**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Atividade enzimática e valores nutricionais de *Pleurotus* spp.
cultivados em vinhaça**

Sérgio Birello Sartori

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2011**

Sérgio Birello Sartori
Biólogo

**Atividade enzimática e valores nutricionais de *Pleurotus* spp. cultivados em
vinhaça**

Orientador:
Profa. Dra. **REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Sartori, Sérgio Birello

Atividade enzimática e valores nutricionais de *Pleurotus* spp. cultivados em
vinhaça / Sérgio Birello Sartori. - - Piracicaba, 2011.
108 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Enzimas lignolíticas 2. Fungos - Propriedades nutricionais 3. Peixes 4. Vinhaça
I. Título

CDD 589.222
S251a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Dedico aos meus pais pelo amor, apoio,
paciência e confiança durante estes anos e sempre.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus, pela minha vida e força concedida tornando possível a conclusão deste trabalho;

À minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente pelo auxílio direto e indireto em minha formação, não só profissional como pessoal;

À minha orientadora, Prof^a Regina Monteiro, pela dedicação, paciência e, acima de tudo, pela confiança depositada em mim, além dos conhecimentos e conselhos, os quais levarei por toda a vida;

Aos técnicos Rosangela e Eduardo e as estagiárias Sabrina e Aline D., pela ajuda em toda a pesquisa, troca de conhecimentos e risadas no laboratório;

Ao Prof. Adibe Luiz Abdalla e a técnica Regina Peçanha do Laboratório de Nutrição Animal, pela realização das análises bromatológicas;

À Bibliotecária Marilia R. G. Henyei, pela atenção e correções feitas na dissertação;

Aos amigos Georgia, Tâmara, Gleison, Aline, Danice, Luciana, Fernando, Gabriela, Roberta, Adriene e Carlos por toda ajuda, paciência, cumplicidade e risadas, dentro e fora do laboratório. Saibam que suas amizades e apoio foram o elemento chave para a conclusão deste trabalho e meu crescimento como pessoa e pesquisador.

Aos amigos de Jáu, Renata, Coy, Juliane, Rafael, Milene, Giovane, Michele, Darcio, Fernanda, Fini, Gabriela e Léo, pelo incentivo, amizade incondicional, e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Esses eu sei que são para sempre;

Aos amigos Gustavão, Gabi “preta”, Danilo, Tati, Gabizinha, Pedro, Zappa, Rep. Uai, e toda a turma de bandeirantes, pelos momentos vividos, festas e reencontros de turma, e que ainda serão muitos;

À Pós-graduação e colegas do curso de Microbiologia Agrícola, por todo conhecimento dividido e confraternizações durante esses anos;

À Bioexx - Tecnologia aplicada, por toda ajuda e confiança depositada neste trabalho;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

Enfim, agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e da minha formação e que por ventura tiveram seus nomes esquecidos, meus sinceros agradecimentos.

"Always walk through life as if you have
something new to learn and you will"

Vernon Howard

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Indústria sucroalcooleira.....	27
3.2 Vinhaça.....	29
3.2.1 Origem da vinhaça	33
3.2.2 Legislação	34
3.3 Fungos basidiomicetos	37
3.3.1 Pleurotus spp.	40
3.4 Enzimas ligninolíticas	42
3.4.1 Lacase.....	43
3.4.2 Peroxidase	44
3.4.3 Manganês-peroxidase.....	44
3.4.4 Histórico de trabalhos desenvolvidos	45
3.5 Danio rerio	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Vinhaça.....	51
4.2 Fungos.....	51
4.3 Armazenamento e cultivo	52
4.4 Cultivo dos fungos em vinhaça	53
4.5 Determinação da atividade enzimática	54
4.5.1 Lacase (EC 1.10.3.2).....	55
4.5.2 Peroxidase (EC 1.11.1.7)	56

4.5.3 Manganês peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13)	56
4.5.4 Fórmula para cálculo das atividades enzimáticas.....	57
4.6 Análise bromatológica do micélio dos fungos	59
4.7 Alimentação de <i>Danio rerio</i> com fungo processado.....	59
4.8 Análises estatísticas	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Crescimento micelial dos fungos e descoloração da vinhaça.....	63
5.2 Determinação da atividade enzimática dos fungos crescidos em vinhaça	66
5.2.1 Atividade enzimática de lacase em vinhaça	66
5.2.2 Atividade enzimática de peroxidase em vinhaça	70
5.2.3 Atividade enzimática de manganês-peroxidase (MnP) em vinhaça.....	72
5.3 Propriedades nutricionais de <i>Pleurotus</i> sp. cultivados em vinhaça	75
5.4 Teste de alimentação de <i>D. rerio</i> com <i>Pleurotus</i> sp.....	79
6 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS	105

RESUMO

Atividade enzimática e valores nutricionais de *Pleurotus* spp. cultivados em vinhaça

A vinhaça é o principal subproduto na fabricação do álcool e o que possui maior quantidade de nutrientes em sua composição. Seu poder poluente, cerca de cem vezes maior que esgoto doméstico, é decorrente da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, corrosividade, elevadas DBO e DQO, além de cor escura e cheiro característico. A aceitação crescente no uso de fungos basidiomicetos em processos de tratamento e/ou biorremediação se deve por apresentarem um sistema enzimático extracelular capaz de romper uma grande quantidade de ligações químicas. Espécies do gênero *Pleurotus* sp. são conhecidas pela produção de enzimas lignolíticas como manganês-peroxidase, peroxidases e lacases. Também são reportados como alimentos por possuírem como seus maiores constituintes carboidratos e proteínas, seguidos de minerais e baixos teores de gorduras. O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade enzimática de quatro fungos basidiomicetos cultivados em meio de vinhaça líquido e sólido, bem como avaliar as propriedades nutricionais dos micélios como fonte de alimento para peixes da espécie *D. rerio*. Os fungos *Pleurotus sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus* sp. CCB 068, *P. flabellatus* CCB 396 e *Pleurotus shimeji*, foram cultivados em meio sólido e líquido de vinhaça para análise de atividade enzimática e para crescimento micelial durante 15 dias. A atividade enzimática foi determinada de acordo com protocolo de Szklars et al. (1989) e Kuwahara et al. (1984) a cada 3 dias. Os fungos foram liofilizados e oferecidos aos peixes na proporção de 2% do peso corpóreo dos mesmos e nas quantidades de 50% fungo + 50% ração e 100% fungo em cinco réplicas comparando com um grupo controle tratado com 100% ração por um período de 28 dias. As quatro espécies de *Pleurotus* apresentaram crescimento satisfatório em meio contendo 100% de vinhaça após 15 dias, sendo obtidos maiores valores com *Pleurotus* sp. CCB 068 (16,27g). Além disso, observou-se o clareamento e diminuição de turbidez da vinhaça pelos fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. shimeji*. Em relação à atividade enzimática, os maiores valores para lacase foram obtidos em meio de vinhaça + ágar pelo fungo *P. sajor-caju* (1.247, 43 UI g⁻¹MS -12º dia) e para peroxidase apresentou, ao 6º dia, atividade de 676,02 UI g⁻¹MS. O mesmo fungo obteve maior valor de MnP no 15º dia de cultivo (318,94 UI L⁻¹) em meio de vinhaça líquido. As análises bromatológicas apresentaram valores nutritivos satisfatórios para os fungos quando comparados à ração comercial, apresentando menores valores somente para proteínas. O teste de alimentação com *D. rerio* durante 28 dia mostrou que houve perda de biomassa, não significativa estatisticamente e, os valores de sobrevivência dos peixes foram de 100% em todos os tratamentos, indicando que os fungos testados cultivados em vinhaça não apresentaram toxicidade. Foi concluído que o uso de fungos do gênero *Pleurotus* sp. cultivados em vinhaça, além de reduzir compostos tóxicos deste subproduto, é eficiente na produção de enzimas de interesse industrial e seus micélios podem ser inclusos na dieta de animais como suplementos nutricionais.

Palavras-chave: Vinhaça; *Pleurotus* spp.; Enzimas lignolíticas; Propriedades nutricionais

ABSTRACT

Enzymatic activity and nutritional values of *Pleurotus* spp. grown in vinasse

The vinasse is the principal subproduct in the manufacture of alcohol and the one who has the high amount of nutrients in your composition. Its pollutant power, about a hundred times higher than domestic waste, is due to its richness in organic matter, low pH, corrosivity, high BOD and QOD, in addition to dark color and characteristic odor. The growing acceptance in the use of basidiomycetes fungi in the treatment process and/or bioremediation must be present for an extracellular enzymatic system capable of breaking a large number of chemistry bonds. Species of the gender *Pleurotus* sp. are known for the lignolytic enzyme production like manganese peroxidase, peroxidases and laccases. Are also reported as food because they have as your major constituent carbohydrates and proteins, follow by minerals and low levels of fat. This study aimed to evaluate the enzymatic activity of four basidiomycetes fungi grown in liquid and solid vinasse medium, and to evaluate the nutritional properties of micelium as a food source for fishes *D. rerio*. The fungi *Pleurotus sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus* sp. CCB 068, *Pleurotus flabellatus* CCB 396 and *Pleurotus shimeji* were grown in solid and liquid vinasse médium for enzymatic activity assay and for micelial grow during 15 days. The enzyme activity was determined according to protocol Szklars et al. (1989) and Kuwahara et al (1984) every 3 days. The fungi were liophilized and offered tho fishes at 2% of body weight and in amounts of 50% of fungus + 50% ration and 100% of fungus in five repetitions compared with a control group treated with 100% ration for 28 days. The four species of *Pleurotus* shown satisfactory growth in vinasse médium after 15 days, with highest values with *Pleurotus* sp. CCB 068 (16,27 g). Besides, was observed the bleaching and turbidity reduction by *P. sajor-caju* CCB 020 and *P. shimeji* fungi. Regarding the enzymatic activity, the highest values for laccase was obtained by *P. sajor-caju* (1.247,43 UI g⁻¹ DM - 12th day) and peroxidase presented, at the 6th day, the activity of 676,02 UI g⁻¹DM. The same fungus had the highest value for MnP on the 15th day of cultivation (318,94 UI L⁻¹) in liquid vinasse médium. The bromatological analysis showed satisfactory nutritional values for the fungi when compared to commercial ration, with lowers values only for proteins. The feeding test with *D. rerio* during 29 days showed that was biomass loss, but not statistically significant, and the survival values of fish were 100% in all treatments, indicating that the tested fungi grown in vinasse showed no toxicity. It was concluded that the use of *Pleurotus* sp. fungi grown in vinasse, besides the reduction of toxic compounds of this subproduct, is effective in the production of industrial interest enzymes and their micelium can be included in the diet of animals as nutritional supplements.

Keywords: Vinasse; *Pleurotus* sp.; Lignolytic enzymes; Nutricional properties

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais áreas produtoras de cana no Brasil. Fonte: UNICA, 2001b.....	28
Figura 2 - Vinhaça utilizada na fertirrigação de cana-de-açúcar	29
Figura 3 - Processo de produção da vinhaça (SOUZA, 2010)	34
Figura 4 - <i>Danio rerio</i>	46
Figura 5 - Fungos basidiomicetos <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB 020 (a); <i>Pleurotus</i> sp. CCB 068 (b); <i>Pleurotus shimeji</i> (c); <i>Pleurotus flabellatus</i> CCB 396 (d).....	52
Figura 6 - Foto do experimento com vinhaça inoculada com fungos em frascos Erlenmeyers	53
Figura 7 - Preparo das placas com vinhaça para análise de atividade enzimática	55
Figura 8 - Fluxograma de transformação de valores de absorbância	58
Figura 9 - Fungos liofilizados para ração. <i>P. sajor-caju</i> CCB 020 (a, e); <i>P. sp</i> CCB 068 (b); <i>P. flabellatus</i> CCB 396; <i>P. shimeji</i> (d)	60
Figura 10 - Teste de alimentação com <i>D. rerio</i>	61
Figura 11 - Descoloração da vinhaça incubada durante 15 dias com os fungos <i>P. sajor-caju</i> CCB 020 (a); <i>Pleurotus</i> sp CCB 068 (b); <i>P. flabellatus</i> CCB 396 (c) e <i>P. shimeji</i> (d).....	65

Figura 12 - Atividade enzimática de lacase em meio de vinhaça líquida no 6º e 15º dias de cultivo.....	67
Figura 13 - Atividade enzimática de lacase em meio sólido de vinhaça durante 15 dias de cultivo.....	68
Figura 14 - Atividade enzimática de peroxidase em meio de vinhaça líquida no 6º e 15º dias de cultivo	70
Figura 15 - Atividade enzimática de peroxidase em meio sólido de vinhaça durante 15 dias de cultivo	71
Figura 16 - Atividade de manganês-peroxidase em meio de vinhaça líquida no 6º e 15º dias de cultivo	73
Figura 17 - Atividade enzimática de manganês-peroxidase em meio sólido de vinhaça durante 15 dias de cultivo	73
Figura 18 - Diferença entre as biomassas iniciais e finais de <i>D. rerio</i> alimentados com diferentes espécies de <i>Pleurotus</i> durante 28 dias	80
Figura 19 - Diferença entre comprimento de <i>D. rerio</i> no início e após 28 dias de alimentação com <i>Pleurotus</i> sp.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química da vinhaça obtida na COSAN (Unidade Costa Pinto) (FERREIRA, 2009).....	30
Tabela 2 - Composição de nutrientes avaliadas no gênero <i>Pleurotus</i> sp.....	41
Tabela 3 - Biomassa de fungos cultivados em vinhaça.....	63
Tabela 4 - Composição bromatológica dos fungos cultivados em vinhaça	76
Tabela 5 - Biomassa de <i>D. rerio</i> tratados com <i>Pleurotus</i> sp.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EE	Extrato Etéreo
FDA	Fibra de Detergente Ácido
FDN	Fibra de Detergente Neutro
KDa	Kilo-Dalton
MEA	Extrato de Malte + Ágar
MM	Matéria Mineral
MnP	Manganês-peroxidase
MO	Matéria Orgânica
MS	Matéria Seca
PB	Proteína Bruta
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	rotações por minuto
UNICA	União da Indústria da Cana-de-Açúcar
UI g ⁻¹ MS	Unidade Internacional por grama de matéria seca
UI L ⁻¹	Unidade Internacional por Litro

1 INTRODUÇÃO

Sendo uma das mais antigas culturas da humanidade, a cana-de-açúcar está presente na economia brasileira desde começo de sua colonização. Hoje podemos constatar sua grande importância para o crescimento econômico brasileiro, tornando-se responsável por um dos maiores ramos do agronegócio nacional por movimentar a economia e contribuir para criação de muitos empregos diretos e indiretos.

Consequentemente ao aumento da produção sucroalcooleira a cada safra, é também acrescida à produção de vinhaça, um subproduto oriundo da fabricação do álcool. Para cada litro de álcool são produzidos de dez a dezoito litros de vinhaça, cuja composição é bastante variável, dependendo principalmente, da composição do vinho (SILVA et al., 2007). Seu poder poluente, cerca de cem vezes maior que o esgoto doméstico, é decorrente da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH (4,0 a 4,8), elevada corrosividade, de cor escura, elevados índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), além de emitir um cheiro forte característico (FREIRE; CORTEZ, 2000). Atualmente, a visão ambiental vem sendo enfatizada e, em alguns casos, a aplicação de vinhaça tem sido contestada pelos seus efeitos no solo e nas águas subterrâneas.

Os problemas causados ao meio ambiente em função dos resíduos recorrentes das indústrias deram origem a diversas tecnologias visando à minimização de impactos ambientais. A observação de como o meio ambiente reage a cada intervenção antropogênica mostra a atuação dos microrganismos existentes na busca da adaptação, enfrentando agentes agressores, em alguns casos degradando tais agentes, constituindo-se numa poderosa arma de defesa ambiental, passível de ser potencializada (PERALTA-ZAMORA et al., 2002). As alternativas mais promissoras para resolução de inúmeros problemas ambientais ocasionados pela atividade industrial derivam do estudo de novas tecnologias para o tratamento de efluentes industriais.

Os tratamentos de resíduos e efluentes com microrganismos capazes de degradar compostos perigosos à substâncias não tóxicas utilizando-os como fonte de carbono, aceleram o processo e o rendimento de técnicas de bioestimulação e bioremediação. Nesse contexto a utilização de processos biológicos baseados na

utilização de fungos e bactérias, ou diretamente na utilização de enzimas, tem surgido como uma das alternativas de grande potencial. Os caminhos atuais da biotecnologia indicam os fungos basidiomicetos, degradadores da lignina, como eficientes na degradação de uma grande variedade de compostos, tais como vinhaça ou corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (BALAN, 1999; FERREIRA, 2009).

O grupo dos basidiomicetos são fungos compreendidos no Filo Basidiomycota popularmente conhecidos como cogumelos, orelhas de pau, bolores, bufa de lobo, trufas, mofos, entre outros, apresentando papel fundamental na ciclagem de nutrientes e manutenção dos ecossistemas, atuando na degradação da matéria orgânica. Além disso, os compostos bioativos produzidos por esses fungos são utilizados há décadas para produção de antibióticos e antifúngicos. Outras utilizações desses fungos ocorrem nos setores agropecuários, no controle natural de pragas e parasitas de plantas (HAWKSWORTH, 2001). A aceitação crescente destes organismos em processos de tratamento e/ou biorremediação se deve aos fungos da decomposição branca apresentarem um sistema enzimático extracelular de caráter não-específico e, capaz de romper uma grande quantidade de ligações químicas diferentes (HIGSON, 1991; EGGEN, 2000).

Espécies do gênero *Pleurotus* sp. ocupam a terceira posição na produção comercial de cogumelos comestíveis no mundo, sendo encontrados naturalmente em materiais lignocelulolíticos (OBODAI et al., 2003). São conhecidos pela produção de enzimas extracelulares, como manganês-peroxidase, peroxidases e lacases, formadoras de um complexo enzimático degradador de lignina e de vários poluentes orgânicos (COHEN, 2002; POINTING, 2001). Também tem sido bastante reportados como alimentos com atividade médica em muitas terapias e estas citações reportam as atividades: antitumoral, antiviral, indução de atividade imunológica, e apresentam atividades: antioxidante (YANG; LIN; MAU, 2002) antimicrobiana, antimitogênica e antiproliferativa (NGAI; NG, 2004).

Além disso, os fungos do gênero *Pleurotus* sp. apresentam facilidade de manejo e produção, apresentando crescimento bastante rápido e ocupando pouco espaço, utilizam matérias-primas (palhas, capins e bagaço) como meio suporte e

possuem resistência a pragas e doenças (Rajaratnam, 1992; Poppe, 2000). Levando em consideração as vantagens e facilidades no cultivo e suas características nutricionais, os fungos do gênero *Pleurotus* sp. podem ser utilizados como alimentação natural ou suplementos alimentares na dieta de diversos animais importantes para a alimentação humana, já que apresentam uma produção rápida e barata.

Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação – Anfalpet (2000), o crescente interesse nos estudos de alimentação natural tem por objetivo colaborar no desenvolvimento de estratégias para o manejo sustentável dos ecossistemas, auxiliando ecologistas, administradores de recursos pesqueiros e piscicultores. Dentre os diversos aspectos relacionados à piscicultura, aqueles envolvidos com a alimentação vêm sendo amplamente discutidos, principalmente por representarem cerca de 70% dos custos de produção em sistema de cultivo intensivo.

Sendo assim, a utilização de resíduos agroindustriais, como a vinhaça, para produção de enzimas de interesse comercial por meio de fungos comestíveis, é de grande interesse do ponto de vista da sustentabilidade da produção da indústria sucroalcooleira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade enzimática de quatro fungos basidiomicetos cultivados em meio de vinhaça líquido e sólido e avaliar as propriedades nutricionais dos micélios como fonte de alimento para peixes da espécie *D. rerio*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade lignolítica das enzimas lacase, peroxidase e manganês-peroxidase, produzidas pelos fungos *Pleurotus sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus* sp. CCB 068, *Pleurotus flabellatus* CCB 396 e *Pleurotus shimeji*, em meio de cultivo composto por vinhaça (líquido) e vinhaça + ágar (sólido);

- Verificar a eficiência nutricional e toxicidade dos micélios dos fungos cultivados em vinhaça líquida como fonte de alimento para peixes da espécie *Danio rerio*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Indústria sucroalcooleira

A crescente preocupação da sociedade mundial com o ambiente vem gerando pressão sobre o uso de combustíveis fósseis, os quais são os grandes responsáveis pela emissão de gases poluentes na atmosfera, poluição do solo e das águas. Vários países estão buscando reduzir o uso desses combustíveis, seja pela substituição do produto ou pela adição de outros combustíveis. Atualmente, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis, apresentando grande importância no cenário agrícola brasileiro e um futuro promissor no cenário mundial.

No Brasil, o Programa Pro-Álcool foi criado em 1975 em resposta à crise internacional do petróleo, como estratégia para diminuir a dependência externa de fontes de energia, por meio da produção de combustível alternativo, renovável e não “poluente”. A preocupação ambiental se somou à redução dos estoques e à alta dos preços dos combustíveis fósseis para valorizar as fontes renováveis e menos poluentes de energia. Assim como as perspectivas de elevação do consumo de álcool se somaram as de aumento da exportação de açúcar, levaram ao crescimento do setor sucroalcooleiro com expansão até os dias de hoje. Essa expansão envolve o cultivo da cana-de-açúcar, a implantação das usinas para produção de álcool e a produção de veículos movidos a álcool, (ARBEX et al., 2004).

A cana-de-açúcar, de origem totalmente renovável, gera divisas para o país através da produção do açúcar, do álcool anidro (aditivo para a gasolina) e do álcool hidratado e da cachaça. Além disso, a cana apresenta-se como uma fonte alternativa de energia, por possibilitar a geração de energia elétrica através da queima do bagaço e produção de plástico biodegradável, o PHB (polihidroxibutirato), a partir do açúcar. Deve ser considerado ainda que os subprodutos são utilizados na lavoura como insumos de fertilização, fechando-se o ciclo de produção. (ORTEGA, 2003).

A cana ocupa cerca de 7 milhões de hectares ou cerca de 2% de toda a terra arável do País, que é o maior produtor mundial, seguido por Índia, Tailândia e

Austrália. As regiões de cultivo são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano. Portanto, durante todo o ano o Brasil produz açúcar e etanol para os mercados interno e externo (UNICA, 2008a).

O mapa (FIGURA 1) mostra em vermelho as áreas onde se concentram as plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados oficiais do IBGE, UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas – SP) e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira).

Figura 1 - Principais áreas produtoras de cana no Brasil. Fonte: UNICA, 2008b.

Segundo dados da UNICA (União da Indústria da Cana-de-Açúcar) para a safra de 2010/2011, foram processadas pelas usinas do centro-sul brasileiro um total de 556,945 mil toneladas de cana-de-açúcar. Esse montante resultou na produção de 33,501 mil toneladas de açúcar (44,93%) e 25,385 milhões de litros de etanol (55,07%). Para a safra de 2011/2012, a UNICA estima o processamento de 533,500 mil toneladas de cana-de-açúcar e a produção de 32,380 mil toneladas de açúcar e 22,545 milhões e litros de etanol. Segundo o professor Francisco Alves (2006), da Universidade Federal de São Carlos, na atualidade, a competitividade dos produtos brasileiros do complexo canavieiro, no mercado internacional, decorre dos baixos custos de produção

resultantes dos baixos salários pagos aos trabalhadores e do pouco controle e investimento nas políticas de proteção ambiental. A grande disponibilidade de terras permite a expansão da produção de modo rápido e a baixos custos. Porém, essa vantagem competitiva é insustentável, uma vez que práticas inadequadas de cultivo intensivo são responsáveis pela degradação ambiental, pela erosão e a perda de solos férteis, assoreamento e poluição de importantes cursos d'água, desaparecimento de nascentes e a perda de biodiversidade. Igualmente importantes são os impactos sobre a saúde humana (MIRANDA et al., 2007).

3.2 Vinhaça

A vinhaça é o principal resíduo na fabricação do álcool, também conhecida como vinhoto, restilo, garapão ou calda de destilaria. Trata-se de um material que contém mais de 93% de água, é bastante rica em potássio, mostrando ainda percentagem de matéria orgânica e quantidade apreciáveis de outros elementos essenciais à nutrição das plantas, como por exemplo: Ca, Mg, SO_4 (Glória, 1976; Pereira et al., 1992) (FIGURA 2).

Figura 2 - Vinhaça utilizada na fertirrigação de cana-de-açúcar

Seu poder poluente, cerca de cem vezes maior que o esgoto doméstico, é decorrente da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH (4,0 a 4,8), elevada

corrosividade, de cor escura, elevados índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) variando de 42.000 a 100.000 mg L⁻¹ e demanda química de oxigênio (DQO) variando de 10.000 a 210.000 mg L⁻¹, além de emitir um cheiro forte característico e da elevada temperatura na saída dos destiladores (FREIRE; CORTEZ, 2000).

A coloração escura da vinhaça se deve à presença de compostos de alto peso molecular, predominando as melanoidinas dos caramelos, com 70% - 80% de todo peso das substâncias coloradas, sendo estas frequentemente tóxicas para os microrganismos propícios aos biotratamentos de efluentes (PÉREZ et al., 2006). Na Tabela 1 é apresentada composição química recente da vinhaça proveniente da Usina Sucroalcooleira COSAN (Unidade Costa Pinto), Piracicaba – SP, durante a safra de 2007/2008, de acordo com os resultados obtidos por Ferreira (2009).

Tabela 1 - Composição química da vinhaça obtida na COSAN (Unidade Costa Pinto) (FERREIRA, 2009)

Parâmetros	Vinhaça 100%
pH (a 20°C)	3,95
DQO (mg L ⁻¹)	42000
DBO (mg L ⁻¹)	11310
Sólidos Suspensos Totais (mg L ⁻¹)	5969
Condutividade (µS/cm)	8630
Sólidos Totais Dissolvidos (ppm)	152126
Açúcares Redutores (mg L ⁻¹)	962
Nitrogênio Total Kjeldahl (mg/L)	70
Potássio (mg L ⁻¹)	2272
Fosfato (como P) (mg L ⁻¹)	200
Magnésio (mg L ⁻¹)	290
Sódio (mg L ⁻¹)	< 50
Cálcio (mg L ⁻¹)	460
Sulfato (mg L ⁻¹)	1320
Índice de fenóis (mg L ⁻¹)	1,1

Quando depositada no solo, a vinhaça pode promover melhoria na sua fertilidade, beneficiando de algum modo à adaptação das culturas agrícolas (FALCÃO, 2005), entretanto, as quantidades não devem ultrapassar sua capacidade de retenção de íons, ou seja, as dosagens dependem de acordo com as características do solo.

Quando usada em proporções desbalanceadas, acarretam na lixiviação de vários íons, sobretudo nitrato e potássio (SILVA, 2007).

Alguns efeitos da vinhaça no solo são: elevação do pH, aumento da disponibilidade de alguns íons, aumento da troca catiônica, promove o aumento da retenção de água e melhora a estrutura física do solo. Esse resíduo também deve ser visto como um agente de aumento na população e na atividade microbiana do solo. A matéria orgânica contida na vinhaça introduzida no solo é metabolizada por fungos, que assim neutralizam a acidez, permitindo a proliferação bacteriana, responsável pela mineralização e imobilização do nitrogênio, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica. A neutralização da acidez do solo também proporciona o aumento de outros microrganismos participantes de ciclos biogeoquímicos de outros elementos (SILVA; COELHO, 2006).

Segundo Cortez (1992), as principais vantagens que levam à ampla difusão desta técnica são:

- O baixo investimento inicial requerido (tanques de decantação, caminhões, e atualmente bombas e dutos);
- O baixo custo de manutenção (pouca mão de obra, diesel e eletricidade);
- A rápida disposição da vinhaça no solo (sem necessidade de grandes reservatórios reguladores)
- Os ganhos compatíveis com o investimento (há lucros com a reciclagem do potássio no solo e o retorno do investimento é bastante rápido);
- O fechamento do ciclo interno que envolve a parte agrícola e a industrial no mesmo setor, diminuindo a dependência de insumos externos (fertilizantes), ausência do envolvimento de tecnologia complexa e ainda o aumento da produtividade da safra e da produtividade na fabricação do açúcar.

Diversas tecnologias estão surgindo para o reaproveitamento e/ou tratamento da vinhaça. Segundo Luksemburg; Sá e Durso (1980), para tratamento e aproveitamento da vinhaça foram apresentados os seguintes processos que ainda são os mesmos, alterando-se apenas sua tecnologia:

- Tratamentos físico-químicos - coagulação, floculação e sedimentação com baixo consumo de energia e remoção de DQO de até 50%, havendo inclusive remoção de cor;

- Osmose reversa - a vinhaça é passada por pressão por uma membrana seletiva. No permeado, há redução na DQO de 90%. É um processo caro com grande consumo energético e dificuldade em encontrar uma membrana adequada;

Incineração - sistema de reação em leito fluidizado. Apesar de reaproveitar os sais minerais nas cinzas, é economicamente inviável;

- Lagoas aeróbicas de Jacinto - a planta aquática, conhecida vulgarmente como Jacinto (aguapé) é a biomassa vegetal produzida a partir da remoção da matéria orgânica e nutriente da vinhaça e pode ser aproveitada na ração animal ou para produção de biogás;

- Lagoas de estabilização - o resíduo pode ser estabilizado com prazo de até 9 meses por ação fermentativa natural, provocando desprendimento de gases com odor desagradável, infiltrações e contaminações do lençol freático;

- Filtros biológicos - biodegradação anaeróbia;

- Produção de biomassa proteica fúngica ou unicelular, no entanto há necessidade de tratamento posterior;

- Reatores anaeróbios – produção de pelo menos 50% de gás metano/L de vinhaça durante a degradação anaeróbia;

- Fertirrigação – a vinhaça *in natura* é utilizada na lavoura para reaproveitamento de nitrogênio, fósforo, potássio, água e matéria orgânica.

Por fim, o processo de biodegradação, permitindo a utilização da vinhaça tratada para os processos de lavagem da cana, irrigação da cultura e outras atividades intrínsecas ao processo industrial, bem como para a produção de metabólitos de interesse comercial. Reduz a contaminação de solos e corpos hídricos principalmente pelo seu armazenamento em regiões que apresentam lençol freático próximo à superfície (FREIRE; CORTEZ, 2000).

3.2.1 Origem da vinhaça

Ao chegar à indústria, a cana é analisada quanto à quantidade de açúcar e lavada, em esteiras, para ser industrializada. Realizado este primeiro processo, a esteira transporta a cana até o picador, que a corta em pedaços; logo a seguir, a cana picada passa pelo desfibrador, no qual os gomos são quebrados e a cana é aberta para facilitar a extração do caldo (VIANA, 2006). Para que isso ocorra de forma efetiva, é adicionada água. Como resultados da moagem, são obtidos o caldo de cana e o bagaço. O bagaço é queimado na caldeira, unidade produtora de vapor, que irá gerar toda a energia necessária ao complexo industrial. Por sua vez, o caldo passa por um sistema de tratamento que envolve filtração e alguns processos químicos (LOPES, 1983).

No final desta etapa, resultam caldo clarificado e lodo que será processado para recuperação do caldo nele existente por meio de filtros rotativos a vácuo que retiram o caldo limpo, mais a torta, rica em sais minerais, enviada à lavoura como adubo. A levedura consome o açúcar presente no caldo e o transforma em álcool. Essa mistura permanece nas dornas, grandes tanques de armazenagem, por volta de 06 a 08 horas, sob rigoroso controle de temperatura. O caldo fermentado recebe o nome de vinho (VIANA, 2006).

Esse vinho é centrifugado e separado em duas partes: uma delas é o leite de levedura, responsável pela transformação dos açúcares em álcool reutilizado em novas fermentações, logo após sofrer um tratamento químico adequado; a outra parte é o vinho sem levedura, que contém de 7% a 8% de álcool e o restante das impurezas líquidas. Além disso, uma porcentagem do material é desidratada e serve para ração animal (SOUZA, 2010).

Quando o vinho é destilado, tem-se o álcool e seus subprodutos – vinhaça e flegmaça (FIGURA 3). A produção de 01 litro de álcool gera de 10 a 15 litros de vinhaça, que é depositada em tanques construídos no solo e enviada para a lavoura através de canais, por gravidade, ou bombeados ou ainda, transportados por caminhões-tanque e finalmente lançada ao solo por aspersão (SOUZA, 2010).

Figura 3 - Processo de produção da vinhaça (SOUZA, 2010)

Embora aperfeiçoamentos tecnológicos tenham tido lugar na agroindústria canavieira desde a implementação do ProAlcool, a relação média entre a quantidade de vinhaça gerada por litro de álcool não apresentou melhora significativa, salvo em algumas usinas, o que as torna produtoras não apenas de álcool (e açúcar) mas também de imensas quantidades do subproduto. Provavelmente, o fato do setor sucroalcooleiro não ter direcionado esforços significativos no sentido da redução da proporção entre vinhaça e álcool deve estar relacionado, por um lado, à sua natureza heterogênea e, por outro, à ausência de uma regulamentação ambiental mais restritiva.

3.2.2 Legislação

Como resposta à alta produção e descarte de vinhaça no ambiente, foram criados códigos que estabelecessem os critérios e procedimentos para armazenamento, transporte e aplicação. Segue abaixo algumas das leis mais importantes e de maior impacto para o setor sucroalcooleiro em relação à este subproduto do etanol:

Legislação Federal:

- Lei nº 4.771, de 15 de setembro de 1965 – Código Florestal.
- Portaria do Ministério do Interior nº 158, de 03 de novembro de 1980 – Dispõe sobre o lançamento de vinhoto em coleções hídricas e sobre efluentes de destilarias e usinas de açúcar.
- Portaria do Ministério do Interior nº 124, de 20 de agosto de 1980 – Normas para localização e construção de instalações que armazenem substâncias que possam causar poluição hídrica.
- Portaria do Ministério do Interior nº 323, de 29 de novembro de 1978 – Proíbe o lançamento de vinhoto em coleções de água.
- Resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA – nº 0002, de 05/06/1984 – determinação da realização de estudos e apresentação de projeto de resolução contendo normas para controle da poluição causada pelos efluentes das destilarias de álcool e pelas águas de lavagem da cana;

Legislação Estadual (CETESB, 2006);

- Lei nº 997, de 31 de maio de 1976 – Dispõe sobre o controle da poluição do meio ambiente.
- Lei nº 6.171, de 04 de julho de 1988 – Dispõe sobre o uso, conservação e preservação do solo agrícola.
- Decreto nº 8.468, de 08 de setembro de 1976 – Aprova o regulamento da Lei nº 997 de 31 de maio de 1976 - Controle da poluição das águas, ar, resíduos, padrões, exigências, licenciamento, penalidades.
- Decreto nº 41.719, de 16 de abril de 1997 – Regulamenta a Lei nº 6.171, de 04 de julho de 1988 que dispõe sobre uso, conservação e preservação do solo agrícola.

A vinhaça deverá ser caracterizada quanto aos seguintes parâmetros quando apresentar como destino a aplicação no solo:

- pH
- resíduo não filtrável total;
- dureza;
- condutividade elétrica;

- nitrogênio nitrato;
- nitrogênio nítrico;-nitrogênio amoniacal;
- nitrogênio Kjeldhal;
- sódio;
- cálcio;
- potássio;
- magnésio;
- sulfato;
- fósforo total;
- DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e
- DQO (Demanda Química de Oxigênio).

Semanalmente, deverá ser determinado o teor de K_2O da vinhaça, expresso em $kg\ m^{-3}$. Essa determinação irá indicar a dosagem de vinhaça a ser aplicada no solo. A dosagem máxima de vinhaça a ser aplicada no tratamento de solos agrícolas em cultura de cana-de-açúcar é calculada pela seguinte equação:

$$m^3 \text{ de vinhaça/ha} = [(0,05 \times CTC - ks) \times 3744 + 185] / kvi$$

onde:

$0,05 = 5\%$ da CTC

CTC = Capacidade de Troca Catiônica, expressa em $cmolc\ dm^{-3}$;

ks = concentração de potássio no solo, expresso em $cmolc\ dm^{-3}$, à profundidade de 0 a 0,80 metros;

3744 = constante para transformar os resultados da análise de fertilidade, expressos em $cmolc\ dm^{-3}$ ou $meq/100\ cm^{-3}$, para kg de potássio em um volume de 1 (um) hectare por 0,80 metros de profundidade.

185 = massa, em kg, de K_2O extraído pela cultura por hectare, por corte.

kvi = concentração de potássio na vinhaça, expressa em $kg\ de\ K_2O\ m^{-3}$.

Cabe ressaltar que outros parâmetros poderão ser solicitados a critério da CETESB levando em consideração os resultados obtidos e a caracterização do solo que receberá aplicação de vinhaça.

3.3 Fungos basidiomicetos

O grupo dos basidiomicetos são fungos compreendidos no Filo Basidiomycota popularmente conhecidos como cogumelos, orelhas de pau, bolores, bufa de lobo, trufas, mofo, entre outros. São fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio. A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada micélio, que por sua vez é formado por muitos filamentos septados chamados hifas. Os basidiomicetos também são caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos: os balistosporos, que são liberados violentamente dos basídios e os estatismosporos, que são liberados passivamente (MOREIRA NETO, 2006).

No mundo estima-se que o grupo dos *Basidiomycota* tenha em torno de 30.000 espécies, correspondendo a 37% do número descrito dos fungos verdadeiros (KIRK et al., 2001). Dentre esses, no Brasil estima-se um número de 8.897 espécies. O número exato de espécies dos principais grupos é bastante controverso, pelo fato da intensa mudança na classificação, ocorrida nos últimos anos (CAPELLARI et al., 1998).

Por ser grande o número de espécies no mundo, só não maior que o número dos *Ascomycota*, o Filo *Basidiomycota* apresenta certas peculiaridades, que vai desde o maior organismo do mundo até fungos causadores de doenças. Alguns exemplos podem ser citados, como o cogumelo do mel ou *Armillaria ostoyae*. O fungo foi encontrado nos Estados Unidos. Descoberto na Floresta Nacional de Malheur, no leste do estado de Oregon. Esse fungo subterrâneo tem 2.400 anos e cobre uma área 890 hectares, o que o torna o maior organismo vivo até agora descoberto (FERGUSON et al., 2003). Existem também registros de novas espécies de *Basidiomycota*, coletadas em alguns dos últimos remanescentes de habitats florestais do Atlântico, perto de São Paulo, Brasil, que emitem luz verde amarelada 24 horas por dia a partir do gel que cobre suas hastes (DESJARDIN et al., 2007).

No enfoque ecológico, os basidiomicetos possuem papel fundamental na ciclagem de nutrientes e manutenção dos ecossistemas, atuando na degradação da matéria orgânica. São sapróbios, parasitas e formam associações com plantas (ectomicorrizas). A conservação *in situ* deste grupo de organismos está intimamente ligada à conservação das florestas preservando, assim, os *habitats* onde eles naturalmente ocorrem. Além disso, os compostos bioativos produzidos por esses fungos são utilizados há décadas para produção de antibióticos e antifúngicos. Outras utilizações desses fungos ocorrem nos setores agropecuários, no controle natural de pragas e parasitas de plantas (HAWKSWORTH, 2001).

Os fungos degradadores de madeira se dividem em três grupos distintos: fungos de degradação marrom, degradação branda ou macia e degradação branca, de acordo com a morfologia da degradação (MELO; AZEVEDO, 2008).

Os fungos de degradação marrom promovem a degradação dos polissacarídeos celulose e hemicelulose, mas com limitada degradação da lignina. Com essa característica, o material restante deste processo tem uma coloração amarronzada e de aparência frágil (LEE, 2003). As células que formam a parede vegetal são atacadas por esses fungos formando poros e erosões, devido à quebra das microfibrilas da celulose. Devido a este mecanismo, as hifas dos fungos podem se dividir em duas categorias: as que degradam os componentes da parede celular da madeira, incluindo a lignina e as que somente modificam a lignina enquanto degradam a celulose e/ou hemicelulose (MELO; AZEVEDO, 2008).

Os fungos de degradação branda ou macia são ascomicetos e fungos anamorfos que participam da degradação da madeira na natureza. Todos os componentes da madeira são degradados, mas as taxas de degradação são mínimas quando comparadas com os outros dois grupos. Este grupo está associado em parte à decomposição da serrapilheira em ecossistemas florestais, geralmente em ambientes mais úmidos. (TUOMELA et al., 2000, MOREIRA NETO, 2006).

Os fungos de degradação branca são responsáveis pela degradação de compostos lignocelulósicos ou pela remoção simultânea de todos os componentes, ou pela remoção seletiva de lignina e polioses, mantendo a celulose praticamente intacta (FERRAZ et al., 2000).

Segundo Ferraz (2004), para iniciar a degradação dos materiais lignocelulósicos os fungos promovem a penetração de suas hifas no lúmen das células vegetais. Essas hifas têm por finalidade a produção de grande diversidade de metabólitos extracelulares, os quais atuam na degradação da parede celular vegetal. Castro et al. (2004) relatam que os fungos da podridão branca da madeira decompõem enzimaticamente o substrato, convertendo-os em CO₂ e água para utilizá-los em seu metabolismo. Essa habilidade permite a utilização destes fungos em muitos processos biotecnológicos a fim de degradar substratos lignocelulósicos, e muitas vezes, serem utilizados como substratos para a produção de cogumelos comestíveis ou ainda para produção de biomassa fúngica a ser empregada em processos industriais (SILVA; COELHO, 2006).

Em função de sua reprodução e crescimento, os fungos adaptam-se em uma grande variedade de substratos, permitindo a bioconversão do substrato residual em biomassa microbiana, sendo esta utilizada para extração de proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos ou também para uso direto em ração animal (TAVARES et al., 1998; BONATTI et al., 2003; CASTRO et al., 2004; DONINI et al., 2006), podendo servir de matéria-prima para produção de fertilizantes e corretivos agrícolas (PHILIPPOUSSIS et al., 2001).

Basidiomicetos como os do gênero *Pleurotus* spp., são responsáveis pela produção de um acervo de enzimas capazes de biodegradar compostos lignocelulósicos bem como substâncias poluentes. Foi relatado que o fungo *P. ostreatus* é capaz de degradar e mineralizar compostos xenobióticos, como PAHs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), corantes industriais e outros poluentes de solo, como a atrazina (MENEZES, 1997; DELLAMATRICE et al., 2005). Muitos grupos de pesquisa estão estudando o uso destes fungos ou de suas enzimas em uma grande variedade de processos biotecnológicos como bioclareamento, eliminação de fases em indústrias de papel e celulose, pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para produção de biocombustíveis, biorremediação do solo, degradação e descoloração de efluentes, uso como aditivos na alimentação, cosméticos e indústrias têxteis, ou até mesmo na síntese de compostos orgânicos (PÉREZ; MORALEDA-MUÑOZ, 2011).

3.3.1 *Pleurotus* spp.

Pleurotus spp. é um gênero de cogumelo comestível (MODA, 2003; FELINTO, 1999), possuindo um complexo enzimático lignocelulolítico específico que lhes confere um enorme potencial para a degradação de resíduos (CASTRO et al., 2004; DONINI et al., 2006).

Espécies deste gênero ocupam a terceira posição na produção comercial de cogumelos no mundo, sendo encontrados naturalmente em materiais lignocelulolíticos (OBODAI et al., 2003). São alimentos de baixa caloria e alta umidade (85 a 90% de água) (SÁNCHEZ, 2004; MANZI et al., 1999), contendo de 40% a 45% de proteína bruta, 38% a 45% de carboidratos, 6% a 8% de fibra, 5% a 7% de cinzas e 3% a 4% de lipídeos, com predominância do ácido linoléico (70% a 78%). Contêm vitamina do complexo B (B1 e B2) e C, niacina, biotina e grande quantidade de potássio (2,97%), além de outros minerais, como P, Mg, Ca, Na, Cu, Zn, Fe, Mn e Mo (FURLANI; GODOY, 2005; SIQUEIRA, 2006).

Também tem sido bastante reportados como alimentos com atividade médica em muitas terapias e estas citações reportam as atividades: antitumoral, antiviral, indução de atividade imunológica, e apresentam atividades: antioxidante (Yang, Lin e Mau, 2002) antimicrobiana, antimitogênica e antiproliferativa (Ngai and Ng, 2004).

São conhecidos pela produção de enzimas como manganês-peroxidase, peroxidases e lacases (COHEN, 2002). O ataque inicial à madeira precisa ser extracelular, não-específico e oxidativo já que a lignina é um polímero aromático que proporciona à célula rigidez, impermeabilidade e resistência microbiana (KIRK, 1986; KLYOSOV, 1990). Através deste sistema, esses fungos são capazes de transformar macromoléculas orgânicas complexas em compostos simples (PHILIPPOUSSIS et al., 2001).

Constituintes como vitaminas, proteínas, lipídeos e fibras vêm sendo focados por profissionais das áreas da saúde e de alimentos, uma vez que desempenham funções importantes no organismo humano e animal (FURLANI; GODOY, 2007). Em várias espécies de *Pleurotus*, os carboidratos e proteínas, também se constituem como

os maiores componentes, seguidos de minerais; já o teor de gorduras é baixo na maioria das espécies (CONFROTIN, 2006).

Segundo Silva et al. (2007), cogumelos produzidos em substratos mais ricos em nitrogênio podem ser também mais ricos em proteína, pois os valores nutricionais estão diretamente ligados com a composição química do substrato e com as condições de cultivo.

Diversos estudos mostram as quantidades de nutrientes encontradas em fungos do gênero *Pleurotus* em diferentes substratos. A Tabela 2 abaixo mostra os valores encontrados em espécies diferentes de *Pleurotus* estudados recentemente:

Tabela 2 - Composição de nutrientes avaliadas no gênero *Pleurotus* sp.

Autor	Fungo	Substrato	Proteína	Lípídeo	Carboidrato	Fibra	Cinza
Silva et al. (2007)	<i>P. sajor-caju</i>	Alto teor de N	28%	1,91%	-	4,7%	6,4%
Furlani e Godoy (2007)	<i>P. shimeji</i>	-	22,22%	4,30%	-	39,6%	-
Bonatti et al. (2003)	<i>P. ostreatus</i>	Palha de	16,21%	-	40,03%	7,60%	4,08%
	<i>P. sajor-caju</i>	bananeira	16,86%	-	46,97%	9,45%	5,58%
Sturion e Oetterer (1995)	<i>Pleurotus</i> sp.	-	17,38% a	1,54% a	-	-	-
			25,31%	1,86%	-	-	-
Ranzani e Sturion (1998)	<i>P. sp "florida"</i>	Folha de	17,4% a	-	-	-	-
	<i>P. sajor-caju</i>	bananeira	24,1%	-	-	-	-
Manzi et al. (1999)	<i>P. ostreatus</i>	Folha de	19,93% a	-	-	-	6,9% a
		bananeira	34,73%	-	-	-	10,5%
Cheung (1996)	<i>Pleurotus</i> spp.	-	-	-	-	42%	-
Ragunathan e Swaminathan (2003)	<i>P. sajor-caju</i>	Resíduos	25,63%	-	40,13%	11,40%	-
	<i>P. platypus</i>	lignocelulo-	a	-	a	a	-
	<i>P. citrinopileatus</i>	líticos	44,30%	-	46,20%	20,48%	-
Wadt (2008)	<i>P. sajor-caju</i>	Vinhaça	18,56%	-	-	40,54%	20,23%
	<i>Pleurotus</i> sp.		31,08%	-	-	31,08%	21,41%
	<i>P. shimeji</i>		17,62%	-	-	39,35%	22,99%
	<i>P. flabelatus</i>		18,80%	-	-	36,37%	21,73%

Estudos mostram, ainda, a composição química encontrada em algumas espécies de *Pleurotus* sp. O micélio de *P. sajor-caju* possui 2,2% de P; 0,52% de Na; 0,24% de Mg; 0,62% de K; 0,84% de Ca; 124 ppm de Fe e 29 ppm de Mn (CHAHAL,

1989). Moda (2003), encontrou valores semelhantes para este mesmo fungo: 17,4% de N; 4,32% de K; 1,97% de P; 0,46 de Mg; 0,77% de S, entre outros minerais. A composição dos fungos varia de acordo com a origem, solo, clima e condições de cultivo, apresentando diferenças significativas entre cogumelos da mesma espécie provenientes de lotes diferentes; embora água, carboidratos e proteínas mantenham-se como os principais constituintes (FURLANI e GODOY, 2007).

3.4 Enzimas ligninolíticas

O grande desafio de pesquisadores que atuam na área de biodegradação é a busca contínua de microrganismos versáteis, capazes de degradar de maneira eficiente um grande número de poluentes a um baixo custo operacional. Na prática, sabe-se que isto é muito difícil principalmente em função da diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente (KUNZ et al., 2002).

Os processos biológicos tradicionalmente utilizados não são destrutivos, ou seja, embora o volume dos resíduos possa ser significativamente diminuído, a disposição final das fases sólidas continua sendo um problema sem solução. Em função desta desvantagem, destacam-se os estudos envolvendo enzimas ligninolíticas, produzidas a partir dos fungos de decomposição branca. Estima-se que grande parte dos problemas apresentados pelos processos biológicos convencionais poderiam ser contornados com a utilização de reatores enzimáticos (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2002).

As vantagens potenciais do tratamento enzimático quando comparadas a tratamentos convencionais incluem: aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em concentrações altas e baixas dos contaminantes, atuação num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, necessidade de aclimatização de biomassa e o fácil processo de controle, entre outros (DURÁN; ESPOSITO, 2000). As enzimas podem atuar em compostos recalcitrantes específicos para removê-los por precipitação ou transformação em outros produtos inócuos (DURÁN, ESPOSITO, 2000). Podem também mudar as características de um determinado rejeito para torná-lo mais

receptivo ao tratamento, ou auxiliar na bioconversão dos rejeitos em produtos de maior valor agregado (KARAM; NICELL, 1997).

3.4.1 Lacase

A enzima lacase (EC 1.10.32) pertence à família das multicobre-oxidases e oxida principalmente compostos fenólicos, agindo na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina (DURAN; ESPÓSITO, 1997). São produzidas pela maioria dos basidiomicetos e suas massas moleculares variam de 45 à 100 kDa (MOREIRA NETO, 2006) dependendo da espécie e da isoforma. Segundo Azevedo (2004), as enzimas lacases são fenoloxidasas produzidas por fungos e plantas e não são dependentes de H_2O_2 para sua atividade. Possuem um íon cobre em seu sítio ativo que pro processo oxidativo remove fenilpropano mais externo à cadeia, gerando radicais fenoloxila.

A sua capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, permite que as lacases sejam usadas em diversas aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes em processos têxteis, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas (DÚRAN et al., 2002; MOREIRA NETO, 2006; FERREIRA, 2009).

Essas enzimas são geralmente extracelulares, encontrando-se ligadas à membrana celular (SZKLARZ et al., 1989). São enzimas excepcionalmente versáteis, catalizando reações com diferentes substratos, alguns destes recalcitrantes. Ainda, participam de outros eventos ligninolíticos de grande importância, como oxidação de unidades não-fenólicas de lignina, a geração de H_2O_2 , a formação de radicais hidroxilas e produção de Mn^{3+} . Atua, também, na geração de formas de oxigênio reduzidas (HÖFER; SCHLOSSER, 2002; GONZALES et al., 2002; SAPARRAT et al., 2002). A produção de lacase é afetada por diversos fatores durante o desenvolvimento do fungo, como a composição do meio de cultura, pH, temperatura e taxa de aeração (KAHRAMAN; GURDAL, 2002).

3.4.2 Peroxidase

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) são um grupo de enzimas oxi-redutases que catalisam a redução do peróxido e a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (IKEHATA, 2004). A sua ação enzimática provem da redução cíclica do átomo de ferro no grupo hematina, na presença de H_2O_2 , a enzima se combina com esta molécula, formando um complexo que pode oxidar uma variedade de doadores de elétrons formando água no final (DELLAMATRICE, 2005).

São enzimas extracelulares dependentes de H_2O_2 para atuarem sobre a lignina, desempenhando importante papel durante a degradação do substrato (POMPEU, 2010). A enzima peroxidase é conhecida por sua capacidade de remoção de grupamentos fenólicos e aminas aromáticas de soluções aquosas e também de descoloração de efluentes da indústria têxtil.

Essas enzimas ocorrem em mais de uma forma molecular em uma mesma espécie, em um mesmo tecido, ou até mesmo, em uma mesma célula. A presença de múltiplas isoenzimas torna difícil a atribuição de funções biológicas específicas às isoformas individualmente. Portanto, a função fisiológica de cada isoenzima encontra-se apenas parcialmente compreendida, devido em parte, a complexidade das isoenzimas presentes em um dado tecido (GILLIKIN e GRAHAM, 1991, citado por WILBERG, 2003).

3.4.3 Manganês-peroxidase

A manganês peroxidase (MnP; E.C.1.11.1.13) é uma enzima extracelular, glicosilada, e massa molecular de 45-47 kDa e é dependente de hidrogênio e do íon Mn^{+2} e α -cetoácidos como o lactato, os quais são responsáveis por estabilizar sua atividade (AZEVEDO, 2004).

A MnP gera Mn^{+3} , um poderoso agente oxidante, que possui papel chave no primeiro estágio de ligninólise. Este íon oxida determinadas estruturas aromáticas não-fenólicas de lignina, resultando na formação de radicais livres que reduzem o Fe^{+3} e iniciam reações com o envolvimento de radicais hidroxilas. Durante a oxidação da

lignina, o Mn^{+3} é quelado e estabilizado por ácidos orgânicos, atuando desta forma como mediador de baixa massa molecular. Este sistema MnP é forte o bastante para degradar ligações entre carbonos e estruturas não-fenólicas de lignina, pela subtração de hidrogênio do anel aromático (HIGUCHI, 2004; FERREIRA, 2009).

Uma cooperação “positiva” da MnP com outras oxidoredutases extracelulares como a lacase, assim como MnP e celulases, resultaram no aumento da despolimerização de lignina (HOFRICHTER, 2002; MOREIRA NETO, 2006).

3.4.4 Histórico de trabalhos desenvolvidos

Diversos trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Ecologia Aplicada utilizando vinhaça como meio de crescimento e produção de enzimas do sistema lignolítico dos fungos. Os estudos com vinhaça inicialmente foram desenvolvidos para produção de biomassa e de exopolissacarídeos (EPS) por Wadt (2008) utilizando fungos comestíveis do gênero *Pleurotus* em meio de vinhaça 100% e diluída em meio sintético para fungos (RODRIGUEZ, et al., 2003) a 75% e 50%. Utilizou-se também a vinhaça incrementada com minerais o que dobrou a produção de biomassa fúngica. A produção de biomassa seca variou de 4 a 29 g L⁻¹ concluindo então que a vinhaça apresentou propriedades de meio de cultura para *Pleurotus* produzindo proteínas com alto valor nutricional. Das várias espécies de *Pleurotus* testadas a *P.sajor caju* CCB 020 foi a mais promissora, além de produzir 11 g L⁻¹ de biomassa seca em vinhaça pura e 28 g L⁻¹ em vinhaça acrescentada de minerais, após 14 dias de cultivo também proporcionou a descoloração completa da vinhaça.

Estudos de descoloração/degradação da vinhaça foram iniciados por Ferreira (2009) avaliando a atividade enzimática de lacase, manganês peroxidase e outras peroxidases relacionadas a descoloração da vinhaça, evidenciando a importância da atividade da lacase na descoloração. Dos fungos testados, três ascomicetos e cinco basidiomicetos, novamente o *P. sajor caju* CCB020 se destacou na descoloração da vinhaça (FERREIRA, et al. 2010). A lacase teve pico de atividade aos nove dias após inoculação, variando de 400-450 UI L⁻¹ e MnP aos 12º dia de cultivo com agitação a 28°C. Foi observado também diminuição da DQO em 83% e DBO em 75%, e a turbidez e cor ao redor de 99%. Foram testados também a toxicidade para organismos

aquáticos: algas, *Daphnias* e *Hydra* (FERREIRA, et al. 2011) mostrando a eficiência do fungo *P. sajor caju* na degradação da vinhaça. Aguiar (2008) mostrou aumento da produção das enzimas ligninolíticas em meio sólido adicionado de vinhaça comparado com outros meios e diversos tratamentos. Mostrou também que o ascomiceto *Tricoderma reesei* apresentou atividade de lacase, MnP e outras peroxidases, na presença de vinhaça, sendo que não foi encontrado na literatura sobre atividade ligninolítica dessa espécie (AGUIAR et al., 2010).

3.5 *Danio rerio*

O paulistinha (*Danio rerio*), conhecido também, como peixe-zebra ou zebrafish, é um peixe de água doce de clima tropical, pertencente à família Cyprinidae, Ordem Cypriniformes (Froese et al., 2007). É um peixe popular de aquário, frequentemente vendido em loja e um importante modelo de organismo vertebrado para pesquisas científicas (FIGURA 4).

O *Danio rerio* é conhecido como zebrafish devido as 5 listras horizontais de coloração azul na lateral e em toda a extensão do seu corpo. Machos possuem o corpo na forma de torpedo e apresente listras douradas entre as azuis; fêmeas possuem barriga mais protuberante e tem listras prateadas entre as azuis ao invés de douradas. O zebrafish pode crescer até 6,4 centímetros, sendo incomum passarem de 4 cm em cativeiro (SPENCE, 2008).

Figura 4 - *Danio rerio*

Este peixe é onívoro, possuindo como principal alimentação zooplankton, insetos, larvas de insetos e fitoplanktons. Ainda pode comer uma variedade de alimentos como minhocas e pequenos crustáceos (SPENCE, 2008). Muitos ainda aceitam a alimentação industrial na forma de flocos quando em aquários.

D. rerio é um comum e eficiente organismo-teste para estudos de desenvolvimento de vertebrados e funções genômicas (MAYDEN, 2007). Pesquisas com *D. rerio* tem permitido avanços no desenvolvimento de campos como biologia, oncologia (XIANG et al., 2009), toxicologia (HILL, 2005), estudos reprodutivos, teratologia, genética, neurobiologia, ciências ambientais, cultura de células e medicina regenerativa (MAJOR, 2007).

De acordo com OECD (2000), a temperatura ideal para testes com esta espécie de peixe é entre 21 – 25 °C apresentando um fotoperíodo de 12 a 16 horas. A variação de peso inicial para testes é de 0,050 g – 0,100 g. Os peixes usados no teste devem ser selecionados de uma única população do mesmo criadouro e devem permanecer pelo menos 2 semanas antes do teste sob condições de água e iluminação similares às usadas no teste. A alimentação deve ser feita diariamente em uma proporção mínima de 2% do peso corpóreo do peixe e de preferência 4% do peso corpóreo durante os testes.

Segundo Dahm (2006) e Jones (2007), o paulistinha apresenta inúmeras vantagens que o capacita como um organismo-teste como (DAHM, 2006; JONES, 2007):

- Genoma completamente seqüenciado;
- Mudanças de comportamento são facilmente observadas e testadas;
- Disponibilidade de produção e caracterização de mutantes;
- Rápido desenvolvimento embrionário;
- As células embrionárias podem ser fundidas produzindo um organismo homozigoto;
- Demonstram similaridade aos mamíferos e humanos em testes de toxicidade;
- Apresentam ciclo de sono diurno, similar ao ciclo de mamíferos, o que facilita pesquisas de comportamento e fisiologia;

Em função de raramente ser possível a observação direta da alimentação de peixes existem muitas dificuldades na análise e interpretação desses dados, sendo algumas delas devidas ao comportamento dos peixes, como a seletividade do alimento e outras a fatores fisiológicos, como taxas diferenciadas de digestão (Royce, 1996).

Há várias metodologias desenvolvidas para avaliar a dieta de peixes porém, existem poucos critérios para determinar qual a mais conveniente, uma vez que todas apresentam vantagens e desvantagens. Para um determinado estudo, um método pode ser melhor que outro dependendo dos objetivos do trabalho e da natureza do alimento (Windell e Bowen, 1978). Entretanto, a maneira com que essas análises são feitas variam substancialmente, tornando difícil a comparação de estudos na área (Hansson, 1998).

O objetivo de alimentar os peixes é disponibilizar, de forma econômica, uma nutrição adequada para o seu crescimento e perfeito desenvolvimento. Para isto, devem ser utilizados alimentos de qualidade e nas quantidades corretas, além de empregar técnicas de alimentação apropriadas.

É importante o conhecimento dos hábitos alimentares dos peixes para a adequação da ração a ser fornecida. O hábito alimentar nos fornece uma idéia das necessidades nutricionais de cada espécie. Por exemplo: peixes carnívoros aproveitam melhor os alimentos de origem animal, necessitando de maior conteúdo protéico na ração quando criados em cativeiro. Peixes onívoros e herbívoros são menos exigentes em conteúdo protéico e aproveitam bem uma variedade maior de alimentos. O manejo alimentar, portanto, deve levar em consideração os hábitos do animal, o sistema de cultivo, a produtividade natural, as condições climáticas o manuseio do alimento, entre outros aspectos (ANFALPET, 2000).

A digestibilidade é um dos aspectos mais importantes na avaliação dos alimentos (PEZZATO et al., 1988; SADIKY; JAUNCEY, 1995; DEGANI et al., 1997) quanto a sua eficiência biológica (HANLEY, 1987). O valor nutricional dos alimentos baseia-se não somente na composição química, mas também na quantidade de nutrientes e de energia que o peixe pode absorver e utilizar (NRC, 1993).

De acordo com Boscolo et al. (2001), os alimentos protéicos são responsáveis pela maior fração dos custos da ração na piscicultura, além de comporem grande

quantidade nas formulações (KIKUCHI, 1999) tornando-se necessário, então, uma ração rica em proteína, o que aumenta os custos de produção. Alimentos protéicos alternativos à farinha de peixe têm sido estudados com o objetivo de diminuir o custo das rações aquícolas (BOOTH et al., 2001; SIDDHURAJU; BECKER, 2001). Entretanto, o fornecimento de alimento adequado em quantidade e qualidade e a falta de informações dos valores de digestibilidade de nutrientes pelos peixes ainda são desafios para que haja o sucesso econômico da piscicultura.

Hahn e Delavira (2002) apresentaram uma compilação de 23 periódicos sobre metodologias mais usadas para alimentação natural de peixes na área de ecologia e meio ambiente. A opção mais registrada, nos artigos analisados, foi por um método qualitativo (ocorrência) e um quantitativo (numérico, volumétrico e gravimétrico), cujos resultados foram apresentados principalmente na forma de gráficos de área ou de barras (como percentual), sem aplicação de índices alimentares. Quando os resultados foram interpretados por apenas um método, o gravimétrico foi o mais utilizado. O percentual de peso ou volume tem sido considerado por alguns autores como a abordagem mais indicada para descrever a importância das presas na dieta (LIAO et al., 2001). Ainda de acordo com as autoras, existem divergências entre os pesquisadores sobre qual é o melhor método a ser utilizado o que se deve principalmente a diferenças nos objetivos dos estudos, ao tipo, tamanho e digestibilidade do alimento, acarretando uma não uniformidade dos procedimentos e dificultando a comparação dos resultados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ecologia Aplicada situado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo (CENA-USP) na cidade de Piracicaba –SP, durante o período de 2009-2011.

4.1 Vinhaça

A vinhaça foi cedida pela Usina sucroalcooleira RAÍZEN - unidade Costa Pinto (Joint Venture formada entre as empresas COSAN e SHELL), localizada em Piracicaba-SP, durante a safra 2010/2011. A coleta foi feita diretamente na saída da dorna de fermentação sendo considerada livre de contaminantes.

Foram coletados 80 litros de vinhaça em galões de 20 litros, feita a medição de pH e, em seguida, esse resíduo foi mantido congelado em freezer à -18°C para que não houvesse ação de microrganismos até seu uso. Para a execução dos testes a vinhaça foi descongelada até temperatura ambiente e em seguida esterilizada em autoclave à 121° C durante 15 minutos.

4.2 Fungos

Para a realização deste projeto, foram selecionados quatro fungos basidiomicetos comestíveis pertencentes ao estoque de culturas do Laboratório de Ecologia Aplicada do CENA/USP, Piracicaba – SP, sendo eles: *Pleurotus sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus* sp. CCB 068, *Pleurotus* sp. *shimeji* e *Pleurotus cf flabellatus* CCB 396 (FIGURA 5). A escolha dos microrganismos foi baseada nos resultados obtidos por Wadt (2008); Aguiar Filho (2008); Ferreira (2009) e Pompeu (2010) que satisfaziam os objetivos deste trabalho.

Figura 5 - Fungos basidiomicetos *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 (a); *Pleurotus* sp. CCB 068 (b); *Pleurotus shimeji* (c); *Pleurotus flabellatus* CCB 396 (d)

4.3 Armazenamento e cultivo

Os fungos foram armazenados em grãos de trigo de acordo com metodologia descrita por Rosolen (2004). Os grãos são previamente hidratados por 24 horas, na proporção de 2:1 (água/trigo), em seguida, foram lavados e cozidos em autoclave, somente tampada, por 30 minutos. Após cozimento, os grãos foram escorridos e acrescentado 0,2% de carbonato de cálcio e 0,8% de sulfato de cálcio na proporção do peso de grãos.

Saquinhas de polietileno (10 x 15 cm) contendo aproximadamente 50 g do grão foram vedados com filtro tampão de algodão e barbante e autoclavados a 121° C por 30 minutos. Após esterilização, os saquinhas foram inoculados com os fungos desejados e mantidos em incubadora por 20 dias a temperatura de 28° C. Uma vez crescido os micélios, os saquinhas foram armazenados sob refrigeração a 4°C e renovados a cada 6 meses. Essa técnica garante maior tempo de armazenamento dos fungos, impede que haja falta de nutrientes e umidade, mantém a produção de enzimas constante além de ser economicamente viável para armazenamento em relação aos meios de cultivo comerciais.

As espécies armazenadas em grãos de trigo foram utilizadas para inoculação em placas de Petri contendo meio sólido de extrato de malte (MEA) da marca HIMEDIA® (50 g L⁻¹) previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. As placas foram, então, incubadas em estufa B.O.D a 28° C, para crescimento dos fungos. A cada sete dias foram realizadas repicagens destes fungos para novas placas contendo meio MEA para utilização nos experimentos.

4.4 Cultivo dos fungos em vinhaça

Os fungos foram inoculados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de vinhaça. Foram utilizados seis frascos por linhagem de fungo (quatro linhagens) mais seis frascos (controle) devidamente autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após atingirem temperatura ambiente, os frascos foram inoculados com o fungo desejado, adicionando três discos de 1 cm de diâmetro, da cultura com sete dias, por frasco. Em seguida, foram colocados para agitação contínua em agitador a 150 rpm por 15 dias para crescimento dos fungos (FIGURA 6).

Figura 6 - Foto do experimento com vinhaça inoculada com fungos em frascos Erlenmeyers

As quatro linhagens foram, também, inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura a base de vinhaça (50 g agar L⁻¹). As placas foram, então, incubadas

em B.O.D a 28°C para crescimento dos fungos. A cada três dias, uma placa de cada linhagem fúngica foi retirada pra análise enzimática.

4.5 Determinação da atividade enzimática

Para o experimento com vinhaça em frascos Erlenmeyers, as amostras foram filtradas com papel filtro Whatman nº 1 em kitassato com auxílio de bomba de vácuo. Os fungos foram armazenados em freezer à -18°C, liofilizados e usados em testes com *Danio rerio*. A vinhaça tratada foi colocada em tubos falcon de 50 mL para leitura imediata das atividades enzimáticas.

Já no experimento com vinhaça sólida em placas, meio de cultivo sólido contendo fungo foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido e seu peso total foi determinado. Desse total, 5 g foi pesado em cadinho de porcelana e congelado em freezer a -18°C por quatro horas. Em seguida, essas amostras foram liofilizadas em Liofilizador L101 da marca LIOTOP para desidratação. Por fim, essas amostras foram maceradas novamente em almofariz tento como produto um “pó”. Tanto a vinhaça líquida tratada quanto o pó de cada amostra foram analisadas para determinação de atividade enzimática (FIGURA 7). Foi pesado 0,1 g do pó obtido do processo descrito, diluído em 10 mL de água destilada, agitado para homogeneização da amostra e centrifugado à uma rotação de 4000 rpm durante 10 minutos para utilização do sobrenadante.

Em tubos de ensaio, foram colocados 1 mL de amostra e fervidos em banho-maria à 100°C durante 15 minutos, para desnaturação das enzimas. Desse modo, essas amostras funcionaram como um controle negativo para o teste. As reações para determinação de atividade enzimática foram feitas em tubos eppendorfs de 1,5 mL e as leituras realizadas em triplicata em Espectrofotômetro (modelo 432) da marca FEMTO.

Figura 7 - Preparo das placas com vinhaça para análise de atividade enzimática

4.5.1 Lacase (EC 1.10.3.2)

Para avaliação da atividade enzimática da lacase foram utilizados Como reagentes:

- **Tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0):** 0,48 g de ácido cítrico + 0,67 g de fosfato de sódio dibásico em 50 mL de H₂O destilada;
- **Solução de Siringaldazina 0,1% em etanol:** 0,05 g de siringaldazina em 50 mL de etanol.

A atividade de lacase foi determinada usando mistura contendo 300 μ L de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 60 μ L de solução enzimática bruta (sobrenadante da amostra), 100 μ L de solução contendo siringaldazina, que é o iniciador da reação e 540 μ L de H₂O destilada totalizando 1 mL. A oxidação da

siringaldazina foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a um comprimento de onda de 525 nm em espectrofotômetro. Foram realizadas leituras nos tempos 0 (logo após adição de siringaldazina) e após 10 minutos de reação para cálculos posteriores. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 :mol de siringaldazina por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $6,5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a siringaldazina oxidada. A atividade da lacase foi expressa em unidade de enzima por litro de caldo enzimático (UI L^{-1}) (SZKLARZ et al., 1989).

4.5.2 Peroxidase (EC 1.11.1.7)

Como reagentes para determinação da atividade de peroxidase foram utilizados:

- **Tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0):** 0,48 g de ácido cítrico + 0,67 g de fosfato de sódio dibásico em 50 mL de H_2O destilada;
- **Solução de H_2O_2 0,002 M:** 30 μL de H_2O_2 em 50 mL de H_2O destilada;
- **Solução de Siringaldazina 0,1% em etanol:** 0,05 g de siringaldazina em 50 mL de etanol.

A atividade de peroxidases foi determinada segundo metodologia de Szklarz et al. (1989), utilizando a siringaldazina como substrato enzimático, oxidando até formação de quinona, na presença de H_2O_2 exógeno no meio da reação.

Adicionou-se em 60 μL de caldo enzimático, 200 μL de tampão citrato-fosfato 0,05 Molar (pH 5,0), 100 μL de solução de H_2O_2 0,002 Molar, 100 μL de solução de siringaldazina 0,1% e 540 μL de H_2O destilada. As leituras foram realizadas com absorbância de 460 nm, no início da reação (tempo 0) e após 10 minutos. A atividade da peroxidase foi expressa em unidade de enzima por litro de caldo enzimático (UI L^{-1}).

4.5.3 Manganês peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13)

Como reagentes para determinação de peroxidase utilizados:

- **Solução de Lactato de sódio 0,25 molar:** 2,8 mL de lactato de sódio em 50 mL de H₂O destilada;
- **Solução de albumina bovina:** 0,25 g de albumina bovina (Albumin Bovine Fraction V, MPBiomedicals) em 50 mL de H₂O destilada;
- **Tampão Succinato de sódio 0,2 molar (pH 4,5):** 2,7 g de succinato de sódio em 50 mL de H₂O destilada;
- **Solução de MnSO₄ 0,002 molar:** 0,017 g de sulfato de manganês em 50 mL de H₂O destilada;
- **Solução de H₂O₂ 0,002 molar:** 30 µL de H₂O₂ em 50 mL de H₂O destilada;
- **Solução de Vermelho de fenol 0,1%:** 0,05 g de vermelho de fenol em 50 mL de H₂O destilada;
- **Solução de NaOH 2N:** 4 g de NaOH em 50 mL de H₂O destilada.

A atividade de MnP foi determinada avaliando-se a oxidação do vermelho de fenol ($L_{610} = 4460 \text{ mol cm}^{-1}$) na presença de manganês e H₂O₂. Em uma mistura de reação composta de 60 µL de caldo enzimático, 540 µL de H₂O destilada, 100 µL de tampão lactato de sódio 0,25 molar, 100 µL de albumina bovina, 100 µL tampão succinato de sódio 0,2 molar, 50 µL de solução de MnSO₄ 0,002 molar e 50 µL de H₂O₂ 0,002 molar, a reação foi iniciada com a adição de 100 µL de vermelho de fenol (0,1%) e a absorbância medida a 610 nm. Foi adicionado 40 µL de NaOH (2,0 N) como solução “stop” da reação após 10 minutos da primeira leitura. A atividade da MnP foi expressa em unidade de enzima por litro de caldo enzimático (UI L⁻¹) (KUWAHARA et al., 1984).

4.5.4 Fórmula para cálculo das atividades enzimáticas

Como resultado da absorbância, quatro valores foram obtidos de cada amostra para cada enzima. Esses valores são transformados de acordo com o fluxograma abaixo (FIGURA 8), para posteriormente serem utilizados na fórmula de atividade enzimática.

Figura 8 - Fluxograma de transformação de valores de absorbância

$$UI/L = \frac{\Delta Abs}{\epsilon \times R \times t} \times 10^6$$

Onde:

ΔAbs = absorbância (Absfinal – Absinicial)

ε = coeficiente de absorção molar

R = volume de solução da amostra

t = tempo de reação em minutos

UI/L = Unidade Internacional, onde internacional significa :mol min⁻¹

- Coeficientes de absorção molar:

Lacase (525 nm) = 65000 L M⁻¹ cm⁻¹

Peroxidase (460 nm) = 29400 L M⁻¹ cm⁻¹

Mangans peroxidase (610 nm) = 4460 L M⁻¹ cm⁻¹

4.6 Análise bromatológica do micélio dos fungos

Para a determinação da composição química do micélio cultivados em vinhaça por 15 dias, os fungos liofilizados foram macerados até a condição de pó. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do CENA/USP seguindo os métodos oficiais da “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1995).

Foram determinados os parâmetros matéria seca (MS); material mineral (MM) ou cinzas (fornece uma estimativa da riqueza da amostra em elementos minerais); matéria orgânica (MO); lignina; proteína bruta (PB) determinada pelo teor de nitrogênio liberado na forma de amônia(método micro KJELDAHL); fibras de detergente neutro (FDN); fibras de detergente ácido (FDA) e extrato etéreo (EE) definido como todas as substâncias extraídas pelo éter (ou clorofórmio): triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol, lecitina, clorofila, álcoois voláteis, resinas e pigmentos.

Os valores encontrados para MS foram dados em g kg⁻¹ de matéria fresca enquanto que os outros parâmetros foram expressos em g kg⁻¹ baseando-se no valor de matéria seca.

4.7 Alimentação de *Danio rerio* com fungo processado

Os fungos cultivados durante 15 dias em vinhaça líquida foram filtrados com papel filtro Whatman nº1 em kitassato com auxílio de bomba à vácuo e liofilizados durante 48 horas para produção de ração para os peixes da espécie *Danio rerio* (FIGURA 9). Os peixes utilizados no experimento foram comprados em loja comercial e mantidos em aquário com capacidade para 25 litros, com substrato composto por areia fina e plantas do gênero *Elodea* sp. para auxiliar na aeração e dar abrigo.

Figura 9 - Fungos liofilizados para ração. *P. sajor-caju* CCB 020 (a, e); *P. sp* CCB 068 (b); *P. flabellatus* CCB 396 (c); *P. shimeji* (d)

O meio de cultura utilizado nos cultivos dos peixes foi de acordo com norma da ABNT-nbr 15088 (2004) e composto por solução 1 (1,5g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 1 litro de H_2O destilada) e solução 2 (0,20 g de KCl + 4,8 g de NaHCO_3 + 6,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 1 litro de H_2O destilada). Em um galão de 20 litros foram adicionados 400 mL de solução 1, 200 mL de solução 2 e completado com H_2O destilada. O pH foi ajustado para 7,2 - 7,6 e o meio mantido em aeração constante por 24 horas para que houvesse saturação de oxigênio. Os peixes foram mantidos nos aquários por duas semanas para aclimação sendo alimentados diariamente com ração comercial da marca TetraMin® (Tropical flakes) e temperatura constante de 22°C.

Após este período, cada peixe foi individualmente pesado em balança analítica e seu comprimento medido em papel milimetrado. Em seguida, foram colocados em béquer de 250 mL contendo 225 mL de meio de cultivo e oxigenação contínua. A cada 5 dias, o meio de cultura foi trocado impedindo acúmulo de sujeiras no fundo dos recipientes.

Os peixes foram alimentados diariamente em uma proporção de 2% do peso médio de todos os peixes. A ração dada para os peixes foi preparada em três concentrações: 100% de fungo liofilizado; 50% de fungo liofilizado + 50% de ração comercial; 100% de ração comercial (controle). Para cada concentração foram

realizadas 5 réplicas com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e temperatura de 22°C, totalizando nove 9 tratamentos distribuídos em 50 béqueres. O teste teve duração de 28 dias ininterruptos sendo coletados dados de massa corpórea e tamanho no 1º e 28º dias (FIGURA 10).

Figura 10 - Teste de alimentação com *D. rerio*

4.8 Análises estatísticas

Os resultados foram trabalhados em Microsoft Office Excel 2007 e submetidos à comparação das médias pelo teste de Tukey (5%) com o auxílio do programa Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas (SASM-Agri).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento micelial dos fungos e descoloração da vinhaça

As quatro espécies de *Pleurotus* apresentaram crescimento satisfatório em meio contendo 100% de vinhaça após 15 dias de cultivo. Houve diferença significativa na biomassa produzida entre as linhagens sendo que os maiores valores foram obtidos com *Pleurotus* sp. CCB 068, tanto para biomassa fresca quanto seca (300,40 g L⁻¹ e 16,27 g L⁻¹, respectivamente) (TABELA 3).

Tabela 3 - Biomassa de fungos cultivados em vinhaça

Fungos	g L ⁻¹	
	Biomassa Fresca	Biomassa Seca
<i>P. sajor-caju</i> CCB 020	209,67 ^c	12,73 ^c
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068	300,40 ^a	16,27 ^a
<i>P. flabellatus</i> CCB 396	174,93 ^d	8,20 ^d
<i>P. shimeji</i>	242,13 ^b	13,27 ^b

Letras iguais indicam que não há diferenças significativas pelo teste de Tukey (5%).

Os valores obtidos estão de acordo com os encontrados por Wadt (2008) que também obteve maiores biomassas para *Pleurotus* sp. CCB 068 (14,80 g L⁻¹) quando cultivado em meio com 100% de vinhaça. A mesma autora constatou, entretanto, que a vinhaça somada a um meio rico em minerais aumentou significativamente a biomassa fúngica (28,8 g L⁻¹). Ferreira (2009) cultivou *P. sajor-caju* em vinhaça nas concentrações de 25%, 50%, 100% e meio sintético para fungos (MSF) durante 12 dias encontrando maiores valores de biomassa fúngica quando cultivados em apenas vinhaça (1,06 g L⁻¹) em relação aos demais tratamentos (0,83-0,91 g L⁻¹) que não diferiram estatisticamente entre si.

Aguiar Filho (2008) quantificou a produção de micélio de diversas linhagens de fungos visando o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar durante 30 dias obtendo maiores valores em meio suplementado com vinhaça. Os fungos que obtiveram maior

biomassa foram *P. sajor-caju* (117,87 g L⁻¹) e *T. reesei* (120,04 g L⁻¹) cultivados a 30°C, confirmando, os resultados de Wadt (2008) que um meio suplementado com vinhaça pode ser melhor para a produção de biomassa de fungos.

Ao contrário do meio sólido, o cultivo submerso de fungos é apropriado para favorecer o aumento de substâncias importantes, as quais podem ser extraídos tanto do líquido quanto do próprio micélio. A biomassa fúngica produzida por este processo pode ser usada com inóculo para a produção de cogumelos comestíveis e/ou para alimentação e complementos nutricionais (SMITH et al., 2002). No caso de basidiomicetos, não ocorre a formação de corpos de frutificação em cultivo líquido, porém a extração da biomassa e metabólitos é facilitada em comparação com métodos de fermentação sólida sendo uma técnica com baixo custo e rápidos resultados podendo ser realizada em larga escala e com vantagem de ser independente das variações sazonais (ROSADO et al., 2003; CONFORTIN, 2006).

Entretanto, Rodriguez et al. (2003), estudando o tratamento de efluentes industriais por um cepa de *Pleurotus* spp. (CCEBI 3024), observou que concentrações a partir de 50% de vinhaça provocaram efeito inibitório no crescimento dos fungos que pode ser atribuído à presença de compostos recalcitrantes e inibidores de crescimento como furfural e/ou compostos fenólicos (LÓPEZ et al., 1999). Em concentrações de 25% de vinhaça, houve efeito estimulante no crescimento dos fungos o que, segundo Bermúdez; Marañón (1998), pode estar relacionado com as baixas concentrações de substâncias tóxicas, prevalecendo a presença de aminoácidos e vitaminas favoráveis ao crescimento.

Consequentemente ao crescimento micelial, observou-se o clareamento e diminuição de turbidez da vinhaça pelos fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. shimeji*. Houve pouca mudança na coloração da vinhaça colonizada com *Pleurotus* sp. CCB 068 e *P. flabellatus* CCB 396 embora observou-se diminuição de partículas e uma vinhaça com baixa turbidez em relação ao controle (FIGURA 11).

A coloração encontrada na vinhaça sem tratamento ocorre devido a presença de caramelos, produtos de degradação alcalina, polifenóis e principalmente melanoidinas, compostos originados durante o processo de fermentação (GOKARN; MAYADEVI, 2000). As melanoidinas são polímeros de alto peso molecular formados

pela reação de Maillard, através da combinação de açúcares e aminoácidos. São substâncias geralmente tóxicas para os microrganismos propícios ao biotratamento de efluentes e altamente recalcitrantes (MIGO et al., 1993; PÉREZ et al., 2006; MOHANA et al., 2008; NAIK, 2008).

Figura 11 - Descoloração da vinhaça incubada durante 15 dias com os fungos *P. sajor-caju* CCB 020 (a); *Pleurotus* sp CCB 068 (b); *P. flabellatus* CCB 396 (c) e *P. shimeji* (d)

Os métodos mais utilizados para a remoção de cor da vinhaça incluem a descoloração a partir de enzimas microbianas que envolvam a quebra de melanoidina e floculação por substâncias secretadas pelos microrganismos. Métodos de degradação química utilizam-se da oxidação dos compostos com ozônio e floculação usando coagulantes inorgânicos (MANE et al., 2006; MOHANA et al., 2008). Os basidiomicetos são eficientes degradadores de compostos recalcitrantes como a melanoidina. Sirianuntaiboon et al. (1995), relatam que o mecanismo de descoloração por *Rhizoctonia* sp. D-90 envolve primeiramente a absorção dos pigmentos pela célula do micélio durante o crescimento do fungo e, finalmente sua acumulação intracelular no citoplasma, e próximo a membrana celular. Posteriormente, enzimas intracelulares atuam na degradação e/ou a melanoidina é absorvida nas células como uma macromolécula atuando como um coletor de peroxidases.

Fungos do gênero *Aspergillus* foram amplamente estudados por apresentarem habilidade para degradar e descolorir efluentes com uma eficiência de 69-75% de descoloração (OHMOMO et al., 1987; MIRANDA et al., 1996; SHAYEGAN et al., 2004; ANGAYARKANNI et al., 2003; MOHAMMAD et al., 2006). Já Ferreira (2009) utilizando basidiomicetos, encontrou valores de até 99% de descoloração da vinhaça.

As atividades desenvolvidas no presente trabalho demonstraram que fungos do gênero *Pleurotus* são considerados eficientes degradadores de substâncias colorantes devido a produção de peroxidases e lacases, embora não produzam lignina peroxidase (LiP). Estas enzimas são extracelulares e apresentam baixa especificidade para o substrato tornando esses organismos bastante interessantes para o tratamento de resíduos ou subprodutos de características variadas (DELLAMTRICE, 2005) como é o caso da vinhaça.

5.2 Determinação da atividade enzimática dos fungos crescidos em vinhaça

De acordo com metodologia proposta em trabalhos recentes, os quais mostram esses dois pontos como os que possuem maiores valores de atividade enzimática (FERREIRA et al., 2010; POMPEU, 2010; AGUIAR FILHO, 2008). A determinação da atividade das enzimas em vinhaça líquida foi realizada aos 6º e 15º dias, após a inoculação dos fungos. Os valores para cada enzima encontrados em meio de vinhaça líquida foram dados em UI L⁻¹. Já em meio sólido, os valores de atividade enzimática foram medidos em UI g⁻¹ Matéria seca (MS), coletados a cada 3 dias a partir da inoculação dos fungos uma vez que não foram encontrados trabalhos que usassem este mesmo tipo de meio suporte para produção de enzimas.

5.2.1 Atividade enzimática de lacase em vinhaça

Os maiores valores de atividade enzimática encontrados para a lacase em meio de vinhaça líquida medidos no sexto dia foram obtidos pelo fungo *Pleurotus* sp. CCB 068 (14,24 UI L⁻¹) e *P. flabellatus* CCB 396 (6,35 U L⁻¹). Para os demais fungos

cultivados, *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. shimeji*, não foi observado crescimento e tão poucas atividades enzimáticas. Por outro lado, após o 15º dia de incubação, *sajor-caju* CCB 020 ($25,01 \text{ UI L}^{-1}$) apresentou a maior atividade, seguido pelo fungo *Pleurotus* sp. CCB 068 ($12,91 \text{ UI L}^{-1}$) e *P. shimeji* ($8,23 \text{ UI L}^{-1}$) enquanto que *P. flabellatus* CCB 396 não apresentou atividade da enzima. Além da produção da enzima aos 15 dias de cultivo *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. shimeji* tiveram um aumento significativo da biomassa e foram mais eficazes no processo de descoloração da vinhaça em relação aos outros fungos (FIGURA 12).

Figura 12 - Atividade enzimática de lacase em meio de vinhaça líquida no 6º e 15º dias de cultivo

Estes valores são conflitantes com os encontrados por Ferreira (2009) que encontrou atividade de lacase acima de 350 UI L^{-1} ao sexto dia de cultivo, em meio com 100% de vinhaça, para *P. sajor-caju* CCB 020 e ao 15º dia valores menores de atividade, próximo à 50 UI L^{-1} . Isso se deve, provavelmente a variação na composição da vinhaça nas diferentes safras.

Por outro lado, os valores de atividade enzimática de lacase dos fungos cultivados em meio com vinhaça sólida se mostraram significativamente maiores que em vinhaça líquida. Os maiores valores encontrados foram para *P. sajor-caju* CCB 020 ($1257,43 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$), *P. shimeji* ($938,46 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$), *Pleurotus* sp. CCB 068 ($397,43 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$) aos 12 dias de incubação e para *P. flabellatus* CCB 396 o maior valor foi de $16,92 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$ ao terceiro dia de incubação (FIGURA 13).

Figura 13 - Atividade enzimática de lacase em meio sólido de vinhaça durante 15 dias de cultivo

Levando em conta a literatura consultada, o presente trabalho aponta que a vinhaça no estado de meio sólido (composição de vinhaça + ágar) mostrou-se altamente eficiente na produção da enzima lacase em relação a outros meios de cultivo.

Os fungos *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* foram cultivados em meio de bagaço moído (cana-de-açúcar) suplementado com vinhaça por Aguiar Filho (2008) obtendo maiores valores de atividade enzimática no sexto dia para *P. sajor-caju* CCB 020 (± 10 UI L⁻¹) e no 15º dia para *P. ostreatus* (300 UI L⁻¹). Pompeu (2010) comparou a atividade de lacase produzida por *P. sajor-caju* em meio de vinhaça, meio de vinhaça com glicose, meio de bagaço e palha de cana com vinhaça em relação ao meio de bagaço contendo extrato de levedura, encontrando valores até 100 vezes maiores de atividade enzimática no meio suprido com extrato de levedura comparado aos outros.

A pesquisa de enzimas ligninocelulolíticas em bagaço de cana-de-açúcar feita por Menezes et al. (2009) revelou a presença da enzima lacase, destacando-se a linhagem *Pleurotus* sp. BCCB 068 com as atividades de 6,23 UI L⁻¹ (15º dia) e 4,68 UI L⁻¹ (20º dia). As demais linhagens não obtiveram resultados expressivos, tendo o fungo *P. sajor-caju* obtido a atividade máxima de 3,52 UI L⁻¹ (10º dia) e a linhagem *Pleurotus thailandia* 1,63 UI mL⁻¹ (10º dia). Trabalhos realizados por Kumaran e colaboradores (1997), apresentaram para o fungo *P. sajor-caju* 10,6 UI L⁻¹ de atividade de lacase, em substrato lignocelulósico.

No trabalho de Gonçalves (2010), o resíduo de cervejaria mostrou-se como um bom meio no que se refere à produção de lacase pelo fungo *Coriolopsis byrsina*,

apresentando valor máximo de 822,64 UI g⁻¹ MS, próximo ao valor encontrado no cultivo em farelo de trigo. Papinutti e Forchiassin (2007) estudaram a produção de enzimas lignocelulolíticas em farelo de soja e farelo de soja misturado com farelo de trigo, por *Fomes sclerodermeus* e encontraram valores semelhantes de atividade para a enzima lacase (520 UI g⁻¹ MS).

Ainda, pode-se observar na Figura 14 que a lacase apresenta picos de atividade no sexto e 12º dias seguidos de um declínio na quantidade de atividade enzimática o que pode ser explicado pelo fato das enzimas perderem a atividade rapidamente quando em condições adversas, como mudanças de temperatura ou pH.

Estas enzimas lignocelulolíticas podem ser inativadas por processos bióticos e/ou abióticos, como adsorção a matriz orgânica do substrato fúngico, desnaturação por acidez ou alcalinidade extrema, desnaturação irreversível pela exposição prolongada a radicais produzidos pelas enzimas ou biodegradação por proteases (CHEFETZ et al., 1998; LI et al., 1999; PALMIERI et al., 2000; AHN et al., 2002; KEUM; LI, 2004). É evidenciado que a lacase é ou são excretadas em estágios tardios do crescimento do fungo, participando de modo significativo na degradação de substratos. Quando as condições do meio se tornam limitantes para o crescimento do fungo, outras enzimas são produzidas como peroxidases ou mecanismos com a finalidade de degradar compostos complexos (FERREIRA, 2009).

A grande variação de atividade enzimática de lacase demonstra que um mesmo fungo, quando submetido a diferentes condições e fontes de nutrientes, pode apresentar uma produção enzimática variável além de estar diretamente relacionada com a quantidade de biomassa produzida como é o caso de espécies de *Pleurotus* (DAS et al., 1997). A lacase promove a desestabilidade das moléculas fenólicas por meio da retirada seqüencial de dois elétrons permitindo a ocorrência da hidrólise (KANDELBAUER; GUBITZ, 2001). Pode também promover a demetilação da molécula e posterior rompimento de anéis aromáticos e ligações entre carbonos em estruturas fenólicas (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002). A detecção de altos valores de atividade de lacase em meios compostos por vinhaça e a permanência desta atividade durante o crescimento do fungo permite valorizar a obtenção desta enzima em um meio não

convencional para seu emprego de forma imobilizada (RODRIGUEZ et al., 2003; Aguiar et al. 2011).

5.2.2 Atividade enzimática de peroxidase em vinhaça

O perfil da atividade de peroxidases em meio com vinhaça líquida no sexto dia de incubação mostrou-se semelhante ao encontrado para a enzima lacase. Somente os fungos *Pleurotus* sp. CCB 068 e *P. flabellatus* CCB 396 apresentaram atividade enzimática significativa de 6,519 UI L⁻¹ e 9,467 UI L⁻¹, respectivamente. Não foi observado crescimento micelial ou atividade enzimática de peroxidase para *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. shimeji* ao sexto dia após inoculação em vinhaça.

Ao 15º dia de incubação em vinhaça, *P. sajor-caju* CCB 020 apresentou maior atividade enzimática (29,56 UI L⁻¹) seguido por *Pleurotus* sp. CCB 068 (9,15 UI L⁻¹) e *P. flabellatus* CCB 396 (4,81 UI L⁻¹). O fungo *P. shimeji* não apresentou atividade para peroxidase aos 15 dias (FIGURA 14), entretanto houve formação significativa de biomassa e descoloração da vinhaça.

Figura 14 - Atividade enzimática de peroxidase em meio de vinhaça líquida no 6º e 15º dias de cultivo

Quando cultivados em meio de vinhaça sólida, os fungos exibiram valores inversos de atividade enzimática para peroxidase em relação ao meio líquido. A partir no terceiro dia de incubação foi observada atividade da enzima para os fungos *P. sajor-caju* CCB 020 (88,15 UI g⁻¹ MS) e *P. shimeji* (53,29 UI g⁻¹ MS), sendo que os maiores

valores encontrados para peroxidase foram obtidos pelos mesmos ao sexto dia (676,02 UI g⁻¹ MS e 401,92 UI g⁻¹ MS, respectivamente). Já para o fungo *Pleurotus* sp. CCB 068 o maior valor de atividade enzimática foi de 284,01 UI g⁻¹ MS no nono dia de incubação e para *P. flabellatus* CCB 396 foi de 57,82 UI g⁻¹ MS somente aos 15 dias de incubação (FIGURA 15).

Figura 15 - Atividade enzimática de peroxidase em meio sólido de vinhaça durante 15 dias de cultivo

Trabalhos anteriores realizados no mesmo laboratório, por outros autores, com as mesmas linhagens mostraram valores inferiores de atividade de peroxidase em relação à atual pesquisa. Aguiar Filho (2008), testando a atividade enzimática em bagaço de cana-de-açúcar + vinhaça (com e sem tratamento com H₂SO₄, NaOH e H₂O₂), obteve valores máximos com o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 no meio sem tratamento (7,50 U L⁻¹) e no bagaço tratado com peróxido de hidrogênio (2,17 U L⁻¹). Por outro lado, não foi observada atividade enzimática nos meios contendo vinhaça cultivando *P. sajor-caju* no trabalho de Ferreira (2009). Já Pompeu (2010), acrescentando extrato de levedura ao bagaço + palha de cana, obteve valores de 150 (0,5% de extrato) a 355 (1% de extrato) vezes maior, que o meio contendo somente bagaço e palha + vinhaça.

Munari et al. (2003) utilizou efluentes provenientes de uma indústria de celulose dos estágios de deslignificação com oxigênio a média consistência (MCO_D) e do branqueamento (hipoclorito de sódio e oxigênio), acrescidos de glicose, como meio

para produção de enzimas, por *P. saior-caju* e verificou que as atividades de peroxidases apresentaram pico de aproximadamente 10 UI mL⁻¹ no sétimo dia de cultivo, com 15 g L⁻¹ de glicose, sendo que para os tratamentos com 5 e 10 g L⁻¹ de glicose este ocorreu apenas no 9º dia.

O papel das peroxidases de origem microbiológica na polimerização de ácidos fenólicos é reconhecidamente o de transformação de substâncias aleloquímicas em substâncias húmicas estáveis e não tóxicas (ADLER *et al.*, 1994). A enzima peroxidase é conhecida por sua capacidade de remoção de grupamentos fenólicos e aminas aromáticas de soluções aquosas e também a descoloração de efluentes. O tratamento com peroxidase resulta na remoção de grupamentos fenólicos tóxicos dos efluentes industriais, usando peróxido de hidrogênio no processo. Na indústria de papel e celulose é empregada na etapa de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes (FORGIARINI, 2009) e como foi confirmado no presente trabalho fazem parte do complexo enzimático capaz de promover o clareamento de outros subprodutos como é o caso da vinhaça.

5.2.3 Atividade enzimática de manganês-peroxidase (MnP) em vinhaça

As análises de atividade enzimática de MnP, em meio de vinhaça mostraram que, no 6º dia de incubação, somente os fungos *Pleurotus* sp. CCB 068 e *P. flabellatus* CCB 396 apresentaram atividade da enzima de 10,65 UI L⁻¹ e 4,85 UI L⁻¹, respectivamente. Como já foi mencionado, não houve crescimento micelial de *P. saior-caju* CCB 020 e *P. shimeji* até o sexto dia e, portanto, não foi observado atividade de MnP para esses basidiomicetos.

Quanto aos valores de atividade da enzima aos 15 dias de incubação, o fungo *P. saior-caju* CCB 020 foi o que apresentou o maior valor de 318,94 UI L⁻¹, destacando-se em relação aos outros fungos. *P. shimeji* e *Pleurotus* sp. CCB 068 também apresentaram atividade de MnP porém, em menor quantidade (40,91 UI L⁻¹ e 34,94 UI L⁻¹) (FIGURA 16).

Figura 16 - Atividade de manganês-peroxidase em meio de vinhaça líquida no 6º e 15º dias de cultivo

Foi observado comportamento semelhante na atividade de MnP no meio de cultivo com vinhaça sólida. No 6º dia de cultivo, encontrou-se valores de atividade para os fungos *P. shimeji* (37,36 UI g⁻¹ MS), *Pleurotus* sp. CCB 068 (13,07 UI g⁻¹ MS) e *P. flabellatus* CCB 396 (11,21 UI g⁻¹ MS). Esses valores apresentaram decréscimo no 12º dia chegando a valores máximos de 7,47 UI g⁻¹ MS por *P. flabellatus* CCB 396, o qual não apresentou atividade no último dia. Já aos quinze dias após a inoculação dos fungos no meio, *P. sajor-caju* CCB 020 alcançou o maior valor de MnP (106,50 UI g⁻¹ MS), seguido de *Pleurotus* sp. CCB 068 (50,48 UI g⁻¹ MS) e *P. shimeji* (16,81 UI g⁻¹ MS) (FIGURA 17).

Figura 17 - Atividade enzimática de manganês-peroxidase em meio sólido de vinhaça durante 15 dias de cultivo

No trabalho de Ferreira (2009), o máximo de atividade atingido foi no 12º dia com valores entre 60-80 UI L⁻¹ para todos os três tratamentos (vinhaça *in natura*, vinhaça + meio sintético para fungos e vinhaça + glicose) utilizando *P. sajor-caju*. Utilizando este mesmo fungo, Aguiar Filho (2008) encontrou valores inferiores para manganês-peroxidase de 18 UI L⁻¹ aos 12 dias de cultivo em meio de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com vinhaça. Pompeu (2010) conseguiu uma atividade máxima de MnP por *P. sajor-caju* (47,1 UI L⁻¹) quando a incubação deste fungo foi feita em bagaço e palha de cana-de-açúcar com a adição de 0,5% de extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Menezes et al.(2009) também testou o potencial de fungos basidiomicetos em produzir enzimas MnP em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com meio nutritivo e obteve maior atividade com a linhagem *Pleurotus* sp. BCCB068 com 31,56 UI L⁻¹ (5º dia) e 24,84 UI L⁻¹ (30º dia). As demais linhagens também produziram atividades consideráveis desta enzima, com a linhagem *P. sajor-caju* atingindo a atividade máxima de 22,86 UI L⁻¹ (10º dia) e a linhagem *Pleurotus tailandia* 23,58 UI mL⁻¹ (15º dia). Outro trabalho mostra o cultivo de 25 linhagens de basidiomicetos em farelo de trigo e farelo de algodão por 5 semanas apresentando maiores valores para MnP de 3,030 UI g⁻¹ MS (*Pycnoporus sanguineus* (SXS 365) e 4,450 UI g⁻¹ MS (SXS 80) respectivamente (GONÇALVES, 2010).

Outros substratos, como o lodo resultante da indústria têxtil, podem induzir a produção de enzimas pelo fungo levando ao clareamento deste resíduo. Dellamatrice (2005), observou produção de MnP por *P. ostreatus* (3,72 UI L⁻¹) e *P. sajor-caju* F2 (2,36 UI L⁻¹) em lodo têxtil causando também, o clareamento deste resíduo. Maciel et al. (2010), cultivou 34 fungos isolados de ambientes contaminados por petroderivados em Erllenmeyers contendo óleo diesel e solução nutritiva de Manachini obtendo valores na produção de manganês peroxidase de 60 UI L⁻¹ $\pm$ 8 produzidos por F25-*Penicillium* sp., cerca de 56 UI L⁻¹ $\pm$ 6 gerados por F4-*Curvularia lunatae* 51 U L⁻¹ $\pm$ 4 por F11-*Paecilomyces* sp.

A bibliografia consultada e os atuais resultados apresentados neste trabalho corroboram a afirmação de que o estresse nutricional proporcionado ao longo do cultivo é um dos fatores responsáveis para a produção de MnP que é comprovadamente

produzida durante o metabolismo secundário dos fungos. Efeitos inversos também podem aparecer causando inibição das enzimas lignolíticas, como é o caso de formação de substâncias húmicas, que podem ser geradas pela reação entre lacases e compostos fenólicos durante a degradação da vinhaça pelo fungo (CHEFETZ et al., 1998; AHN et al., 2002; FASANELLA, 2008). Além disso, fatores como temperatura, pH e tempo de incubação do organismo podem interferir na atividade das enzimas (MACHADO, 1998) aumentando a atividade ou causando desnaturação enzimática diminuindo, assim, a ação dos fungos nos subprodutos à serem tratados.

5.3 Propriedades nutricionais de *Pleurotus* sp. cultivados em vinhaça

Os micélios provenientes do cultivo e clareamento da vinhaça foram secos em estufa e obtidos suas porcentagens de matéria seca (MS), baseando-se nos valores de matéria fresca (g kg^{-1}) de cada fungo. Os demais parâmetros analisados por bromatologia são apresentados na Tabela 4 abaixo de acordo com suas porcentagens em relação à matéria seca (g kg^{-1} MS). Cabe ressaltar que os micélios fúngicos já haviam passado pelo processo de liofilização. Estudos feitos por Scherba et al. (1999) e Confortin (2006), comprovam que existe similaridade entre a composição do micélio produzido em meio líquido e o corpo de frutificação, permitindo, assim, que a discussão seja feita comparando-os.

A análise bromatológica mostrou maior quantidade de MS para o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 (5,67%), seguido por *P. shimeji* (5,23%), *Pleurotus* sp. CCB 068 (5,03%) e *P. flabellatus* CCB 396 (4,49%) (TABELA 4). Este parâmetro é constituído por matéria mineral (MM) e matéria orgânica (MO) que quando somados totalizam 100% da MS. Sendo assim, os fungos que apresentaram maiores valores de MM possuem menor quantidade de MO em sua composição e vice-versa.

Os teores de matéria seca das linhagens encontrada no presente estudo foram bem próximos aos apresentados por Wadt (2008) em cultivo dos mesmos fungos em vinhaça pura, com valor médio de 4,42% para *Pleurotus* sp. CCB 068 a 8,85% para *P. sajor-caju* CCB 020. Já Sturion e Ranzani (2000), conseguiram valores maiores para

corpos de frutificação de *Pleurotus* spp. (hiratake e shimeji) com valor médio de 10,27% de MS, aproximadamente metade do encontrado no atual trabalho (5,23%).

Foram encontrados maiores valores de MM nos fungos *P. sajor-caju* CCB 020 (26,74%) e *P. flabellatus* CCB 396 (25,81%). O controle apresentou valores semelhantes aos encontrados pelos fungos. Em contrapartida, os fungos *Pleurotus* sp. CCB 068 e *P. shimeji* apresentaram as maiores porcentagens de MO presente na matéria seca (76,33% e 76,06%, respectivamente).

A matéria mineral encontrada neste trabalho é superior à encontrada na literatura consultada, apresentando valores máximos de 26,74%. Silva et al. (2007) obteve valor máximo de 6,4% de MM com *P. sajor-caju* cultivado em um substrato com alto teor de nitrogênio. Cultivando *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em palha de bananeira, Bonatti et al. (2003), chegou a valores de 5,58% enquanto que Manzi et al. (1999), obtiveram valores entre 6,9% e 10,5% de matéria mineral para *P. ostreatus* em folha de bananeira. Os valores mais próximos encontrados na literatura, foram os de Wadt (2008) em vinhaça pura com valor máximo de 22,99% para *P. shimeji*. A mesma autora relata que altos teores de cinzas (MM) são consequência do uso da vinhaça como meio de cultivo, confirmando a alta concentração de minerais presentes neste subproduto.

Tabela 4 - Composição bromatológica dos fungos cultivados em vinhaça

Fungo	MS	MM	MO	PB	EE	FDN	FDA	Lignina
P. sajor-caju CCB 020	5,67	26,74	73,26	20,96	4,29	33,60	20,17	6,10
Pleurotus sp. CCB 068	5,03	23,67	76,33	15,22	2,72	29,42	16,33	1,79
P. flabellatus CCB 396	4,49	25,81	74,19	16,92	4,00	36,63	29,29	13,73
P. shimeji	5,23	23,94	76,06	18,98	5,56	27,39	20,07	9,92
TetraMin T. Flakes*	-	20,50	79,50**	47,00	10,0	3,00		-

Valores de MS expressos em % de matéria fresca. Valores dos demais parâmetros expressos em % de matéria seca. * = porcentagens presentes na embalagem da ração comercial. ** = valor obtido da diferença entre MM considerando que a somatória é igual a 100%.

A proteína bruta (PB) é um parâmetro importante para o objetivo deste trabalho já que alimentos ricos em proteínas são responsáveis pela maior fração dos custos da ração no caso da piscicultura (Boscolo et al., 2001). A maior quantidade de PB encontrada foi para *P. sajor-caju* CCB 020 (20,96%) e para *P. shimeji* (18,98%) enquanto que *P. flabellatus* CCB 396 e *Pleurotus* sp. CCB 068 não obtiveram valores

acima de 17% de PB. Esses valores estão abaixo da quantidade de PB presente na ração comercial (47%).

A PB aqui analisada, chegou a valores máximos de 20,96% no fungo *P. sajor-caju* CCB 020 enquanto que o controle (TetraMin T. Flakes) apresenta valores ao redor de 47%. No trabalho Wadt (2008), foi apresentado que quando cultivado em vinhaça, o maior valor de PB foi encontrado para *Pleurotus* sp. CCB 068 (31,08%). Trabalhos utilizando outros substratos para basidiomicetos mostram que os valores de PB variam de acordo com o meio de cultivo o qual o fungo está sendo incubado. Silva et al. (2007), conseguiu 28% de PB com *P. sajor-caju* em meio suplementado com alto teor de nitrogênio. Utilizando o mesmo fungo, Bonatti et al. (2003) obteve valores máximos de 16,86% de PB em palha de bananeira. Já a folha de bananeira como substrato, fez com que o nível de proteína de *P. sajor-caju* e *Pleurotus* sp. “florida” apresentassem valores máximos de 24,1% (RANZANI; STURION, 1998). Os maiores valores para proteína bruta encontrados na literatura foram os encontrados por Ragunathan e Swaminathan (2003) utilizando os fungos *P. sajor-caju*, *P. platypus* e *P. citrinopileatus*, cultivados em resíduos lignocelulolíticos, obtendo valores máximos de 25,63% a 44,30%.

Outras fontes de alimentação foram testadas na dieta de juvenis de pacu, entre elas, o farelo de peixe o qual apresentou maior valor de proteína (55,21%), e o farelo de soja com valor médio de 47,29% (FERNANDES et al., 2001). Já Galdioli et al. (2002), conseguiu 39,25% de PB com farelo de canola como ração de alevinos de Curimatã.

A composição de extrato etéreo (EE) presente no micélio dos fungos se manteve relativamente baixa, variando entre 5,56% para *P. shimeji* a 2,72% para *Pleurotus* sp. CCB 068. Os fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. flabellatus* CCB 396 apresentaram valores médios de 4% de EE. A ração comercial, entretanto, possui valores de 10%, ou seja, apresenta mais gordura em sua composição. Os números encontrados para quantidade de extrato etéreo (EE) foram maiores que os encontrados por Wadt (2008) para fungos cultivados em vinhaça com valores médios de 0,36 a 4,69%, mas estão de acordo com os apresentados por Furlani e Godoy (2007) com valor de 6,50% para *P. shimeji*. Para o fungo *P. sajor-caju*, foram encontrados valores baixos de EE de 1,91% (substrato com alto teor de nitrogênio) e 1,86% nos trabalhos de Silva et al. (2009) e Sturion e Oetterer (1995), respectivamente. Já com outras fontes

nutritivas usadas como ração, foram encontrados valores bem acima dos encontrados no atual trabalho. Fernandes et al. (2001) encontrou até 17% de extrato etéreo em farelo de arroz, e 7% em farelo de soja.

Em relação às fibras presentes na composição dos fungos, foram analisadas as fibras detergentes neutras (FDN) e fibras detergentes ácidas (FDA). A fração de FDN inclui celulose, hemicelulose e lignina como os componentes principais enquanto que a fração de FDA dos alimentos inclui celulose e lignina como componentes primários além de quantidades variáveis de cinza e compostos nitrogenados (BIANCHINI et al., 2007). Pode-se notar que FDN é mais abundante que FDA, sendo os maiores valores dos dois parâmetros encontrados no fungo *P. flabellatus* CCB 396, 36,63% (FDN) e 29,29% (FDA). Por fim, os valores de lignina obtidos foram, também, maiores para *P. flabellatus* CCB 396 (13,73%) enquanto que para os fungos *P. saior-caju* CCB 020, *Pleurotus* sp. CCB 068 e *P. shimeji*, os valores não ultrapassaram 10% de lignina. Como já foi dito, a lignina pode ser analisada juntamente com FDN e FDA, o que explica os altos valores para *P. flabellatus* CCB 396.

Flores et al. (2008) analisou a fermentação por *Pleurotus* spp. em resíduos agroindustriais e conseguiu valores de FDA relativamente altos após a fermentação de uma mistura de palha, serragem, farelo e sabugo de milho (65% de FDA); mistura de palha e farelo de milho (70%) com o fungo *P. ostreatus*. Wadt (2008) apresentou valores semelhantes aos encontrados neste trabalho, com valores de FDA entre 9,22% para *Pleurotus* sp. CCB 068 a 23,19 para *P. flabellatus* CCB 396. Já para as fibras detergentes neutra (FDN) a mesma autora obteve valores médios de 30,88% para *P. shimeji* a 40,54% para *P. saior-caju*.

Pesquisas recentes apresentam os valores de fibras totais contidas em basidiomicetos incubados em diferentes meios de cultivo. Bonatti et al. (2003) apresentou valores de fibras de 9,45% em *P. saior-caju* enquanto que Furlani e Godoy (2007) conseguiram valores maiores com *P. shimeji* em palha de bananeira. Utilizando resíduos lignocelulolíticos como substrato para *Pleurotus* sp., Ragunathan e Swaminathan (2003) chegaram a valores de fibras de 20,48%. Em relação à outros tipos de alimentos usados, como o farelo de soja (6,45%) e farelo de canola (8,80%)

(GALDIOLI et al., 2002), os fungos apresentam significativa abundância de fibras, enquanto que a ração comercial utilizada como controle, é composta somente por 3%.

5.4 Teste de alimentação de *D. rerio* com *Pleurotus* sp.

Para analisar as propriedades nutricionais e /ou tóxicas de *Pleurotus* sp. crescidos em vinhaça, os micélios secos foram utilizados como ração na dieta alimentar de adultos de paulistinha (*D. rerio*).

Durante todo o teste, foi observado que os fungos apresentaram boa palatabilidade para os peixes sendo que todo o alimento cedido inicialmente flutuou e foi prontamente consumido. As partículas de alimento que se depositaram no fundo do frasco foram consumidas ao longo do tempo. Não foi observado diferenças na preferência alimentar dos peixes nas concentrações de 50% e 100% para os fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus* sp. CCB 068 e *P. shimeji*. Entretanto, no tratamento com o fungo *P. flabellatus* CCB 396 (50%) foi observado que os peixes se alimentavam primeiramente da ração comercial e no tratamento com 100% do mesmo fungo havia maior quantidade de partículas depositadas no fundo do frasco, o que pode indicar que a composição nutricional ou de palatabilidade de *P. flabellatus* CCB 396 é diferente dos outros *Pleurotus* testados.

Analisando os resultados entre a biomassa do início e final do teste, observa-se que não houve diferença estatística entre o peso dos peixes para todos os tratamentos, com exceção para o tratamento com *Pleurotus* sp. CCB 068 (100%) que apresentou significativa perda de biomassa após 28 dias (FIGURA 18).

Figura 18 - Diferença entre as biomassas iniciais e finais de *D. rerio* alimentados com diferentes espécies de *Pleurotus* durante 28 dias

Os dados apresentados na Tabela 5 mostram a porcentagem de biomassa ganha ou perdida pelos peixes durante o teste. Os tratamentos que apresentaram maiores perdas de biomassa foram os compostos por 100% do fungo *Pleurotus* sp. CCB 068 (36,59%) e *P. sajor-caju* CCB 020 (22,73%). No tratamento com 50% de *P. sajor-caju* CCB 020 não houve diferenças entre a biomassa dos peixes. Já, para os peixes alimentados com 50% de *Pleurotus* sp. CCB 068 houve ganho de biomassa de 7,89% e para os peixes alimentados com ração comercial (Controle) o ganho foi de apenas 1,03%. Para os outros tratamentos as perdas de biomassa foram ao redor de, 15%. Os peixes controle apresentavam biomassa maior que os demais desde o início.

Tabela 5 - Biomassa de *D. rerio* tratados com *Pleurotus* sp.

Fungos	Biomassa inicial (g)	Biomassa final (g)	Ganho (%)
<i>P. sajor-caju</i> CCB 020 (100%)	0,15	0,11	-22,73*
<i>P. sajor-caju</i> CCB 020 (50%)	0,10	0,10	0,00
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068 (100%)	0,14	0,09	-36,59*
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068 (50%)	0,13	0,14	7,89
<i>P. flabellatus</i> CCB 396 (100%)	0,21	0,18	-14,29*
<i>P. flabellatus</i> CCB 396 (50%)	0,25	0,21	-13,51*
<i>P. shimeji</i> (100%)	0,13	0,11	-15,38*
<i>P. shimeji</i> (50%)	0,17	0,15	-10,00*
Controle	0,32	0,33	1,03

*. Valores negativos indicam perda de biomassa.

Outro parâmetro analisado juntamente à biomassa foi o comprimento dos peixes usados. Estatisticamente, não houve diferenças entre os tratamentos analisados (FIGURA 19). Entretanto, pode-se observar que os tratamentos com *Pleurotus* resultou em aumento do comprimento dos peixes. *P. sajor-caju* CCB 020 (100%), *Pleurotus* sp. CCB 068 (100%) e *P. shimeji* (100%) apresentaram um aumento de 6,8%; nos tratamentos com *P. flabellatus* CCB 396 (50 e 100%) e *P. shimeji* (50%) os peixes cresceram 3,3% enquanto que no controle foi observado aumento de tamanho do tamanho de 2%.

Figura 19 - Diferença entre comprimento de *D. rerio* no início e após 28 dias de alimentação com *Pleurotus* sp.

Siccard III et al., (2009) testou sete tipos diferentes de rações em peixes da espécie *Danio rerio* sendo elas, cinco rações comerciais (Aquamax Grower 400®, Cyclop-eeze®, Nutrafin Max Flake Food®, Tetra Pond Koi Vibrance® e TetraMin Tropical Flakes®) e duas outras rações formuladas pelo autor (dieta A e B), com o objetivo de determinar a eficiência destas como fonte de alimento. Os peixes alimentados com as rações formuladas foram os que apresentaram maior crescimento (2,5 cm $\pm$ 1) em relação às rações comerciais (2,0 cm $\pm$ 2). Referente aos valores de biomassa, o maior valor foi para a ração Dieta A, seguido da TetraMin Tropical Flakes® e da ração Dieta B.

Mesmo tendo ocorrido perda de biomassa no presente estudo, embora esta não seja significativa, os valores de sobrevivência dos peixes foram de 100% em todos os tratamentos indicando que os fungos testados não são tóxicos e podem ser inclusos na dieta de animais como suplementos nutricionais. A perda de biomassa durante o teste pode-se dar devido a fatores estressantes como espaço físico, luminosidade e principalmente o manuseio durante as pesagens e troca do meio de cultivo dos peixes. Embora as taxas de crescimento não sejam necessariamente indicativos de saúde dos peixes, sugerem que o *D. rerio* reage à quantidade e/ou qualidade de nutrientes específicos necessários para taxas normais de crescimento (SICCARD III et al., 2009). As dietas oferecidas podem influenciar outros processos fisiológicos, incluindo os associados com sistema endócrino, neurológico, imonológico ou reprodutivo (GOEDE; BARTON, 1990).

Geralmente, quando alguns fungos se desenvolvem em alimentos, são associados à produção de metabólitos secundários denominados de micotoxinas, com potencial de toxicoses ao homem e aos animais, depois de ingeridos (KAWASHIMA *et al.*, 2002; ROSSETTO *et al.*, 2005) e são considerados um dos mais importantes fatores que afetam a qualidade das sementes e grãos, além de acelerarem o processo de deterioração durante o armazenamento. Entretanto, os resultados apresentados no presente trabalho mostram que os fungos do gênero *Pleurotus* podem fazer parte da dieta de animais, visto que apresentam valores nutricionais importantes e não demonstraram efeitos tóxicos nos peixes.

Muitos pesquisadores utilizam principalmente o micro-crustáceo (*Artemia* sp.) como alimentação para essas espécies de peixes, pesquisas para o desenvolvimento de outras dietas é de grande importância sabendo que a qualidade nutricional de espécies de *Artemia* podem variar consideravelmente de acordo com a localização geográfica (NAVARRO et al., 1999), condições de criação (RUIZ et al., 2007) e sua história nutricional.

Galdioli et al.(2002) utilizou o farelo de canola como substituto do farelo de soja na alimentação de alevinos de *Prochilodus lineatus* (curimbatá) tendo como principal parâmetro a análise da proteína dos farelos, e obteve valores de ganho de peso de 180% a 220% dos peixes utilizando o farelo de canola. Fernandes et al. (2001), testou

algumas misturas de farelos como fonte de proteína para a alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e apesar de não ocorrerem diferenças estatísticas entre as fontes protéicas testadas, os peixes que receberam a farinha de peixe como principal fonte protéica, apresentaram ganho de peso numericamente inferior (38,97 g) em relação àqueles que receberam farelo de soja (43,75 g), enquanto a mistura farinha de peixe mais farelo de soja possibilitou tendência de melhores resultados (51,75 g).

Conceição et al. (2009), apresentaram uma revisão das novas metodologias desenvolvidas para estudos de nutrição de larvas de peixes seguindo a premissa de que as taxas de sobrevivência são muitas vezes baixas ou variáveis, ocorrendo problemas de qualidade nutricionais e o potencial de crescimento nem sempre é aproveitado ao máximo (Koumoundouros et al., 1997; Shields, 2001; Cahu et al., 2003). Conceição et al. (2009), concluíram que as bases biológicas e nutricionais para o desenvolvimento de larvas de peixes melhorou muito, principalmente com o uso de técnicas que utilizam marcadores isotópicos e genômica funcional, embora, a compreensão da fisiologia da nutrição e os valores nutricionais ainda seja limitado.

A nutrição é agora conhecida por ser um importante determinante da progressão de doenças em todos os modelos de roedores, e os autores são agora obrigados a reportar a dieta específica utilizada nessas investigações. Entretanto, esta variante e suas conseqüências ainda não foram incluídas nos esforços de pesquisa de peixes como o *D. rerio* (SICCARD III et al., 2007) . Na ausência de um entendimento e padronização do consumo alimentar, faz-se necessários pesquisas que busquem novas fontes nutritivas e seus efeitos no desenvolvimento e sanidade dos peixes, principalmente os destinados à alimentação humana.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que as quatro espécies de fungos testadas: *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus* sp., *Pleurotus flabellatus* e *Pleurotus shimeji* apresentaram crescimento micelial satisfatório em vinhaça pura e apresentaram capacidade de descoloração da mesma. A vinhaça mostrou-se, também, como um potencial meio para produção de enzimas do sistema ligninolítico, de interesse biotecnológico, sendo o *Pleurotus sajor-caju* superior às outras linhagens. Os testes de alimentação com *Danio rerio* e os valores nutricionais dos micélios apontam esses fungos desenvolvidos em vinhaça, como possíveis suplementos alimentares, apresentando valores nutritivos próximos à ração comercial com exceção da quantidade de proteínas.

REFERÊNCIAS

ABNT. **NBR 15088**: 2004. Versão Corrigida: 2006. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. São Paulo, 2006. p. 1-22.

ADLER, P.A.; ARORA, R.; EI GHAOUTH, A.; GLENN, D.M.; SOLAR, J.M. Bioremediation of phenolic compound from water with plant root surface peroxidases. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 23, p. 1113–1117, 1994.

AGUIAR FILHO, J.M.M.; FERREIRA, L.F.R.; MONTEIRO, R.T.R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, p. 1245-1254, 2010.

AGUIAR FILHO, J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AHN, M.Y.; DEC, J.; KIM, J.K.; BOLLAG, J.M. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 1509-1515, 2002.

ALVES, F. Porque morrem os cortadores de cana? **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 90-80, set/dez. 2006.

ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M.; SWAMINATHAN, K. Biotreatment of distillery effluent using *Aspergillus niger*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 70, n. 2, p. 268–277, 2003.

ARBEX, M.A.; CANÇADO, J.R.D.; PEREIRA, L.A.A.; BRAGA, A.L.F.; SALDIVA, P.H.N. Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p. 158-175, 2004.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS (ANFLPET). **Guia prático de orientação ao aqüicultor**. São Paulo, 2000. 32 p.

AZEVEDO, M.M.; CARVALHO, A.; PASCOAL, C.; RODRIGUES, F.; CÁSSIO, F. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 377, p. 233-243, 2007.

AZEVEDO, J.L. Genética de fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap. 5, p. 173-214.

BERMUDÉZ, R.C.; MARAÑÓN, A. Caracterización del residual de la destilería "Hatuey" de Santiago de Cuba. In: FORO NACIONAL DE CIENCIA Y TÉCNICA, 10., 1998, Santiago de Cuba. **Resúmenes...** Santiago de Cuba, 1998. p. 12-16.

BIANCHINI, W.; RODRIGUES, E.; JORGE, A.M.; ANDRIGUETO, C. Importância da fibra na nutrição de bovinos. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.8, n.2, 2007. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020207.html>; Acessado em de agosto de 2011.

BONATTI, M. Estudo da composição das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* cultivados em palha de bananeira. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 4, n. 1, p. 1-35, jun. 2002.

BOOTH, M.A.; ALAN, G.L.; FRANCES, J.; PARKINSON, S. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus* IV. Effects of de-hulling and protein concentration on digestibility of grain legumes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 196, p. 67-85, 2001.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Farinhas de peixe, carne e ossos, vísceras e crisálida como atractantes em dietas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1397-1402, 2001.

CAHU, C.; ZAMBONINO INFANTE, J.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, Melbourne, v.227, p. 245-258, 2003.

CAPELARI, M.; GUGLIOTTA, A.M.; FIGUEIREDO, M.B. O estudo de fungos macroscópicos no Estado de São Paulo. In: JOLY, C.A.; BICUDO, C.E.M. (Ed.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, 1998. p. 9-35.

CASTRO, A.L.A.; PAIVA, P.C.A.; BANY, V.L.; DIAS, E.S.; SANTOS, J. Avaliação da produção de *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer utilizando resíduo do beneficiamento têxtil de algodão como substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1286-1290, set/out. 2007.

CASTRO, A.L.A.; PAIVA, P.C.A.; DIAS, E.S.; SANTOS, J. Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade do resíduo de lixadeira de algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 608-613, 2004.

CETESB. **Vinhaça** - Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, dez. 2006. p. 1-12.

CHAHAL, D.S. Production of protein-rich mycelial biomass of mushrooms, *Pleurotus sajor-caju*, on corn stover. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 68, p. 334-338, 1989.

CHEFETZ, B.; CHEN, Y.; HADAR, Y. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 3175-3179, 1998.

CHEUNG, P.C.K. Dietary fiber content and composition of some edible mushroom fruiting bodies and mycelia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 2, p. 468-471, 1996.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wooddegrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 58, p. 582-594, 2002.

CONCEIÇÃO, L.E.C. da; ARAGÃO, C.; RICHARD, N.; ENGROLA, S.; GAVAIA, P.; MIRA, S.; DIAS, J. Avanços recentes na nutrição de larvas de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, p. 26-35, 2009.

CONFORTIN, F.G. **Produção de biomassa fúngica da linhagem OS-2001 de *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer em cultura submersa**. 2006. 95 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 1-17, 1992.

DAHM, R. The Zebrafish exposed. **American Scientist**, New Haven, v. 94, n. 5, p. 446–453, 2006.

DAS, N.; SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, M. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 4120-4122, 1997.

DEGANI, G.; VIOLA, S.; YEHUDA, Y. Apparent digestibility of protein and carbohydrate in feed ingredients for adult tilapia (*Oreochromis aureus* X *O. niloticus*). **Bamidgeh**, Jerusalem, v. 49, n. 3, p. 115-123, 1997.

DELLAMATRICE, P.M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana, SP**. 2005. 137 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R.; KAMIDA, H. M.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; Blaise, C. Decolourization of municipal effluent and sludge by *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 1363-1369, 2005.

DESJARDIN, D.E.; CAPELARI, M.; STEVANI, C. Bioluminescent *Mycena* species from Sao Paulo, Brazil. **Mycologia**, New York, v. 99, n. 2, p. 317–331, 2007.

DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J.S. do. Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostreatus*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 6, n. 2, p. 185-193, 2006.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, Amsterdam, v. 28, p. 83-99, 2000

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação da lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Microbiologia ambiental**, Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1997. p. 303-319.

DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: **A Review. Enzyme and Microbial Technology**, Surrey , v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.

EGGEN, T. **Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi**. 2000, (Doctor Scientiarum Theses) Jordforsk, Norway. Agricultural University of Norway, 2000.

FALCÃO, A.A. **Análises químicas de resíduo sólidos para estudos agroambientais**. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

FASANELLA, C.C. **Ação de enzimas lignocelulolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FELINTO, A.S. **Cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* spp. em resíduos agroindustriais**. 1999. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

FERGUSON, B.A. DREISBACH, T.A.; PARKS, C.G.; FILIP, G.M.; SCHMITT, C.L. Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 33, p. 612–623, 2003.

FERNANDES, J.B.K.; CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e níveis de proteínas em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n. 3, p. 617-626, 2001.

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de materiais lignocelulolíticos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. p. 213-242.

FERRAZ, A.L.; PARRA, C.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J. Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 641-645, 2000.

FERREIRA, L.F.R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos**. 2009. 134 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, M.; POMPEU, G.B.; MESSIAS, T.G.; MONTEIRO, R.T.R. Selection of vinasse degrading microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1613-1621, 2010.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR FILHO, J.M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; QUEIJEIRO LOPEZ, A.M.; SILVA, D.P.; MONTEIRO, R.T.R. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 132-137, 2011.

FLORES, L.R.F.; INTROVINI, L.R.; TRINDADE, J.L.F. da. Análise da fermentação realizada por *Pleurotus* spp. em resíduos agroindustriais da região dos campos gerais. **VI Semana de Tecnologia de Alimentos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa, Paraná. v. 02, n. 24, p. 1-7, 2008.

FORGIARINI, E. **Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP)**. 2006. 121 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. (Série Engenharia Agrícola, 1).

FROESE, R.; PAULY, D. (Ed.). *Danio rerio*. In: FISHBASE. Paris: WorldFish Center, Mar. p. 376-379, 2007.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.

GADIOLI, E.M.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M.; FURUYA, V.R.B.; FARIA, A.C.E.A. Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do farelo de canola em rações para alevinos de curimatã (*Prochilodus lineatus* V.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.2, p. 552-559, 2002.

GLÓRIA, N.A. **Emprego da vinhaça para fertilização**. Piracicaba: CODISTIL, 1976. s.n.p.

GOEDE, R.W.; BARTON, B.A. Organismic indices and an autopsy based assessment as indicators of health and condition of fish. **American Fisheries Society Symposium**, v.8, p. 93–108, 1990.

GOKARN, A.N.; MAYADEVI, S. Active charcoal from agro-waste for colour removal of treated spentwater. In: ANNUAL CONVENTION OF D.S.T.A., 2000, Pune. **Proceedings...** Pune, 2000. pt 1, p. B1-B10.

GONÇALVES, A.Z.L. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal**. 2010. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

GONZALES, L.; GONZALES, L.; HERNÁNDEZ, J.R.; PERESTELO, F.; CARNICERO, A.; FALCÓN, M.A. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by lacase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoideum*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 30, p. 474-481, 2002.

HAHN, N.S.; DELARIVA, R.L. **Métodos para avaliação de alimento natural de peixes**: O que estamos usando? Maringá: Universidade Estadual de Maringá, p. 1-10, 2002.

HANLEY, F. The digestibility of foodstuffs and the effects of feeding selectivity on digestibility determinations in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 66, p. 163-179, 1987.

HANSSON, S. Methods of studying fish feeding: a comment. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 55, p. 2706-2707, 1998.

HAWKSWORTH, D.L. Why to study tropical fungi? In: WATLING, R.; FRANKLAND, J.C.; AINSWORTH, A.M.; ISAAC, S.; ROBINSON, C.H. (Ed.). **Tropical mycology: Micromycetes**. Wallingford: CAB International, 2001b. p. 1-12.

HIGSON, F.K. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. In: Ware G.W. (Ed.). **Reviews of environmental contamination and toxicology**. New York: Springer Verlag, p. 122-125, 1991.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. **Proceedings of the Japan Academy. Series B Physical and Biological Sciences**, Tokyo, v. 80, p. 204-214, 2004.

HILL, A.J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R.E. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005.

HOFER, C.; SCHLOSSER, D. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 451, p. 186-190, 1999.

HOFRICHTER, M. Mangan-Peroxidasen: enzymatische verbrennung von lignin. **BioSpektrum**, Helsinki, v. 6, p. 198-199, 2000.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.D.; SMITH, D.W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal of Environmental of Engineering and Science**, Ottawa, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2004.

JONES, R. Let Sleeping Zebrafish Lie: a new model for sleep studies. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 10, e281, 2007. doi:10.1371/journal.pbio.0050281.

KARAM, J; NICELL, J.A. Potential Application of Enzymes in Waste Treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 69, p. 141-153, 1997.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, p. 215-217, 2002.

KANDELBAUER, A.; GUBITZ, G.M. Current strategies for enzymatic and microbial treatments of textile effluents. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA TÊXTIL, 2001, Blumenau. **Anais...** Blumenau: Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química, 2001. p. 83-99.

KEUM, Y.S.; LI, Q.X. Copper dissociation as a mechanism of fungal laccase denaturation by humic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 588-592, 2004.

KIKUCHI, K. Use of deffated soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, p. 3-11, 1999.

KIRK, T.K.; CROAN, S.; TIEN, M. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and us of a mutant strain. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 8, p. 27-32, 1986.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the fungi**. 10. ed. Wallingford: CAB International, 2008. p. 3-16.

KLYOSOV, A. A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 29, p. 10577-10585, 1990.

KOUMOUNDOUROS, G.; GAGLIARDI, F.; DIVANACH, P. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. **Aquaculture**, Melbourne, v.149, p.215-226, 1997.

KUMARAN, S.; SASTRY, C.A.; VIKINESWARY, S. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 13, p. 43-49, 1997.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 78-82, 2002.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 247-250, 1984.

LEE, K.; MOON, S.H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.102, p.261-268, 2003.

LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K.E.L. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, n. 6, p. 2654-2660, 1999.

LIAO, H.; PIERCE, C.L.; LARSCHEID, J.G. Empirical assessment of indices of prey importance in the diets of predacious fish. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 130, p. 583-591, 2001.

LÓPEZ, Z.; SÁNCHEZ, J.; BELLO, R. Coffee wastes: quality of effluent water from de pasteurizing of coffee pulp. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 16., 1999, Kyoto. **Proceedings...** Kyoto, 1999. p. 440-446.

LOPES, C.H. Lavagem de cana e tratamento de seus efluentes. **Saccharum**, Piracicaba, v. 6, n. 76, p. 26-31, 1983.

LUKSENBERG, J.M.; SÁ, A.; DURSO, M.N. **Processo para a produção de álcoolcombustível, sem vinhoto**. Guarulhos: Dyna Engenharia, 1980. (Relatório descritivo da patente de invenção).

MACHADO, K.M.G. **Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basideomicetos lignocelulolíticos em solos contaminados com resíduos industriais**. 1998. 172 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1998.

MACIEL, C.C.S.; SOUZA, M. A. de; GUSMÃO, N.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **Exacta**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.

MAJOR, R.J.; POSS, K.D. Zebrafish heart regeneration as a model for cardiac tissue repair. **Drug Discovery Today: Disease Models**, Amsterdam, v. 4, p. 219–225, 2007.

MANE, J.D.; MODI, S.; NAGAWADE, S.; PHADNIS, S.P.; BHANDARI, V.M. Treatment of spentwash using chemically modified bagasse and colour removal studies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 1752-1755, 2006.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, Barking, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

MAYDEN, R.L.; TANG, K.L.; CONWAY, K.W.; FREYHOF, J.; CHAMBERLAIN, S.; HASKINS, M.; SCHENEIDER, L.; SUDKAMP, M.; WOOD, R.M.; AGNEW, M.; BUFALINO, A.; SULAIMAN, Z.; MIYA, M.; SAITOH, K.; HE, S. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. **Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution**, Hoboken, v. 308B, n. 5, p. 642-654, 2007.

MELLO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. v. 2, p. 304-319.

MENEZES, C.R.; SILVA, I.S.; DURRANT, L.R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, São Leopoldo, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

MENEZES, T.J.B. Os fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

MIGO, V.P.; MATSUMURA, M.; ERNESTO, J.D.R. Decolourization of molasses waste water using an inorganic flocculent. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 75, n. 6, p. 438, 1993.

MIRANDA, A.C.; MOREIRA, J.C.; CARVALHO, R.; PERES, F. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 7-14, 2007.

MIRANDA, P.M.; BENITO, G.G.; CRISTOBAL, N.S.; NIETO, C.H. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 57, n. 3, p. 229-235, 1996.

MODA, E.M. **Produção de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana-de-açúcar lavado e o uso de aditivos visando sua conservação *in natura***. 2003. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MOHAMMAD, P.; AZARMIDOKHT, H.; FATOLLAH, M.; MAHBOUBEH, B. Application of response surface methodology for optimization of important parameters in decolorizing treated distillery wastewater using *Aspergillus fumigatus* UB2.60. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 57, n. 4, p. 195–199, 2006.

MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 12-25, 2008. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.079.

MOREIRA NETO, S.L.M. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB 444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MUNARI, F.M.; GAIO, T.A.; DILLON, A.J.P. Cinética de Secreção de lacases e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* com efluentes da indústria papaleira. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES (SINAFERM), 14., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2003. 1 CD ROM.

NAIK, N.M.; JAGADEESH, K.S.; ALAGAWADI, A.R. Microbial decolorization of spentwash: a review. **Indian Journal of Microbiology**, Nova Delhi, v. 48, p. 41-48, 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes**: nutrient requirements of domestic animals. Washington, D.C., 1993. 114 p.

NAVARRO, J.C.; AMAT, F.; SARGENT, J.R.; A study of the variations in lipid-levels, lipid classcomposition and fatty-acidcomposition in the 1st stages of *Artemia* sp. **Marine Biology**, Berlin, v. 111, p. 461–465, 1991.

NGAI, P.H.K.; NG, T.B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides**, New York, v. 5, p. 11–17, 2004.

OBODAI, M.; CLELAND-OKINE, J.; VOWOTOR, K.A. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. Heidelberg, v. 30, p. 146-149, 2003.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test OECD. Paris, Jan. 2000.

OHMOMO, S.; KANEKO, Y.; SIRIANUNTAPIBOON, S.; SOMCHAL, P.; ATTHASAMPUNNA, P.; NAKAMURA, I. Decolorization of molasses wastewater by a thermophilic strain, *Aspergillus fumigatus* G-2-6. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, Tokio, v. 51, p. 3339–3346, 1987.

ORTEGA FILHO, S. **O potencial da agroindústria canavieira no Brasil**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF/USP, 2003. 9 p. Disponível em: http://www.fcf.usp.br/Departamentos/FBT/HP_Professores/Penna/EstudoDirigido/Agroindustria_Canavieira.pdf.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P., BIANCO, C., FONTANELLA, B.; SANNIA, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 920-924, 2000.

PAPINUTTI, V.L.; FORCHIASSIN, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes scleroderneus* growing in solid state fermentation. **Journal of Food Engineering**, London, v. 81, p. 54-59, 2007.

PERALTA-ZAMORA, P.; TIBURTIUS, E.R.L; MORAES, S.G; DURÁN,N. Degradação Enzimática de Corantes Têxteis. **Química Têxtil**, São Paulo, n. 68, p. 32-38, 2002.

PEREIRA, J.P.; ALVARENGA, E.M.; TOSTES, J.R.P; FONTES, L.E.F. Efeito da adição de diferentes dosagens de vinhaça a um latossolo vermelho-amarelo distrófico na germinação e vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 14, n. 2, p. 147-150, 1992.

PÉREZ, J.; MORALEDA-MUÑOZ, A. Fungal Lignocellulolytic Enzymes: Applications in Biodegradation and Bioconversion. **Mycofactories**, Lisboa, v. 1, n. 1, p. 28-44 , 2011.

PÉREZ, S.R.; SAVÓN, R.C.B.; DIAZ, M.S.; KOUROUMA, A. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. **Revista Mexicana de Micología**, México, v. 23, p. 9-15, 2006.

PEZZATO, L.E.; PEZZATO, A.C.; SILVEIRA, A.C. Digestibilidade aparente de fontes protéicas pela tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5., 1988, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SIMBRAQ, 1988. p. 373.

PHILIPPOUSSIS, A.; ZERVAKIS, G.; DIAMANTOPOULOU, P. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Valvariella valvavea* and *Pleurotus spp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, p. 191-200, 2001.

POMPEU, G.B. **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol.** 2010. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**, Barking, v. 80, p. 371-375, 2003.

RAJARATHNAM, S. Biopotentialities of the Basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.37, p.233-361, 1992.

RANZANI, M.R.T.C.; STURION, G.L. Avaliação da composição em aminoácidos de *Pleurotus* spp. cultivados em folha de bananeira. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 48, n. 4, p. 339-48, 1998.

RODRIGUEZ, S.; FERNANDEZ, M.; BERMUDEZ, R. C.; MORISS, H. Tratamiento de efluentes industriales coloreados com *Pleurotus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 20, p. 164-168, 2003.

ROSADO, F.R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E.R.; COSTA, S.M. da; IACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.:Fr.) Kummer. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 43, n. 3, p. 230-237, 2003.

ROSOLEN, L.A. **Biodegradação de efluentes têxtil e corantes utilizando fungos basidiomicetos.** 2004. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ROSSETTO, C.A.; SILVA, O.F.; ARAÚJO, A.E.S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.309-315, 2005.

ROYCE, W.F. **Introduction to the practice of fishery science**. New York: Academic Press, 1996. 428 p.

RUIZ, O.; MEDINA, G.R.; COHEN, G.; AMAT, F.; NAVARRO, J.C. Diversity of the fatty acid composition of *Artemia* sp. Cysts from Argentinean populations. **Marine Ecology Progress Series**, Germany, v. 335, p. 155–165, 2007.

SADIKU, S.O.E.; JAUNCEY, K. Digestibility, apparent amino acid availability and waste generation potential of soybean flour: poultry meat meal blend based diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 26, p. 651-657, 1995.

SÁNCHEZ, C. Modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 756-762, 2004.

SAPARRAT, M.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A.M.; MARTINEZ, A.T.; MARTINEZ, M.J. Induction, Isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *coriolopsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 4, p. 1534-1540, 2002.

SHAYEGAN, J.; PAZOUKI, M.; AFSHARI, A. Continuous decolorization of anaerobically digested distillery wastewater. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 3/4, p. 1323–1329, 2004.

SHIELDS, R.J. Larviculture of marine finfish in Europe. **Aquaculture**, Melbourne, v.200, p.55-88, 2001.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Preliminary nutritional evaluation of *Mucuna* seed meal (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) in common carp (*Cyprinus carpio* L.): an assessment by growth performance and feed utilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 196, p. 105-123, 2001.

SILVA, V.L.M.M.; GOMES, W.C.; ALSINA, O.L.S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, p. 27-32, 2007.

SILVA, R.R.; COELHO, G.D. **Fungos**: principais grupos e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 20 p.

SIQUEIRA, F.G. **Efeito do teor de nitrogênio, inoculantes e métodos de compostagem para o cultivo de *Agaricus blazei***. 2006. 138 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SIRIANUNTAPIBOON, S.; SIHANONTH, P.; SOMCHAI, P.; ATTHASAMPUNNA, P.; HAYASHIDA, S. An adsorption mechanism for melanoidin decolorization by *Rhizoctonia* sp. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, n. 7, p. 1185–1189, 1995.

SMITH, J.E.; ROWAN, N.J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 24, p. 1839-1845, 2002.

SOUZA, P.H.T.O. **Rede neural artificial para monitoramento em tempo real da concentração de potássio de vinhaça *in natura***. 2010. Dissertação (Mestrado em Sistemas Dinâmicos) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 83, n. 1, p. 13–34, 2008.

STURION, G.L.; OETTERER, M. Composição química dos cogumelos comestíveis (*Pleurotus spp.*) originados de cultivos em diferentes substratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 189-193, 1995.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAVARES, V.B.; SIVIERI, K.; CERON, C. R.; SILVA, R.; TRABUCO, E. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 722-725, 1998.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 72, p. 169-183, 2000.

VIANA, A.B. **Tratamento anaeróbio de vinhaça em reator UASB operado em temperatura na faixa termofílica (55°C) e submetido ao aumento progressivo de carga orgânica**. 2006. 102 p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Setor sucroenergético** – Histórico. São Paulo, 2008a. Disponível em: <http://www.unica.com.br/default.asp>. Acesso em: 15 jul. 2011.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Setor sucroenergético** – Mapa da produção. São Paulo, 2008b. Disponível em: <http://www.unica.com.br/default.asp>. Acesso em: 15 jul. 2011.

XIANG, J.; YANG, H.; CHE, C.; ZOU, H.; WEI, Y.; QUAN, J.; ZHANG, H.; YANG, Z.; LIN, S. Identifying tumor cell growth inhibitors by combinatorial chemistry and zebrafish assays. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 2, p. e4361, 2009.

WADT, L.C. **Cultivo de *Pleurotus* spp. em vinhaça à produção de biomassa e exopolissacarídeos**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

WILBERG, K.Q. **Oxidação de compostos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

WINDELL, J.T.; BOWEN, S.H. Methods for study of fish diets based on analysis of stomach contents. In: BAGENAL, T. (Ed.) **Methods for assessment of fish production in fresh waters**. 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific, 1978. p. 219-223. (IBP Handbook, 3).

YANG, J.H.; LIN, H.C.; MAU, J.L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, Banking, v. 77, p. 229–235, 2002.

ANEXOS

ANEXO A - Atividade enzimática média dos fungos em vinhaça líquida

LACASE (UI L⁻¹)		
	6 dias	15 dias
<i>P. sajorcaju</i> CCB 020	-	25,013
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068	14,244	12,910
<i>P. flabellatus</i> CCB 396	6,359	0,000
<i>P. shimeji</i>	-	8,231
Controle	0,000	0,000
PEROXIDASE (UI L⁻¹)		
	6 dias	15 dias
<i>P. sajorcaju</i> CCB 020	-	29,563
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068	6,519	9,155
<i>P. flabellatus</i> CCB 396	9,467	4,819
<i>P. shimeji</i>	-	0,000
Controle	0,000	0,142
Mn-PEROXIDASE (UI L⁻¹)		
	6 dias	15 dias
<i>P. sajorcaju</i> CCB 020	-	318,946
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068	10,650	34,940
<i>P. flabellatus</i> CCB 396	4,858	0,000
<i>P. shimeji</i>	-	40,919
Controle	0,000	0,000

ANEXO B - Atividade enzimática média dos fungos em vinhaça no meio sólido.

	LACASE (UI L ⁻¹)				
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias
<i>P. sajorcaju</i> CCB 020	6,551	13,385	10,974	125,744	3,000
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068	0,603	0,000	27,718	39,744	2,833
<i>P. flabellatus</i> CCB 396	1,692	0,000	1,641	0,000	1,359
<i>P. shimeji</i>	0,071	13,526	6,103	93,846	10,641

	PEROXIDASE (UI L ⁻¹)				
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias
<i>P. sajorcaju</i> CCB 020	8,815	67,602	26,729	14,399	20,096
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068	0,000	18,027	28,401	25,822	0,935
<i>P. flabellatus</i> CCB 396	0,000	1,361	0,000	0,000	5,782
<i>P. shimeji</i>	5,329	40,193	17,432	17,063	3,855

	Mn-PEROXIDASE (UI L ⁻¹)				
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias
<i>P. sajorcaju</i> CCB 020	0,000	0,000	0,000	0,000	10,650
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068	0,000	1,308	0,000	0,374	5,045
<i>P. flabellatus</i> CCB 396	0,000	1,121	0,000	0,747	0,000
<i>P. shimeji</i>	0,000	3,737	2,803	0,561	1,682

ANEXO C - Valores da biomassa inicial e final das respetições de *D. rerio* alimentados com *Pleurotus* sp. durante 28 dias.

Fungos -Doses	Repetições	Biomassa (g)		Tamanho (cm)	
		Inicial	Final	Inicial	Final
<i>P. sajor-caju</i> CCB 020 - 100%	1	0,09	0,08	2,00	2,30
<i>P. sajor-caju</i> CCB 020 - 100%	2	0,24	0,17	3,00	3,00
<i>P. sajor-caju</i> CCB 020 - 100%	3	0,11	0,09	2,50	2,70
<i>P. sajor-caju</i> CCB 020 - 50%	1	0,11	0,11	2,50	2,50
<i>P. sajor-caju</i> CCB 020 - 50%	2	0,10	0,09	2,50	2,50
<i>P. sajor-caju</i> CCB 020 - 50%	3	0,10	0,11	2,50	2,50
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068 - 100%	1	0,12	0,08	2,00	2,50
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068 - 100%	2	0,16	0,10	3,00	3,00
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068 - 100%	3	0,13	0,08	2,50	2,50
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068 - 50%	1	0,13	0,15	3,00	3,00
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068 - 50%	2	0,15	0,15	3,00	3,00
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068 - 50%	3	0,10	0,11	2,50	2,50
<i>P. flabellatus</i> CCB 396 - 100%	1	0,22	0,21	3,00	3,20
<i>P. flabellatus</i> CCB 396 - 100%	2	0,20	0,18	3,00	3,00
<i>P. flabellatus</i> CCB 396 - 100%	3	0,21	0,15	3,00	3,10
<i>P. flabellatus</i> CCB 396 - 50%	1	0,22	0,19	3,00	3,00
<i>P. flabellatus</i> CCB 396 - 50%	2	0,25	0,24	3,00	3,20
<i>P. flabellatus</i> CCB 396 - 50%	3	0,27	0,21	3,00	3,10
<i>P. shimeji</i> - 100%	1	0,13	0,12	2,50	2,50
<i>P. shimeji</i> - 100%	2	0,13	0,12	2,50	2,80
<i>P. shimeji</i> - 100%	3	0,13	0,09	2,50	2,70
<i>P. shimeji</i> - 50%	1	0,18	0,17	3,00	3,00
<i>P. shimeji</i> - 50%	2	0,18	0,15	3,00	3,00
<i>P. shimeji</i> - 50%	3	0,14	0,13	2,50	2,80
Controle	1	0,34	0,36	3,50	3,50
Controle	2	0,32	0,30	3,00	3,30
Controle	3	0,31	0,32	3,50	3,40

ANEXO D - Laudo das análises bromatológicas feitas com o micélio dos fungos.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

LANA 2011

Piracicaba, 30 de novembro de 2011.

RESULTADO DE ANÁLISE

INTERESSADO: Sérgio Sartori – Lab. Ecologia Aplicada

MATERIAL: vinhaça COSAN

Nº DE AMOSTRAS : 04

Amostra	MS	MM *	MO *	PB *	aFDNom *	FDAom *	Lignina *	EE *
Amt 01 – P. sajor caju 020	56,70	267,40	732,60	209,63	336,04	201,72	60,98	42,90
Amt 02 – P. sp 068	50,27	236,69	763,31	152,17	294,18	163,28	17,86	27,21
Amt 03 – P. shimeji	52,34	239,43	760,57	189,79	273,91	200,67	99,18	55,56
Amt 04 – P. flabelatus 396	44,89	258,10	741,90	169,23	366,29	292,92	137,33	39,97

MS expressa em g/kg de matéria verde

* Valores expressos em g/kg de matéria seca

Helder Louvandini

Resp. Laboratório de Nutrição Animal