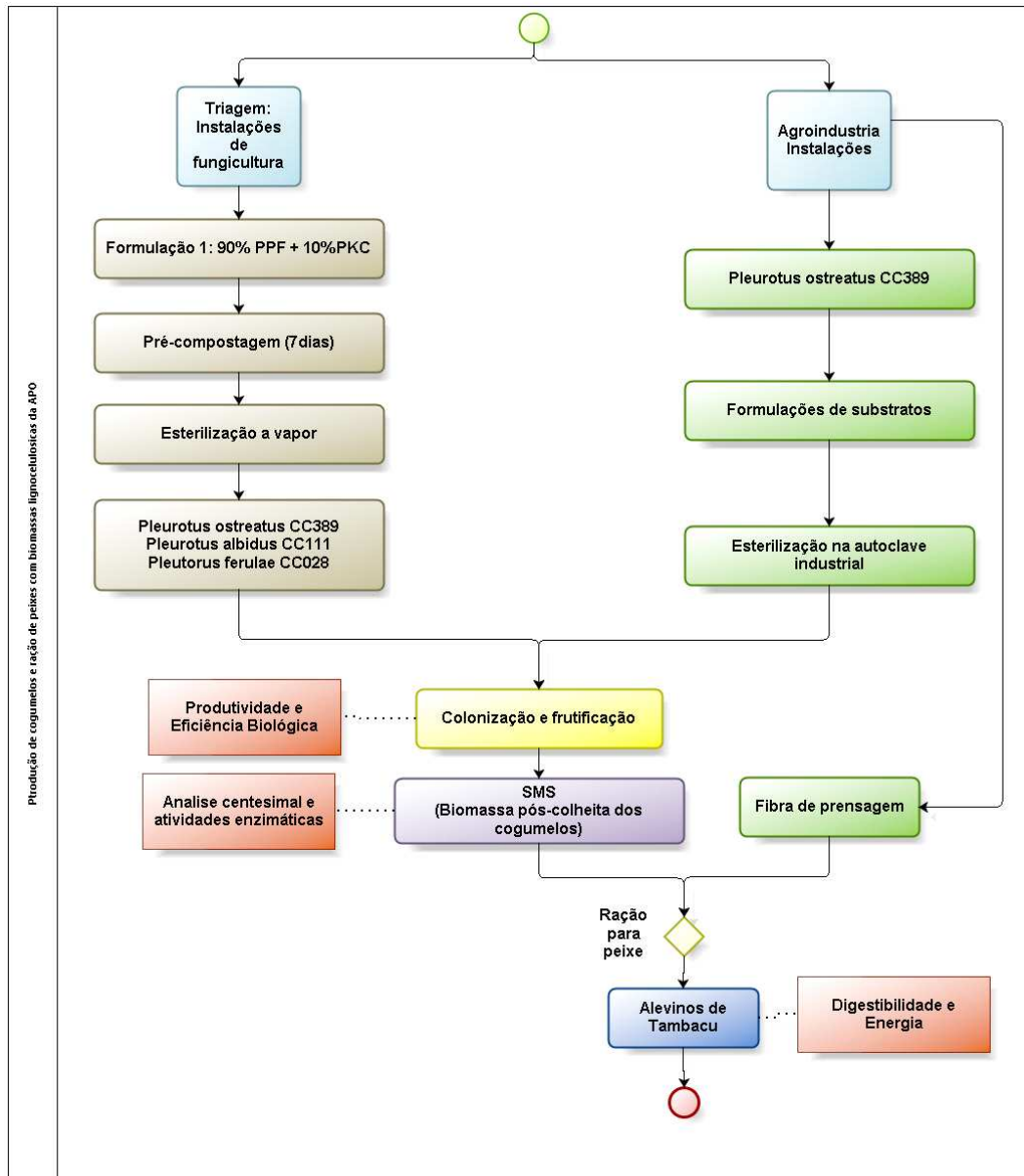
As cepas estavam mantidas em meio de cultura tipo batata-dextrose-ágar – BDA (PDA – *Potato Dextrose Agar*, em inglês) e foram repicados em placas contendo BDA. Após a colonização total do meio de cultura, a massa micelial foi transferida para um segundo meio de cultura a base de arroz com casca, que foi utilizado como inoculo.

O meio de cultivo utilizado como inoculo foi feito com arroz em casca suplementado com 10% de farelo de trigo, com umidade ajustada a 65%. A mistura foi acondicionada em frascos de vidro com tampa de metal e membrana *micropore* (0,22um) na tampa, para realização das trocas gasosas. Os frascos foram esterilizados em autoclave por 40 minutos a 121°C. O micélio dos macrofungos foi inoculado nos meios estéril e armazenado em estufas ventiladas com temperatura de 28°C, por 30 dias.

Formulação dos substratos e sistemas de cultivos

Os experimentos para o cultivo do gênero *Pleurotus* e nutrição dos alevinos de

tambacu com SMS estão resumidos no fluxograma 1.



Fluxograma 1: Etapas experimentais realizadas para cultivo dos cogumelos do gênero *Pleurotus* com resíduos lignocelulósicos de APOs e a nutrição de alevinos de tambacu.

Experimento 1: pré-compostagem e pasteurização a vapor dos substratos

O processo de pré compostagem e pasteurização foram feitos conforme Siqueira *et al.*, (2012) com algumas modificações. As três espécies de *Pleurotus* foram primeiramente triadas quanto a capacidade de crescimento e frutificação em formulação de substrato (massa seca) contendo 90% fibra de prensagem do endocarpo (PPF) enriquecidas com 10% torta de palmiste (PKC). Os substratos foram preparados por meio de pré-compostagem (7 dias) e esterilização a vapor. A pré-compostagem foi feita por meio da mistura dos substratos que posteriormente foi colocada em caixa metálica com orifícios, com volume 0,8 m³. Após serem empilhados os substratos foram umedecidos com água corrente. A homogeneização e oxigenação das pilhas foram feitas por reviragem a cada dois dias. Os substratos pré-compostados por 7 dias foram transferidos para sacolas de polipropileno com filtros (0,22µm). As sacolas receberam 1,5 kg substrato úmido. A esterilização das 150 sacolas com substratos pré-compostados foi realizada utilizando-se vapor de água canalizado para ambiente fechado (sala de 2x2x2 m) por 12 horas, com temperatura de 110°C ± 4°C. Após a esterilização os substratos foram armazenados em câmara fria (± 4°C) por 12 horas. A inoculação foi executada em câmara de fluxo laminar com 5% de inoculo dos respectivos fungos. Para cada espécie de *Pleurotus* foram feitos 50 repetições. A incubação para colonização dos substratos ocorreu em estufa escura sem controle de temperatura e umidade e a frutificação, em estufas com ventilação, temperatura e umidade controlada.

Experimento 2: Esterilização em autoclave industrial (Agroindústria)

O *Pleurotus ostreatus* CC389 foi escolhido para realizar os experimentos de cultivo fazendo uso das instalações da agroindústria de palma de óleo. O substrato foi preparado por meio das misturas de cachos vazios (EFB), torta de palmiste (PKC), borra do tridecâter (DCPO), cinzas da fibra de prensagem utilizada aquecimento da caldeira (APPG) e o efluente (POME) para ajuste da umidade entre 65 e 70% (Tabela 1).

As biomassas e efluente (POME) foram misturados em betoneiras (equipamento de construção civil) para melhor homogeneização dos substratos. Para avaliar o efeito

da contaminação por outros fungos utilizou-se diferentes estratégias de esterilização, uma vez que as sacolas de polietileno de alta densidade (PEAD), normalmente utilizadas pela fungicultura, tem ponto de fusão abaixo das condições de temperatura/pressão programadas nas autoclaves industriais deste tipo de agroindústria.

Tabela 1. Formulação dos substratos lignocelulósicos e efluentes da agroindústria de palma de óleo (dendê) para o cultivo do *Pleurotus ostreatus* CC389 (Experimento 2).

Formulação: Biomassas e Efluente	Quantidade (Kg)	Massa Seca (%)
Cacho vazio (EFB)*	28,00	28%
Torta de Palmiste (PKC)	20,00	20%
Borra do Tridecâter (DCPO)	50,00	50%
Cinza da Caldeira (APPG)	2,00	2%
Efluente (POME)	50,00	-

*Os cachos vazios foram triturados.

O primeiro lote (L1) de substrato, previamente misturado, foi acondicionado em sacolas PEAD (2 kg de massa úmida) e esterilizados em autoclave comercial (tipo laboratório) por uma hora a 121°C e 1 Atm de pressão. Os lotes de substratos dois (L2) e três (L3) são provenientes do processo de esterilização em autoclave industrial (agroindústria do dendê). Para isso os substratos foram transferidos para sacos de algodão cru (50x80 cm) e colocados nos vagonetes utilizados para esterilização juntos com os cachos com frutos frescos. Esta etapa ocorreu conforme a agenda de trabalho da linha de processamento APO. Os autoclaves industriais tem a programação ajustada para 145°C e aproximadamente 3 Atm de pressão por 90 minutos.

Após a esterilização “industrial” os sacos de panos com substratos foram transferidos para uma sala com ar-condicionado a 15°C, onde permaneceram por 12 horas. Após o resfriamento os substratos foram acondicionados em sacolas PEAD (2 kg de massa úmida) e foram divididos em dois lotes (L2 e L3). O L2 refere-se às sacolas com substratos resubmetidos a esterilização, fazendo uso de autoclave comercial (conforme fora feito com L1). Enquanto que as sacolas com o L3

representam o substrato esterilizado nas condições industriais, ou seja, esterilização única. Os três lotes foram manipulados em sala limpa, fechada e refrigerada a 15°C. Um quarto lote (L4) foi feito como os substratos (sacolas com 2 kg, úmidos) utilizando amostras do processo de mistura, sem nenhum procedimento de esterilização (testemunho). O número de repetições foi de 20 sacolas/substratos por lote (L1, L2, L3 e L4).

Inoculação e Colonização Micelial

A inoculação dos substratos com a massa micelial fúngica foi feita da mesma maneira nos dois experimentos. Os substratos receberam 2% (massa inoculo/massa úmida de substrato) de inoculo de cada fungo (Experimento 1) e *Pleurotus ostreatus* CC-389 (Experimento 2).

Após inoculação, em ambos os experimentos, as sacolas foram transferidas para sala de colonização escura, ventilação por exaustor e temperatura ambiente (33 a 38°C).

O crescimento micelial foi verificado periodicamente para avaliação da contaminação por fungos “verdes”, tais como os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e outros, como fora feito para as sacolas testemunhas (L4 do experimento 2, por exemplo). O tempo de colonização (dias) também foi registrado até o surgimento dos primórdios, que sinaliza o momento de transferência para sala de frutificação.

Frutificação, Produtividade e Eficiência Biológica

Após o surgimento dos primórdios os lotes (L1, L2 e L3) foram colocados na sala de frutificação. As sacolas PEAD foram perfuradas com lâmina (estéril) em diferentes partes, de modo a proporcionar o crescimento dos cogumelos. A temperatura da sala foi ajustada para 16°C por 48 horas e o restante do processo a 25°C. O ambiente teve a umidade ajustada a aproximadamente 90%, fazendo uso de vaporizadores. A ventilação ocorreu por meio de exaustores e iluminação por foto períodos a cada 12 horas.

A colheita ocorreu manualmente, durante quatro semanas, onde foram

contabilizados três fluxos (Fx-1, Fx2 e Fx3). A maioria dos cogumelos foram colhidos quando o píleo atingia o máximo de tamanho (antes da abertura das lamelas). A produtividade da colheita foi determinado pela relação da massa de cogumelos frescos colhidos (g) pelo massa úmida dos substratos, conforme equação 1 (Siqueira *et al.*, 2012).

Equação 1:

Onde:

- P = rendimento. MCF (Massa Cogumelos Frescos em g) e MSU (Massa Substrato Úmido, determinado no início do processo).

A eficiência biológica (EB) foi estabelecida por meio da equação 2 (Siqueira *et al.*, 2012), onde foi feito a relação entre a massa de cogumelos frescos pela massa de substrato inicial em massa seca (g).

Equação 2:

Onde:

- EB = Eficiência Biológica. MCF (Massa Cogumelos Frescos em g) e MSS (Massa Substrato Seca, determinado no início do processo).

Atividades Enzimáticas: substratos colonizados pelos *Pleurotus*

(Experimento 1)

Para obtenção do extrato enzimático bruto, pesou-se 25 g dos substratos totalmente colonizados pelos *Pleurotus* no experimento 1. Adicionou-se 50 mL de água destilada (1:4) em erlenmeyer de 150 mL e solução de triton X-100, como surfactante para ajudar na dessorção das enzimas ligadas aos substratos sólidos. A mistura foi então homogeneizada em shaker (agitação mecânica) durante 40 min a 5° C. O sobrenadante foi filtrado em funil de buchner com papel de filtro e auxílio de

bomba de vácuo, para obtenção do extrato bruto enzimático (enzimas extracelulares). Para evitar contaminações foi adicionado azida sódica junto ao extrato (0,01 mL de solução 1% para cada 50mL de extrato).

Determinação dos Açúcares Redutores - DNS

Para a determinação dos açúcares redutores liberados após reações enzimáticas, utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), originalmente proposto por Miller (1959), com modificações de acordo com protocolo da Embrapa Agroenergia. O método do DNS baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, concomitantemente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Após aquecimento, a solução torna-se avermelhada, sendo lida em espectrofotômetro a 540 nm. O preparo da solução de DNS seguiu o método de Ghose (1987).

Determinação das atividades de holocelulases

Os ensaios enzimáticos para determinação de CMCase (endoglicanase), xilanase, pectinase e mananase presentes no extrato bruto enzimático obtido dos substratos colonizados pelos *Pleurotus* foram realizados utilizando 50 µL de enzima (extrato bruto) e 100 µL de substrato (carboximetilcelulose, xilana, pectina cítrica ou galactomanana), sendo os três primeiros ensaios com solução de 1% do substrato e 0,5% para o último ensaio, que reagiram por 30 minutos a 50°C. Após este tempo foram adicionados 300 µL de DNS (preparado de acordo com 4.12) e os tubos com os ensaios foram fervidos por 10 minutos. Adicionou-se 1,5 mL de água para leitura do ensaio no espectrofotômetro a 540 nm. Para o ensaio de FPase (celulase total) foi utilizado como substrato papel Whatman número 1 em forma de tiras de 1x6 cm, com aproximadamente 50 mg de massa, e 150 µL de enzimas (extrato bruto), que foram incubadas por 1 h a 50°C. Os ensaios de FPase foram interrompidos e analisados como descrito acima para outras holocelulases.

Para determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos foram construídas as curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as cadeias principais dos respectivos polissacarídeos. Para calibração foi utilizado uma solução estoque de 2 mg/mL para cada açúcar redutor quantificado pelo

método DNS, conforme descrito anteriormente (glicose, xilose, manose e ácido galacturônico). Variando a concentração do açúcar redutor com água destilada, assim foram construídos 5 pontos do gráfico de regressão linear, e a partir da equação da reta obtida pelo método DNS. Para todos os ensaios enzimáticos foi utilizado $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ como unidade de açúcar redutor liberada durante todo o tempo do ensaio enzimático. Unidade internacional (UI) representa a quantidade que a enzima necessita para liberar $1\ \mu\text{mol}$ de açúcar redutor por minuto.

Atividades de proteases

O método de determinação das atividades proteásicas foi realizado de acordo com o protocolo de Charney e Tomarelli (1946) com adaptações. Os ensaios para proteases presentes nos substratos colonizados ocorreram em tubos de centrifuga tipo falcon de 15 mL. Foram adicionados 500 μL do filtrado (extrato bruto enzimático), 500 μL de azocaseína, incubados em banho-maria a 37°C por 40 min. Após o término de incubação (40 min) a reação foi paralisada com TCA (ácido tricloroacético). No preparo do branco da amostra para que não haja reação enzimática o TCA é adicionado antes do extrato enzimático. Para o branco do aparelho adicionou 500 μL de azocaseína, 500 μL de tampão acetato de sódio pH 5. As amostras foram a 6000 rpm, por 10 min a 4°C . Os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos, então adicionou-se 1 mL de KOH 0,5 M. A leitura em espectrofotômetro foi a 430 nm.

Para o cálculo da atividade de protease não foi usada curva padrão como a metodologia usando DNS, mas sim uma fórmula, descrita abaixo:

Onde:

- Abs = Absorbância ensaio - Absorbância branco
- t = tempo em minutos no banho-maria;
- V = volume

- EC = ensaio colorimétrico

Determinação das atividades enzimáticas de oxi-redutases

A determinação das atividades enzimáticas de oxi-redutases dos substratos colonizados de *Pleurotus* seguiu protocolo sugerido por Neto (2010). Para a obtenção do extrato, o substrato foi homogeneizado na proporção de 1:5, ou seja, para cada 1 g do meio colonizado, adicionou-se 5 mL de água destilada. Após a homogeneização, o material foi mantido em banho de gelo por 1 hora com agitação manual a cada 15 minutos e em seguida, filtrado com o auxílio de bomba a vácuo.

Para a determinação das atividades de ligninases foi utilizada a equação derivada da Lei de Beer-Lambert:

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = coeficiente de extinção da enzima (absortividade molar $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

R = volume (mL) do sobrenadante;

T = Tempo de reação (min).

Todas as atividades enzimáticas foram expressas em unidade internacional por mL ($\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$), definidas como número de μmol liberado do produto por mL, por minuto, nas condições do teste.

Lacases

A atividade de lacases foi determinada com o uso do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). A mistura reacional para ABTS continha 0,45 mM do ABTS, 90 mM de tampão acetato de sódio pH 5,0, e 1 mL de amostra diluída 10 vezes com água destilada. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 90 segundos a 25°C (WOLFENDEN e WILSON, 1982).

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = Lacase: 36000 L.mol⁻¹cm⁻¹;

R = volume (mL) do sobrenadante

T = Tempo de reação (min).

Atividade de lignina peroxidase

A atividade de LiP foi determinada pela oxidação de álcool veratrílico na presença de peróxido de hidrogênio, segundo Tien e Kirk (1984). O meio reacional foi composto de 500 μL de sobrenadante do extrato enzimático centrifugado, 200 μL de álcool veratrílico (2 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M; pH 3,0) e 200 μL de peróxido de hidrogênio (2 mM). A formação de aldeído veratrílico foi acompanhada pela leitura da absorbância a 310 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP-2000 UV) por 5 minutos, com registros a cada 10 segundos.

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = LiP: 9300 L.mol⁻¹cm⁻¹;

R = volume (mL) do sobrenadante;

T = Tempo de reação (min).

Manganês peroxidases

A atividade de manganês peroxidases foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional consistiu de 50 mg.mL⁻¹ de vermelho de fenol, 50 mM de sulfato de manganês, 50 mM de H₂O₂, 12,5 mM de lactato de sódio, 500 mg.mL⁻¹ de albumina bovina e tampão succinato de sódio pH 4,5, sendo adicionados 0,5 mL de amostra (extrato bruto enzimático). Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40 mL de NaOH, 2M. A formação do

produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância (610 nm).

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = MnP: $460\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$;

R = volume (mL) do sobrenadante;

T = Tempo de reação (min).

Atividade de fitase

Os ensaios enzimáticos de fitases foram mensurados pela quantidade de fósforo inorgânico liberado, seguindo o protocolo sugerido pela Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com). Foram incubados $500\mu\text{L}$ de fitato de sódio e $25\mu\text{L}$ do extrato enzimático durante 30 minutos na temperatura de 37°C . A reação foi então paralisada pela adição de 4mL da solução “color reagent” (molibdato de amônio 10mM , ácido sulfúrico 5N e acetona na proporção 1:1:2. Uma unidade de fitase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar $1\ \mu\text{mol}$ de fosfato inorgânico por minuto a partir de fitato de sódio a 37°C em pH 2,5.

Análises bromatológicas

Todas as amostras foram trituradas no moinho tipo Willey com peneira de 60 mesh. O teor de matéria seca foi determinado em estufa a 105°C por 12 h, e a matéria mineral (cinzas) em forno tipo mufla a 600°C por 3h.

Para a determinação do teor de proteína bruta (PB) foi utilizado o equipamento destilador de nitrogênio Kjeldahl, e o fator de conversão foi de 6,25 (NOGUEIRA, 2005).

O extrato etéreo foi determinado através do extrator de óleo Ankon (Modelo XT-15). As análises das frações de FDN e FDA foram feitas através do equipamento

Ankon (Modelo A220) e a lignina determinada com a adição de ácido sulfúrico 72% no resíduo insolúvel da determinação da FDA (VAN SOEST, 1994).

O teor dos carboidratos não fibrosos foi determinado através da fórmula: $CNF = 100 - [Fibra\ em\ Detergente\ Neutro + Proteína\ Bruta + Cinzas + Extrato\ Etéreo]$. O teor de Hemicelulose através do FDN menos o FDA.

Análise elementar (CHN)

A determinação do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio nos substratos foi realizada em um analisador elementar (CHN/S 2400 series II, Perkin Elmer, EUA). As amostras foram pesadas (1,5 – 2,5 mg) em cápsulas de estanho em balança analítica com precisão de 0,1 mg. Os elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio foram analisados simultaneamente, mediante curva analítica obtida com padrões secos e de alta pureza, com tempo de queima de 600 segundos, entre temperatura de 926-1000°C e fluxo de gás hélio. As análises foram realizadas em duplicata. Em cada análise obtiveram-se os valores percentuais de C, H e N presentes em cada amostra.

Juvenis de tambacu

Os alevinos de tambacu foram adquiridos em lojas de piscicultura na cidade de Belém, Pará, apresentando o tamanho médio de cinco centímetros. Os alevinos foram transportados, seguindo as recomendações da empresa quanto ao tipo de recipiente para transporte, qualidade da água, oxigenação e tempo de descolamento até os tanques de recria, para minimizar o estresse e mortalidade dos animais.

Os alevinos foram transferidos para tanques de aclimação existentes na Embrapa Amazônia Oriental, Belém/PA, por 20 dias. Durante este período os animais foram nutridos com ração padrão até chegarem a fase juvenil.

Preparo das rações e nutrição dos juvenis de tambacu

A Estação de Piscicultura da Embrapa Amazônia Oriental foi o local onde foram preparadas as rações e o experimento para avaliação da digestibilidade por parte dos juvenis de tambacu.

Três tipos de rações foram preparadas para a realização do experimento de digestibilidade. A tabela 2 descreve a formulação para ração controle (RC), ração com a adição de torta de palmiste (RTP) e a terceira, a ração com adição do substrato do cultivo do cogumelo (SMS). O SMS e a torta do palmiste foram secos a 105°C por 24 horas e triturados em moinhos de faca (Maqtron B-611) (Figura 4).

Tabela 2. Proporção dos ingredientes nas formulações para rações dos juvenis de Tambacu. Ração Controle (RC), Ração com Torta de Palmiste (RT) e na Ração com SMS (RSMS).

INGREDIENTE	RC	RT	RSMS
	-----%-----		
Farelo de Soja	37.90	26.50	26.50
Farelo de Milho	34.20	23.94	23.94
Farelo de Trigo	10.00	7.00	7.00
Farinha de Peixe	10.00	7.00	7.00
Óleo de Soja	4.10	2.87	2.87
Fosfato Bicálcico	2.50	1.75	1.75
Premix Mineral	0.75	0.525	0.525
Metionina	0.25	0.175	0.175
Lisina	0.20	0.14	0.14
Óxido de Cromo III	0.10	0.10	0.10
Torta de Palmiste	-	30.00	-
SMS*	-	-	30.00
Total	100.0	100.0	100.0

*SMS de *Pleurotus ostreatus* CC389 do experimento 2, Lote 3.

Figura 4. Preparado do SMS para adição na formulação da ração para os juvenis de Tambacu. A) SMS; B) Triturador; C) SMS triturado e pronto para ser adicionado na ração.

Foram preparados 10 kg para cada tipo de formulação básica que foi utilizado no preparo das rações. Os ingredientes foram levados a um misturador de rações (marca G. Paniz, modelo AM 25), foram adicionados 1,5 L de água na ração I e 3,0L nas rações II e III, com o objetivo de ajustar a umidade da dieta. As rações foram misturadas por aproximadamente 30 minutos e posteriormente seguiram para o processo de peletização (Figura 5). Depois de peletizadas as rações foram secas por 12

horas a 60° C. Após secagem as rações foram embaladas e guardadas em freezer a -22 °C.



Figura 5. Imagens do preparo das rações para nutrição dos juvenis da Tambacu. A) Mistura dos ingredientes da ração; B) Peletização; C) Secagem dos pellets. D) Rações peletizadas: RC= Ração Controle; RSMS= Ração com SMS; Ração com Torta de Dendê.

Utilizou-se um marcador externo nas três dietas, o óxido de cromo III, que adicionado a um alimento ou dieta permite calcular o coeficiente de digestibilidade (ANDRIGUETTO *et al*, 1988).

Após aclimação os juvenis de tambacu foram divididos em três grupos, contendo 30 peixes em cada grupo (Figura 6). Os animais foram colocados em basquetas acopladas a um sistema de recirculação contínua de água, com filtro físico e biológico e aeração durante 24 horas.



Figura 6. Sistema de acondicionamento dos juvenis de tambacu que antecederam os experimentos para avaliação da digestibilidade aparente.

Coleta e tratamento das amostras fecais dos juvenis de tambacu

Os dois grupos que não tiveram coleta de fezes foram alimentados *ad libitum* (à vontade) três vezes durante o dia.

O grupo que seguiu para a coleta das fezes foi alimentado quatro vezes ao dia: às 9:00h, 15:00h, 16:00h e 17:00h. Às 18:00h os peixes foram levados à garrafas pet acopladas com tubos Falcon de 50 mL (incubadoras adaptadas ao sistema Guelph) e permaneceram até manhã seguinte (6:00h). Esse sistema também foi acoplado à caixas de isopor com gelo para preservação das amostras. Depois da retirada dos tubos

com as amostras, os animais foram levados às basquetas para descanso. Essa rotina foi feita para os grupos subsequentes. O pH da água foi determinado diariamente para controle da qualidade da água.

Depois de coletadas, as amostras foram centrifugadas (CELM, modelo LS – 3 Plus), por 10 minutos, a 3.000 rpm. Separada a parte líquida da sólida, as fezes foram pesadas em balança analítica (SHIMADZU – modelo - AUY220) e, posteriormente, secas em estufa (Nova Ética), por 12 horas, a 60 °C. Depois foram novamente pesadas e guardadas em freezer a -22 °C, para posterior análise de composição. Foram coletadas 5g de fezes por grupo e o experimento durou 32 dias.

Digestibilidade aparente dos ingredientes das rações pelos peixes

Para o cálculo do coeficiente de digestibilidade aparente das rações, foi utilizada a fórmula citada por Ramirez (2005). Também foi calculado o índice de recuperação do cromo (Cr₂O₃) através da equação descrita por Lobo Junior *et al.* (2001).

Calculo da Digestibilidade Aparente (CDA)

Índice de Recuperação do Cromo nas Fezes

Resultados e Discussão

Eficiência biológica e produtividade

O experimento 1 foi orientador para a escolha de uma espécie para outros experimentos. Dentre as três espécies, *P. ostreatus* CC389 foi o fungo que apresentou melhor eficiência tanto no crescimento micelial quanto na produção de corpos de frutificação, produtividade e eficiência biológica (Tabela3). Enquanto que *P. ferulae*

CC111 e *P. albidus* CC028 não frutificaram, apesar da rápida colonização entre 21 e 25 dias, respectivamente. Estas duas espécies também foram as mais suscetíveis a contaminação, com 12,5 e 18,3%, respectivamente. A espécie *P. ostreatus* tem sido cultivado em temperaturas que variam entre 15 e 28°C, com resultados significativos, enquanto que as espécies *P. ferulae* e *P. albidus*, normalmente são colocadas para frutificar em estufas com temperaturas próxima dos 15°C. A estufa de frutificação teve a temperatura ajustada por volta dos 25°C com uso de exatores (sem ar condicionado), isso pode ter afetado a frutificação das duas espécies (Tabela 3). Assim, a espécie *P. ostreatus* CC389 foi selecionado para um segundo experimento, em função das condições de cultivo das estufas.

Tabela 3. Eficiência biológica, produtividade, tempo de colonização e contaminação dos *Pleurostus* nos substratos formulados com biomassas lignocelulósicas e efluentes da agroindústria da palma de óleo (dendê).

Cultivos	Macrofungos / Espécie	Colonização (dias)	Contaminação*** (%)	Produtividade %	Eficiência biológica (EB) %
Experimento #1	<i>P. ostreatus</i> CC389	19	6,3%	18.60±1,47	41.33±1,49
	<i>P. ferulae</i> CC111	21	12,5%	0*	0*
	<i>P. albidus</i> CC028	25	18,3%	0*	0*
Experimento #2	<i>P. ostreatus</i> CC3899 – L1**	29	7,8%	8.9±0.98	22,9±1,04
	<i>P. ostreatus</i> CC3899 – L2**	28	12,4%	8.1±1,25	21,3±1,31
	<i>P. ostreatus</i> CC3899 – L3**	25	17,1%	10,7±1,09	23,3±1,22
	<i>P. ostreatus</i> CC3899 – L4**	-	100%	-	-

*Espécies de *Pleurotus* cultivados normalmente em temperaturas em torno de 15°C. Condições de cultivo neste experimento foi de aproximadamente 25°C.

**L1-L2-L3-L4: Diferentes formas de esterilização dos substratos utilizados no experimento 2. Sendo que o L4 foi utilizado como controle, ou seja, sem esterilização e sem inoculação do *P. ostreatus*.

***Contaminação por fungos filamentosos esporulantes “verdes e laranjas”, provavelmente como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, entre outros.

A produtividade e EB *P. ostreatus* CC389 no experimento 2 foi mensurada nos três lotes de cultivo (Tabela 3), em que se percebe resultados similares para ambas

avaliações. A produtividade variou entre 8,1 e 10,7% para os três lotes, enquanto que a EB ficou entre 21,3 e 23,3%. A contaminação por fungos “verdes” ou “laranjas” foi de 100% no L4, que fora controle das misturas sem nenhum tipo de esterilização. Entre os três lotes o L3 foi o que mais contaminou com 17,1%. No L3 foi feita apenas a esterilização na autoclave industrial, porém foi feita em sacos de pano, para depois serem colocados nas sacolas PEAD (esterilizadas). Os demais lotes apresentaram menores índices de contaminação por fungos esporulantes, mas com valores ainda preocupantes. Assim, se faz necessário buscar um recipiente que resista às condições de temperatura e pressão das autoclaves industriais da APO, para minimizar as contaminações. O tempo de colonização dos substratos e início na formação dos primórdios ficou entre 25 e 29 dias (Tabela 3).

A opção de colher os cogumelos em mais de um fluxo, também favorece o aparecimento de contaminações, além de redução da produção, principalmente a partir do terceiro fluxo. Entretanto, para pequenas produções não mecanizadas, ainda é válida a colheita entre dois e três fluxos. Em sistemas automatizados de preparo, esterilização e inoculação normalmente faz-se apenas uma colheita na produção de cogumelos do gênero *Pleurotus*. O decréscimo da produtividade e eficiência biológica a partir do 2º fluxo de colheita pode ser explicado pela diminuição dos nutrientes do substrato ou pelo acúmulo de substâncias tóxicas desfavoráveis à frutificação (UPADHYAY *et al.*, 2002; ALANANBEH *et al.*, 2014).

Marlina *et al.* (2015) descrevem o cultivo de *P. ostreatus* em formulações com diferentes concentrações de cachos vazios (EFB) suplementadas com farelo de arroz, CaC₂ e fertilizante mineral (TSP). O macrofungo quando cultivado em formulação com 93% de EFB; 4,4% de farelo de arroz; 1,3% de CaC₂ e 0,44% de TSP apresentou rápido crescimento micelial, colonizando todo o substrato em 35 dias. Nessa formulação foram realizados três fluxos de colheita com rendimento de 204,2g, 120,7g, 32,2g, respectivamente. No entanto quando os autores diminuíram a concentração de EFB na formulação para 87% e aumentaram a concentração de farelo de arroz para 10% o mesmo fungo cresceu de forma mais lenta, porém o rendimento aumentou nos três fluxos de colheita: 289,7g, 86,3g e 177,4g.

Alananbeh *et al.* (2014) avaliaram diferentes resíduos agroindustriais (folhas de boobialla, palmeira, serragem, palha de trigo) como substrato para produção de *Pleurotus ostreatus* e concluíram que palha de trigo misturado com palmeira na

proporção de 75:25 foi a melhor formulação para produção de cogumelos. Nessa formulação o rendimento de *P. ostreatus* foi de 120 g/saco e eficiência biológica (EB) de 250%. Os mesmos autores também relatam que houve diminuição da produção de cogumelos entre o 1º fluxo de colheita e o 2º fluxo.

Razak (2013) também usou resíduos da dendeicultura para produção de *Auricularia polytricha*, com produtividade de 43%, em serragem misturado com óleo de palma (90:10). A produtividade de 40% quando cultivou o mesmo fungo em serragem misturado com o cacho vazio (50:50).

A produtividade e eficiência biológica de *P. ostreatus* no presente trabalho ficaram abaixo dos valores considerados ideais descritos na literatura, em decorrência de fatores como: i) poucas formulações de substratos; ii) mecanismos de esterilização dos substratos; iii) controle de temperatura na frutificação.

No entanto, os resultados encontrados neste trabalho permitem inferir que é possível produzir esta espécie de cogumelo associado a indústria do óleo de palma. Para este cenário promissor, será necessária ação conjunta entre indústrias de processamento de óleo de palma e de cultivo de cogumelos comestíveis. As condições como temperatura e pressão das autoclaves utilizadas no processamento dos cachos com frutos do dendê são de aproximadamente 145°C e 4 atm, ou seja, mais que suficiente para esterilização dos substratos. Entretanto, ajustes serão necessários, tais como alternativas de recipientes para acondicionar os substratos que suportem tais condições. A geração de energia elétrica por queima de fibra de prensagem feito nas agroindústrias também é outro item que poderá favorecer a ação, uma vez que a implementação de sistemas de ar condicionado para o período de frutificação, abrirá o leque de opções de espécies de cogumelos a serem cultivadas.

A associação da dendeicultura com a fungicultura tem sido promovida em países como a Malásia, pois o país gera centenas de milhares de toneladas de resíduos lignocelulósicos da cultura da palma de óleo. Assim, diante da grande quantidade de resíduos de palma de óleo e da sua constituição heterogênea, de celulose (40 a 50 %), hemicelulose (25 a 35%) e lignina (25 a 35%) e dada sua grande quantidade de macro e micronutrientes, estes têm se mostrado promissor no uso como substrato para cultivo de cogumelos comestíveis (CHIEJINA e OSIBE, 2015; MOHAMMAD *et al.*, 2012). A cada milhão de toneladas de cachos de frutos frescos processados, são gerados aproximadamente 65.000 toneladas de POME - Palm Oil Mill Effluent

(SUDIRMAN *et al.*, 2011) se tornando um dos maiores problemas dessa indústria, que pode ser utilizado para ajustar a umidade dos substratos para os cultivos de cogumelos, além de fornecer micronutrientes ao macrofungo.

Atividades Enzimáticas

Através das atividades enzimáticas, pode-se observar que as três espécies de *Pleurotus* após a colonização total dos substratos no experimento 1 tiveram atividades para proteases similares (Figura 7). A lacase foi mensurada de forma significativa em *P. ostreatus* CC389 e *P. albidus* CC028. As peroxidases totais foram detectadas em *P. albidus* CC028. As CAZYmes, tais como, exoglicanase, FPases, beta-glicosidase e xilanase foram observadas para as três espécies, entretanto a nível basal.

Figura 7. Atividades enzimáticas observadas nos extratos brutos obtidos do cultivo dos três *Pleurotus* após a colonização total do substrato (experimento #1).

Análises bromatológicas

Quanto às análises bromatológicas, a tabela 4 refere-se aos dados obtidos das amostras do experimento 1, enquanto que a tabela 5 refere-se ao experimento 2. As biomassas colonizadas e os SMS apresentam teores próximos dos 10% e lipídios que podem variar entre 3,79 e 5,14% (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Análise bromatológica do experimento #1 referente aos ingredientes, substratos formulados, substratos colonizados, SMS e cogumelos.

Fontes de origem	Amostras	MS*	CINZ*	EE*	FDN*	FDA*	LIG*	PB*	HEM*	CNF*
Ingredientes (Exp. #1)	FPD	94,47	4,06	7,74	73,16	51,61	22,38	6,61	21,55	8,43
	TPD	97,89	2,50	9,34	61,32	45,77	16,12	11,41	15,55	15,43
Substratos (Exp.#1)	F1E1-Pré	94,75	3,83	5,56	73,49	50,59	21,77	6,39	22,90	10,73
	F1E1-Pós	96,76	3,70	8,90	69,77	50,27	24,62	8,45	19,50	9,18
Substratos colonizados (Exp. #1)	CC389	95,79	3,69	4,58	67,94	50,73	19,74	9,13	17,21	14,66
	CC028	95,25	4,54	3,79	72,14	54,41	22,74	9,88	17,73	9,65

	CC111	95,50	3,78	5,14	69,42	52,33	22,17	9,19	17,09	12,47
SMS (Exp. #1)	CC389	95,11	11,40	0,96	55,83	41,60	11,32	9,90	14,23	21,91
Cogumelos (Exp. #1)	CC389	95,31	8,64	2,04	45,00	22,02	15,00	26,21	22,98	6,92

Legenda: MS = Matéria Seca; Cinz = Cinzas; EE = Extrato Etéreo; FDN = Fibra em Detergente Neutro; FDA = Fibra em Detergente Ácido; LIG = Lignina; PB = Proteína Bruta; HEM = Hemicelulose; CNF = Carboidratos não fibrosos. (Torta do palmiste do dendê - TPD e Fibra de prensagem do dendê - FPD), das formulações dos substratos (FIE1 PRÉ E PÓS), do Colonizado (CC 389, CC28 e CC111), do SMS (composto pós cultivo do cogumelo composto por: 23 kg de cacho vazio prensado + 2 kg de torta de palmiste + 50 kg de borra do tridecnater + 2 kg de cinza de caldeira = 50 l de POME), das Rações com Torta de Palmiste (RT), Ração com SMS (RSMS) e Ração Controle (RC), e da Frutificação (Cogumelo CC 389).

Tabela 5: Análise bromatológica do experimento #2 referente aos ingredientes, substratos formulados, substratos colonizados, SMS, cogumelos e formulações das rações.

Fontes de origem	Amostras	MS*	CINZ*	EE*	FDN*	FDA*	LIG*	PB*	HEM*	CNF*
Ingredientes (Exp. #2)	FPD	94,47	4,06	7,74	73,16	51,61	22,38	6,61	21,55	8,43
	TPD	97,89	2,50	9,34	61,32	45,77	16,12	11,4 ₁	15,55	15,43
	EFB	94,47	4,06	7,74	73,16	51,61	22,38	6,61	21,55	8,43
	DCPO	97,89	2,50	9,34	61,32	45,77	16,12	11,4 ₁	15,55	15,43
Substrato (Exp.#2)	Antes esterilização industrial	94,75	3,83	5,56	73,49	50,59	21,77	6,39	22,90	10,73
	Depois esterilização industrial	96,76	3,70	8,90	69,77	50,27	24,62	8,45	19,50	9,18
Substrato colonizado (Exp. #2)	CC389 – L1	95,79	3,69	4,58	67,94	50,73	19,74	9,13	17,21	14,66
	CC389 – L2	95,25	4,54	3,79	72,14	54,41	22,74	9,88	17,73	9,65
	CC389 – L3	95,50	3,78	5,14	69,42	52,33	22,17	9,19	17,09	12,47
SMS	CC389 – L3	95,11	11,40	0,96	55,83	41,60	11,32	9,90	14,23	21,91
Cogumelos	CC389 – L3	95,31	8,64	2,04	45,00	22,02	15,00	26,2 ₁	22,98	6,92
Rações	RT	89,71	6,43	1,86	33,09	20,27	6,28	25,8 ₆	12,82	32,76

RSMS	91,28	8,53	1,11	32,85	20,97	5,72	25,7 8	11,88	31,73
RC	96,50	10,45	1,48	16,93	7,32	1,76	28,5 7	9,61	42,57

Legenda: MS = Matéria Seca; Cinz = Cinzas; EE = Extrato Etéreo; FDN = Fibra em Detergente Neutro; FDA = Fibra em Detergente Ácido; LIG = Lignina; PB = Proteína Bruta; HEM = Hemicelulose; CNF = Carboidratos não fibrosos. (Torta do palmiste do dendê - TPD e Fibra de prensagem do dendê - FPD), das formulações dos substratos (FIE1 PRÉ E PÓS), do Colonizado (CC 389, CC28 e CC111), do SMS (composto pós cultivado do cogumelo composto por: 23 kg de cacho vazio prensado + 2 kg de torta de palmiste + 50 kg de borra do tridecnater + 2 kg de cinza de caldeira = 50 l de POME), das Rações com Torta de Palmiste (RT), Ração com SMS (RSMS) e Ração Controle (RC), e da Frutificação (Cogumelo CC 389).

As rações preparadas para os juvenis de tambacu também foram avaliadas quanto à bromatologia (Tabela 5). Os teores de proteína total variaram entre 25 e 28%, enquanto que o extrato etéreo (lipídios totais) variou entre 1,11 e 1,86%. Os valores de FDA e FDN para ração com fibra de dendê e SMS tiveram valores aproximados de 20 e 33% respectivamente, enquanto que a ração controle apresentou 7,32% (FDA) e 16,93% (FDN) (Tabela 5). Assim as rações com fibra de dendê e SMS apresentaram maior disponibilidade de fibras que podem interferir na ganhas de energia de monogástrico, como peixes. A ração controle também apresentou maior quantidade de carboidratos não fibrosos 42,57%, enquanto que a rações com fibra de dendê e SMS 32,76 e 31,73%, respectivamente (tabela 5). O SMS apresenta não somente a biomassa vegetal, mas também biomassa microbiana, diferentemente das duas outras formulações.

Digestibilidade da ração pelos juvenis de tambacu

A análise bromatológica das fezes foi realizada para determinar os valores residuais de proteína total, extrato etéreo e fibras. A proteína total das fezes nas rações com fibra de dendê e SMS foi menor que as apresentadas no controle

A tabela 7 mostram os coeficientes de digestibilidade aparente das rações utilizadas no experimento com juvenis de tambacu. Na ração controle os valores de digestibilidade aparente para matéria seca, extrato etéreo e proteína bruta foram menores que os resultados encontrados no trabalho de Braga *et al.* (2009) em dieta referência utilizando feno.

A ração contendo torta de dendê (RTD) obteve dados de coeficiente de digestibilidade para matéria seca (-1954), cinzas (-1236), extrato etéreo (-264) e proteína bruta (-418) negativos. Resultados negativos também foram encontrados por Pezzato *et al.* (2002) analisando digestibilidade aparente em tilápia do Nilo, onde encontraram o valor médio do coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca de -21,57%, valor semelhante ao encontrado neste trabalho que foi de -21,53 (RSMS). Os autores explicam que estes resultados podem estar relacionados a vários fatores, tais como a presença dos produtos digestórios acrescidos à ingesta, provenientes do estômago e hepatopâncreas dos animais; e tais secreções digestórias aumentam a concentração de MS, PB e EE, diluindo o marcador externo (Cr₂O₃) e possibilitando essas distorções nos resultados.

O CDA (%) matéria seca do SMS foi semelhante ao encontrado no trabalho Pezzato *et al.* (2002), onde avaliou o coeficiente de digestibilidade aparente de uma ração purificada marcada com indicador externo óxido de cromo em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). Segundo MORO *et al.* (2015), rações purificadas e semipurificadas são compostas por ingredientes de alta qualidade e digestibilidade, com composição química bem definida, e diferem entre si pelo tipo de ingrediente utilizado.

Os animais foram mantidos em sistema semelhante ao utilizados neste trabalho (Sistema Ghelf). A digestibilidade foi avaliada ao longo do intestino (terço proximal, terço intermédio e terço distal) através da obtenção das fezes pelo método de dissecação.

Pedrosa (2014) salienta que quando o óxido de cromo for utilizado nos ensaios de digestibilidade, as coletas das fezes devem ser feitas a partir do terceiro dia de alimentação para que ocorra a total recuperação do marcador. O autor ainda comenta que vários outros fatores interferem nos resultados de digestibilidade. Entre eles, o método de coleta utilizado, fatores biológicos e ambientais (tamanho, peso e espécie de peixe utilizada, temperatura), erros experimentais, equação utilizada para o cálculo e diferenças no processamento, qualidade e composição química das matérias-primas. Neste trabalho, as basquetas para acomodação dos alevinos pode ter interferido, pois, o tambacu, espécie de crescimento rápido, foi acomodado neste recipiente pequeno contendo 30 alevinos por grupo.

Os coeficientes de digestibilidade aparente de extrato etéreo (67,1%) e da proteína bruta (60,0%) do SMS foram maiores que os valores obtidos por Pezzato *et al.* (2002) nos coeficientes de digestibilidade aparente de matéria seca e proteína bruta obtidos por dissecação das porções intermediária e distal do intestino de tilápia do Nilo.

Comparando-se os percentuais de CDA nas dietas controle e ração contendo SMS, em relação aos teores de extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB), observa-se que a RSMS obteve um valor maior no teor de EE (6,29%) e um teor menor de PB (2,30%).

O SMS tem potencial para ser utilizado na nutrição de peixes, em substituição aos ingredientes proteicos de origem animal (Ex: farinha de peixe e farinha de víscera), proteicos de origem vegetal (ex: farelo de soja e de algodão), energéticos (ex: Milho e farelo de trigo) e dos óleos vegetais (ex: óleo de soja), sem que ocorra perdas no coeficiente de digestibilidade aparente, e sem interferir na palatabilidade da ração

Pedrosa (2014) relata que a farinha de peixe é responsável por até 60% da composição da dieta de peixes de cativeiro que em 2008, 67% da produção mundial de peixes foi destinada a produção de farinha de peixe. O autor ainda destaca que a substituição da farinha de peixe por outras fontes proteicas amenizaria a pressão por produtos pesqueiros e reduziria os custos das rações para a aquicultura.

De acordo com Da Silva (2016), o resíduo do composto para produção de cogumelos pode ser direcionado para diversos fins agropecuários gerando renda, inclusive no uso de rações, pois o exaurido resultante do processo de frutificação possui substâncias como polímeros de β -glucanos, conhecidas por sua atuação como estimulantes da atividade imunológica do hospedeiro, mesmo após a colheita dos cogumelos.

Os resultados encontrados nesse trabalho corroboram com o modelo de biorrefinaria proposto por Rodrigues (2011), pois a partir do cultivo de cogumelos comestíveis foi possível converter a biomassa lignocelulósica da Agroindústria da Palma de Óleo em aditivo para ração de alevinos de tambacu. Assim, a combinação da tecnologia da dendeicultura e da fungicultura possibilitou a criação de um produto com valor agregado.

Considerações finais

O principal objetivo desse trabalho foi demonstrar que é possível integrar a cadeia produtiva do óleo de palma e fungicultura (cogumelos comestíveis), fazendo uso dos resíduos lignocelulósicos, efluentes e estruturas de esterilização/vapor para minimizar os custos de instalações de equipamentos, tais como autoclaves, além de gerar alimentos para os restaurantes das agroindústrias e vendas no mercado local.

Dessa forma, em estudos posteriores visando obter a máxima eficiência biológica e produtividade, parâmetros como relação C/N, pH, umidade, quantidade de inóculo inicial devem ser ajustados. Além de testar diferentes recipientes para suportar as condições de esterilização industrial.

Os resultados obtidos no trabalho mostram que os resíduos da dendecultura têm potencial para uso como substrato de cultivo para cogumelos e que o SMS (*Spent Mushroom Substrate*) pode entrar em formulações de rações para peixes, principalmente em regiões como os arredores de Belém/PA, por terem a cultura do consumo da carne de pescado e um polo de colônia japonesa que pode fomentar o consumo de cogumelos comestíveis, por força da tradição cultural.

Referências

ALVES, Sérgio Augusto Oliveira. Sustentabilidade da agroindústria de palma no Estado do Pará. 2011. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ALVES, S. A. O. *et al.* Caracterização dos recursos genéticos dos plantios de dendê no Estado do Pará. *Bioenergia em revista: diálogos*, a. 3, n. 1, p. 20-31, jan/jun., 2013.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I. **Nutrição animal**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1988. v. 1, p. 71-75.

ATNAW, S. M.; SULAIMAN, S. A.; YUSUP, S. Influence of fuel moisture content and reactor temperature on the calorific value of syngas resulted from gasification of oil palm fronds. **The Scientific World Journal**, Malásia, p. 1-10, 2014.

BARCELOS E.; RIOS S.D.A; CUNHA R.N.V., et al. (2015) Oil palm natural

diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**.

BIBBINS-MARTÍNEZ, M. *et al.* Enzymatic and expression profiling of oxidases produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation in the presence of Remazol Brilliant Blue R (RBBR) and Yellow Azo (AYG) dyes. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, México, v. 4, n. 5, p. 17-25, nov., 2014.

BRABO, M. F. *et al.* Competitividade da cadeia produtiva da piscicultura no nordeste paraense sob a perspectiva dos extensionistas rurais. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 44, n. 5, set/out., 2014.

BRAGA, L. G. T. *et al.* Inclusão de celulose em rações para juvenis de tambacu. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.15, n.4, p.947-956 out/dez., 2014.

BRAGA, Z. C. A. C. *et al.* Avaliação do consumo e digestibilidade aparente de rações com diferentes níveis de farelo de coco. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 249-256, jan/mar., 2009.

CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, Brasil, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHEW, T. L. *et al.* Catalytic processes towards the production of biofuels in a palm oil and oil palm biomass-based biorefinery – review. **Bioresource Technology**. V. 99, p. 7911-7922, 2008.

CHIEW, Y. L. *et al.* Current state and environmental impact assessment for utilizing oil palm empty fruit bunches for fuel, fiber and fertilizer - A case study of Malaysia. **Biomass and Bioenergy**, v. 51, p. 109-124, 2013.

CHIEJINA, N. V.; OSIBE, D. A. Oil palm fruit promotes the yield and quality of *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer, an edible Nigerian mushroom. **African Journal Biotechnology**, Nigeria, v. 14, n. 14, p. 1195-1200, 2015.

CONFORTINI, Fernanda Grison. **Produção de biomassa fúngica da linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer em cultura submersa**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

DA LUZ, J. M. R. *et al.* Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal Microbiology**, Brasil, p. 1508-1515, 2012.

DA SILVA, Amanda Souza Calixto. **Parâmetros industriais para produção de**

Pleurotus ostreatus. 2016. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, 2016.

DASHTBAN, M. *et al.* Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **Int. J. Biochem. Mol. Biol.** Canadá, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.

DE LA RUBIA, T. *et al.* Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the lignolytic fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. **Research in Microbiology**, Espanha, v. 153, p. 547-554, 2002.

DIAS, E. S. *et al.* Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, nov/dez. 2003.

DIAS, E. S. *et al.* Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, nov/dez. 2003.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 795-803, jul/ago., 2010.

EIRA, F. C. *et al.* Shiitake Production in corn cob substrates. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Brasil, v.4, n.2, p.141-148, 2005.

FIGUEIRÓ, Gláucia Garcia. **Influência do substrato no cultivo e na composição química do cogumelo *Pleurotus florida***. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Ilha Solteira, 2009.

FORTES, Bruno Duarte Alves. **Métodos de avaliação de alimentos para aves**. 2011. 46 f. Seminário (Doutorando em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS. **Projeto potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica piscicultura**. 2003. Brasil, 2003, 72 p.

FURLAN JÚNIOR, J. **Dendê: manejo e usos dos subprodutos e dos resíduos**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Documentos 246. 2006. Belém, 2006, 37 p.

GARCIA-NUNEZ, J. A. **Evolution of Palm Oil Mills into Biorefineries**, Washington State University, 2015. Ph.D. dissertation.

GILBERT, N. Palm-oil boom raises conservation concerns: Industry urged towards sustainable farming practices as rising demand drives deforestation. **Nature International Weekly Journal of Science**, v. 484, p. 14-15, 12 jul/ 2012.

KADIRI, M.; MUSTAPHA, Y. The use of spent mushroom substrate of *L. subnudus* Berk as a soil conditioner for vegetables. **Bayero Journal of Pure and Applied**

Sciences, Nigéria, v. 3, n. 2, p. 16 – 19, dez., 2010.

KARINGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of microbial in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme Research**, India, p. 1-12, 2011.

KARP, S. G. et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v. 56, n. 4, p. 679-689, jul/ago., 2013..

KURNIA, J. C. et al. Advances in biofuel production from oil palm and palm oil processing wastes: A review. **Biofuel Research Journal**.V. 9, p. 332-346, 2016.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems – an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, USA, v. 25, p. 1–30, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsões e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. 2016. Brasil, 2016, 115 p.

LIMA, S. M. V. *et al.* Desempenho da cadeia produtiva do dendê na Amazônia Legal. 2002. 164 f. Trabalho de cooperação SUDAM/Fundação de Apoio ao desenvolvimento da UFPE – Ministério da Integração Nacional, Belém, 2002.

LOBO JÚNIOR, M. F. *et al.* Coeficiente de digestibilidade aparente pelos métodos de indicadores e coleta total de fezes em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Brasil, v.53, n.6, p.691-694, 2001.

MBA, O. I. et al. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review. **Food Bioscience**, v. 10.P. 26-41, 2015.

MADAKI, Y. S.; SENG, L. Palm oil Mill effluent (POME) from Malaysia palm oil mills: waste or resource. **International Journal of Science, Environment and Technology**, Malásia, v. 2, n. 6, p. 1138 – 1155, 2013.

MARTINS, Marcelo Gaspar. **Complexo enzimático SFF em rações para juvenis de Tilápia do Nilo e Tambacu**. 2014. 57 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

MARTOS, Emerson Tokuda. **Aditivos microbianos no processo de compostagem e na cama de cobertura para o cultivo do cogumelo *Agaricus brasiliensis***. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – Minas Gerais, 2009.

MOHAMMED, N.; ALAM, M. Z.; KABBASHI, N. A.; AHSAN, A. Effective composting of oil palm industrial waste by filamentous fungi: a review. **Resources, Conservation and Recycling**, Malásia, v. 58, p. 69–78, 2012.

NETO, João Ronaldo Tavares de Vasconcellos. **Diversidade e seleção de fungos basidiomicetos afiloforóides para produção de enzimas lignocelulolíticas em área de mata atlântica do sul da Bahia.** 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) **Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)**, Feira de Santana/BA, 2010.

NOGUEIRA, A. R. DE A. **Manual de Laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos** / Ana Rita de Araújo Nogueira, Gilberto Batista de Souza. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 334p., 2005.

NORHAIZAN, M. E. *et al.* Palmoil: Features and applications. **Lipid Technology**, v. 25, n. 2, p. 39-42, 2013.

OLIVEIRA FILHO, Paulo Roberto Campagnoli de. **Coeficiente de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen*.** 2005. 49 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2005.

OLIVEIRA, M. A. *et al.* Produção de inoculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet – CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, Brasil, v.27, p. 84-87, ago., 2007.

OLIVEIRA, Paulo Andrade de. **Torta de dendê em dietas para vacas leiteiras em pastagem com *Brachiaria brizantha*.** 2015. 136 f. Tese (Doutorado em zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga/BA, 2015.

PARK, J. H. *et al.* Spent mushroom substrate influences Elk (*Cervus Elaphus Canadensis*) hematological and serum biochemical parameters. **Asian-Aust. J. Anim. Sci., Coréia**, v. 25, n. 3, p. 320-324, mar., 2012.

PEDROSA, Ricardo Uriel. **Digestibilidade de ingredientes proteicos e energéticos para crescimento de bijupirá (*Rachycentron canadum*).** 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

PEREIRA, Bruno Henrique Silva. **Uso de complexo em dietas para Tilápia do Nilo: digestibilidade enzimática, desempenho produtivo e parâmetros fisiológicos.** 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal, 2014.

PEZZATO, L. E. *et al.* Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 965-971, 2002.

PIMENTA, M. E. S. G. *et al.* Desempenho produtivo e digestibilidade pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) alimentada com dietas suplementadas

com níveis crescentes de silagem ácida de pescado. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1953-1959, nov/dez., 2008.

PINTO, A. C. *et al.* Biodiesel: an overview. **J. Braz. Chem. Soc.**, Brasil, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.

PLÁCIDO, J.; CAPAREDA, S. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 2, n. 23, 2015.

POLLEGIONE, L.; TONIN, F.; ROSINI, E. Lignin-degrading enzymes. **The FEBS Journal**, Itália, v. 282, p. 1190-1213, 2015.

PRASERTSAN. S. *et al.* Biomass and biogas energy in Thailand: Potential, opportunity and barriers. **Renewable Energy**, v. 31, p. 599-610, 2006.

RAMÍREZ, Adriana Patrícia Muñoz. **Utilização de carboidratos digestíveis em dietas para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holemborg, 1887)**. 2005. 137 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2005

RAZAK, Dang Lelamurni Binti Abd. **Cultivation of *Auricularia polytrichia* Mont. Sacc (Black Jelly Mushroom) using oil palm wastes**. 2013. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade da Malásia, 2013.

RESENDE, E. K. Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. *Aquabrazil*. **R. Bras. Zootec.**, Brasil, v.38, p.52-57, 2009.

ROY, S. *et al.* Evaluation of spent mushroom substrate as biofertilizer for growth improvement of *Capsicum annuum* L. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, Índia, v. 3, n. 3, p. 022-027, mai/jun., 2015.

SALMAN, A. K. D. *et al.* **Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Documentos 136. 2010. Porto Velho, 2010, 36 p.

SANTANA, M. C. C. B. *et al.* Dendê e seu potencial de uso: uma prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, Brasil, v. 6, n. 4, p. 516-525.

SILVA, E. G. *et al.* Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 72-75, jan/mar., 2007.

SILVA, E. G. *et al.* Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 72-75, jan/mar., 2007.

SIQUEIRA, F. G.; MACIEL, W. P.; MARTOS, E. T.; DUARTE, G. C.; MILLER, R. N.G.; SILVA, R.; DIAS, E. S. Cultivation of *Pleurotus* mushroom in substrates obtained by short composting and steam pasteurization. **African Journal of Biotechnology**, Brasil, v. 11, n. 53, p. 11630-11635, jul.,2012.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Brasil, v.2, n.1, p. 121-139, jan/abr., 2009.

STICHNOTHE, H. et al. Life cycle assessment of two palm oil production systems. **Biomass and bioenergy**, v. 35, p. 3976-3984, 2011.

SUDIRMAN, L. I; SUTRISNA, A.; LISTIYOWATI, S.; FADLI, L.; TARIGAN, B. The potency of oil palm plantation wastes for mushroom production. **Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)**, Indonesia, p. 378-384, 2011.

TELES, Daniel Aparecida do Amaral. **Características físicas e rendimento em óleo de cachos de duas cultivares de dendzeiro cultivadas, sob irrigação, no cerrado do Distrito Federal**. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

TEOH, CHENG HAI. Key Sustainability Issues in the Palm Oil Sector: A Discussion Paper for Multi-Stakeholders Consultations (commissioned by the World Bank Group). The World Bank. 2010.

WAHID, M.B. Overview of the Malaysian Oil Palm Industry 2009. Malaysian Palm Oil Board, Bangi, Malaysia, 2010.

YOSHIZAKI, T. et al. Improved economic viability of integrated biogas energy and compost production for sustainable palm oil mill management. **Journal of Cleaner Production**.V. 44, p. 1-7, 2013.

ZHU, J.; HAN, M.; ZHANG, G.; YANG, L. Co-digestion of spent mushroom substrate and corn stover for methane production via solid-state anaerobic digestion. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, China, v. 7, 2015.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os substratos lingocelulósicos e efluente da agroindústria do dendê podem ser combinados para o cultivo do macrofungo *Pleurotus ostreatus* associada ao processamento da agroindústria do dendê.
- A contaminação por fungos filamentosos esporulantes em ambientes ainda

não totalmente adaptados, como a agroindústria do dendê, é um fator que pode limitar o sucesso do cultivo.

- As condições de temperatura e pressão das autoclaves industriais da agroindústria do dendê são suficientes para esterilização dos substratos para cultivo de *Pleurotus ostreatus*, entretanto se faz necessário avaliar recipientes para acomodação dos substratos que resistam a tais condições.

- O uso do SMS de *Pleurotus ostreatus* cultivados em resíduos lignocelósicos e POME de após podem ser utilizados como ingrediente nas formulações de rações para animais e surge como alternativa para diminuir o uso de vários ingredientes em rações para juvenis de tambacu, por exemplo.

9. REFERÊNCIAS

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração proteica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holemborg, 1887). **R. Bras. Zootec.**, Brasil, v.33, n.5, p.1101-1109, 2004.

ADEBAYO, E. A.; MARTINEZ-CARRERA, D. Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. **African Journal Biotechnology**, Nigeria, v. 14, n.1, p. 52-67, 2015.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Quim. Nova**, Brasil, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

ALVES, S. A. O. *et al.* Caracterização dos recursos genéticos dos plantios de dendê no Estado do Pará. **Bioenergia em revista: diálogos**, a. 3, n. 1, p. 20-31, jan/jun., 2013.

ALVES, Sérgio Augusto Oliveira. **Sustentabilidade da agroindústria de palma no Estado do Pará**. 2011. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ANDRIANI, D. *et al.* Immobilization of cellulose from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. **Bioprocess Biosyst Eng**, Coréia do Sul, v. 35, p. 29-33, 2012.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I. **Nutrição animal**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1988. v. 1, p. 71-75.

ANPC, Associação dos Produtores de Cogumelos. **O setor de cogumelos**. Outubro, 2013. Disponível em <<http://www.anpc.org.br/>>. Acesso em: 15 ago., 2015.

ATNAW, S. M.; SULAIMAN, S. A.; YUSUP, S. Influence of fuel moisture content and reactor temperature on the calorific value of syngas resulted from gasification of oil palm fronds. **The Scientific World Journal**, Malásia, p. 1-10, 2014.

AVIN, F. A. *et al.* Molecular classification and phylogenetic relationships of selected edible Basidiomycetes. **Mol Biol Rep**, Malásia, v. 39, p. 7355-7364, 2012.

AZAPAGIC, A. Sustainability considerations for integrated biorefineries. **Trends in Biotechnology**, Reino Unido, v. 32, n. 1, p.1-4, jan./ 2014.

BLACKWELL, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **Am J Bot.** V. 98, n. 3, pp. 426-38, 2011.

BARCELOS, E. *et al.* Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**, Brasil, v. 6, p. 1-16, mar/2015.

BONATTI, Mariane. Estudo do potencial nutricional de cogumelos do gênero *Pleurotus* cultivados em resíduos agrícolas. 2001. 167 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2001.

BRABO, M. F. *et al.* Viabilidade econômica da piscicultura em tanques-rede no reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí, Estado do Pará. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 43, n. 3, mai/jun., 2013.

BRAGA, L. G. T. *et al.* Inclusão de celulose em rações para juvenis de tambacu. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.15, n.4, p.947-956 out/dez., 2014.

CARVALHO, Patrícia Turano de. **Balanco de emissões de gases de efeito estufa de biodiesel produzido a partir de soja e dendê no Brasil**. 2012. 166 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético)- Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2012.

CASTRO JÚNIOR, Augusto Gomes de. **Biodiesel do dendê: um estudo de viabilidade econômico-financeira do Pará**. 2012. 199 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) – Fundação Getúlio Vargas – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz (ESALQ/USP), São Paulo, 2012.

CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim.Nova**, Brasil, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHEW, T. L.; BHATIA, S. Catalytic processes towards the production of biofuels in a palm oil and oil palm biomass-based biorefinery. **Bioresource Technology**, Malásia, v. 99, p. 7911-7922, 2008.

CHIEJINA, N. V.; OSIBE, D. A. Oil palm fruit promotes the yield and quality of *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer, an edible Nigerian mushroom. **African Journal Biotechnology**, Nigeria, v. 14, n. 14, p. 1195-1200, 2015.

COLOMBIAN - ROUNDTABLE ON SUSTENABLE PALM OIL - RSPO, 2016

CORRÊA, R.; MOTA, D.; MEYER, G. Tipologia da piscicultura familiar no nordeste paraense. **Agrotropica**, Brasil, v. 22, n. 2, p. 75-88, 2010.

COSTA, D. A. et al. Consumo e digestibilidade de dietas com níveis de torta de dendê para ovinos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, Brasil, v.11, n.3, p.783-792 jul/set, 2010.

CONCEIÇÃO, H.E.O. & MÜLLER, A.A. **Botânica e morfologia do dendezeiro**. In: VIÉGAS, I.J.M.; MÜLLER, A.A., eds. A cultura do dendezeiro na amazônia brasileira. Belém, Embrapa – Amazônia Oriental/Manaus, Amazônia Ocidental, 2000. p.31-47.

DA SILVA, Amanda Souza Calixto. **Parâmetros industriais para produção de *Pleurotus ostreatus***. 2016. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, 2016.

DASHTBAN, M. *et al.* Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **Int. J. Biochem. Mol. Biol.** Canadá, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.

DE MATTOS-SHIPLEY, K. M.J.; FORD, K. L.; ALBERTI, F.; BANKS, A. M.; BAILEY, A. M.; FOSTER, G. D. The good, the bad and the tasty: The many roles of mushrooms. **Stud Mycol.** V. 85, pp. 125–157, 2016.

DIAS, E. S. *et al.* Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, nov/dez. 2003.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 795-803, jul;ago., 2010.

ELISASHVILI, V. *et al.* Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Georgia, v. 25, p. 331-339, 2009.

ERTZ, D.; FISCHER, E.; KILLMANN, D.; RAZAFINDRAHAJA, T.; SÉRUSIAUX, E. Savoronala, a new genus of *Malmideaceae* (*Lecanorales*) from Madagascar with stipes producing sporodochia. **Mycological Progress.** V. 12, pp. 645–656, 2013.

ERDEN, E. et al. Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of remazole marine blue. **Brazilian Journal of Microbiology**, Turquia, v. 40, p. 346-353, 2009.

FAO. FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED

NATIONS - STATISTICS DIVISION. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. 2016.

FAOSTAT, Food and agriculture organization of the united nations, 2012.

Production. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/384/default.aspx>>. Acesso em: 18 ago., 2016.

FEDEPALMA, STATISTICAL YEARBOOK 2015. The Oil Palm Agroindustry in Colombia and the World 2010-2014, Javegraf, Bogota, Colombia, 2015.

FERREIRA, C. B. *et al.* Diversidade genética molecular de progênie de dendezeiro. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 47, n. 3, p. 378-384, mar. 2012.

FERREIRA-LEITÃO, V. *et al.* Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**, Brasil, v. 1, p. 65-76.

FIGUEIRÓ, Gláucia Garcia. **Influência do substrato no cultivo e na composição química do cogumelo *Pleurotus florida*.** 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Ilha Solteira, 2009.

FONSECA, T. R. B. *et al.* Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, Brasil, v. 9, n. 30, p. 1814-1822, jul., 2015.

FURLAN JÚNIOR, J. **Dendê: manejo e usos dos subprodutos e dos resíduos.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Documentos 246. 2006. Belém, 2006, 37 p.

GLOVATSKI, T. G. G.; RAIHER, A. P. A oferta de matérias-primas (oleaginosas) do biodiesel no Brasil e seus determinantes: uma análise dos anos de 1991 a 2010. **Estudo & Debate**, Brasil, v. 20, n. 2, p. 07-32, 2013.

GOMES, D.; AKAMATSU, I.; SOUZA, E. Censo paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais. **Pesquisa & Tecnologia**, Brasil, v. 13, n. 1, jan/jun., 2016.

GHERBAWY, Y.; VOIGT, K. Molecular Identification of Fungi. **Springer eBooks**. 501p, 2010.

HERRERA, Ozana Maria. **Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Agaricus blazei*: um enfoque de cadeia produtiva**. 2001. 200 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, 2001.

HEILMANN-CLAUSEN, J.; AUDE, E.; VAN DORT, K.; CHRISTENSEN, M.; PILTAVER, A.; VEERKAMP, M.; WALLEYN, R.; SILLER, I.; STANDOVÁR, T.; ÓDOR, P. Bryophytes and fungi on dead beech logs in Europe. **J. Biogeogr.** V. 41, pp. 2269-2282, 2014.

HIBBETT D. S., et al..A higher-level phylogenetic classification of the Fungi.**Mycol Res.** V. 111, pp. 509-47, 2007.

INÁCIO, F. D. *et al.* Production of enzymes and biotransformation of Orange waste by oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quéf.**Advances in Microbiology**, Brasil, v. 5, p. 1-8, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsões e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. 2016. Brasil, 2016, 115 p.

INSTITUTO OBSERVATÓRIO SOCIAL. **O comportamento sócio-trabalhista na produção do óleo de palma do dendê no Estado do Pará com foco nas empresas Agropalma, Biovale/Biopalma, Petrobrás Combustíveis**. 2013. São Paulo, 2013. 80 p.

JONES M. D.1, FORN I, GADELHA C, EGAN MJ, BASS D, MASSANA R, RICHARDS TA. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature*. 2011 May 11;474(7350):200-3. doi: 10.1038/nature09984.

KADIRI, M.; MUSTAPHA, Y. The use of spent mushroom substrate of *L. subnudus* Berk as a soil conditioner for vegetables. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, Nigéria, v. 3, n. 2, p. 16 – 19, dez., 2010.

KARINGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of microbial in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme Research**, India, p. 1-12, 2011.

KOHARI, Edson Kenji. **Produção do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* em resíduos lignocelulósicos e avaliação das características do substrato exaurido visando sua utilização como fertilizante orgânico**. 2000. 118 f. Dissertação

(Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems – an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, USA, v. 25, p. 1–30, 2005.

KULSHRESHTHA, S.; SHARMA, K. Perspectives of bioremediation through mushroom cultivation. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, Índia, v. 5, n. 5, p. 1-2, 2014.

LIMA, A. L. Palmas para o dendê – Pesquisas buscam a causa do amarelecimento fatal do dendezeiro. **Agroenergia em Revista**, Brasil, a. 2, n. 2, p. 17, mai., 2011.

LIMA, S. M. V. *et al.* **Desempenho da cadeia produtiva do dendê na Amazônia Legal**. 2002. 164 f. Trabalho de cooperação SUDAM/Fundação de Apoio ao desenvolvimento da UFPE – Ministério da Integração Nacional, Belém, 2002.

McLaughlin D. J. E. M. Frieders H. S. Lü 1995. A microscopist's view of heterobasidiomycete phylogeny. *Studies in Mycology* 38: 91-109. Jayasiri et al., (2015)

McLAUGHLIN D. J. E. M. FRIEDERS H. S. Lü 1995. A microscopist's view of heterobasidiomycete phylogeny. *Studies in Mycology* 38: 91-109. Jayasiri et al., (2015)

MADAKI, Y. S.; SENG, L. Palm oil Mill effluent (POME) from Malaysia palm oil mills: waste or resource. **International Journal of Science, Environment and Technology**, Malásia, v. 2, n. 6, p. 1138 – 1155, 2013.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N; HYDE, K.D; JONES, E.B.G. et al. 2015. Towards a natural classification and backbone tree for Sordariomycetes. *Fungal Diversity*. 72:199-301

MAIHARA, V. A. *et al.* Arsenic and cadmium content in edible mushrooms from São Paulo, Brazil determined by INAA and GF AAS. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Brasil, v. 278, n. 2, p. 395-397, 2008.

MAMIRO, D. P.; MAMIRO, P.S. Yield and mushroom size of *Pleurotus ostreatus* grown on rice straw basal substrate mixed and supplemented with various crop residues. **Journal of Animal & Plant Sciences**, Tanzânia, v. 10, p. 1211-1218, 2011.

MANTOVANI, T. R. D`A. et al. Formulação de substratos na produção de biomassa

micelial e de lacase de *Pleurotus ostreatus*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1681-1692, set./out. 2012.

MARTINS, Marcelo Gaspar. **Complexo enzimático SFF em rações para juvenis de Tilápia do Nilo e Tambacu**. 2014. 57 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

MENEZES, Fábio Pacheco. Degradação de biossólidos por fungos lignocelulolíticos. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

MOHAMMED, N.; ALAM, M. Z.; KABBASHI, N. A.; AHSAN, A. Effective composting of oil palm industrial waste by filamentous fungi: a review. **Resources, Conservation and Recycling**, Malásia, v. 58. p. 69–78, 2012. MONTEIRO, Kátia Fernanda Garcez. **Análise de indicadores de sustentabilidade socioambiental em diferentes sistemas produtivos com palma de óleo no Estado do Pará**. 2013. 198 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2013.

MTUI, G. Y. S. Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: types, substrates and applications. **Scientific Research and Essays**, Tanzânia, v. 7, n. 15, p. 1544-1555, abr., 2012.

NETO, João Ronaldo Tavares de Vasconcellos. **Diversidade e seleção de fungos basidiomicetos afiloforóides para produção de enzimas lignocelulolíticas em área de mata atlântica do sul da Bahia**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana/BA, 2010.

OECD-FAO, Agricultural Outlook 2013-2022. Disponível em: <https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HIGH_AGLINK>. 2013.

OLIVEIRA, Paulo Andrade de. **Torta de dendê em dietas para vacas leiteiras em pastagem com *Brachiaria brizantha***. 2015. 136 f. Tese (Doutorado em zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga/BA, 2015.

OLIVEIRA, Ricardo da Silva. **Inclusão do substrato de *Pleurotus ostreatus* na cinética de fermentação *in vitro* do feno de braquiária**. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

PARK, J. H. *et al.* Spent mushroom substrate influences Elk (*Cervus Elaphus Canadensis*) hematological and serum biochemical parameters. **Asian-Aust. J. Anim. Sci., Coréia**, v. 25, n. 3, p. 320-324, mar., 2012.

PEDROSO, Aurora Luzia. **Produção de Pleurotus spp em resíduos da indústria do cigarro e avaliação do substrato exaurido**. 2003. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

PEREIRA, Bruno Henrique Silva. **Uso de complexo em dietas para Tilápia do Nilo: digestibilidade enzimática, desempenho produtivo e parâmetros fisiológicos**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal, 2014.

PHAN, C. V.; SABARATNAM, V. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. **Appl Microbiol Biotechnol**, Malásia, v. 96, p. 863-873, 2012.

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; HAYTOWITZ, D. B. Folate composition of 10 types of mushroom determined by liquid chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, USA, v. 129, p. 639-636, 2011.

PIMENTA, M. E. S. G. *et al.* Desempenho produtivo e digestibilidade pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) alimentada com dietas suplementadas com níveis crescentes de silagem ácida de pescado. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1953-1959, nov/dez., 2008.

PINTO, A. C. *et al.* Biodiesel: an overview. **J. Braz. Chem. Soc.**, Brasil, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.

POLLEGIONE, L.; TONIN, F.; ROSINI, E. Lignin-degrading enzymes. **The FEBS Journal**, Italia, v. 282, p. 1190-1213, 2015.

RAZAK, Dang Lelamurni Binti Abd. Cultivation of *Auricularia polytrichia* Mont. Sacc (Black Jelly Mushroom) using oil palm wastes. 2013. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade da Malásia, 2013.

RESENDE, E. K. Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. **Aquabrazil. R. Bras. Zootec.**,

Brasil, v.38, p.52-57, 2009.

ROLIM, Leonardo do Nascimento. **Estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares isolados de *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Cultivados pela técnica “jun-cao”**. 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

ROSMIZA, M. Z. et al. Prospects for increasing commercial mushroom production in Malaysia: challenges and opportunities. **Mediterranean Journal of Social Sciences**, Itália, v. 7, n. 1.p. 406-415, 2016.

ROY, S. *et al.* Evaluation of spent mushroom substrate as biofertilizer for growth improvement of *Capsicum annuum* L. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, Índia, v. 3, n. 3, p. 022-027, mai/jun., 2015.

SANTANA, M. C. C. B. *et al.* Dendê e seu potencial de uso: uma prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, Brasil, v. 6, n. 4, p. 516-525.

SCHEFFERS, B. R.; JOPPA, L. N.; PIMM, S. L.; LAURANCE, W. F. What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**.V. 27, n. 9, pp. 501–510, 2012.

SENANAYAKE IC, et al. Camporesi E. 2015 —Towards unraveling relationships in Xylariomycetidae (Sordariomycetes). *Fungal Diversity* (In press)

SCHOCH, C. L.; SHOEMAKER, R. A.; SEIFERT, K. A.; HAMBLETON, S.; SPATAFORA, J. W.; CROUS, P. W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci.**Mycologia**. V. 98, pp. 1041-1052, 2006.

SILVA, E. G. *et al.* Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 72-75, jan/mar., 2007.

SINGH, R.*et al.* The oil palm *Virescens* gene controls fruit colour encodes a R2R3-MYB. *Nature Communications*.2014, DOI: 10.1038/ncomms5106.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Brasil, v.2, n.1, p. 121-139, jan/abr., 2009.

STICHNOTHE, H.; SCHUCHARDT, F. Comparison of different treatment options for palm oil production waste on a life basis. **Int. J. Life Cycle Assess.**, v. 15, p. 907-915, nov./2010.

SUDIRMAN, L. I; SUTRISNA, A.; LISTIYOWATI, S.; FADLI, L.; TARIGAN, B. The potency of oil palm plantation wastes for mushroom production. **Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)**, Indonesia, p. 378-384, 2011.

TARGHETTA, Bianca Lucchesi. **Desenvolvimento de inoculantes alternativo de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (Jacq.) P. Kumm. e *Lentinula edodes* (Berk) Pegler por cultivo submerso**. 2015. 137 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

TELES, Daniel Aparecida do Amaral. **Características físicas e rendimento em óleo de cachos de duas cultivares de dendezeiro cultivadas, sob irrigação, no cerrado do Distrito Federal**. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de

VAN KUIJK, S. J. A. et al. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. **Biotechnology Advances**, Holanda, v. 33, p. 191-202, 2015.

VIEIRA, Fabrício Rocha. **Potencial de uso de gramíneas como substrato pasteurizado no cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.** 2012. 134 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, 2012.

VIRMOND, E. *et al.* Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Brasil, v. 30, n. 2, p. 197-229, abr/jun., 2013.

VISWANATH, B. et al. Fungal laccase and their applications in bioremediation. **Enzyme Research**, Índia, p. 1-22, 2014.

YOSHIZAKI, T. *et al.* Improved economic viability of integrated biogas energy and compost production for sustainable palm oil mill management. **Journal of Cleaner Production**, v. 44, p. 1-7, apr./2013.

ZHU, J.; HAN, M.; ZHANG, G.; YANG, L. Co-digestion of spent mushroom

substrate and corn stover for methane production via solid-state anaerobic digestion.
Journal of Renewable and Sustainable Energy, China, v.7, 2015.