

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE  
MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

GIORDANA DE ORNELLAS STRAPAZZON PEREIRA

**CORPOS FRUTÍFEROS E PECTINASES DE *Pleurotus sajor-caju*  
PROVENIENTES DE RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE SUCO DE CEBOLA**

JOINVILLE

2017

GIORDANA DE ORNELLAS STRAPAZZON PEREIRA

**CORPOS FRUTÍFEROS E PECTINASES DE *Pleurotus sajor-caju*  
PROVENIENTES DE RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE SUCO DE CEBOLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente para a obtenção do grau de mestre em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville.  
Orientadora: Dra. Regina Maria Miranda Gern

JOINVILLE

2017

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

P436c Pereira, Giordana de Ornellas Strapazzon  
Corpos frutíferos e pectinases de *Pleurotus sajor-caju* provenientes de resíduo da produção de suco de cebola/ Giordana de Ornellas Strapazzon Pereira; orientadora Dra. Regina Maria Miranda Gern. – Joinville: UNIVILLE, 2017.

80 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Resíduos agrícolas. 2. Cebola. 3. Pectinase. 4. Fermentação. I. Gern, Regina Maria Miranda (orient.). II. Título.

CDD 628.746

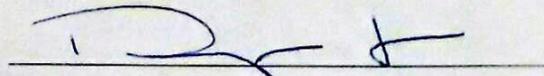
**Termo de Aprovação**

**“Corpos Frutíferos e Pectinases de *Pleurotus sajor-caju* provenientes de Resíduo da Produção de Suco de Cebola”**

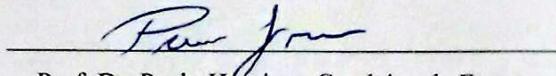
por

Giordana de Ornellas Strapazzon Pereira

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

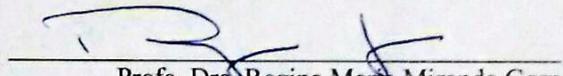


Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern  
Orientadora (UNIVILLE)

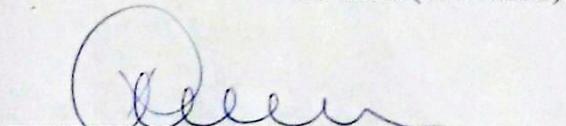


Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

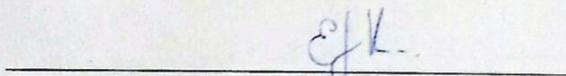
**Banca Examinadora:**



Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern  
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Rita de Cássia Siqueira Curto Valle  
(UFSC)



Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck  
(UNIVILLE)

Joinville, 23 de fevereiro de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dra. Regina Gern, pelo gigantesco aprendizado, pela doçura, apoio e paciência em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste sonho.

À minha mana, Juliana, pelo exemplo a ser seguido, por todo auxílio e pela Helena.

Aos meus amores, Ibanor, Esther e Sofia, minha vida não teria a menor graça sem vocês, obrigada pela paciência e apoio.

Aos meus pais, Aparecida e Jorge, por ter nos ensinado que a educação é a única forma de liberdade, pela casa, comida e amor oferecidos sempre que precisei.

À minhas queridas colegas de bancada, Nicole e Marina, foi um prazer trabalhar com vocês.

A todos os professores, colegas e amigos que tive contato, vocês foram essenciais para a realização desta jornada.

À professora Dra. Elisabeth Wisbeck, pela generosidade ao dividir o seu imenso conhecimento e por toda a colaboração durante esta pesquisa.

À professora Dra. Jamile Rampinelli, pela simpatia, disposição e colaboração sempre que solicitada.

À Maria Isabel e Ana, sem vocês teria sido muito mais difícil, muito obrigada por toda ajuda e aprendizado.

Às técnicas dos laboratórios de pesquisa, em especial Aline Scheller Coan, o auxílio de vocês foi fundamental.

Agradeço à Deus, que se manteve presente em todos os momentos, desde a seleção até a entrega deste trabalho.

## RESUMO

O aumento na produção de cebola ocorrido nos últimos anos trouxe como consequência um grande incremento na quantidade de resíduos gerados. Sendo a cebola uma boa fonte de carbono, e devido à característica de seus polissacarídeos estruturais da parede celular, a produção de corpos frutíferos e enzimas por fungos do gênero *Pleurotus*, se torna uma boa opção para o uso deste resíduo. Diante deste contexto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a produção de corpos frutíferos e pectinases por meio do processo de fermentação em estado sólido (FES) do resíduo do suco de cebola, utilizando o fungo *Pleurotus sajor-caju*. A caracterização físico-química do resíduo desidratado a 55°C foi realizada quanto à umidade (9,41 % ± 0,09), cinzas (1,48 % ± 0,04), pH (3,53), densidade aparente (0,11 g/cm<sup>3</sup>), densidade real (0,84 g/cm<sup>3</sup>) e porosidade (0,84 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>). Para a extração e quantificação dos açúcares presentes no resíduo desidratado, dois métodos foram utilizados: a extração aquosa com agitação magnética e a extração aquosa em banho com ultrassom. Os resultados em termos de açúcares redutores (36,56 ± 2,30 g/100g, massa seca) obtidos em ambos os métodos não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Glicose (15,96 % ± 3,15) e frutose (15,68 % ± 2,95), ambos em base seca, foram os únicos açúcares solúveis extraídos do resíduo. Em relação à granulometria, a maioria das partículas (>57 %) apresentou diâmetro médio entre 2,36 mm e 4,75 mm. Os valores de carbono orgânico (95,84 %), realizado por gravimetria e nitrogênio total (0,36 %), pelo método de Kjeldahl resultaram em uma relação C:N de 266/1. Foi realizado um teste preliminar de forma a verificar a viabilidade do crescimento fúngico no resíduo de cebola preparado em três condições diferentes: *in natura* (IN), desidratado em estufa a 55 °C com imersão em água (DIA) e desidratado com adição de água (DAA). Os resultados, avaliados em termos de crescimento micelial radial, mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as velocidades globais de crescimento quando os substratos IN e DIA foram utilizados. No entanto, não houve crescimento no substrato contendo DAA. A avaliação da produção de corpos frutíferos em FES foi realizada com os substratos IN, DIA e DIB (mistura 1:1 de DIA com folhas de bananeira desidratadas e reidratadas por imersão em água). O rendimento (R %) e a eficiência biológica (EB %) foram de 45,73 % e 4,66 %, respectivamente, quando o substrato DIA foi utilizado. Nos demais substratos (IN e DIB), não houve produção de corpos frutíferos. O extrato enzimático obtido do substrato residual congelado apresentou atividade de pectinase de 4,82 U/mL. A caracterização da enzima bruta encontrou dois picos de pH ótimo (3,0 e 6,0) e termotolerância, com AE aumentando à partir de 60°C, com 7,62 ± 0,32 U/mL em 80°C. Os valores de K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> (243,83 mM e 6,99 mM/min) sugerem baixa afinidade da enzima pelo substrato. Esta pesquisa demonstrou um bom potencial do uso do resíduo do suco da cebola como substrato para produção de corpos frutíferos e pectinases por *Pleurotus sajor-caju*.

**Palavras-chave:** Resíduo agroindustrial. Cebola. Pectinase. Fermentação em Estado Sólido. *Pleurotus sajor-caju*

## ABSTRACT

The increase in onion production in recent years led to a large increase in the amount of waste generated. Since onion is a good source of carbon, and due to the characteristic of its structural polysaccharides of the cell wall, the production of fruit bodies and enzymes by fungi of the genus *Pleurotus*, becomes a good option for the use of this residue. In this context, the objective of this work was to evaluate the production of fruit bodies and pectinases by *Pleurotus sajor-caju* using onion juice residue as substrate in solid state fermentation process (FES). The physico-chemical characterization of the dehydrated residue (55°C) was performed for moisture (9.41 % ± 0.09), ash (1.48 % ± 0.04), pH (3.53), apparent density (0, 11 g / cm<sup>3</sup>), actual density (0.84 g / cm<sup>3</sup>) and porosity (0.84 cm<sup>3</sup> / cm<sup>3</sup>). For the extraction and measurement of the sugars from the dehydrated residue, two methods were evaluated: the aqueous extraction with magnetic stirring and the aqueous extraction in a ultrasound bath. The results in terms of reducing sugars (36.56 ± 2.30 g / 100 g, dry mass) obtained in both methods did not present a statistically significant difference. Glucose (15.96 % ± 3.15) and fructose (15.68 % ± 2.95), both on dry basis, were the only soluble sugars extracted from the residue. Regarding particle size, the majority of particles (> 57 %) had a diameter between 2.36 mm and 4.75 mm. The values of organic carbon (95.84 %) by gravimetry and total nitrogen (0.36 %) by the Kjeldahl method resulted in a C: N ratio of 266/1. A preliminary test was carried out to verify the viability of fungal growth in onion residue prepared in three different conditions: *in natura* (IN), dehydrated at 55 °C with subsequent immersion in water (DIA) and dehydrated with addition of water (DAA). The results, evaluated in terms of radial mycelial growth, showed that there was no statistically significant difference between the global growth rates when the IN and DIA substrates were used. However, there was no growth on the substrate DAA. The evaluation of the production of fruit bodies in FES was performed with IN, DIA and DIB substrates (1: 1 mixture of DIA with banana leaves dehydrated and rehydrated by immersion in water). The yield (R %) and the biological efficiency (EB %) were 45.73 % and 4.66 %, respectively, when the substrate DIA was used. In the other substrates (IN and DIB), there was no production of fruit bodies. The enzymatic extract obtained from the frozen residual substrate presented pectinase activity of 4.82 U/mL. The characterization of the crude enzyme found two peaks of optimum pH (3.0 and 6.0) and thermo-tolerance, with EA increasing from 60 °C, with 7.62 ± 0.32 U/mL at 80 °C. The values of  $K_m$  and  $V_{max}$  (243.83 mM and 6.99 mM/min) suggest low affinity of the enzyme for the substrate. This research demonstrated a good potential of the use of onion juice residue as a substrate for the production of fruit bodies and pectinases by *Pleurotus sajor-caju*.

**Keywords:** Agrowastes. Onion. Pectinase. Solid-state fermentation. *Pleurotus sajor-caju*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da cebola.....	13
Figura 2 - Geração dos principais grupos responsáveis pelo flavor.....	14
Figura 3 - Corpos frutíferos de <i>Pleurotus sajor-caju</i> . ....	19
Figura 4 - Representação da hifa fúngica e suas organelas, sendo (a) o segmento da ponta da hifa e (b) a célula da hifa ampliada .....	20
Figura 5 - Ciclo de vida dos basidiomicetos .....	21
Figura 6 - Cultivo de <i>Pleurotus</i> spp. na Europa (a) e na Ásia (b).....	26
Figura 7 - Delineamento experimental .....	32
Figura 8 - Experimento de verificação da absorção de água pelo resíduo desidratado de cebola em função do tempo .....	39
Figura 9 – Resíduo da extração do suco de cebola, desidratado em estufa a 55 °C, por 24 h.....	45
Figura 10 - Perfil granulométrico do resíduo do suco de cebola desidratado. ....	49
Figura 11 - Cinética de absorção de água pelo resíduo de cebola seco. ....	52
Figura 12 - Placa de Petri contendo resíduo desidratado de cebola adicionado de água (DAA) até umidade de 70 %......	53
Figura 13 - Cinética de crescimento micelial radial de <i>P. sajor-caju</i> em resíduo de suco cebola <i>in natura</i> (IN). Os símbolos representam as replicatas. ....	54
Figura 14 - Cinética de crescimento micelial radial de <i>P. sajor-caju</i> em resíduo de suco cebola desidratado e reidratado por imersão em água (DIA). Os símbolos representam as replicatas. ....	54
Figura 15 - Crescimento micelial nos dias 1, 10 e 18, em resíduo de cebola <i>in natura</i> (a) e em resíduo de cebola desidratada com imersão em água (b).....	56
Figura 16 - Pacotes com resíduo de suco de cebola na forma <i>in natura</i> em câmara de frutificação (a) e contaminação do substrato após 7 dias (b).....	57
Figura 17 - Pacote com substrato de resíduo de cebola <i>in natura</i> (IN) e folhas secas de bananeira desidratadas e reidratadas por imersão em água (INB) (m/m). ....	58
Figura 18 – Primórdios (a) e corpos frutíferos (b) de <i>P. sajor-caju</i> em pacotes contendo o substrato DIA.....	59
Figura 19 - Variação da atividade enzimática da pectinase produzida por <i>P. sajor-caju</i> conforme o pH. ....	62

Figura 20 - Variação da atividade enzimática da pectinase produzida por <i>P. sajor-caju</i> de acordo com a temperatura. Os valores representam a média $\pm$ o desvio padrão. Os símbolos ■ e □ representam os valores das replicatas. ....	63
Figura 21 - Variação da AE da pectinase produzida por <i>P. sajor-caju</i> com a concentração de substrato (a) e linearização da curva apresentada na Figura 21a utilizando-se o método de Lineweaver & Burk (b). ....	65

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Composição nutricional da cebola .....	15
Tabela 2 - Substratos utilizados para o cultivo sólido de <i>Pleurotus sajor-caju</i> e resultados obtidos. ....	24
Tabela 3 - Atividade enzimática (AE) da pectinases produzidas por <i>Pleurotus</i> spp..	30
Tabela 4 - Caracterização físico-química do resíduo do suco de cebola desidratado. ....	46
Quadro 1 - Aplicações das pectinases na indústria alimentícia. ....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABS - Absorbância  
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas  
ACSO - alk(en)yl cystein sulphoxides  
AE – Atividade enzimática  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AOAC - Association of Official Analytical Chemists  
AR – Açúcares Redutores  
BI – Folha de Bananeira com imersão em água  
C - Carbono  
CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cálcio  
CaCO<sub>2</sub> – Carbonato de Cálcio  
CaSO<sub>4</sub> – Sulfato de Cálcio  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono  
DAA – Substrato desidratado com adição de água  
DIA – Substrato desidratado com imersão em água  
DNS - ácido 3,5 – dinitro-salicílico  
EB – Eficiência Biológica  
FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations  
FES – Fermentação em Estado Sólido  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido Sulfúrico  
HCl – Ácido Clorídrico  
HPLC - High performance liquid chromatography  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IN – Substrato *in natura*  
INB – Substrato *in natura* com folhas de bananeira  
LDL - Low Density Lipoprotein  
N - Nitrogênio  
NaOH – Hidróxido de Sódio  
R - Rendimento  
SMC/SMS – Spent Mushroom Compost/Spent Mushroom Substrate  
U - Unidade  
WDA – Wheat Dextrose Agar  
WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivos</b>	<b>12</b>
1.1.1	Objetivo geral	12
1.1.2	Objetivos específicos	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Cebola</b>	<b>13</b>
2.1.1	Características	13
2.1.2	Produção	16
2.1.3	Processamento	17
2.1.4	Resíduos de cebola	17
<b>2.2</b>	<b>O gênero <i>Pleurotus</i></b>	<b>18</b>
2.2.1	Características	18
2.2.2	Cultivo e produção	21
<b>2.3</b>	<b>Enzimas</b>	<b>27</b>
2.3.1	Características	27
2.3.2	Pectinases	28
<b>3</b>	<b>INTERDISCIPLINARIDADE</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Micro-organismo e manutenção</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização físico-química do resíduo de cebola desidratado</b>	<b>33</b>
4.2.1	Umidade	34
4.2.2	Cinzas	34
4.2.3	pH	34
4.2.4	Densidade Aparente	34
4.2.5	Densidade Real	35
4.2.6	Porosidade	35
4.2.7	Açúcares Redutores	35
4.2.7.1	Testes de extração	35
4.2.7.2	Quantificação dos açúcares redutores	36
4.2.8	Granulometria	36
4.2.9	Pectina	37
4.2.10	Carbono orgânico (C) e Nitrogênio total (N)	38
<b>4.3</b>	<b>Avaliação do crescimento micelial de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em resíduo de suco de cebola</b>	<b>38</b>
4.3.1	Preparo do substrato desidratado e reidratado por adição de água – DAA	38
4.3.2	Preparo do substrato desidratado e reidratado por imersão em água – DIA	39
4.3.3	Velocidade de crescimento micelial radial	40
<b>4.4</b>	<b>Produção de corpos frutíferos de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em resíduo de suco de cebola</b>	<b>40</b>
4.4.1	Preparo do inóculo ou “Spawn”	40
4.4.2	Cultivo de <i>Pleurotus sajor-caju</i>	40

<b>4.5</b>	<b>Extração e análise de pectinases por <i>Pleurotus sajor-caju</i></b> .....	<b>42</b>
4.5.1	Preparo do extrato enzimático .....	42
4.5.2	Determinação da atividade enzimática da pectinase .....	42
4.5.3	Determinação de pH ótimo .....	43
4.5.4	Determinação da variação da AE de acordo com a temperatura .....	44
4.5.5	Parâmetros cinéticos .....	44
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização físico-química</b> .....	<b>45</b>
5.1.1	Umidade .....	46
5.1.2	Cinzas .....	46
5.1.3	pH.....	47
5.1.4	Porosidade e granulometria.....	48
5.1.5	Açúcares redutores .....	49
5.1.6	Pectina .....	50
5.1.7	Relação carbono:nitrogênio .....	51
<b>5.2</b>	<b>Avaliação do crescimento micelial de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em resíduo de suco de cebola</b> .....	<b>51</b>
<b>5.3</b>	<b>Produção de corpos frutíferos de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em resíduo de suco de cebola</b> .....	<b>56</b>
<b>5.4</b>	<b>Produção de pectinases por <i>Pleurotus sajor-caju</i></b> .....	<b>60</b>
<b>5.5</b>	<b>Caracterização da enzima pectinase</b> .....	<b>61</b>
5.5.1	Determinação de pH ótimo.....	61
5.5.2	Determinação da atividade enzimática em relação à variação de temperatura	62
5.5.3	Parâmetros cinéticos.....	64
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção e processamento da cebola trouxe como consequência um grande incremento na quantidade de resíduos gerados. Somente na União Europeia, estima-se que, aproximadamente, 450.000 toneladas de resíduos da cebola sejam descartados anualmente (FAO, 2013). Em âmbito nacional, não existem dados referentes aos valores de processamento e produção de resíduos, porém, em Santa Catarina, em uma única empresa produtora de suco de cebola concentrado, foram geradas aproximadamente 80 toneladas de resíduo de cebola no ano de 2016 (CORREA, 2016).

Estudos com o resíduo de cebola comprovaram que este, além dos diversos benefícios para a saúde, como fonte de fibra dietética, de minerais como ferro e zinco e de apresentar alta atividade antioxidante, é uma matéria prima com grande potencial de uso em processos biotecnológicos (BENÍTEZ *et al.*, 2011a). Dentre eles, a produção de fungos do gênero *Pleurotus* é uma boa alternativa, pois além de serem cogumelos comestíveis comercialmente importantes, comumente conhecidos como Shimeji (*P. ostreatus*) e o Houbitake (*Pleurotus sajor-caju*), são decompositores úteis de diversos resíduos agrícolas (KURT; BUYUKALACA, 2010).

Os cogumelos deste gênero são apreciados, não somente pelo seu sabor, mas também pelo seu elevado valor nutricional, pois contêm alto teor de proteínas de boa qualidade, todos os aminoácidos essenciais, elevada proporção de ácidos graxos insaturados, diversas vitaminas e minerais, além de baixos teores de gorduras, colesterol, ácidos nucléicos e calorias (STURION; RANZANI, 2000; BONATTI *et al.*, 2004).

Para a produção de corpos frutíferos, o cultivo deste fungo é realizado em meio sólido (Fermentação em Estado Sólido – FES), com parâmetros como luminosidade, temperatura e umidade controlados (BONATTI *et al.*, 2004). Nesta técnica, os micro-organismos retiram do substrato onde estão acondicionados, o material necessário para o seu desenvolvimento, liberando no meio de cultivo enzimas e outras substâncias que poderão ser aplicadas em processos industriais (HOLKER; HOFER; LENZ, 2004). O substrato empregado neste tipo de cultivo normalmente é um resíduo agroindustrial, que após utilizado pelo fungo apresenta uma vasta gama de aplicações, tais como suplemento para ração animal (KIM *et al.*, 2011), geração de energia (ASADA *et al.*, 2011; OGURI *et al.*, 2011), na produção

agrícola aumentando a matéria orgânica e recuperando o solo (CÓRDOVA JUÁREZ *et al.*, 2011; KADIAN *et al.*, 2008), na biorremediação (ROSALES; PAZOS; ÁNGELES SANROMÁN, 2013) e na produção de enzimas como lacases, lignina e manganês peroxidases, celulases, pectinases, entre outras (SINGH *et al.*, 2011; SINGH; ABDULLAH; VIKINESWARY, 2003).

As enzimas são biocatalisadoras altamente eficazes e possuem a capacidade de realizar transformações químicas muito específicas, tornando-se muito úteis para processos industriais, sendo possível a produção em larga escala (KUMAR *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2012). Dentre as enzimas comercialmente utilizadas, destacam-se as pectinases, por sua significativa utilização, especialmente na indústria de alimentos, indústria cervejeira e de vinho, bem como na indústria têxtil e nas indústrias de papel e celulose (BHAT, 2000).

Devido à ampla disponibilidade de resíduos de cebola gerados na região, este trabalho pretende contribuir com a geração de valor agregado a um resíduo e minimizar o impacto ambiental causado pelo seu descarte.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

Verificar o potencial de uso do resíduo gerado na produção do suco de cebola no cultivo de corpos frutíferos por *Pleurotus sajor-caju* e na obtenção de pectinases.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente o resíduo desidratado do suco de cebola quanto à sua umidade, cinzas, pH, densidade aparente, densidade real, porosidade, açúcares redutores, granulometria, pectina, carbono:nitrogênio;
- Definir qual a melhor condição de tratamento do resíduo do suco de cebola para o crescimento micelial de *P. sajor-caju*;
- Determinar o rendimento e eficiência biológica da produção de corpos frutíferos de *P. sajor-caju* cultivado no resíduo do suco de cebola por meio de fermentação em estado sólido;
- Verificar a atividade enzimática de pectinases no substrato residual do fungo.

## 2 REVISÃO

### 2.1 Cebola

#### 2.1.1 Características

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma hortaliça membro da família *Alliaceae*, gênero *Allium* e espécie *Allium cepa* L., (BREWSTER, 2008). Este gênero vegetal inclui, além da cebola, várias outras espécies de hortaliças de importância econômica tais como o alho (*A. sativum* L.), a cebolinha verde (*A. fistulosum* L.), o alho poró (*A. ampeloprasum* L.), a cebolinha chinesa (*A. chinense* G. Don.), a cebolinha comum (*A. schoenoprasum* L.), bem como diversas espécies ornamentais (BOITEUX; MELO, 2004).

Morfologicamente, é descrita como uma planta herbácea, sendo que o bulbo, a parte mais comercializada e consumida, apresenta folhas justapostas em camadas e variação de formato, cor, pungência, tamanho e conservação pós-colheita (KILL; RESENDE; SOUZA, 2007). É um bulbo tunicado simples, o catáfilo interno também é conhecido como túnica ou escama, a casca como catáfilo externo ou película envolvente e o prato como caule, conforme apresentado na Figura 1.

**Figura 1 - Estrutura da cebola**



Fonte: CEASA MINAS, 2016.

As cebolas são ricas em dois grupos químicos que oferecem benefícios para a saúde e são responsáveis pelas suas principais características, os flavonóides e os sulfóxidos-S-alquenil cisteína (ACSOs). Dois subgrupos de flavonóides são encontrados na cebola, as antocianinas, as quais conferem a cor vermelho/púrpura



Em relação ao seu valor nutricional, apresenta uma grande quantidade de nutrientes e baixo valor calórico, porém em função dos baixos teores de proteína, ácidos graxos e carboidratos, não pode ser considerada fonte nutricional, sendo classificada como especiaria pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2005) . Especiarias são definidas como produtos constituídos de partes como raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes e talos de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas.

De acordo com Carvalho e Machado (2004), a composição química das cebolas pode sofrer a influência das condições de cultivo, como sistemas de produção, o tipo de solo e o clima ou/e de fatores genéticos.

Sua composição nutricional está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1** – Composição nutricional da cebola

<b>CONSTITUINTES</b>	<b>QUANTIDADES (EM 100G)</b>
Carboidratos	8,9g
Proteínas	1,7g
Lipídios	0,1g
Fibras alimentares	2,2g
Energia total	39,0 kcal
<b>Vitaminas</b>	
Niacina	Traços
Piridoxina	0,14 mg
Riboflavina	Traços
Tiamina	0,04mg
Ácido ascórbico	4,7mg
<b>Minerais</b>	
Sódio	1,0mg
Potássio	176,0mg
Cálcio	14,0mg
Cobre	0,05mg
Ferro	0,2mg
Magnésio	12,0mg
Manganês	0,13mg
Fósforo	38,0mg
Zinco	0,2mg

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimento - TACO, 2011

A parede celular da cebola consiste de microfibrilas de celulose e xiloglucano, num estado cristalino, incorporado numa matriz de pectina (BREWSTER, 2008). A quantidade de polissacarídeos pécticos é maior na casca da cebola, diminuindo nas

camadas internas, apresentando, em média, um total de 5 % de pectina (JAIME *et al.*, 2002; O'DONOGHUE *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Produção

Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization), em 2013, a produção mundial de cebola foi de 85,7 milhões de toneladas. Os principais produtores foram a China, com 26 % e Índia, com 22 %. Esses dois países juntos produziram 48 % da produção mundial. No Brasil, a produção foi de 1,54 milhão de toneladas, cerca de 2 % da produção mundial, sendo o 10º maior produtor mundial de cebolas.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), no período de 1961 a 2005, a área cultivada com cebola no Brasil passou de 40.890 para 58.388 ha, o que representa um aumento da ordem de 42,8 %. No entanto, em relação à produção, no período de 1940 (48,55 mil t) a 2005 (1,13 milhão de t), registrou-se um incremento de 2.227,5 %.

No Brasil, a cebola é cultivada desde a região Sul até a região Nordeste. Os estados com maior produção são: Santa Catarina (31 %), Bahia (21%), Minas Gerais (11 %) Paraná (8 %), Goiás (6 %), Rio Grande do Sul (5 %), São Paulo (5 %) e Pernambuco (3 %). Estes estados são responsáveis pela quase totalidade da produção nacional (IBGE, 2015). O consumo per capita da cebola no país fica em torno de 4,7 a 5,0 kg por ano (BOITEUX; MELO, 2004).

No país, além da relevância econômica, o cultivo de cebola, apresenta uma importância social, visto que, os pequenos agricultores são os responsáveis por grande parte da produção nacional de cebola, o que gera renda e emprego para estas famílias e reduz a migração do campo para as grandes cidades (BOEING, 2002).

As mudanças dos hábitos e estilo de vida das pessoas, ocorrido nas últimas décadas, e a entrada das mulheres no mercado de trabalho aumentou a procura por produtos alimentícios mais práticos, saudáveis e de preparo rápido. Como alternativa para as indústrias alimentícias, o processamento surgiu como uma possibilidade para agregarem valor a esta e outras matérias primas, com segurança e manutenção da qualidade sensorial e nutricional (CENCI, 2011).

### 2.1.3 Processamento

A cebola, além de sua forma *in natura*, tem sido muito utilizada tanto processada (pasta, molhos, picles, pó, suco) quanto minimamente processada (descascada, cortada em rodela e fatiada) (BEZERRA *et al.*, 2011).

Para ser considerado processado, o alimento passa por etapas que alteram sua característica fisiológica, e apresentam um produto final com uma forma diferente da sua original. O termo minimamente processado tem como definição a fruta ou hortaliça que foi alterado fisicamente, porém permanece fresco. (MATTOS; MORETTI, 2015).

Estes produtos começaram a ser desenvolvidos nos anos 80, nos Estados Unidos e rapidamente, propagaram-se para o exterior, principalmente, para países da Europa. No Brasil, apenas na década de 90 houve a introdução desta forma de consumo, com boa aceitação pelo mercado consumidor (CENCI, 2011).

Entre as formas já citadas, o azeite e suco de cebola são comuns em países desenvolvidos ocidentais (CENCI, 2011). Algumas indústrias também utilizam o suco da cebola como ingrediente, como ocorre no estado Santa Catarina, onde uma empresa produz suco de cebola concentrado, como ingrediente na elaboração de outros produtos (CORREA, 2016).

### 2.1.4 Resíduos de cebola

O aumento na produção de cebola ocorrido nos últimos anos trouxe como consequência um grande aumento na quantidade de resíduos gerados. Somente na União Europeia, estima-se que aproximadamente 450.000 toneladas de resíduos de cebola sejam descartados anualmente (FAO, 2013).

Os resíduos incluem a pele marrom, as camadas exteriores, raízes e caules, bem como as cebolas que não são grandes o suficiente para uso comercial, ou que apresentem alguma malformação, doença ou qualquer tipo de dano aparente (CHOI *et al.*, 2015; KOSSEVA; WEBB, 2013).

Há uma preocupação sobre a produção de grandes quantidades de resíduos de cebola industrial e seu escoamento. Na União Europeia, os resíduos de cebola são produzidos, principalmente do Reino Unido, Holanda e Espanha. Este resíduo não é adequado para a forragem, ou deposição em aterro, devido ao rápido

crescimento de fitopatógenos, como por exemplo, o fungo *Sclerotium cepivorum*, (NG; SMITH; WALDRON, 1998).

Há uma grande variedade de estudos que buscam a valorização dos resíduos agroindustriais. Em especial, estudos com o resíduo de cebola comprovaram que além dos diversos benefícios para a saúde, é uma matéria prima com grande potencial de uso em processos biotecnológicos. Os produtores e as indústrias de processamento, baseados nestas pesquisas, têm sugerido a conversão do resíduo da cebola em ingredientes alimentares (BENÍTEZ *et al.*, 2011a; PATRA *et al.*, 2013; ROLDÁN *et al.*, 2008), como proteína de célula única, ácidos orgânicos, etanol, cogumelos, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes. A utilização destes resíduos agrícolas em bioprocessos pode fornecer substratos alternativos e, além disso, ajudar a amenizar os problemas ambientais relacionados ao seu descarte inadequado (REDDY *et al.*, 2003).

Considerando que os polissacarídeos estruturais da cebola, localizados na parede celular, são ricos em celulose, hemiceluloses e pectinas, a produção de enzimas por fungos do gênero *Pleurotus*, que realizam a degradação destas estruturas, se tornam uma boa opção para o uso deste resíduo (O'DONOGHUE *et al.*, 2004; RAYMOND; MSHANDETE; KIVAISI, 2015).

## **2.2 O gênero *Pleurotus***

### **2.2.1 Características**

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* spp. pertencem a classe dos basidiomicetos e são cogumelos comestíveis comercialmente importantes, comumente conhecidos como o Shimeji (*P. ostreatus*), Ostra rosa (*P. djamor*) Houbitake (*Pleurotus sajor-caju*) (Figura 3), entre outros.

Seus corpos frutíferos são muito apreciados pelo seu sabor e por seu alto valor nutricional. Apresentam grandes quantidades de proteína de alta qualidade, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais, bem como baixo teor de gordura e baixo valor calórico (BONATTI *et al.*, 2004; COGORNÍ *et al.*, 2014; KAYODE *et al.*, 2015; MANZI; PIZZOFERRATO, 2000; RAMPINELLI *et al.*, 2010), sendo considerados um potente suplemento alimentar (KAKON; CHOUDHURY; SAHA, 2012).

Figura 3 - Corpos frutíferos de *Pleurotus sajor-caju*.



Fonte: [www.dreamstime.com/photos-images/sajor.htm](http://www.dreamstime.com/photos-images/sajor.htm)

Considera-se suplemento alimentar aqueles ingredientes extraídos de alimentos, ervas, plantas e espécies fúngicas que não são usados como alimento regular, mas que estimulam o sistema imunológico ou ajudam a manter a saúde (CHANG; MILES, 2004).

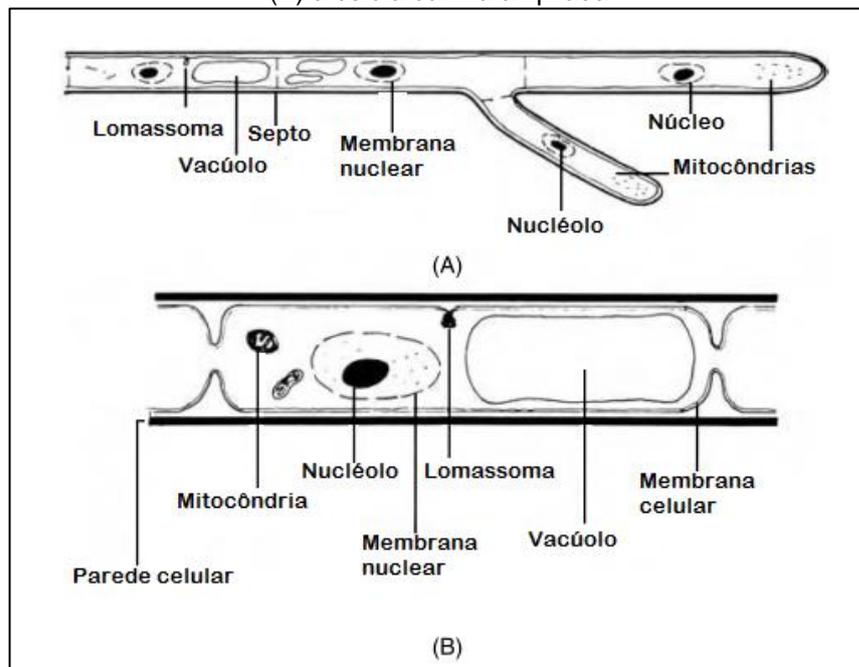
O gênero *Pleurotus* têm despertado grande interesse da comunidade científica devido às suas propriedades medicinais, mediado principalmente pelos polissacarídeos presentes em sua estrutura, denominados  $\beta$ -glucanos, que são polímeros biologicamente ativos (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Diversos estudos realizados comprovaram variados benefícios para a saúde provenientes de fungos do gênero *Pleurotus*, tais como a imunomodulação, potencial hipoglicemiante e atividades antioxidante, antitrombótica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral, bem como redução da pressão sanguínea e da concentração de colesterol (LDL) no sangue (CORRÊA *et al.*, 2016; FACCHINI *et al.*, 2014).

Os fungos deste gênero são decompositores úteis de diversos resíduos agrícolas, sendo conhecidos como fungos da podridão branca, devido ao aspecto esbranquiçado de seu micélio e por crescerem em troncos de árvore ou madeiras apodrecidas (SCHWARZE; ENGELS; MATTHECK, 2000). Durante o crescimento e o desenvolvimento do micélio fúngico, alterações bioquímicas ocorrem como consequência da produção de enzimas extracelulares. Estas enzimas convertem/degradam os componentes insolúveis, e de elevada massa molar de materiais lignocelulósicos para os compostos solúveis e de baixa massa molecular,

que são subsequentemente tomadas por enzimas intracelulares do fungo para a sua nutrição (KURT; BUYUKALACA, 2010).

Os fungos em geral, apresentam uma parede celular composta de quitina, localizada externamente à membrana plasmática, responsável por tornar as células desses organismos mais rígidas e resistentes. Nos fungos filamentosos as células são agrupadas em filamentos e denominadas hifas, e nos basidiomicetos, como os do gênero *Pleurotus*, são do tipo septadas, que realizam a separação interna do filamento em segmentos igualitários, sendo assim, cada septo pode permitir o movimento livre de material citoplasmático entre eles. O conjunto das hifas de um fungo é chamado de micélio (BORGES, 2016). Uma representação diagramática da hifa e suas organelas é demonstrada na Figura 4.

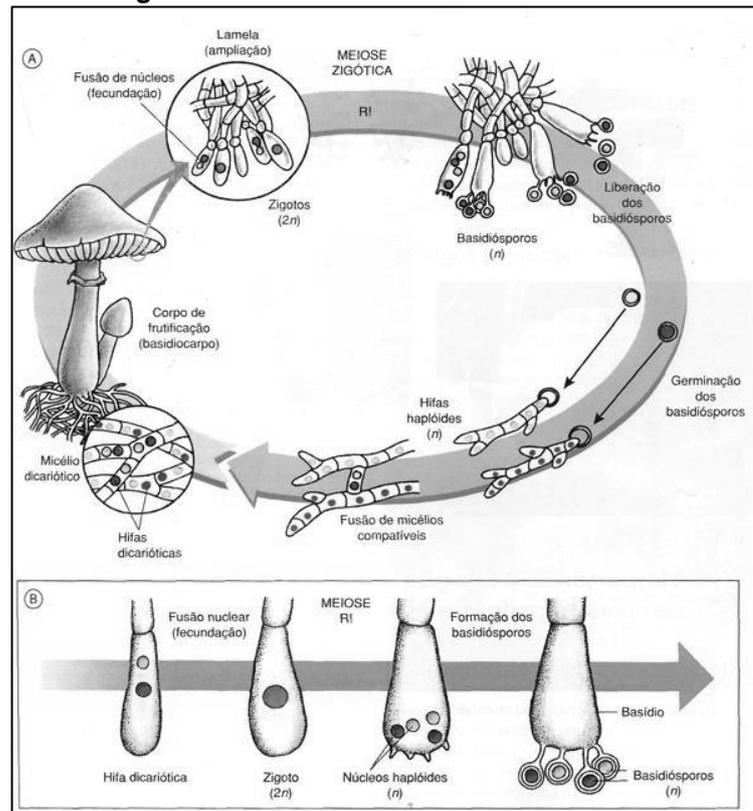
**Figura 4** - Representação da hifa fúngica e suas organelas, sendo (A) o segmento da ponta da hifa e (B) a célula da hifa ampliada



Fonte: CHANG; MILES, 2004

Os fungos se reproduzem sexuadamente ou assexuadamente por meio da formação de esporos (Figura 5). Para basidiomicetos como os do gênero *Pleurotus*, na natureza seu ciclo de vida tem início quando o basidioma lança os esporos (basidiospórios) no ar sendo disseminados facilmente pelo vento ou pela água, até encontrarem um substrato adequado, onde ocorrerá a germinação dos esporos, seguido pela fusão de hifas compatíveis, desenvolvimento dos primórdios e frutificação (BRAGA *et al.*, 1998).

**Figura 5 - Ciclo de vida dos basidiomicetos**



Fonte: MOURA, 2014

### 2.2.2 Cultivo e produção

Entre as diferentes espécies cultivadas, o gênero *Pleurotus* ocupa o segundo lugar na produção mundial de cogumelos comestíveis, com 27 % da produção total (ROYSE, 2014). Esta espécie pode crescer e produzir corpos frutíferos em zonas temperadas e tropicais, e não requer nenhum pré-tratamento do substrato. De acordo com Poppe (2000) sua produção resulta em uma grande quantidade de proteína (como enzimas extracelulares) em substratos que consistem principalmente de resíduos agroindustriais e florestais.

No Brasil, o cultivo de cogumelos teve início na primeira metade do século 20, com a chegada dos imigrantes asiáticos que se estabeleceram na área rural do estado de São Paulo, sendo a região que apresenta a maior produção nacional até os dias atuais. Porém, somente a partir da década de 80, houve o surgimento de pesquisas de técnicas mais avançadas para a produção de cogumelos no país (DIAS, 2010). Segundo a Associação Nacional dos produtores de cogumelos (ANPC), estima-se que existam 300 produtores no país, sendo que no ano de 2013

foram produzidas 2000 toneladas do gênero *Pleurotus*, ficando atrás apenas do *Agaricus bisporus*, o Champignon de Paris (8.000 t).

No ano de 1996, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia realizou a adaptação da técnica conhecida como Jun-Cao (Jun - fungo e Cao - gramínea), desenvolvida em 1983 por professores chineses, substituindo o tipo de substrato, de serragem para capim, permitindo, desta forma, maior economia no cultivo de cogumelos, além de ser ambientalmente mais saudável, já que na área rural as gramíneas são abundantes. Esta técnica permite o uso de grande variedade de resíduos agroindustriais para o cultivo de fungos do gênero *Pleurotus* (DUPRAT; CONTE, 2008).

Além das vantagens descritas anteriormente, os corpos frutíferos produzidos com a técnica Jun-Cao apresentam valor nutricional superior aos produzidos em serragem, com a diminuição do período de cultivo, resultando em um aumento da produção e conseqüente redução no custo (DUPRAT; CONTE, 2008).

O cultivo de *Pleurotus* spp. realizado com esta técnica ocorre por meio de um processo fermentativo conhecido como Fermentação em Estado Sólido (FES), sendo esta definida como o cultivo de micro-organismos em suportes sólidos úmidos, quer em suportes inertes ou sobre substratos insolúveis que podem, além disso, ser utilizados como fonte de carbono e energia. A fermentação realiza-se na ausência ou quase ausência de água livre, sendo assim, perto do meio ambiente natural de micro-organismos como os fungos, que são adaptados a estas condições (HOLKER; HOFER; LENZ, 2004).

Os micro-organismos retiram do substrato onde estão acondicionados, o material necessário para o seu desenvolvimento, liberando no meio de cultivo as substâncias que poderão ser aplicadas em processos industriais (HOLKER; HOFER; LENZ, 2004). Estes meios devem conter boas fontes de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento, micronutrientes, elementos minerais e elementos traços para a obtenção de um desenvolvimento adequado do micro-organismo utilizado no processo (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Os fungos do gênero *Pleurotus* apresentam um bom potencial de biotransformação de resíduos agroindustriais em produtos com alto valor agregado e subprodutos de interesse econômico, tais como as enzimas (PHAN; SABARATNAM, 2012), pois entre o grupo de cogumelos cultivados, é o que apresenta a maior capacidade de degradação de resíduos lignocelulíticos e de colonização em uma

ampla gama de substratos, porém a sua eficiência produtiva dependerá dos compostos escolhidos (PATRABANSH; MADAN, 1997).

A fermentação em estado sólido oferece maiores vantagens quando fungos do gênero *Pleurotus* são utilizados, porque ao contrário de outros micro-organismos, estes fungos crescem tipicamente na natureza em substratos sólidos, tais como pedaços de madeira, sementes, caules, raízes e partes secas de animais, como pele, ossos e matéria fecal (BHARGAV *et al.*, 2008). Além disso, a contaminação por leveduras e bactérias é dificultada pela baixa atividade da água, os reatores utilizados são menores devido à concentração do substrato, a produtividade é significativamente maior, há menor demanda energética, a produção de águas residuais é diminuída e é considerada ambientalmente amigável devido ao uso de resíduos agrícolas e industriais (PANDEY, 2003). Existem parâmetros físico-químicos e bioquímicos que influenciam o processo fermentativo em estado sólido, tais como o tamanho da partícula (granulometria), a umidade inicial, o pH e pré-tratamento do substrato, umidade relativa, temperatura de incubação, agitação, aeração, a idade e tamanho do inóculo, a suplementação de nutrientes, tais como nitrogênio (N), fósforo (P) e oligoelementos, suplementação adicional de carbono, extração e purificação do produto, entre outros (CHANG; MILES, 2004).

O cultivo sólido de *Pleurotus* spp. pode empregar como substrato uma ampla variedade de resíduos lignocelulósicos tais como palhas, serragens, folhas, pseudocaules etc. (EIRA; MINHONI, 1997). De acordo com Poppe (2004), mais de 90 tipos de resíduos agroindustriais foram comprovados como substrato para o crescimento de fungos deste gênero, como subprodutos do milho (sabugo, folhas), casca e polpa de café, casca e fibra de côco, cascas de amendoim, bagaço de cana-de-açúcar, cascas de cítricos, entre outros.

Na maioria dos casos, estes substratos necessitam ser suplementados com uma fonte de nitrogênio como farelo de trigo ou de arroz para atingir a relação carbono/nitrogênio (C/N) mínima de 29:1 (URBEN, 2004). Na tabela 2 são citados alguns substratos utilizados em estudos que avaliaram a produção de corpos frutíferos do gênero *Pleurotus sajor-caju* quanto à seu rendimento (R %) e eficiência biológica (EB %) e o número de fluxos ocorridos.

**Tabela 2** - Substratos utilizados para o cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju* e resultados obtidos.

SUBSTRATO	R (%)	EB (%)	FLUXOS	REFERÊNCIA
Palha de arroz	83,00	9,80	2 a 3	FURLAN <i>et al.</i> (2000)
Palha de sorgo moída	36,84	3,67	4	RAGUNATHAN e SWAMINATHAN (2003)
Fibra de coco	27,33	2,42	4	RAGUNATHAN e SWAMINATHAN (2003)
Haste de algodão	41,42	2,86	4	RAGUNATHAN e SWAMINATHAN (2003)
Palha de arroz moída	101,80	20,36	2	ZHANG; LI; FADEL (2002)
Papel	47,00	6,43	3	MANDEEL; AL-LAITH; MOHAMED (2005)
Papelão	77,90	8,02	2	MANDEEL; AL-LAITH; MOHAMED (2005)
Fibras de plantas	78,40	8,31	3	MANDEEL; AL-LAITH; MOHAMED (2005)
Serragem branca	47,20	5,28	3	MANDEEL; AL-LAITH; MOHAMED (2005)
Bagaço de uva	64,21	4,80	1	RETTORE, GIOVANNI e PAZ (2011)
Palha de arroz	74,70	7,47	1	KURT; BUYUKALACA (2010)
Palha de trigo	48,20	4,82	1	KURT; BUYUKALACA (2010)
Palha de gergelim	66,20	6,62	1	KURT; BUYUKALACA (2010)
Resíduos de vitivinicultura	70,40	7,04	1	KURT; BUYUKALACA (2010)
Folhas de pupunha	55,30	4,70	1	SCHULZ <i>et al.</i> (2013)

A produção do corpo frutífero é a parte final do ciclo vital destas espécies. Este também pode ser denominado como cogumelo, fruto, carpóforo, basidiocarpo ou basidioma. Com a maturação dos cogumelos, o píleo abre-se, as lamelas expõem-se e ocorre a disseminação dos esporos, sexuados e haploides (CHANG; MILES, 2004).

Segundo Stamets (1993) a reprodução dos fungos do gênero *Pleurotus* pode ser definida de acordo com suas necessidades nutricionais e resumida em três etapas distintas:

- a) Colonização do substrato (de 8 a 14 dias), nesta fase o micélio se desenvolve

em função do substrato, através de uma atividade biológica intensa onde o micélio degrada o substrato e absorve seus nutrientes (STAMETS, 1993);

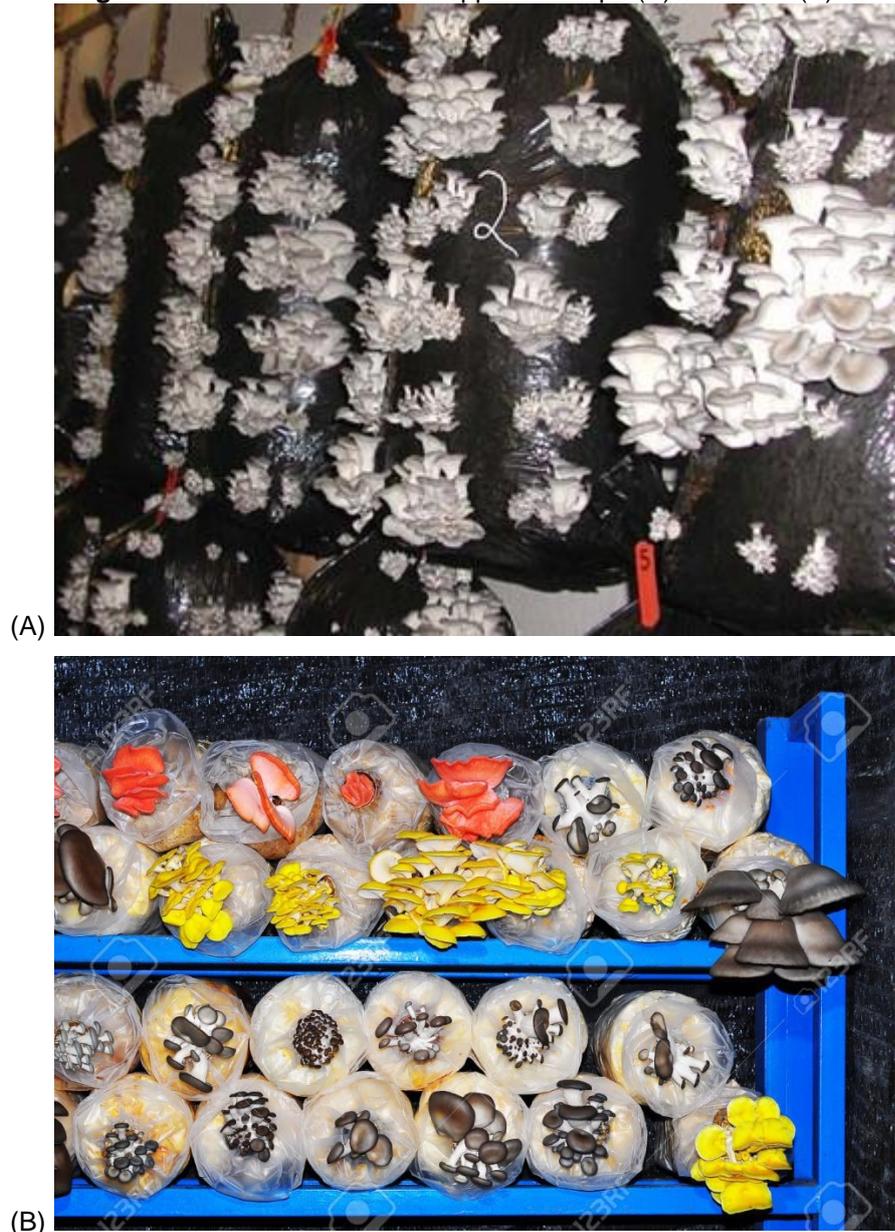
- b) Formação do primórdio (de 3 a 5 dias), esta etapa caracteriza-se pela necessidade de ajustes, tais como o aumento da umidade, a troca gasosa, a queda da temperatura e introdução de luz (STAMETS, 1993);
- c) Corpo de frutificação (de 3 a 5 dias), aqui mantêm-se as características da fase de formação de primórdios, tendo o cuidado de manter sempre níveis elevados de umidade (STAMETS, 1993).

Atualmente, a utilização de sistemas de cultura mais modernos, em ambiente controlado, permitiu a produção de corpos frutíferos durante todo o ano, com fluxos mais curtos, aumento da produtividade e melhora na qualidade do produto, sem a necessidade de instalações muito específicas e onerosas, além de permitir reciclar determinados resíduos agrícolas e agroindustriais que representam um grave problema ambiental (RAMOS *et al.*, 2011).

De acordo com Zadrazil e Kurtzman (1981), diversos sistemas de ensacamento foram testados para a produção de corpos frutíferos, tais como tabuleiros, contentores cilíndricos, prateleiras de madeira ou de poliestireno, blocos e sacos plásticos. Sendo que os sacos plásticos apresentaram maior rendimento na colheita, com o menor nível de contaminação. Segundo Chang e Miles (2004), em comparação ao método tradicional de cultivo em toras de madeira, o uso de sacos de polietileno aumentaram em até 80 % o rendimento, diminuindo consideravelmente o tempo de produção, além de facilitarem o manuseio e colheita. Mandeel, Al-Laith e Mohamed (2005), avaliaram a eficiência biológica e rendimento de quatro variedades de embalagem: sacos de polietileno (109,4 %), bandejas de plástico (71,9 %), bandejas de cerâmica (86,1 %) e redes de poliéster (56,1 %). Neste estudo também se confirmou a vantagem do uso dos sacos de polietileno, tanto na quantidade, quanto na qualidade dos corpos frutíferos produzidos.

Na Europa, os produtores usam principalmente grandes sacos pretos perfurados, enquanto nos países asiáticos utilizam-se sacos menores, onde a inoculação e a colheita são administradas em uma extremidade do pacote (MANDEEL; AL-LAITH; MOHAMED, 2005), conforme mostrado na Figura 6.

**Figura 6** - Cultivo de *Pleurotus* spp. na Europa (A) e na Ásia (B)



Fontes: Mushroom Adventures (A); Mushroom Cultivation (B)

O ciclo produtivo do gênero *Pleurotus* é bastante curto, uma vez que, geralmente, necessita menos de 30 dias desde a inoculação até à primeira colheita, podendo atingir, em situações favoráveis, três fluxos de produção. Além disso, requer uma tecnologia de produção menos complexa, sendo estas características determinantes na viabilidade técnica e econômica de um cultivo em escala industrial (MANDEEL; AL-LAITH; MOHAMED, 2005).

Como resultado do processo de cultivo sólido de corpos frutíferos de *Pleurotus*, há a geração de um composto orgânico chamado “spent mushroom compost” (SMC) ou “spent mushroom substrate” (SMS), em livre tradução “substrato

residual de cogumelos”. Este composto contém micélio e enzimas extracelulares produzidas pelos fungos durante o crescimento e degradação do material lignocelulósico. Estima-se que para cada 200 g de cogumelos produzidos, entre 600 e 800 g de SMS ficam disponíveis (SINGH *et al.*, 2011).

Este substrato residual apresenta uma vasta gama de aplicações, tais como suplemento para ração animal (KIM *et al.*, 2011), geração de energia (ASADA *et al.*, 2011; OGURI *et al.*, 2011), na produção agrícola aumentando a matéria orgânica e recuperando o solo mais rapidamente após a aplicação de herbicidas e pesticidas (CÓRDOVA JUÁREZ *et al.*, 2011; KADIAN *et al.*, 2008), na produção de enzimas (SINGH *et al.*, 2011; SINGH; ABDULLAH; VIKINESWARY, 2003) e na biorremediação (ROSALES; PAZOS; ÁNGELES SANROMÁN, 2013). Porém, supõe-se que o resultado varie conforme a composição do substrato e a espécie fúngica cultivada (PHAN; SABARATNAM, 2011).

## 2.3 Enzimas

### 2.3.1 Características

As enzimas são biocatalisadoras altamente eficazes, e estão envolvidas em vários processos metabólicos, como os processos essenciais para a vida, ou seja, na replicação do DNA e sua transcrição, na síntese de proteínas, metabolismo e transdução de sinal, entre outros. Possuem a capacidade de realizar transformações químicas muito específicas, tornando-se muito úteis para processos industriais, sendo possível a produção em larga escala (KUMAR *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2012). Usualmente, estes processos que utilizam enzimas na indústria, são relativamente simples, fáceis de operar e são eficientes energeticamente (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Podem ser aplicadas em várias áreas, e dividem-se em três categorias: as enzimas técnicas (indústrias de detergentes, têxtil, papel e celulose, indústria farmacêutica, biocombustíveis e em pesquisa e desenvolvimento), as enzimas alimentícias (utilizadas em panificação e confeitaria, sucos, vinhos, cervejarias, laticínios, produção de óleos e gorduras), e enzimas de ração animal (KUMAR *et al.*, 2014). A produção de enzimas movimentava bilhões de dólares anualmente, com

expectativa de arrecadação mundial, em torno de US\$ 6 bilhões em 2016 (LI *et al.*, 2012).

Dentre as enzimas comercialmente utilizadas, destacam-se as pectinases, utilizadas na indústria de alimentos desde 1930, sendo que seu uso aumentou consideravelmente, especialmente na indústria alimentícia, na cervejeira e de vinho, bem como na indústria têxtil e nas indústrias de papel e celulose. Estas enzimas são responsáveis por cerca de 20 % do mercado mundial de enzimas (BHAT, 2000).

### 2.3.2 Pectinases

As pectinases ou enzimas pectinolíticas, são um grupo de enzimas que degradam as substâncias pécticas, como os polissacarídeos estruturais presentes nas células vegetais, responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos das plantas (CASTILHO; MEDRONHO; ALVES, 2000; FREIXO; KARMALI; ARTEIRO, 2008).

As substâncias pécticas são compostas por longas cadeias de resíduos de ácido galacturônico. As pectinases (poligalacturonase, pectina hidrolase, pectina liase e pectato liase) são classificadas com base no ataque a estas cadeias em: protopectinases que solubilizam a protopectina para formar pectina, pectinaesterases que removem os grupos metil éster do polímero e enzimas despolimerizantes que quebram as ligações glicosídicas das substâncias pécticas (CASTILHO; MEDRONHO; ALVES, 2000; UENOJO; PASTORE, 2007).

A principal utilização das pectinases é na indústria de alimentos, sendo muito utilizadas na redução da viscosidade e na melhora da eficiência e clarificação nas indústrias de sucos e extração de polpas; nas indústrias vinícolas são usadas no pré-tratamento da uva; nos tecidos vegetais agem na maceração, liquefação e extração; na fermentação de chá, café e cacau; para melhorar a extração de óleos vegetais, melhorando o rendimento e a produção, e reduzindo a indução ao ranço do óleo de oliva extra virgem. Porém também é utilizada na purga, alvejamento e maceração das fibras naturais para a indústria têxtil, auxilia no branqueamento na indústria de papel, e em conjunto com outras enzimas nas rações animais, aumentando a absorção dos nutrientes (UENOJO; PASTORE, 2007). O Quadro 1 apresenta um resumo das principais aplicações das pectinases na indústria de alimentos e vinhos.

**Quadro 1** - Aplicações das pectinases na indústria alimentícia.

ENZIMAS	APLICAÇÕES
Enzimas de maceração (pectinases, celulases e hemicelulases)	Melhoramento na extração de sucos de frutas e de óleo de oliva, liberação de aromas, enzimas, proteínas, polissacarídeos, amido e ágar
Pectina ácida e termo-estável com poligacturonase, pectina esterase e pectina transeliminase	Melhora o rompimento da fruta e aumenta a extração de pigmentos de cor
Poligalacturonase com alta atividade de pró-pectinase e baixa celulase	Produção de purês com alta viscosidade
Poligalacturonase e pectina transeliminase com baixa atividade de pectina esterase e hemicelulases	Produção de sucos vegetais não clarificados de baixa viscosidade
Poligalacturonase, pectina transeliminase e hemicelulases	Clarificação de suco de frutas
Pectinase e $\beta$ -glicosadase	Alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais
Pectina esterase com atividade de poligalacturonase e de pectina liase	Produção de ketchup de alta qualidade e de polpa de frutas
Pectina esterase	Melhoramento na clarificação de cidra
Enzimas de maceração (pectinases, celulases e hemicelulases)	Melhoramento da maceração da casca e extração de pigmentos de cor de uvas, qualidade, estabilidade, filtração e clarificação de vinhos

Fonte: BHAT, 2000

Há uma grande variedade de substratos utilizados por micro-organismos para a produção de pectinase, como farelo de trigo, farelo de soja, polpa de maçã, polpa de amora, polpa de morango, polpa de beterraba, polpa de café e casca, cacau, limão e casca de laranja, combinação de bagaço de cana e bagaço de laranja, entre outros, sendo que a produção por fermentação em estado sólido é 6 vezes maior do que via fermentação submersa (BHARGAV *et al.*, 2008).

Vários tipos de micro-organismos (fungos, leveduras e bactérias) têm habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas, porém os fungos são os preferidos em escala industrial, pois secretam aproximadamente 90 % das enzimas no substrato (BLANDINO *et al.*, 2001), sendo que sua síntese sofre influência das características do meio onde foi cultivado, principalmente pela quantidade de carbono e nitrogênio, a presença de pectina e condições de cultivo (FIEDUREK; ILCZUK; LOBARZEWSKI, 1989)

Há poucos estudos que avaliam a produção de pectinases por *Pleurotus* spp. Dois deles, realizados no Brasil, relatam a análise de pectinases em cultivo sólido usando resíduos provenientes da extração do suco de laranja por *P. ostreatus* e *P.*

*pulmonarius* (ALEXANDRINO *et al.*, 2007; INÁCIO *et al.*, 2015). Raymond, Mshandete e Kivaisi (2015) avaliaram a produção de pectinase por *Pleurotus HK-37* em FES, usando resíduo de sisal suplementado com esterco de vaca. Freixo, Karmali e Arteiro (2008) avaliaram a produção de pectinase por *P. ostreatus* utilizando bagaço de tomate como fonte de carbono em cultivo submerso. A produção de pectinase por *P. pulmonarius* também foi detectada em cultivo submerso usando glicose como substrato (DÍAZ-GODÍNEZ *et al.*, 2016). Pectinase também foi detectada no cultivo sólido de *P. florida* usando palha de arroz (MALAYIL; CHANAKYA, 2016). Dados das atividades enzimáticas de pectinases produzidas por fungos do gênero *Pleurotus* encontradas por diversos autores estão apresentados na Tabela 3. Não foi encontrada nenhuma publicação relatando a produção de pectinase por *Pleurotus sajour-caju*.

**Tabela 3** - Atividade enzimática (AE) da pectinases produzidas por *Pleurotus* spp.

VARIEDADE	SUBSTRATO	AE (U/mL)	REFERÊNCIAS
<i>P. ostreatus</i>	Resíduo laranja	nd*	ALEXANDRINO <i>et al.</i> , 2007
<i>P. ostreatus</i>	Bagaço tomate	2,18	FREIXO;KARMALI;ARTEIRO, 2008
<i>P. pulmonarius</i>	Resíduo laranja	9,4	INÁCIO <i>et al.</i> , 2015
<i>P. HK-37</i>	Resíduo de sisal com esterco de vaca	3,31	RAYMOND;MSHANDETE;KIVAISI, 2015
<i>P. pulmonarius</i>	Glicose	0,7	DÍAZ-GODÍNEZ <i>et al.</i> , 2016
<i>P. florida</i>	Palha de arroz	1,00	MALAYIL;CHANAKYA, 2016

\*não detectado

### 3 INTERDISCIPLINARIDADE

O Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE tem por objetivo formar profissionais habilitados em uma perspectiva interdisciplinar em saúde e meio ambiente, com capacidade para aproximar estas áreas, contribuindo para o desenvolvimento de políticas voltadas aos cuidados com a preservação ambiental com conseqüente prevenção e melhoria da saúde. Neste contexto, as pesquisas realizadas no âmbito do curso devem, necessariamente, abordar os temas saúde e meio ambiente sob uma ótica interdisciplinar.

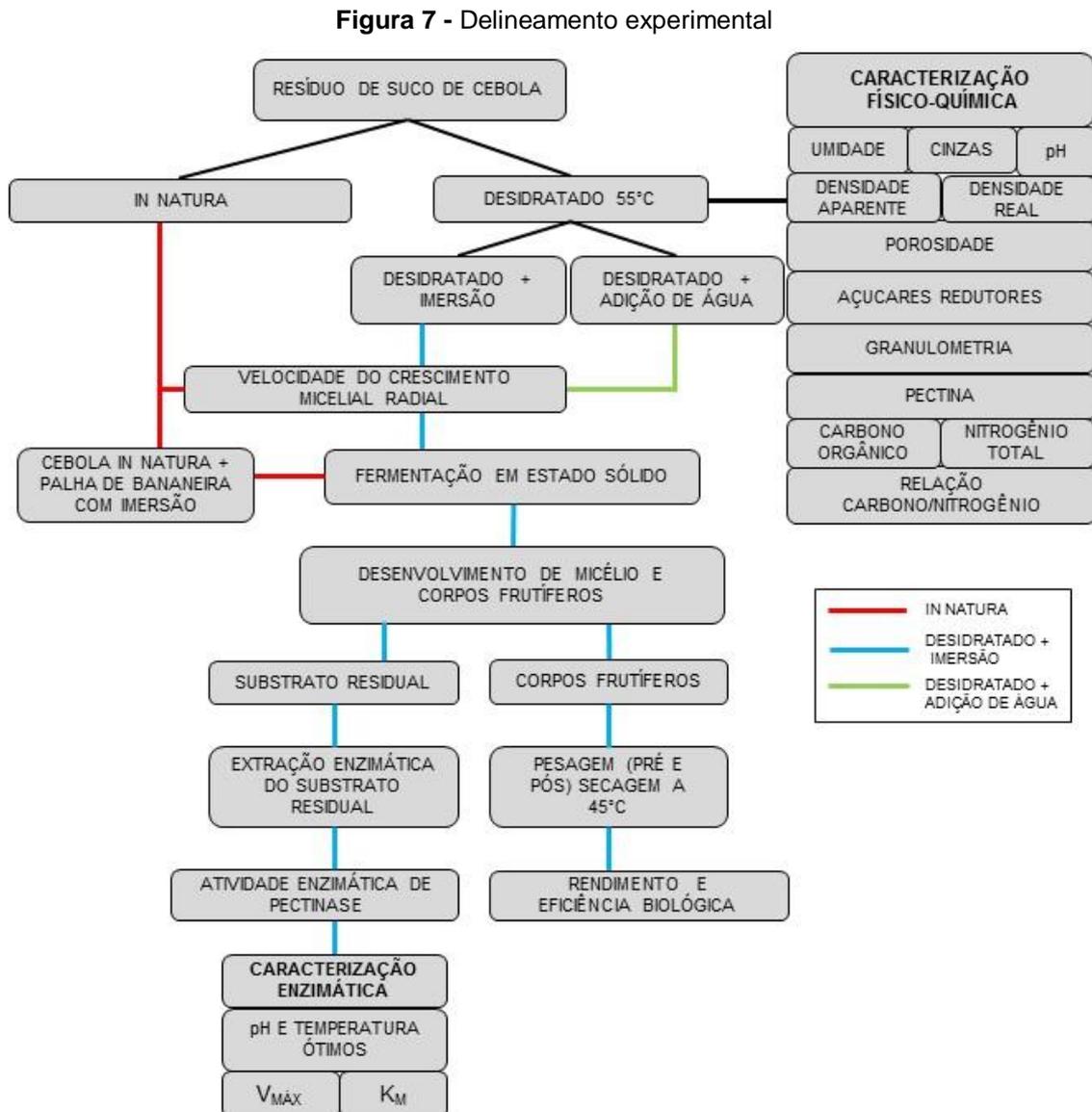
Este estudo buscou uma opção para o uso do resíduo gerado na produção de suco de cebola, cujo acúmulo pode tornar-se prejudicial ao meio ambiente, por meio do cultivo de corpos frutíferos do fungo *Pleurotus sajor-caju*, cogumelo comestível, com valor gastronômico, nutricional e medicinal amplamente comprovado, como também a obtenção da enzima pectinase, com vasta aplicação na indústria de alimentos, extraída do substrato residual deste cultivo.

A geração de resíduos provenientes do aumento da produção e processamento de cebola cria um problema ambiental, pois estes resíduos não são adequados para forragens devido ao seu odor característico, e nem podem ser utilizados como fertilizantes por causa do rápido desenvolvimento de agentes fitopatogênicos (NG; SMITH; WALDRON, 1998).

Sabe-se que o ambiente afeta a saúde de várias maneiras, muitos estudos já comprovaram que tanto a exposição direta a agentes nocivos, como o desequilíbrio dos ecossistemas que sustentam a vida, provocam um impacto significativo na saúde humana (REMOUNDOU; KOUNDOURI, 2009). Em 2006, a World Health Organization (WHO) estimou que 13 milhões de mortes por ano foram atribuídas a causas ambientais evitáveis, sendo que países em desenvolvimento sofriam 15 vezes mais doenças de carga ambiental do que os desenvolvidos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma com todas as etapas realizadas neste trabalho, apresentado na Figura 7, foi construído para um melhor entendimento do delineamento experimental utilizado neste trabalho.



Fonte: A autora

### 4.1 Micro-organismo e manutenção

Este trabalho foi desenvolvido utilizando a linhagem *Pleurotus sajor-caju* CCB019, obtida da Coleção de Culturas de Basidiomicetos do Instituto de Botânica

de São Paulo. A linhagem foi cultivada em placas de Petri contendo o meio WDA (Wheat Dextrose Agar) (FURLAN *et al.*, 1997) composto por 20 g de glicose e 15 g de ágar para cada litro de extrato de trigo. O extrato de trigo foi preparado pela infusão em água de grãos de trigo previamente lavados, na proporção de 1:2 (grãos:água, m/m). Os grãos foram mantidos por 10 min em ebulição, resfriados à temperatura ambiente e filtrados em diversas camadas de gaze. O extrato de trigo livre dos grãos foi utilizado no preparo do meio WDA. As placas de Petri contendo o meio WDA e completamente colonizadas pelo fungo (30 °C, aproximadamente 7 dias) foram armazenadas sobre refrigeração ( $4 \pm 1$  °C) e repicadas a cada 3 meses. Os grãos cozidos foram utilizados para o preparo do inóculo (*spawn*) da fermentação em estado sólido (FES) como descrito no item 4.4.

#### **4.2 Caracterização físico-química do resíduo de cebola desidratado**

Com o objetivo de verificar se o resíduo do suco de cebola possuía características adequadas para o cultivo e produção de corpos frutíferos do fungo em fermentação em estado sólido (FES) e extração de enzimas pectinolíticas, algumas análises físico-químicas foram realizadas.

Cebolas brancas com casca, adquiridas no comércio local, foram lavadas em água corrente, cortadas em partes iguais, trituradas em multiprocessador doméstico Philips Walita Super Master (modelo RI3142), com acessório faca, durante 20 s, sendo em seguida centrifugadas em Centrífuga de frutas Mondial Premium (modelo CF01) sendo o suco descartado. O resíduo de cebola gerado neste processo foi similar ao gerado nas indústrias de produção de suco de cebola e denominado resíduo *in natura*. O resíduo *in natura* foi desidratado em estufa com circulação forçada de ar à 55 °C, por 24 h. Após este período, permaneceu em dessecador, acondicionado em saco de polietileno.

A caracterização físico-química do resíduo do suco de cebola desidratado foi realizada quanto à umidade, cinzas, pH, densidade aparente, densidade real, porosidade, açúcares redutores e açúcares totais, granulometria, pectina, carbono orgânico e nitrogênio total, de acordo com as metodologias descritas a seguir. Com exceção do carbono orgânico e nitrogênio total, as análises foram realizadas em triplicatas para que fosse possível a determinação de grandezas estatísticas, como o valor médio e desvio padrão.

#### 4.2.1 Umidade

Foi calculada secando-se 20 g do resíduo do suco de cebola desidratado em cadinho previamente tarado, até massa constante, a 105 °C em estufa com circulação de ar, segundo método A.O.A.C (1995). O teor de umidade foi determinado por meio da diferença de massa entre os substratos desidratados a 55°C e o substrato seco a 105°C.

#### 4.2.2 Cinzas

O percentual de cinzas foi calculado segundo método A.O.A.C (1995), quantificando a massa da amostra após incineração. Colocou-se 1,0 g de amostra do resíduo desidratado em cápsulas de porcelanas previamente secas em mufla, a uma temperatura de 600 °C, durante 4 horas. Resfriou-se as cápsulas em dessecador e pesou-se em balança analítica. O teor de cinzas foi determinado pela diferença entre a massa inicial da amostra e a massa da amostra após calcinação na mufla.

#### 4.2.3 pH

Para análise do pH foi preparada uma suspensão de 4 g de amostra em 40 mL de água destilada. Após completa homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos e em seguida o pH foi medido diretamente com um potenciômetro digital, previamente calibrado (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### 4.2.4 Densidade Aparente

Para determinação da densidade aparente do material foram pesados 5 g (ma) do material, sendo esta massa colocada em uma proveta, sem que houvesse compactação, para determinar o volume (V) ocupado pela amostra. A densidade aparente foi calculada seguindo a Equação 1 (ANVISA, 2005b).

$$\text{Densidade Aparente (g/cm}^3\text{)} = \frac{ma}{V} \quad (1)$$

#### 4.2.5 Densidade Real

A densidade real foi determinada a partir da relação entre a massa e o volume ocupado pela amostra, por meio do deslocamento de um fluido de volume conhecido, que nesse caso foi o óleo de soja comercial. Inicialmente colocou-se o óleo em uma proveta e mediu-se o seu volume ( $V_1$ ), em seguida adicionou-se 5 g do resíduo ( $m$ ) e esperou-se que a mesma se depositasse totalmente no fundo da proveta. Mediu-se novamente o volume indicado na proveta ( $V_2$ ), e o volume real ocupado pelo resíduo foi determinado pela diferença entre esses volumes ( $V_2 - V_1$ ). A densidade real foi determinada pela Equação 2 (ANVISA, 2005b).

$$\text{Densidade Real (g/cm}^3\text{)} = \frac{m}{V_2 - V_1} \quad (2)$$

#### 4.2.6 Porosidade

A porosidade do material foi determinada pela divisão da densidade aparente pela densidade real, conforme a Equação 3 (KEEY, 1991).

$$\text{Porosidade (cm}^3\text{/cm}^3\text{)} = 1 - \frac{\text{Densidade Aparente}}{\text{Densidade Real}} \quad (3)$$

#### 4.2.7 Açúcares Redutores

##### 4.2.7.1 Testes de extração

Para análise dos açúcares redutores foram testadas duas formas de extração. Em ambos os testes, 5 g do resíduo desidratado foram adicionados de 50 ml de água destilada e macerados. Completou-se o volume com 150 ml de água e procedeu-se a extração de duas formas:

- a) o béquer contendo a amostra (suspensão do resíduo desidratado de cebola) foi mantido durante 1 h a 55 °C, sob agitação magnética

- b) o béquer contendo a amostra (suspensão do resíduo desidratado de cebola) permaneceu durante 1h imerso em um banho ultrassom (Thornton, mod. C/T, 60 Hz) na temperatura de 46 °C.

Após a extração, as suspensões foram filtradas em bomba à vácuo, em papel filtro Whatman nº 1, e os extratos foram congelados até a análise dos açúcares redutores.

#### 4.2.7.2 Quantificação dos açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores (AR) foi determinada seguindo a metodologia descrita por Miller (1959), com algumas adaptações, a qual baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a 3-amino-5-nitrosalicílico, simultaneamente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Os extratos foram diluídos de 1:20 e 1 ml do extrato foi adicionado de 1 mL do reagente DNS e levado à ebulição a 100 °C, em banho-maria, por exatos 5 minutos. A mistura foi resfriada em água gelada para interromper a reação e adicionou-se 5 mL de água destilada. Realizou-se a leitura da absorbância da amostra em um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm. Uma amostra contendo água em substituição ao extrato de açúcares, submetida ao mesmo procedimento das demais amostras foi considerada o “zero” de absorbância. A concentração de açúcares redutores foi obtida utilizando-se uma curva de calibração construída com concentrações de glicose variando de 0,1 a 1 g/L (0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 g/L). Os resultados de açúcares redutores foram expressos em gramas de açúcares redutores por 100 gramas de amostra.

Os açúcares totais foram determinados utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC, empregando Coluna Transgenomic ice-ion 300, com curva de calibração série 5267 - lactose, (r:0,9986) glicose (r:0,9999), frutose (r:0,9997), manitol (r:0,9963), ác. succínico (r:0,9995), ác. acético (r:0,9996), glicerol (r:0,9994), metanol (r:0,9689) e etanol (r:0,9995), com eluente 8,5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com fluxo de 0,4 mL/min, a 70°C, detecção através de índice de refração e volume de injeção de 20,0 u/L.

#### 4.2.8 Granulometria

O perfil granulométrico do resíduo desidratado foi determinado de acordo com as recomendações da NBR – 7181 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1984).

Para isso, foram pesados 50 g do resíduo em uma balança analítica. Em seguida, o material foi transferido para um agitador de peneiras PRODUTEST a uma frequência de 50 rpm por 15 minutos, em jogo constituído por sete peneiras: 4 mesh (4,75 mm), 8 mesh (2,36 mm), 10 mesh (1,70 mm), 20 mesh (0,850 mm), 35 mesh (0,425 mm), 80 mesh (0,180mm) e 120 mesh (0,125 mm). O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados foram expressos percentualmente em relação à massa da amostra analisada.

#### 4.2.9 Pectina

Os métodos de determinação de pectinas se fundamentam na extração por água quente seguida por precipitação com ácido e, após a purificação, pesagem na forma de pectato de cálcio, segundo Rangana (1979).

Em um béquer de 1000 mL, foram colocados 20 g da amostra ( $m_a$ ), adicionando-se 400 mL de solução de HCl 0,05 N e levada para aquecimento por duas horas a 80-90 °C. Após este período a suspensão foi resfriada, e seu volume foi completado com água destilada até 500 ml, filtrando-a em papel filtro qualitativo.

Em um béquer de 1000 mL, 200 mL (V) do extrato filtrado foram diluídos em 250 mL de água destilada. A solução foi neutralizada com NaOH 1 N. Após a neutralização, foi adicionado mais 10 mL de NaOH 1 N mantendo agitação constante. Essa solução ficou em repouso durante uma noite (overnight). No dia seguinte, foi adicionado 50 mL de ácido acético (1 N) e após 5 minutos foram acrescentados 25 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  (1 N), com agitação. A solução foi posta em ebulição por 2 minutos, permanecendo em repouso por 3 horas. Após este período, a mesma foi filtrada com papel de filtro previamente seco e pesado ( $m_p$ ), com auxílio de bomba à vácuo.

O papel de filtro contendo o pectato de cálcio foi transferido para estufa a 105 °C até peso constante, resfriado em dessecador e pesado ( $m_{as}$ ). A pectina contida no resíduo do suco de cebola foi expressa em % de pectato de cálcio conforme Equação 4.

$$P (\%) = \frac{((m_{as} - m_p) * 500)}{m_a * V} * 100 \quad (4)$$

#### 4.2.10 Carbono orgânico (C) e Nitrogênio total (N)

As duas análises foram realizadas em laboratório terceirizado (Laboratório Inova), sendo que para avaliação do carbono orgânico utilizou-se a técnica de gravimetria ou perda de massa por ignição, seguindo a metodologia de Schumacher (2002). No teste de nitrogênio total aplicou-se o método Kjeldahl segundo a A.O.A.C (1995), envolvendo três etapas: digestão, destilação e titulação. As amostras foram digeridas com ácido sulfúrico até conversão em sulfato de amônia. Em seguida o sulfato de amônia foi destilado em destilador de nitrogênio em meio básico, liberando gás amônia, o qual foi recolhido em ácido bórico formando borato de amônia. O borato de amônia foi titulado com ácido sulfúrico 0,02 N. Os resultados foram expressos em %.

Os dados obtidos foram utilizados para calcular a relação carbono:nitrogênio (C:N) do substrato.

### 4.3 Avaliação do crescimento micelial de *Pleurotus sajor-caju* em resíduo de suco de cebola

De forma a avaliar a viabilidade do crescimento de *Pleurotus sajor-caju* no resíduo gerado na produção de suco de cebola, realizou-se um experimento preliminar em Placas de Petri contendo 30 g do resíduo de cebola como substrato para o crescimento micelial do fungo em três condições: *in natura* (IN), conforme descrito no item 4.2; desidratado e reidratado por adição de água até 70 % de umidade (DAA); e desidratado reidratado por imersão em água até 86,73 % de umidade (DIA), obtida conforme item 4.2.1.

#### 4.3.1 Preparo do substrato desidratado e reidratado por adição de água – DAA

O resíduo *in natura* foi disposto em uma camada fina (1 cm) sobre fôrmas de alumínio e desidratado em estufa com circulação forçada de ar, a 55 °C, até atingir massa constante. Calculou-se o volume de água necessário a ser adicionado ao

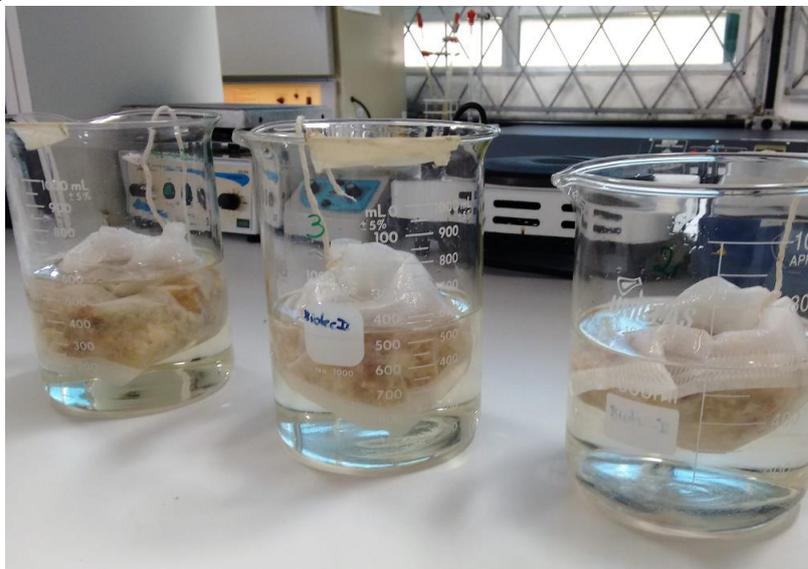
resíduo desidratado, considerando que a condição de umidade adequada para o crescimento micelial é de 70 %. Sabendo previamente que 70 g de resíduo desidratado de cebola possuem 2,11 g de umidade, em um béquer contendo 100 g do resíduo desidratado foram adicionados 67,89 ml de água, misturados e deixados em repouso por 45 minutos, até não haver nenhuma água aparente.

#### 4.3.2 Preparo do substrato desidratado e reidratado por imersão em água – DIA

O resíduo *in natura* foi desidratado nas mesmas condições descritas no item 4.3.1 e imerso em água destilada. Para determinar o tempo de imersão, um estudo prévio foi realizado, no qual o resíduo desidratado (20 g) foi acondicionado dentro de saco de TNT fechado com barbante, colocado em béquer de 1000 ml, e imerso, com auxílio de um peso, em água suficiente para cobrir a amostra (Figura 8). Após a imersão, a água foi drenada, através de fricção manual até cessar o escoamento, em intervalos regulares de 1 hora amostras do resíduo foram pesadas, até obtenção de massa constante.

Com o tempo de imersão ideal determinado, o resíduo desidratado foi acondicionado em saco de tecido TNT e colocado em imersão em água suficiente para manter coberto o material, em seguida o resíduo foi drenado até eliminar todo o excesso de água.

**Figura 8** - Experimento de verificação da absorção de água pelo resíduo desidratado de cebola em função do tempo



Fonte: A autora

#### 4.3.3 Velocidade de crescimento micelial radial

30 g de cada substrato a ser avaliado (IN, DAA e DIA) foram acondicionados em placas de Petri de vidro. As placas foram autoclavadas a 121 °C, a 1 atm, durante 20 minutos. Após o resfriamento, em uma câmara de fluxo laminar, as placas foram inoculadas com um disco de ágar de 8 mm contendo micélio fúngico proveniente das placas de Petri de manutenção do micro-organismo em meio WDA (item 1.1). O disco foi disposto no centro da placa e estas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 29 °C, ao abrigo da luz e o crescimento micelial radial foi acompanhado diariamente, com a utilização de paquímetro, pela medida nos quatro quadrantes da placa. Os valores determinaram a média de crescimento em cada substrato avaliado. O experimento foi realizado em quadruplicata.

#### 4.4 Produção de corpos frutíferos de *Pleurotus sajor-caju* em resíduo de suco de cebola

##### 4.4.1 Preparo do inóculo ou “Spawn”

Para a produção do inóculo (BONATTI *et al.*, 2004) utilizou-se os grãos de trigo cozidos provenientes do preparo do extrato de trigo, conforme descrito no item 4.1 como substrato. Os grãos foram adicionados de 0,35 % de CaCO<sub>3</sub> e 1,3 % de CaSO<sub>4</sub> (massa seca) e 250 g foram acondicionados em sacos de polipropileno. Os sacos foram autoclavados a 121 °C e 1 atm, por 1 hora. Após o resfriamento, foram inoculados com 3 discos de ágar de 8 mm, obtidos das placas de manutenção da cepa, contendo o micélio fúngico, e incubados em estufa microbiológica, a 30 °C, em ausência de luz até que o substrato fosse totalmente colonizado pelo micélio.

##### 4.4.2 Cultivo de *Pleurotus sajor-saju*

Inicialmente, duas formas de preparo do resíduo do suco de cebola foram utilizadas como substrato para o cultivo de corpos frutíferos de *Pleurotus sajor-caju*: o resíduo *in natura* (IN, item 4.3.1) e o resíduo desidratado e reidratado por imersão em água (DIA, item 4.3.3). Em função dos resultados obtidos nestes dois ensaios, uma terceira forma de preparo do substrato foi incluída: a mistura (1:1, massa seca)

do resíduo de suco de cebola *in natura* (IN) com palha de folhas de bananeira reidratada por imersão, esta, amplamente utilizada como substrato para a produção de corpos frutíferos de fungos do gênero *Pleurotus* (BONATTI *et al.*, 2004; DALONSO *et al.*, 2010; SILVEIRA; FURLAN; NINOW, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2014; WOLFF *et al.*, 2008). Esta mistura foi chamada de INB. As folhas de bananeira foram secas em estufa a 60 °C por 24 horas, cortadas em triturador/picador forrageiro (partículas de 2 a 5 cm) e embaladas em saco de ráfia. Este material ficou imerso em água por 12 horas e após este período foi deixado escorrer para retirar o excesso de água por aproximadamente 2 horas (MADAN *et al.*, 1987). Para o cultivo dos corpos frutíferos foi utilizada a técnica Jun-Cao (DUPRAT; CONTE, 2008). 200 g de IN (22,2 g de massa seca), 70 g de DIA (70 g de massa seca) e 241 g de INB (35g DI + 35 g BI, massa seca), foram acondicionados em pacotes de polipropileno e esterilizados em autoclave, a 121 °C e 1 atm, por 20 min. Estas massas foram determinadas de forma a permitir que todos os substratos ocupassem aproximadamente o mesmo volume nos pacotes, mantendo assim a similaridade de troca gasosa em todas as condições. O experimento foi realizado em sextuplicata. Após total resfriamento, os sacos foram inoculados, em câmara de fluxo laminar, com 10 % do inóculo (massa seca), preparado conforme descrito no item 3.4.1.

Os pacotes foram incubados em estufa a 30 °C, na ausência de luz, até completa colonização do substrato. Após este período, os pacotes foram perfurados para a saída do CO<sub>2</sub> e transferidos para a câmara de cultivo com controle automático de 12 h/dia de luz, 90 % de umidade relativa do ar e 28 °C ± 2 de temperatura, para favorecer o desenvolvimento dos primórdios.

Os corpos frutíferos foram colhidos quando as margens do píleo apresentavam-se planas, estágio que precede a esporulação (STURION; OETTERER, 1995), pesados em balança analítica para determinação de massa fresca, desidratados a 45 °C e novamente pesados para obtenção da massa seca e, por fim, armazenados. Foi realizada a colheita da totalidade dos corpos frutíferos do primeiro fluxo produtivo, quando os de maior tamanho atingiam o ponto de colheita, independentemente do tamanho dos demais. O substrato após colheita foi tratado conforme será descrito no item 4.5.1 deste trabalho. Os resultados foram avaliados em termos de Rendimento (R %) e Eficiência Biológica (EB %).

Para determinação do Rendimento (R %) do processo, foi utilizada a relação proposta por Chang, Lau e Cho (1981), que relaciona a massa fresca dos corpos frutíferos e a massa de substrato seco, conforme a Equação 5.

$$R (\%) = \frac{\text{Massa fresca de cogumelos}(g)}{\text{Massa seca do substrato}^* (g)} \times 100 \quad (5)$$

\*seco a 105°C, por 24 h.

A Eficiência Biológica (EB %) do processo foi determinada pela relação, proposta por Bisaria, Madan e Bisaria (1987), entre a massa dos corpos frutíferos secos e a massa de substrato seco, segundo a Equação 6.

$$EB (\%) = \frac{\text{Massa dos corpos frutíferos desidratados} (g)}{\text{Massa seca do substrato}^* (g)} \times 100 \quad (6)$$

\*seco a 105°C, por 24 h.

## 4.5 Extração e análise de pectinases por *Pleurotus sajor-caju*

### 4.5.1 Preparo do extrato enzimático

A extração foi realizada com a adição de 1 g do substrato colonizado congelado em 20 ml de tampão acetato 50 mM, pH 5,0. A suspensão foi mantida sob agitação de 150 rpm, a 30 °C, durante 2 horas. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro qualitativo e centrifugadas a 2012 x g por 15 minutos, a 4 °C (MÉLO, 2016). Os sobrenadantes foram congelados para posterior análise da atividade enzimática.

### 4.5.2 Determinação da atividade enzimática da pectinase

A atividade da pectinase seguiu a metodologia descrita por Rodríguez-Fernández *et al.* (2011). Em tubos de ensaio de 20 mL foram adicionados 0,9 mL da solução de pectina cítrica 0,5 % (Sigma) em tampão citrato 0,1 M e pH 4,0, incubado

em banho-maria à 50 °C até sua total diluição. Em seguida, foi adicionada uma alíquota de 0,1 mL do extrato (diluído 1:6) contendo a enzima, agitando-se em vórtex. A reação foi incubada a 50 °C durante 15 min, interrompendo-se a reação com a adição de 2,5 mL de DNS, procedendo-se a determinação dos açúcares redutores liberados pela hidrólise da pectina, de acordo com Miller (1959), usando como padrão o ácido D- galacturônico monoidratado (1 g/L) (Sigma) (0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 g/L).

Com o fim de determinar a concentração de ácido galacturônico total, um branco da amostra contendo tampão citrato 0,1 M (pH 4,0) em substituição à solução de pectina foi submetida ao mesmo procedimento das demais amostras.

Uma amostra substituindo-se o extrato enzimático por água (1 mL) foi considerada o “zero” de absorvância.

A unidade de atividade foi determinada com a quantidade de ácido D- galacturônico liberado por mililitro por minuto ( $\mu\text{mol}/\text{mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) nas condições estabelecidas.

Após a leitura em espectrofotômetro (540 nm) foi elaborado um gráfico de ABS (absorvância) versus concentração (concentração do ácido D-galacturônico), obtendo-se o coeficiente angular (m) e o intercepto da reta (n), considerados na Equação 7.

$$A (U/ml) = ((m * ABS) + n) \left(\frac{V_r}{V_a}\right) \left(\frac{1}{t}\right) d \quad (7)$$

Onde:

ABS: Absorvância da amostra.

m: Coeficiente linear da curva padrão ( $\mu\text{mol}$  de Ac. Galact./mL).

n: Interseção da curva padrão.

V<sub>r</sub>: Volume de reação (1 mL).

V<sub>a</sub>: Alíquota do extrato enzimático (0,1 mL).

t: Tempo de reação (min).

d: Diluição do extrato.

#### 4.5.3 Determinação de pH ótimo

A influência do pH sobre a atividade da pectinase foi determinada para as faixa de pH entre 2 e 8 (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) utilizando tampão McIlvaine – fosfato dissódico/ácido cítrico (ASSUMPÇÃO; MORITA, 1968), em temperatura de 50 °C sendo mantidas as demais condições padrão de análise conforme descrito no item 4.5.2.

#### 4.5.4 Determinação da variação da AE de acordo com a temperatura

A variação da atividade da enzima com a temperatura de incubação foi determinada para a faixa de temperatura entre 30 e 80 °C, em escala crescente de 10 °C, mantendo-se as demais condições padrões de análise conforme descrito no item 4.5.2.

#### 4.5.5 Parâmetros cinéticos

O efeito da concentração de substrato sobre a atividade da pectinase foi avaliado incubando-se a enzima em diferentes concentrações de pectina cítrica (2,0, 6,0, 12,0, 15,0 e 18,0 g/L, correspondendo a 10,30; 30,91; 61,81; 77,26 e 92,72 mM, respectivamente). A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima da reação ( $V_{máx}$ ) foram estimadas conforme procedimento gráfico proposto por Lineweaver e Burk (1934).

Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

## 4.6 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados pelo teste estatístico para rejeição de valores desviantes (Teste Q de Dixon), sendo aceitos ou não (RORABACHER, 1991).

Os demais dados foram, também, submetidos à análise de variância dos valores médios das amostras, através do Teste F, com nível de significância de 5% (ANOVA), utilizando-se o programa Microsoft Office Excel.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização físico-química

Objetivando identificar a composição do resíduo desidratado do suco de cebola (Figura 9), foi realizada a sua caracterização físico-química considerando diversas características desse resíduo que afetam o processo de fermentação em estado sólido, como a umidade, o pH, porosidade e granulometria, como também as que são determinantes na síntese das enzimas, como o percentual de pectina, a relação C:N e os açúcares redutores. Os dados obtidos nas análises físico-químicas estão apresentados na Tabela 4.

**Figura 9** – Resíduo da extração do suco de cebola, desidratado em estufa a 55 °C, por 24 h.



Fonte: A autora

**Tabela 4** - Caracterização físico-química do resíduo do suco de cebola desidratado.

PARÂMETROS ANALISADOS	VALORES ± DESVIO PADRÃO
Umidade (%)	9,41 ± 0,09
Cinzas (%)	1,48 ± 0,04
pH	3,53 ± 0,11
Densidade Aparente (g/cm <sup>3</sup> )	0,11 ± 0,00
Densidade Real (g/cm <sup>3</sup> )	0,84 ± 0,00
Porosidade (cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup> )	0,87 ± 0,00
AR*	36,56 ± 2,30
Pectina (%)	3,25 ± 0,60
Carbono orgânico (%)	95,84
Nitrogênio total (%)	0,36
C:N	266:1

\* g/100 g de resíduo desidratado

#### 5.1.1 Umidade

O resíduo de cebola *in natura* apresentou umidade de 88,86 %, revelando o alto teor de água do material. A umidade do resíduo desidratado (previamente seco em estufa a 55 °C, durante 24 h) foi de 9,41 %. A desidratação dos resíduos da cebola é vantajoso no que se refere à diminuição de peso e volume, favorecendo seu transporte e armazenagem (COHEN; YANG, 1995). Para a realização da fermentação em estado sólido, buscando atender os parâmetros de umidade necessários para o crescimento micelial (>70 %), a mesma foi corrigida através de imersão e posterior drenagem do excesso de água do resíduo desidratado, atingindo 86,73 %.

#### 5.1.2 Cinzas

A cinza de um alimento é definida pelo resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, entre 550 – 570 °C, a qual é transformada em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NO<sub>2</sub>, assim sendo, a cinza de um material é o ponto de partida para a análise de minerais específicos. Estes minerais são analisados tanto para fins nutricionais como também para segurança, pois ao verificar os componentes individuais das cinzas é possível identificar tanto minerais indispensáveis para o

metabolismo, quanto agrotóxicos ou resíduos de processos industriais (CECCHI, 2003).

De acordo com Chang e Miles (2004), minerais, como fósforo, potássio e magnésio são essenciais para o crescimento micelial dos fungos.

O valor de cinzas encontrado neste estudo (1,48 %) ficou abaixo do relatado por Benítez *et al.* (2011b), Bhat (2000) e Jaime *et al.* (2002), sendo 4,6, 3,2 e 3,3 %, respectivamente, em estudos onde analisaram diferentes espécies de cebolas. Porém é o mesmo valor encontrado (1,4 %) por Alexander e Sulebele (1973) na cebola branca. No entanto, devemos considerar que o que está sendo avaliado é o resíduo da extração do suco de cebola e, portanto, parte dos minerais podem ter ficado diluídos no próprio suco.

O teor de cinzas encontrado é semelhante ao de alguns substratos utilizados no cultivo de *Pleurotus* spp., tais como a espiga de milho 1,36 % (NARAIAN *et al.*, 2009) e papel 1,1 – 3,9 % (FERNANDES *et al.*, 2015), e abaixo do encontrado em bagaço de cana-de-açúcar 4,5 – 9 % (AGUILAR-RIVERA *et al.*, 2012; ORTEGA *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2007), polpa de café 8,2 % (MATA; MURRIETA HERNÁNDEZ; IGLESIAS ANDREU, 2005; VELÁZQUEZ-CEDEÑO; MATA; SAVOIE, 2002) e no resíduo de bananeira 11,4 % (BONATTI *et al.*, 2004; GHOSH; MUKHERJEE; NANDI, 1998; REDDY *et al.*, 2003)

### 5.1.3 pH

O substrato avaliado apresentou um valor de pH igual a 3,53, sendo ácido, o que favorece o crescimento fúngico, e é vantajoso para evitar ou minimizar a contaminação bacteriana (GOWTHAMAN; KRISHNA; MOO-YOUNG, 2001). O valor do pH está associado ao nível de ácidos orgânicos presentes na composição da cebola (BREWSTER, 2008). Rodríguez Galdón *et al.* (2008) avaliaram a composição de ácidos orgânicos de cebolas provenientes de diferentes cultivares. Os autores concluíram que existem diferenças significativas entre os cultivares nas concentrações médias de todos os ácidos avaliados. Ácido glutâmico foi o mais abundante ( $325 \pm 133$  mg/100 g), seguido por ácido cítrico ( $48,5 \pm 24,1$  mg/100 g) e ácido málico ( $43,6 \pm 10,4$  mg/100 g).

De acordo com Chang e Miles (2004), o pH de crescimento micelial do gênero *Pleurotus* varia entre 3 e 7,5. Em estudo realizado por Furlan *et al.* (1997), com *P.*

*ostreatus*, pHs entre 5 e 6,4 apresentaram os melhores valores de crescimento micelial. Em outra pesquisa com *P. ostreatus*, o máximo crescimento foi obtido em pH 5,5, apresentando crescimento moderado entre os pH 6,5 e 8,5 (NEELAM; CHENNUPATI; SINGH, 2013).

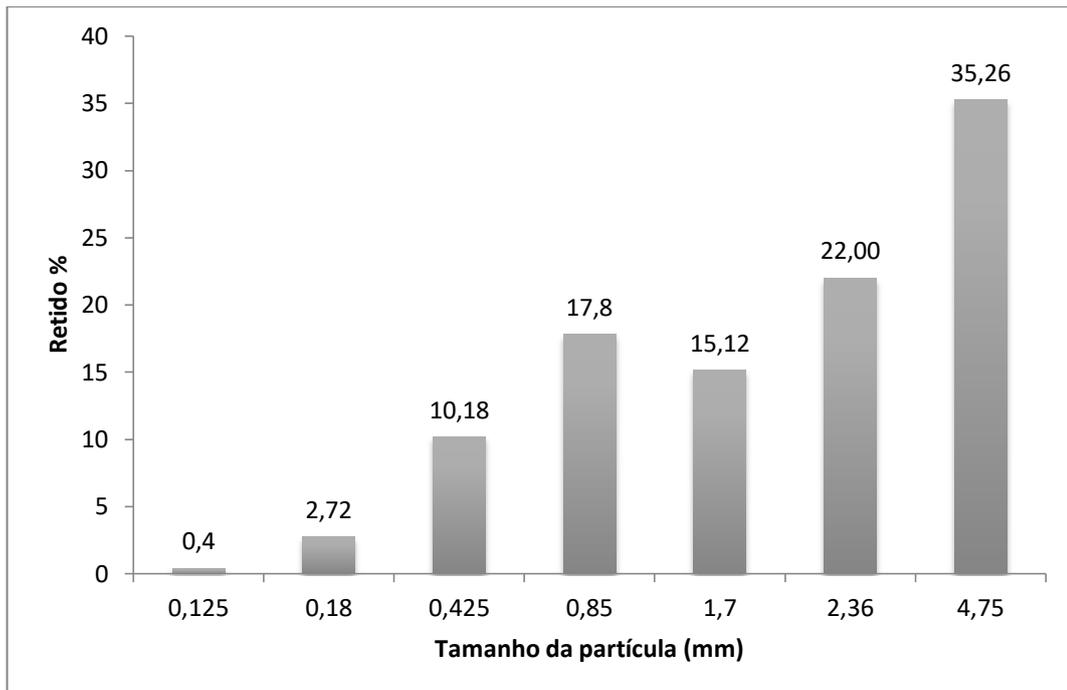
Segundo Gowthaman, Krishna e Moo-Young (2001) na fermentação em estado sólido os valores de pH inicial não permanecem, necessariamente, os mesmos durante todo o processo de fermentação, pois poderá haver variação conforme a fonte de nitrogênio. E Chang e Miles (2004) afirmam que ao longo do processo fermentativo o pH tende a se estabilizar de acordo com a necessidade do micro-organismo.

#### 5.1.4 Porosidade e granulometria

A estrutura do substrato, principalmente o tamanho e a porosidade irão determinar a área superficial acessível ao micro-organismo. Partículas maiores promovem maior espaço interpartículas, embora possuam área superficial menor (PANDEY; SOCCOL; LEON, 2001). As partículas com maior relação entre área e volume apresentam maiores rendimentos, pois as moléculas do substrato tornam-se mais acessíveis as enzimas hidrolíticas responsáveis pelo desenvolvimento do micélio fúngico, em contrapartida, as partículas menores resultam na compactação do substrato, impedindo a troca gasosa (GOWTHAMAN; KRISHNA; MOO-YOUNG, 2001). Desta forma, o perfil granulométrico do resíduo desidratado de cebola foi avaliado quanto ao tamanho das partículas e a porosidade.

A distribuição granulométrica apresentada na Figura 10, mostra a maioria das partículas (>57 %) com tamanhos entre 2,36 mm e 4,75 mm, sendo adequado para o cultivo do gênero *Pleurotus* por meio de fermentação em estado sólido, conforme comprovado no estudo realizado por Alexandrino *et al.* (2007), que utilizaram partículas de 4 mm do resíduo de laranja em cultivo de *P. ostreatus*.

**Figura 10** - Perfil granulométrico do resíduo do suco de cebola desidratado.



#### 5.1.5 Açúcares redutores

Tanto o crescimento celular quanto a produção de pectinases são influenciados pela composição do meio de cultivo, já que este pode conter substâncias que afetam os fenômenos de indução, repressão catabólica e inibição de produção (GALIOTOU-PANAYOTOU *et al.*, 1997). Os carboidratos, fundamentais como fonte de energia para a grande maioria dos micro-organismos, são responsáveis por uma grande parte do peso seco dos bulbos de cebola, incluindo a glicose, frutose, sacarose, e fruto-oligossacarídeos (SHARMA, 2015).

O método mais simples e comum proposto para extrair carboidratos solúveis de material sólido é a extração aquosa sob agitação (WEINMANN, 1947). No entanto, alguns autores também relatam o aumento do rendimento da extração quando esta é assistida por ultrassom (HROMADKOVA; EBRINGEROVA; VALACHOVIC, 1999; VALACHOVIC; PECHOVA; MASON, 2001). Neste trabalho, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos quando os dois métodos para extração dos açúcares do resíduo desidratado de cebola foram utilizados. Este resultado pode ter sido influenciado pelo tamanho das partículas ou pela estrutura do material pouco fibroso. A extração aquosa utilizando agitador magnético rendeu  $9,60 \pm 0,64$  g/L de açúcares redutores, enquanto que a

extração aquosa em banho com ultrassom resultou em  $8,68 \pm 0,24$  g/L. Considerou-se, então, a média entre os dois processos utilizados ( $9,14 \pm 0,63$  g/L), representando  $36,56 \pm 2,30$  g/100 g de resíduo (massa seca). Analisando o bagaço da variedade Recas, Benítez *et al.* (2011b) encontraram o valor de 32,48 % de açúcares totais.

No presente trabalho, a glicose ( $15,96 \pm 3,15$  g/100g de resíduo) e a frutose ( $15,68 \pm 2,95$  g/100g de resíduo) ambos em base seca, foram os únicos açúcares solúveis detectados no extrato. Em estudo realizado por Terry *et al.* (2005), com três espécies de cebolas, foram encontrados a glicose, a frutose e a sacarose, como açúcares presentes, porém em duas espécies a glicose (24,15 e 17,53 %) e a frutose (25,68 e 26,01 %) apresentaram valores bem maiores do que a sacarose (4,62 e 6,52 %) em massa seca.

Os açúcares presentes no meio podem suprir a necessidade para o crescimento dos micro-organismos, sendo a pectina do meio pouco utilizada. Para que haja altas taxas de atividades pectinolíticas, possíveis condições restritivas de concentração de açúcares direcionariam o metabolismo para a quebra da molécula de pectina, de modo que esta pudesse ser consumida (FAWOLE; ODUNFA, 2003).

#### 5.1.6 Pectina

A pectina, expressa em pectato de cálcio, derivada do resíduo da cebola foi estimada por Abdel-Fattah e Edrees (1971), em variedades egípcias, e por Alexander e Sulebele (1973), na cebola branca, encontrando 25 – 34 % e 9,2 %, respectivamente, ambas pesquisas analisaram as peles exteriores secas das variedades pesquisadas. No ano de 2004, O'Donoghue *et al.*, encontraram 5 % de pectina em duas espécies de cebola locais da Nova Zelândia, neste estudo a cebola foi analisada integralmente. Em todas as pesquisas citadas foram encontrados valores de pectina acima do presente estudo (3,25 %). Nos estudos realizados em 1971 (ABDEL-FATTAH; EDREES) e 1973 (ALEXANDER; SULEBELE), foram analisadas duas metodologias de extração, utilizando oxalato de amônia ou ácido clorídrico, sendo que nas duas pesquisas a primeira metodologia apresentou resultados superiores à segunda opção. Nesta pesquisa foi realizada apenas a extração com ácido clorídrico.

### 5.1.7 Relação carbono:nitrogênio

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* crescem em vários resíduos agroindustriais, sendo a madeira o seu habitat natural. A ótima razão entre carbono e nitrogênio varia conforme a espécie. Na natureza, a madeira apresenta-se como fonte de pouco nitrogênio, apresentando razão C:N de 350 a 500:1 (CHANG; MILES, 2004; CHOI, 2004), neste estudo a razão foi de 266:1. O valor de nitrogênio do resíduo desidratado da cebola foi de 0,36 %, semelhante ao resíduo de algodão (0,41 %) e um pouco abaixo da espiga de milho e da palha de trigo, ambas com 0,48 % (CHOI, 2004). Segundo o autor, durante o processo fermentativo o nitrogênio é convertido em amônia, o que causa, em grandes quantidades, a diminuição ou interrupção do crescimento micelial.

Em pesquisa realizada por Silva *et al.* (2007) avaliando o crescimento e produtividade de *P. sajor-caju* em diferentes teores de N, houve inibição total do crescimento micelial em níveis acima de 1,50 % de N. Naraian *et al.* (2009), utilizando *P. florida*, encontrou valores ideais entre 0,5 e 2 % de N.

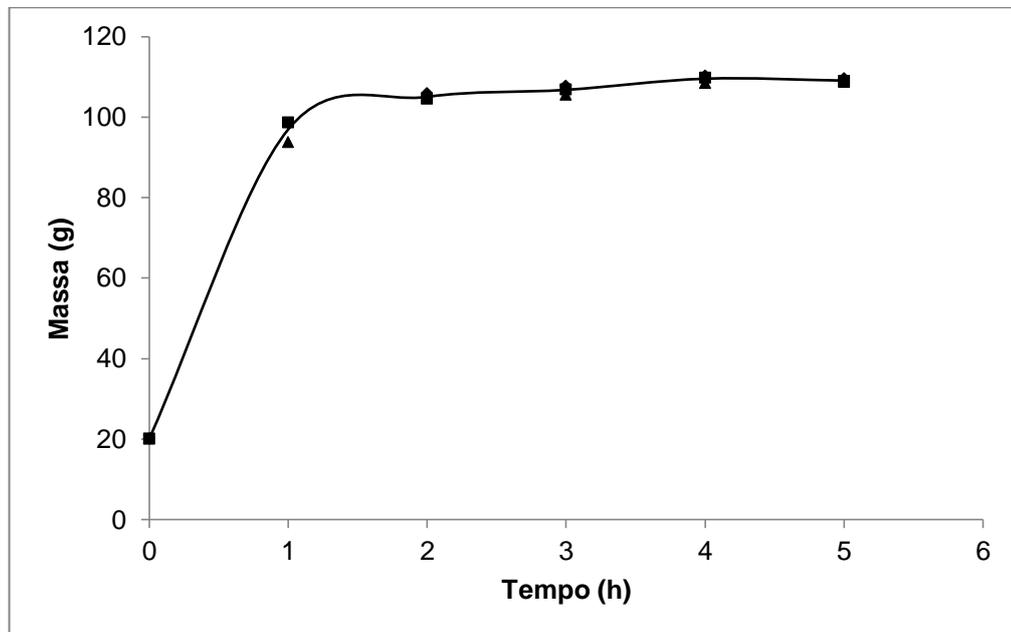
Kurt e Buyukalaca (2010) analisaram o efeito da razão C:N no rendimento de *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*, em palha de trigo (102,1:1), em resíduos de vitivinicultura (75,8:1), palha de arroz (97,6:1) e palha de sésamo (90,1:1), com melhor resultado em palha de arroz. Bernardi *et al.* (2009), avaliaram o cultivo e características nutricionais de *P. ostreatus* e *sajor-caju* em capim-elefante com C:N 162:1. Figueiró e Gracioll (2011) avaliaram a composição química de substratos utilizados no cultivo de *Pleurotus*, como a palha de arroz (44,2), palha de feijão (46,2), palha de trigo (60,1), folha de bananeira (20,2), palha de sorgo (79,3) e sabugo de milho (70,7). Todos os estudos apresentaram uma ampla variação na relação de carbono e nitrogênio entre os substratos, confirmando a capacidade do gênero *Pleurotus* de se desenvolver em razões variadas de C:N.

As características físico-químicas do resíduo do suco de cebola determinadas neste trabalho mostraram que este resíduo é adequado para utilização como substrato em FES. Sendo assim, a próxima etapa foi a avaliação do uso deste resíduo para o crescimento de *P. sajor-caju*.

## 5.2 Avaliação do crescimento micelial de *Pleurotus sajor-caju* em resíduo de suco de cebola

Foi analisada a velocidade de crescimento micelial de *P.sajor-caju* em três condições diferentes do resíduo de cebola: *in natura* (IN), desidratado com imersão em água (DIA) e desidratado com adição de água (DAA). Esta análise teve o objetivo de avaliar qual a melhor forma de preparo de resíduo do suco de cebola para o crescimento micelial de *P. sajor-caju*. Para o preparo do substrato DIA, foi determinado o tempo de imersão em água do substrato desidratado necessário para este atingir massa constante. Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que após 2 horas de imersão, o resíduo umedecido permanece com massa constante, sendo este determinado como tempo ideal de imersão do resíduo desidratado.

**Figura 11** - Cinética de absorção de água pelo resíduo de cebola seco.



Dentre os diversos fatores influenciadores do crescimento micelial, a umidade é extremamente relevante (CHANG; MILES, 2004; ZADRAZIL; BRUNNERT, 1981). Neste estudo, apesar da quantidade de água adicionada ter sido calculada para alcançar os 70 % de umidade, a mesma pode não ter sido totalmente absorvida, não levando ao teor de umidade suficiente para o crescimento do micélio fúngico.

Sendo assim, na condição DAA não houve crescimento micelial, conforme pode ser observado na Figura 12.

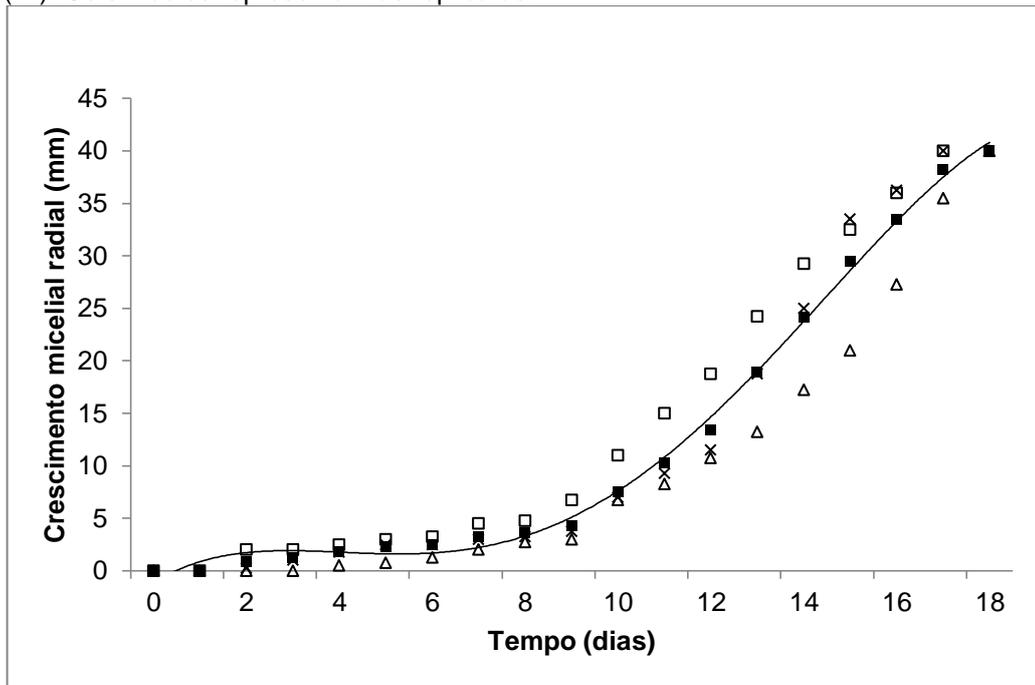
**Figura 12** - Placa de Petri contendo resíduo desidratado de cebola adicionado de água (DAA) até umidade de 70 %.



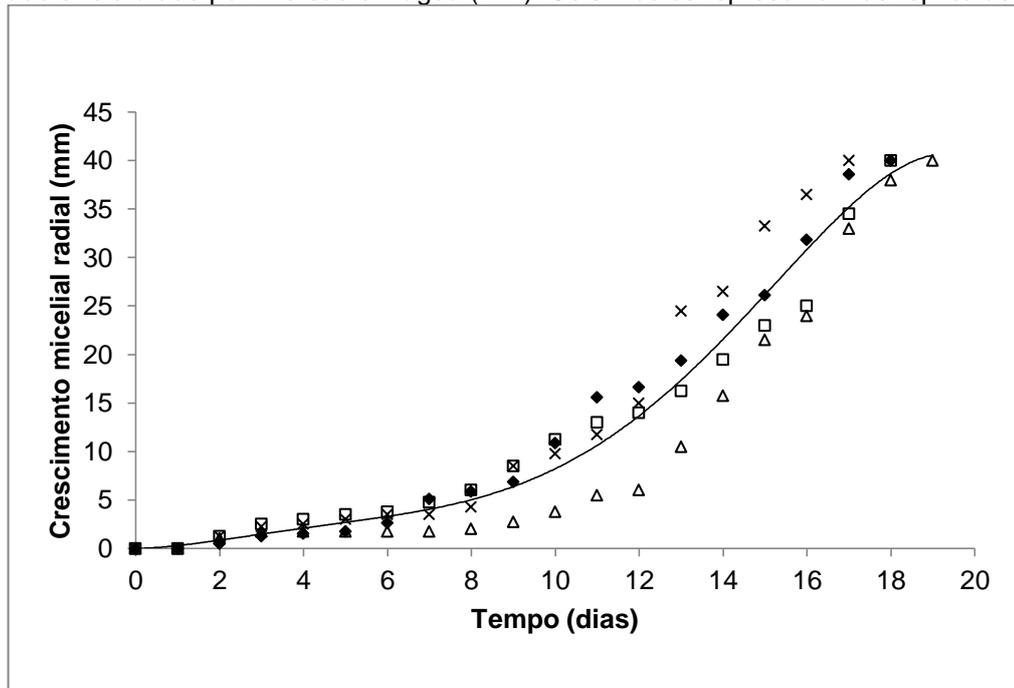
Fonte: A autora

O micélio de *P. sajor-caju* nas placas contendo substrato IN e DIA apresentou desenvolvimento uniforme, com velocidades médias globais de crescimento micelial radial de  $2,29 \pm 0,08$  e  $2,23 \pm 0,10$  mm/dia, respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa entre elas. As Figuras 13 e 14 apresentam a cinética de crescimento micelial radial de *P. sajor-caju* em resíduo de cebola *in natura* (IN) e em resíduo de cebola desidratado e reidratado por imersão (DIA), respectivamente. O teste de variância (ANOVA) entre as placas contendo os substratos IN e DIA demonstrou que não houve diferença significativa no crescimento micelial, ao nível de 95% de confiabilidade, entre os substratos.

**Figura 13** - Cinética de crescimento micelial radial de *P. sajor-caju* em resíduo de suco cebola *in natura* (IN). Os símbolos representam as replicatas.



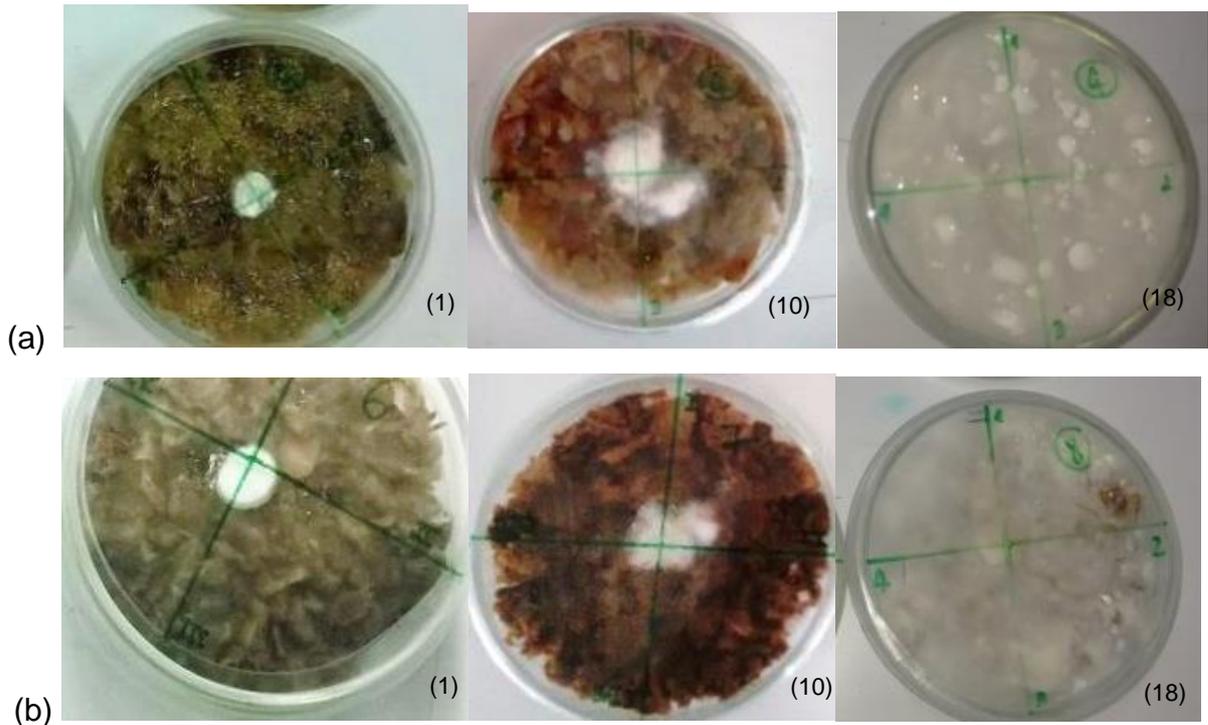
**Figura 14** - Cinética de crescimento micelial radial de *P. sajor-caju* em resíduo de suco cebola desidratado e reidratado por imersão em água (DIA). Os símbolos representam as replicatas.



Os valores encontrados neste estudo são menores do que apontam a maioria das pesquisas realizadas. Albuquerque, Peil e Nascimento (2012) avaliaram o crescimento de *P. sajor-caju* em extratos preparados com ágar dextrose e cascas de arroz, amendoim e semente de mamona, com resultados de 10,68, 12,30 e 7,66 mm/dia, respectivamente. Sales-Campos *et al.* (2011) obtiveram o valor de 11,57 mm/dia (*P. ostreatus*) em meio contendo serragem, dextrose, ágar e extrato de semente de açaí. Wisbeck *et al.* (2016), utilizando folhas de pupunheira obtiveram o valor de 6,20 mm/dia. Resultado semelhante ao deste estudo foi encontrado em pesquisa realizada com casca de banana (2,39 mm/dia) e maracujá (1,53 mm/dia), também utilizando apenas o substrato bruto para avaliação do crescimento do gênero *Pleurotus* spp. (RIVAS *et al.*, 2010).

Na Figura 15 é possível observar a evolução da colonização micelial no 1º, 10º e 18º dia no substrato *in natura* e no substrato desidratado com imersão em água, respectivamente. Ambas as condições apresentaram um crescimento micelial lento até o 10º dia, com média de 0,82 mm/dia, com significativo aumento de velocidade (3,73 mm/dia) após este período, apresentando colonização completa em 17 (IN) e 18 (DIA) dias. Além da característica fase “lag” de crescimento, na qual ocorre a adaptação do micro-organismo ao substrato, a velocidade de crescimento inicial também pode ter sido influenciada pelo pH do resíduo, pois de acordo com Furlan *et al.* (1997) e Sardar *et al.* (2015), que avaliaram os efeitos do pH no crescimento micelial de *Pleurotus* spp., o pH 4 apresenta característica inibitória de crescimento. Porém, no decorrer da colonização, é provável que o fungo tenha alterado o pH do meio, por meio da produção de metabólitos, de acordo com a sua necessidade, confirmando a afirmação de Chang e Miles (2004). Desta forma, o resíduo do suco de cebola demonstrou ser adequado para o cultivo do fungo *P. sajor-caju*.

**Figura 15** - Crescimento micelial nos dias 1, 10 e 18, em resíduo de cebola *in natura* (a) e em resíduo de cebola desidratada com imersão em água (b).



Fonte: A autora

### 5.3 Produção de corpos frutíferos de *Pleurotus sajor-caju* em resíduo de suco de cebola

Tendo em vista que não houve diferença estatisticamente significativa na velocidade de crescimento micelial radial observada nos substratos IN e DIA, ambos foram utilizados para avaliação da produção de corpos frutíferos de *P. sajor-caju*. Os pacotes contendo os substratos IN e DIA foram inoculados com 10 % (massa seca) de Spawn e mantidos durante 14 e 10 dias, respectivamente, em estufa a 30 °C antes de serem transferidos para a câmara de frutificação. Os pacotes contendo o substrato IN, após a esterilização, com valor de 88,86 % de umidade, apresentaram acúmulo de líquido no fundo dos pacotes, impedindo a troca gasosa necessária para o desenvolvimento fúngico e aumentando o risco de contaminação (GOWTHAMAN; KRISHNA; MOO-YOUNG, 2001), não apresentando colonização completa do substrato, com presença de micélio somente na superfície do substrato. Desta forma, com a intenção de tentar eliminar o excesso de água, os sacos foram perfurados com estilete e seu desenvolvimento foi acompanhado. Após o período de

7 dias não houve crescimento micelial e todos os pacotes apresentaram contaminação, conforme apresentado na Figura 16.

Além dos fatores nutricionais, é preciso que os fatores ambientais apresentem condições adequadas, como a temperatura, iluminação, umidade, pH e aeração, tanto para o desenvolvimento do micélio quanto para a frutificação (CHANG; MILES, 2004).

**Figura 16** - Pacotes com resíduo de suco de cebola na forma *in natura* em câmara de frutificação (a) e contaminação do substrato após 7 dias (b).



Fonte: A autora

Considerando que o excesso de umidade do substrato IN prejudicou o desenvolvimento micelial adequado do fungo, foi realizado um novo experimento, no qual utilizou-se uma mistura 1:1 de palha de folhas de bananeira desidratadas e reidratadas por imersão em água com o substrato IN. Este novo substrato foi chamado de INB. O objetivo deste experimento foi tentar diminuir parte do excesso de água gerado no substrato IN pela absorção desta pelas folhas de bananeira. No entanto, no pacote contendo INB também houve acúmulo de líquido, não havendo desenvolvimento micelial adequado (Figura 17), sendo que após 15 dias de incubação, o substrato INB foi esterilizado e descartado.

**Figura 17** - Pacote com substrato de resíduo de cebola *in natura* (IN) e folhas secas de bananeira desidratadas e reidratadas por imersão em água (INB) (m/m).



Fonte: A autora

Os pacotes contendo o resíduo de suco de cebola desidratado e reidratado por imersão (DIA) apresentaram os primeiros primórdios após 3 dias de incubação na câmara de frutificação e ponto de colheita do 5° ao 7° dia, totalizando um período de 19 dias entre a inoculação e a colheita. Rangunathan *et al.* (1996) obtiveram o aparecimento dos primórdios no 22° dia em turfa de coco, e no 21° dia em fibra de coco em *P. sajor-caju* (RAGUNATHAN; SWAMINATHAN, 2003). Rettore, Giovanni e Paz (2011), utilizando bagaço de uva Isabel, obtiveram os primórdios entre 30 e 40 dias. Resultado semelhante foi encontrado por Pokhrel *et al.* (2013) com 29 dias em talo de milho, 30 dias em resíduo de ervilha e 36 dias em folha de bananeira, todos suplementados com farelo de arroz.

Os pacotes com primórdios e corpos frutíferos em ponto de colheita estão apresentados na Figura 18.

**Figura 18** – Primórdios (a) e corpos frutíferos (b) de *P. sajor-caju* em pacotes contendo o substrato DIA.



Fonte: A autora

O cultivo de corpos frutíferos desenvolvidos em DIA apresentou Rendimento (R %) de  $45,73 \% \pm 10,12$  e Eficiência Biológica (EB %) de  $4,66 \% \pm 1,40$ . Deve-se considerar que estes valores foram obtidos no substrato bruto, sem adição ou suplementação de quaisquer componentes, e do primeiro fluxo de produção. Resultados semelhantes foram encontrados com bagaço de uva Isabel (R de 64,21 % e EB de 4,80 %) (RETTORE; GIOVANNI; PAZ, 2011) e em palha de trigo (R de 48,2 % e EB de 4,82 %) (KURT; BUYUKALACA, 2010), ambos calculados com um fluxo de produção e sem suplementação ou correção. Os resultados foram superiores em relação ao rendimento e eficiência biológica dos experimentos realizados por Ragunathan e Swaminathan (2003), com palha de sorgo (R=36,84 % e EB=3,67 %), fibra de coco (R=27,33 % e EB=2,42 %) e haste de algodão (R=41,42 % e EB=2,86 %) após 4 fluxos de produção e ficaram abaixo dos valores apresentados por Kurt e Buyukalaca (2010), obtidos do primeiro fluxo e sem suplementação, em palha de arroz, de gergelim e resíduos de vitivinicultura, com R de 74,7 %, 66,2 % e 70,4 % e EB de 7,47 %, 6,62 % e 7,04 %, respectivamente e Schulz *et al.* (2013) em folhas de pupunheira com 5 % de farelo de arroz (R de 55,30 % e EB de 4,70 %). Este trabalho também resultou em resultados inferiores aos obtidos em palha de arroz por Furlan *et al.* (2000) adicionado de 10 % de nitrato de amônio, calculados após 2 ou 3 fluxos produtivos e de Zhang, Li e Fadel (2002) com o mesmo substrato moído, porém sem adições e obtido de 2 fluxos, com valores de R de 83,0 % e 101,8 % e EB 9,80 % e 20,36 %, respectivamente. Mandeel, Al-Laith e Mohamed (2005) utilizaram resíduos de papel, papelão, fibras de plantas e

serragem branca, sendo todos os substratos adicionados de estrume de galinha (5:1), 5 g de aveia seca e 2 % de  $\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$  para estabilização de pH. Os resultados foram calculados após 2 ou 3 fluxos de produção, apresentando R entre 47 e 78,4 % e EB entre 5,28 e 8,31 %. Todos os estudos citados utilizaram *P. sajor-caju*.

#### 5.4 Produção de pectinases por *Pleurotus sajor-caju*

Utilizando o substrato após congelamento, obteve-se atividade enzimática da pectinase de 4,82 U/mL, valor superior ao encontrado por Alexandrino *et al.* (2007) em resíduo de laranja (1 % de pectina em tampão citrato 50 mM e pH 5.5) para *P. ostreatus*, onde não foi detectada nenhuma atividade de pectinase, apesar da alta quantidade de pectina da laranja (22 %). Os autores justificaram que a metodologia utilizada, com análise de açúcares redutores, não é adequada para as enzimas pectina liase e pectina-esterase. Porém, com o mesmo resíduo e metodologia, mas com *P. pulmonarius*, Inácio *et al.* (2015) encontraram uma AE de 9,4 U/mL, valor acima do encontrado no presente estudo. *P. pulmonarius* também foi utilizado em fermentação submersa, com glicose como substrato, produzindo pectinase com AE de 0,7 U/mL (DÍAZ-GODÍNEZ *et al.*, 2016). Atividade semelhante foi encontrada por Malayil e Chanakya (2016) em palha de arroz (1,0 U/mL) utilizando *P. florida*. O valor encontrado nesta pesquisa foi semelhante às atividades enzimáticas obtidas em resíduos de tronco de sisal com esterco de vaca (3,31 U/mL) com *P. HK-37* (RAYMOND; MSHANDETE; KIVAISI, 2015) e em bagaço de tomate (2,18 U/mL) com *P. ostreatus* (FREIXO; KARMALI; ARTEIRO, 2008). As diferenças entre os micro-organismos, as metodologias de determinação da atividade de pectinase, a condução do processo de cultivo (líquido ou sólido), bem como o número de fluxos ou a fase do desenvolvimento do fungo em que houve a extração da enzima, dificultam a comparação dos resultados, porém permitem sugerir ordem de grandeza semelhante entre os valores encontrados pelos demais autores e este trabalho concluir que o resíduo de cebola apresenta-se como uma fonte promissora para extração de pectinase.

## 5.5 Caracterização da enzima pectinase

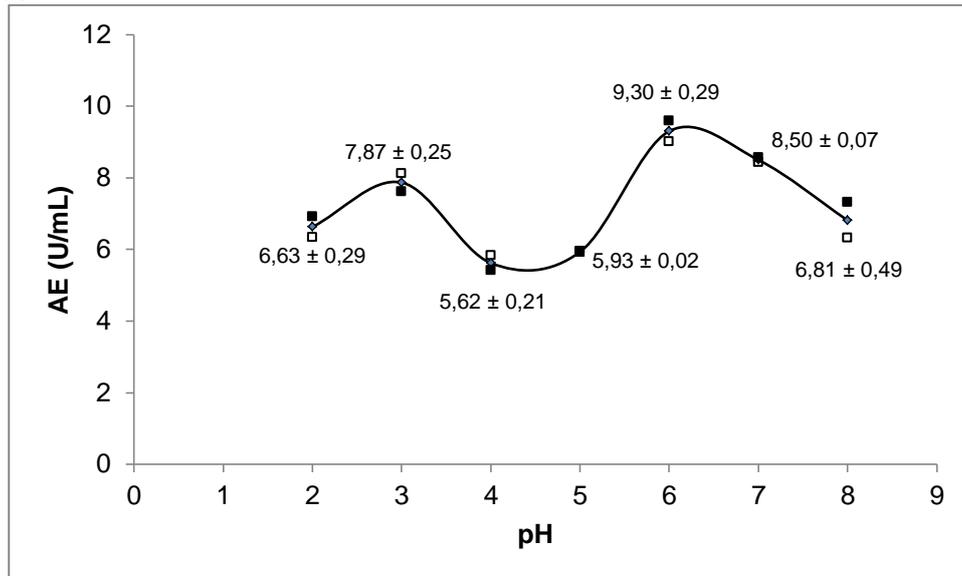
As enzimas são proteínas que apresentam uma estrutura tridimensional característica e podem sofrer desnaturação e conseqüente perda de atividade biológica ao serem submetidas a temperaturas elevadas e a valores extremos de pH. Porém, cada enzima exibe uma atividade máxima em determinados valores de temperatura e pH, os quais são denominados por temperatura ótima e pH ótimo (YUDKIN, 1953).

### 5.5.1 Determinação de pH ótimo

Devido ao fato da enzima possuir vários grupos ionizáveis, mudanças no pH afetam o sítio catalítico e a conformação da enzima. Em geral, enzimas são ativadas numa faixa limitada de pH e para cada enzima existe um ótimo ou uma faixa ótima de atuação (BAILEY; OLLIS, 1986).

Neste estudo a enzima apresentou dois picos de pH ótimo, em 3,0 e 6,0 (Figura 19), com atividades de  $7,87 \pm 0,25$  U/mL e  $9,30 \pm 0,29$  U/mL. Segundo Yudkin (1953), quando ocorre a presença de dois picos em um experimento, suspeita-se que existem duas enzimas envolvidas. Xavier-Santos *et al.* (2004) analisando a atividade de poligalacturonase em fungos basidiomicetos, com extrato bruto, também encontraram dois picos de pH, um ácido (3,5 – 4,5) e outro alcalino (8,5 – 9,5), concluindo que poderiam haver outras enzimas que libertaram açúcar redutor da pectina.

**Figura 19** - Variação da atividade enzimática da pectinase produzida por *P. sajor-caju* conforme o pH. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão. Os símbolos ■ e □ representam os valores das replicatas.



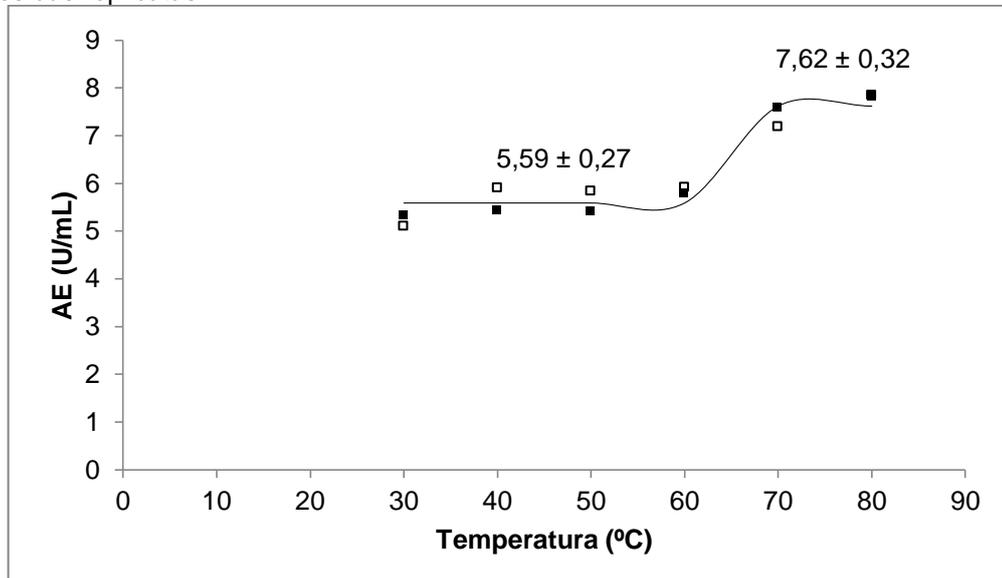
Gomes *et al.* (2012), ao caracterizarem bioquimicamente as pectinases, em relação ao pH ótimo, produzidas por *Aspergillus phoenicis*, a pectina esterase apresentou maior atividade em pH 4,0, a pectina liase em pH 8,0, a endopoligalacturonase foi estável em pH 7,0 e a poligalacturonase mostrou dois picos, em 4,0 e 8,0. Em *A. nigger*, a maior atividade da pectinase foi em pH 6,0 (OYELEKE *et al.*, 2012). Rashad *et al.* (2010) analisaram a atividade da poligalacturonase de *P. ostreatus*, com pH ótimo em 3,5, porém, Freixo, Karmali e Arteiro (2008), com o mesmo fungo, determinaram o pH ótimo em 7,0 para a mesma enzima. Valor intermediário foi demonstrado por Zheng e Shetty (2000), com poligalacturonase obtida de *L. edodes*, com pH ótimo em 5,0, porém com uma ampla tolerância ao pH mais ácido (3,0 – 6,0). Os estudos citados sugerem que as pectinases apresentam parâmetros diferentes conforme o seu tipo, o micro-organismo e o substrato utilizado na sua produção.

#### 5.5.2 Determinação da atividade enzimática em relação à variação de temperatura

A análise de determinação da temperatura ótima mostrou uma enzima com capacidade para atuar em alta temperatura. Os resultados de atividade enzimática nas temperaturas entre 30 e 60 °C, não demonstraram variação mantendo-se constante em  $5,59 \pm 0,27$  U/mL, observando-se um aumento a partir de 60 °C,

chegando a  $7,62 \pm 0,32$  U/mL de AE em 80 °C (Figura 20). As enzimas que possuem a característica de estabilidade em relação a altas temperaturas são conhecidas como termoestáveis ou termoenzimas (GOMES *et al.*, 2007).

**Figura 20** - Variação da atividade enzimática da pectinase produzida por *P. sajor-caju* de acordo com a temperatura. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão. Os símbolos ■ e □ representam os valores das replicatas.



Além de apresentarem maior estabilidade à temperatura, as enzimas termoestáveis são geralmente mais resistentes a agentes detergentes e às enzimas proteolíticas e estáveis em amplas faixas de pH, podendo ser usadas em diferentes tipos de processos (BRUINS *et al.*, 2001).

Geralmente, as enzimas termoestáveis são originadas de micro-organismos termofílicos, tais como as poligalacturonases obtidas de *Aspergillus fumigatus* com temperatura ótima em 60 °C (PHUTELA *et al.*, 2005), *Thermoascus aurantiacus* com 65 °C (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000) e 70°C (MARTINS *et al.*, 2002) e *Thermomyces lanuginosus* com 60°C (SATHISH-KUMAR; PALANIVELU, 1999). Porém, recentemente, foi encontrada uma pectinase termoestável (50 a 70 °C) e alcalina (pH 8,2) de *A. nigger*, conhecido como um fungo mesofílico (KHATRI *et al.*, 2015). Não foi encontrada nenhuma pesquisa apontando a produção de pectinase termoestável originada especificamente de fungos do gênero *Pleurotus* ou outros basidiomicetos.

Estas enzimas são muito vantajosas em processos industriais, pois de acordo com Gomes *et al.*, (2007) a utilização de temperaturas mais elevadas reduzem o risco de contaminação, bem como, favorecem a solubilidade de substratos e produtos, reduzindo o tempo e custo dos processos, como na produção de sucos e vinhos, onde o tratamento térmico é amplamente utilizado, sendo necessária posterior refrigeração para tratamento com as pectinases comerciais.

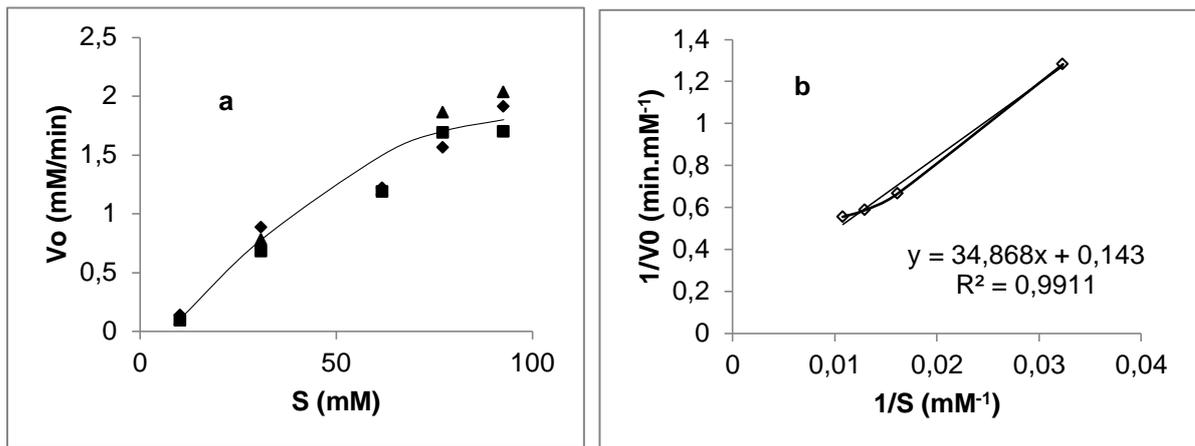
As características que determinam a termoestabilidade das enzimas ainda não foi totalmente esclarecido. Os estudos apontam alguns fatores intrínsecos ou diretamente associados à estrutura da molécula, principalmente o efeito hidrofóbico causado por alguns aminoácidos, e fatores extrínsecos, que ajudam na estabilização das proteínas em um determinado meio, como alguns solutos, ligantes, chaperonas moleculares e o próprio substrato (BRUINS, 2016; SINGH *et al.*, 2012; YOU *et al.*, 2010).

### 5.5.3 Parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  são de grande importância na área biotecnológica, pois é por meio destes que se avalia a velocidade de transformação do complexo enzima-substrato ( $V_{m\acute{a}x}$ ) e a afinidade da enzima pelo substrato ( $K_m$ ). Quanto menor o  $K_m$ , maior a afinidade da enzima pelo substrato e a velocidade da reação também será maior (SEGEL, 1979).

A Figura 21a mostra que a enzima segue a cinética Michaeliana. Os parâmetros cinéticos da enzima ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ) foram obtidos por meio da linearização da curva apresentada na Figura 21a utilizando-se o método de Lineweaver & Burk, que forneceu a equação da reta  $y = 34,868x + 0,143$  ( $R^2 = 0,9911$ ) (Figura 21b). A partir da equação da reta, obteve-se  $V_{m\acute{a}x}$  igual a 6,99 mM/min e  $K_m$  igual a 243,83 mM (47,34 mg/mL).

**Figura 21** - Variação da AE da pectinase produzida por *P. sajour-caju* com a concentração de substrato (a) e linearização da curva apresentada na Figura 21a utilizando-se o método de Lineweaver & Burk (b). Os símbolos na Figura 21 (a) representam as replicatas.



Os valores obtidos neste estudo ficaram bem acima dos estudos realizados com *P. ostreatus*. Freixo, Karmali e Arteiro (2008) observaram os parâmetros cinéticos da enzima purificada, utilizando concentrações de 0 - 10 g/L de ácido poligalacturônico como substrato, obtendo  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  de 13,23 mg/mL e 5530,8 UI/mg. Rashad *et al.* (2010) avaliaram  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da poligalacturonase purificada, com concentrações de pectina cítrica variando de 0,25 a 3% como substrato, obtendo 1,33 mg/mL e 28,6  $\mu$ M/min, respectivamente.

A diferença entre estes parâmetros, obtidos por cada autor, pode ser explicada pelas diferenças nas composições dos meios de cultivo, do substrato utilizado, das condições de cultivo, bem como da pureza da enzima avaliada. Desta forma, diferentes isoenzimas são produzidas por cada fungo, assim como compostos inibidores da atividade de pectinase.

## 6 CONCLUSÃO

Várias estratégias têm sido pesquisadas para utilizar resíduos agroindustriais, como os gerados pelo processamento da cebola. Com a realização deste trabalho foi possível confirmar a viabilidade do uso do resíduo do suco de cebola para o cultivo de corpos frutíferos e produção de pectinases por *P. sajor-caju*.

Por meio da caracterização físico-química do resíduo do suco de cebola foi possível determinar diversos parâmetros importantes para o processo de fermentação em estado sólido e para a produção de pectinases, comprovando a adequação deste resíduo como substrato para o processo fermentativo em estado sólido, com valores de açúcares redutores de 36,56 g/100g de substrato, na forma de açúcares solúveis como a glicose e frutose, com o pH ácido (3,53), tamanho de partículas entre 2,36 e 4,75  $\mu$ m e quantidade de pectina em torno de 3,25 %, compatíveis com aqueles desejáveis para a FES e produção de pectinases.

A quantificação da velocidade do crescimento micelial radial demonstrou resultados semelhantes tanto no substrato na forma *in natura* (2,29 mm/dia), quanto desidratado e reidratado em imersão em água (2,23 mm/dia), porém durante o cultivo utilizando a técnica Jun-Cao, o substrato *in natura* apresentou acúmulo de líquido, com crescimento micelial superficial e sem a produção de corpos frutíferos, tornando inviável sua utilização. O substrato desidratado e reidratado em imersão apresentou rápido crescimento micelial, com o primeiro fluxo de corpos frutíferos em 19 dias e com promissores valores de rendimento (45,73 %  $\pm$  10,12) e eficiência biológica (4,66 %  $\pm$  1,40).

A pectinase obtida a partir do substrato residual do cultivo apresentou atividade enzimática de 4,82 U/mL e uma interessante característica termoestável (AE ótima em 80 °C), característica esta, de grande interesse para a indústria. Porém o aparecimento de dois picos de pH ótimo (3,0 e 6,0) e baixa afinidade da enzima pelo substrato, devido ao valor de  $K_m$  (243,83 mM) sugere a presença de várias pectinases e necessidade de purificação da enzima para obtenção de resultados mais específicos.

Os resultados deste estudo fornecem importantes informações para futuras aplicações do resíduo de cebola como substrato para produção de fungos comestíveis e produção de enzimas, já que os bons resultados foram obtidos na sua forma bruta, sem correção de parâmetros ou adição de suplementos. Sendo assim,

como perspectivas de continuidade deste trabalho, podemos propor avaliar diferentes razões de carbono:nitrogênio, bem como de pH do substrato, além da produção de outras enzimas. Também sugerimos a avaliação dos corpos frutíferos produzidos, quanto ao seu valor nutricional e características organolépticas, devido às características marcantes do resíduo de cebola.

Esta pesquisa oferece uma alternativa para o uso do resíduo de cebola, gerando um valor agregado ao produto e contribuindo para uma possível redução do impacto ao meio ambiente causado pelo seu descarte inadequado, além de prevenir consequentes prejuízos à saúde.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A.F.; ENDREES, M. Chemical investigations on some constituents of pigmented onion skins. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.22, n. 298, 1971.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181: Solo - Análise Granulométrica**, 1984.
- AGUILAR-RIVERA, N.; MORAN, A. C.; LAGUNES, A. D. R.; GONZALEZ, J. M. Production of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) grown on sugar cane biomass (trash, bagasse and pith). In: ANDRES S.; BAUMANN N. (Eds.), **Mushrooms: Types, properties and nutrition**. Nova Science Publishers Inc., 2012. p. 77 – 103.
- ALBUQUERQUE, M. P. DE; PEIL, R. M. N.; NASCIMENTO, J. S. DO. Crescimento micelial de *Lentinus sajor caju* (Fr.) Fr. e *Pleurotus* spp. em diferentes resíduos agrícolas. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 895–902, 2012.
- ALEXANDER, M. M.; SULEBELE, G. A. Pectic substances in onion and garlic skins. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 24, p. 611–615, 1973.
- ALEXANDRINO, A. M. *et al.* Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 27, n. 2, p. 364–368, 2007.
- ANTC. ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE COGUMELOS. **Cogumelos**, 2013. Disponível em: <http://www.anpccogumelos.org/cogumelos>. Acesso em: dez. 2016.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC-276, de 22/09/05: dispõe sobre regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Brasília: Editora MS, p. 1017, 2005.
- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official methods of analysis**. 16 ed., Washington, DC, 1995.
- ASADA, C. *et al.* Characterization of the steam-exploded spent Shiitake mushroom medium and its efficient conversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10052–10056, 2011.
- ASSUMPÇÃO, R.M.; MORITA, T. **Manual de soluções**. São Paulo: Edgard Blucher, 627p, 1968
- BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F., **Biochemical Engineering Fundamentals**. Mc Graw Hill Intl Editions, ed. 2, 1986. 928 p.
- BENÍTEZ, V. *et al.* Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.):

dietary fibre and bioactive compounds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 48–57, 2011a.

BENÍTEZ, V. *et al.* Effect of sterilisation on dietary fibre and physicochemical properties of onion by-products. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 501–507, 2011b.

BERNARDI, E. *et al.* Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado. **Bragantia**, v. 68, n. 4, p. 901–907, 2009.

BEZERRA, F. *et al.* Qualidade de cebola minimamente processada. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 1, n. 1, p. 13–18, 2011.

BHARGAV, S. *et al.* **Solid-state Fermentation : An Overview**. v. 22, n. 1, p. 49–70, 2008.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355–383, 2000.

BHAT, N. R.; DESAI, B. B.; SULEIMAN, M. K. Flavors in onion: characterization and commercial applications. In: **Handbook of Fruit and Vegetable Flavors**.. John Wiley & Sons, Inc: 2010. Cap.44, p. 849–872.

BISARIA, R.; MADAN, M.; BISARIA, V. S. Biological efficiency and nutritive value of *Pleurotus sajor-caju* cultivated on different agro-wastes. **Biological Wastes**, v. 19, n. 4, p. 239–255, 1987.

BLANDINO, A. *et al.* Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 497–503, 2001.

BOEING, G. **Fatores que afetam a qualidade da cebola na agricultura familiar catarinense**. Florianópolis: Instituto CEPA/SC, 2002. 88 p.

BOITEUX, L.S.; MELO, P.C.T. **Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L.)**. In: Taxonomia e origem. volume 5, Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. 2004. Versão eletrônica. Disponível em:  
[http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas\\_producao/cultivo\\_da\\_cebola/taxonomia\\_e\\_origem.htm](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/taxonomia_e_origem.htm). Acesso: 5 jun. 2016

BONATTI, M. *et al.* Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 425–428, 2004.

BORGES, D.N.A.F., **Reino Fungi**. Escola educação (página da web). Disponível em: <http://escolaeducacao.com.br/reino-fungi/>. Acesso em: out. 2016

BOTREL, N.; OLIVEIRA, V. Cultivares de cebola e alho para processamento. **Horticultura Brasileira** 30, v. 30, n. 2, p. 8420–8434, 2012.

BRAGA, G.C.; EIRA, A.F.; CELSO, P.G.; COLAUTO, N.B.. **Manual de cultivo de *Agaricus brasiliensis* Murril "Cogumelo do sol"**. Botucatu: FEPAF – UNESP, 1998.

- BREWSTER, J. L. **Onion and other vegetable alliums**. 2. ed. London: CAB International, 2008.
- BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-189, 2001
- CARVALHO, P.G.B.; MACHADO, C.M.M. **Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L.)**. In: Série características nutricionais e funcionais, volume 5, Embrapa Hortaliças, Brasília- DF. Versão eletrônica ([www.cnph.embrapa.br](http://www.cnph.embrapa.br)), dezembro, 2004.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45–50, 2000.
- CEASA MINAS. **Agroqualidade da cebola**. Disponível em: <http://www.ceasaminas.com.br/agroqualidadecebola.asp>. Acesso em: 2 set. 2016
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 2003.
- CENCI, S. A. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças. Tecnologia, qualidade e sistemas de embalagem**. 1 ed. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011. 144 p.
- CHANG, S.T., LAU, O.W., CHO, K.Y. The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. **European Journal Microbiology Biotechnology**, v.12, p. 58-62, 1981.
- CHANG, S.T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2. ed. CRC Press LLC, 2004.
- CHOI, I. S. *et al.* Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar. **Food Chemistry**, v. 188, p. 537–542, 2015.
- CHOI, K. W. Shelf cultivation of Oyster mushroom - with emphasis on substrate fermentation. In: **Mushroom Growers' Handbook**. 2004. Cap.7, p. 153–165.
- COGORNÍ, P. F. B. O. *et al.* The production of *Pleurotus sajor-caju* in peach palm leaves (*Bactris gasipaes*) and evaluation of its use to enrich wheat flour. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n. 2, p. 267–274, 2014.
- COHEN, J. S.; YANG, T. C. S. Progress in food dehydration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 1, p. 20–25, 1995.
- CÓRDOVA JUÁREZ, R. A. *et al.* Use of spent substrate after *Pleurotus pulmonarius* cultivation for the treatment of chlorothalonil containing wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 3, p. 948–952, 2011.
- CORREA, J. P. **Efeito do pré-tratamento térmico e enzimático da cebola sobre a extração de suco e influência da temperatura e pressão sobre a concentração do produto**. Dissertação [Mestrado]. Universidade da Região de Joinville, 2016.

CORRÊA, R. C. G. *et al.* Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 103–117, 2016.

DALONSO, N. *et al.* Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2265–2274, 2010.

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

DÍAZ-GODÍNEZ, G. *et al.* Enzymatic, antioxidant, antimicrobial, and insecticidal activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* grown separately in an airlift reactor. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 4186–4200, 2016.

DREAMSTIME. **Cogumelos *Pleurotus sajor-caju*** (Imagem da web). Disponível em: <https://www.dreamstime.com/photos-images/sajor.htm>. Acesso em: set. 2016

DUPRAT, L. A.; CONTE, A. C. **Relatório de avaliação dos impactos das tecnologias geradas pela Embrapa**. 1. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

EIRA, A.F.; MINHONI, M.T.A. **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis**. 2.ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 115 p., 1997.

FACCHINI, J. M. *et al.* Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 72–77, 2014.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, p.223-227, 2003

FERNANDES, Â. *et al.* Nutritional characterisation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) *P. Kumm.* produced using paper scraps as substrate. **Food Chemistry**, v. 169, p. 396–400, 2015.

FIEDUREK, J.; ILCZUK, Z.; LOBARZEWSKI, J. Influence of the mycelium growth-conditions on the production of amyolytic, proteolytic and pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Acta Biotechnologica**, v. 9, n. 4, p. 355–361, 1989.

FIGUEIRÓ, G. G.; GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 924–930, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAOSTAT** (2013). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em set. 2016

FREIXO, M. DO R.; KARMALI, A.; ARTEIRO, J. M. Production and chromatographic behaviour of polygalacturonase from *Pleurotus ostreatus* on immobilized metal chelates. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 531–539, 2008.

FURLAN, S. A. *et al.* Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13, p. 689–692, 1997.

FURLAN, S. A. *et al.* Influência da suplementação de palha de arroz na produção de *Pleurotus sajor-caju*. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 60–63, 2000.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAI, M.; KALANTZI, O. Growth conditions of *Aspergillus sp.* ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 425-429, 1997.

GHOSH, M.; MUKHERJEE, R.; NANDI, B. Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. **Acta Biotechnologica**, v. 18, n. 3, p. 243-254, 1998.

GOMES, E. *et al.* Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.

GOMES, S. C. M. *et al.* **Biochemical characterization of pectinases produced by *Aspergillus phoenicis* URM4924 by submerged fermentation using tangerine peel.** 4 International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2012.

GOWTHAMAN, M. K.; KRISHNA, C.; MOO-YOUNG, M. Fungal solid state fermentation - an overview. **Applied Mycology and Biotechnology**, v. 1, n. C, p. 305–352, 2001.

GRIFFITHS, G. *et al.* **Onions - A global benefit to health** **Phytotherapy Research**, nov. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1222>>. Acesso em: 1 set. 2016

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, 1 abr. 2004.

HROMADKOVA, Z.; EBRINGEROVA, A.; VALACHOVIC, P. Comparison of classical and ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **Ultrason Sonochem**, v. 5, n. 4, p. 163–168, 1999.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática:** Tabela 1612: área plantada, área colhida, quantidade produzida e valor da produção da lavoura temporária em 2014. IBGE, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>. Acesso em: 10 ago. 2016.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **Indicadores conjunturais** - produção agrícola/agricultura. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 10 ago. 2016.

INÁCIO, F. D. *et al.* Production of enzymes and biotransformation of orange waste by Oyster mushroom , *Pleurotus pulmonarius* ( Fr .) Qué l . **Advances in Microbiology**, v. 5, p. 1–8, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Versão eletrônica, 2008.

JAIME, L. *et al.* Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 122–128, 2002.

KADIAN, N; GUPTA, A; SATYA, S; MEHTA, R.K.; MALIK, A..Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed materials. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4642–4647, 2008

KAKON, A.; CHOUDHURY, M. B. K.; SAHA, S. Mushroom is an ideal food supplement. **Journal of Dhaka National Medical College & Hospital**, v. 18, n. 1, p. 58–62, 2012.

KAYODE, R. M. O. *et al.* Evaluation of amino acid and fatty acid profiles of commercially cultivated oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) grown on gmelina wood waste. **Nigerian Food Journal**, v. 33, n. 1, p. 18–21, 2015.

KEEY, R. B. **Drying of loose and particulate materials**. New York: Hemisphere, p. 57, 1991.

KHATRI, B. P. *et al.* Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal. **SpringerPlus**, v. 4, p. 488, 2015.

KILL, L.H.P; RESENDE, G.M. de; SOUZA, R.J. de. **Sistema de produção 3** Botânica. In: Cultivo da cebola no Nordeste. Embrapa semi- árido, nov. 2007. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolardeste/botanica.htm> Acesso: 10 ago. 2016.

KIM, M. K. *et al.* Recycling of fermented sawdust-based oyster mushroom spent substrate as a feed supplement for postweaning calves. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 4, p. 493–499, 2011.

KOSSEVA, M. R.; WEBB, C. **Food Industry Wastes - Assessment and Recuperation of Commodities**. 1 ed. ed. Oxford: Elsevier Inc., 2013.

KUFORIJ, O. O.; FASIDI, I. O. Enzyme activities of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer, cultivated on selected agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4275–4278, 2008.

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 & Biotechnology**, v. 13, p. 43–49, 1997.

KUMAR, V. *et al.* Global market scenario of industrial enzymes. In: BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. (Eds.). **Industrial Enzymes: Trends, Scope and Relevance**. 1. ed. New York: Nova Science Publishers, 2014. p. 173–196.

KURT, S.; BUYUKALACA, S. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3164–3169, 2010.

LI, S. *et al.* Technology prospecting: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–11, set. 2012.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934

MADAN, M., VASUDEVAN, P., SHARMA, S. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on different agro-wastes. **Biological Wastes**, v.22, p.241-250, 1987.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 3, p. 461–88, 2000.

MALAYIL, S.; CHANAKYA, H. N. Fungal enzyme cocktail treatment of biomass for higher biogas production from leaf litter. **Procedia Environmental Sciences**, v. 35, p. 826–832, 2016.

MANDEEL, Q. A.; AL-LAITH, A. A.; MOHAMED, S. A. Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 601–607, 2005.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 315–318, 2000.

MARTINS, E. S. *et al.* Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 949–954, 2002.

MATA, G.; MURRIETA HERNÁNDEZ, D. M.; IGLESIAS ANDREU, L. G. Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 143–150, 2005.

MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L. Qualidade química e física de cebola minimamente processada armazenada sob refrigeração. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa hortaliças**, v. 127, 2015.

MÉLO, B. C. A. **Produção de celulases por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (*Malpighia* sp.) utilizando *Trichoderma reesei***. Tese [Doutorado]. Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

MILLER, G.L..Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p.426-428, 1959.

MOURA, A. **Grupo basidiomicetos**. Estudando a biologia (página da web). Disponível em: <<http://estudandoabiologia.wordpress.com/grupo-basidiomicetos/>> Acesso em: set. 2016.

MUSHROOM ADVENTURES. **Oysters Grown Commercially** (imagem da web). Disponível em: [http://www.mushroomadventures.com/Images/media/Photos\\_we\\_like/commercial-oyster1.jpg](http://www.mushroomadventures.com/Images/media/Photos_we_like/commercial-oyster1.jpg) . Acesso em: out. 2016

MUSHROOM CULTIVATION STOCK PHOTOS AND IMAGES. **Eatable Cultured Mushroom** (imagem da web). Disponível em: <http://www.123rf.com/search.php?word=mushroom+cultivation&start=200&searchopts=&itemsperpage=100&sti=mk7hld991udfowpc>. Acesso em out. 2016.

NARAIAN, R. *et al.* Influence of different nitrogen rich supplements during cultivation of *Pleurotus florida* on corn cob substrate. **Environmentalist**, v. 29, n. 1, p. 1–7, 2009.

NEELAM, S.; CHENNUPATI, S.; SINGH, S. Comparative studies on growth parameters and physio-chemical analysis of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 3, n. 1, p. 163–169, 2013.

NG, A.; SMITH, A. C.; WALDRON, K. W. Effect of tissue type and variety on cell wall chemistry of onion (*Allium cepa* L.). **Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 17–24, 1998.

O'DONOGHUE, E. M. *et al.* Evaluation of carbohydrates in pukekohe longkeeper and grano cultivars of *Allium cepa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5383–5390, 2004.

OGURI, E. B. *et al.* Bioethanol production by pichia stipitis from enzymatic hydrolysates of corn cob based spent mushroom substrate. **Food Science and Technology Research**, v. 17, n. 4, p. 267–272, 2011.

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

ORTEGA, G. M. *et al.* Enzyme activities and substrate degradation during white rot fungi growth on sugar-cane straw in a solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 210–212, 1993.

OYELEKE, S. *et al.* Cellulase and pectinase production potentials of *Aspergillus niger* isolated from corn cob. **Bayero Journal of Pure and Applied Science**, v. 5, n. 1, p. 78–83, 2012.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. **Solid-state fermentation in biotechnonogy: fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech, 2001.

PATRA, P. *et al.* Pectic polysaccharide from immature onion stick (*Allium cepa*): structural and immunological investigation. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 345–352, 2013.

PATRABANSH, S.; MADAN, M. Studies on cultivation, biological efficiency and chemical analysis of *Pleurotus sajor-caju* (FR.) SINGER on different bio-wastes. **Acta Biotechnologica**, v. 17, n. 2, p. 107–122, 1997.

PHAN, C. W.; SABARATNAM, V. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 863–873, 2012.

PHUTELA, U. *et al.* Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 63–69, 2005.

POPPE, J. Use of agricultural waste materials in the cultivation of mushrooms. **Mushroom Science**, v. 15, p. 3–22, 2000.

POPPE, J. Agricultural wastes as substrates for oyster mushroom. In: **Mushroom Growers' Handbook 1**. Oyster Mushrooms Cultivation. Part II: Oyster Mushrooms. MushWorld, Korea, 2004. cap. 5.

POKHREL, C. P. *et al.* Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* using different agricultural residues. **International Journal of Agricultural Policy and Research**, v. 1, n. April, p. 19–23, 2013.

RAGUNATHAN, R. *et al.* Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. **Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 139–144, 1996.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 371–375, 2003.

RAMOS, C. *et al.* Produção de três espécies de cogumelos *Pleurotus* e avaliação da qualidade em atmosfera modificada. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 64, 2011.

RAMPINELLI, J. R. *et al.* Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 197–202, 2010.

RANGANA, S. **Manual of analysis of fruits and vegetable products**. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1979. 634 p.

RASHAD, M. M. *et al.* Purification and characterization of extracellular polygalacturonase from *Pleurotus Ostreatus* using citrus limonium waste. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 6, n. 1, p. 81–88, 2010.

RAYMOND, P.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. K. Enzyme profiles of *Pleurotus* HK-37 during mycelia vegetative growth and fruiting on solid sisal waste fractions supplemented with cow manure. **Advances in Biochemistry**, v. 3, n. 5, p. 57–65, 2015.

REDDY, G. V. *et al.* Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1457–1462, 2003.

REMOUNDOU, K.; KOUNDOURI, P.. Environmental effects on public health: an economic perspective. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.6, n. 8, p. 2160-2178, 2009.

RETTORE, V.; GIOVANNI, R. N.; PAZ, M. F. Influência da luz na produção do cogumelo hiboukitake em bagaço de uva. **Evidência, Joaçaba**, v. 11, n. 2, p. 29–36, 2011.

RIVAS, P. M. S. *et al.* Avaliação de substratos pectocelulósicos para o cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* sp. (agaricales). **Cadernos de Pesquisas**, v. 17, n. 3, p. 78–83, 2010.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E. *et al.* The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10657–10662, 2011.

RODRÍGUEZ GALDÓN, B.; TASCÓN RODRÍGUEZ, C.; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, E.; DÍAZ ROMERO, C. Organic acid contents in onion cultivars (*Allium cepa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6512–6519, 2008.

ROLDÁN, E. *et al.* Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 907–916, 2008.

RORABACHER, D. B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 139–146, 1991.

ROSALES, E.; PAZOS, M.; ÁNGELES SANROMÁN, M. Feasibility of solid-state fermentation using spent fungi-substrate in the biodegradation of PAHs. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 41, n. 6, p. 610–615, 2013.

ROYSE, D.J. **A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina***. Proceedings of the 8th International conference on mushroom biology and mushroom products, 2014.

SALES-CAMPOS, C. *et al.* Cinética micelial dos fungos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* em resíduos lignocelulósicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 141–145, 2011.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, p. 130–139, 2014.

SARDAR, H. *et al.* Effects of different culture media, temperatura and pH levels on the growth of wild and exotic *Pleurotus* species. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 27, n. 2, p. 139–145, 2015.

SATHISH-KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an

extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 643–646, 1999.

SCHULZ, J. G. *et al.* Folhas de pupunheira na produção de *Pleurotus sajor-caju* CCB 019. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 380–383, 2013.

SCHUMACHER, B. A. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments. **Ecological Risk Assessment Support Center**, v. 2002, p. 1–23, 2002. Disponível em: [http://bcodata.whoi.edu/LaurentianGreatLakes\\_Chemistry/bs116.pdf](http://bcodata.whoi.edu/LaurentianGreatLakes_Chemistry/bs116.pdf).

SCHWARZE, F.W.M.R; ENGELS, J.; MATTHECK, C. Fungal strategies of decay in trees. **Springer**, Berlin, 2000

SEGEL, I. H. *et al.* **Enzyme kinetics**. Wiley, New York, 1975.

SHARMA, K. *et al.* Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 2, p. 243–252, 2015.

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

SILVEIRA, M.; FURLAN, S.; NINOW, J. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 28, n. 4, p. 858–862, 2008.

SILVEIRA, M. L. L. *et al.* Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear  $\beta$ -d-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 588–596, 2014.

SINGH, A. D. *et al.* Enzymes from spent mushroom substrate of *Pleurotus sajor-caju* for the decolourisation and detoxification of textile dyes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 535–545, 2011.

SINGH, A. D.; ABDULLAH, N.; VIKINESWARY, S. Optimization of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 7, p. 743–752, 2003.

SINGH, R. *et al.* Cloning, expression and characterization of a metagenome derived thermoactive/thermostable pectinase. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 8, p. 8353–8361, 2012.

STAMETS, P. **Growing gourmet and Medicinal Mushrooms**. Hong Kong: Graphics Unlimited, 1993.

STURION, G. L.; RANZANI, M. R. T. C. Composição em minerais de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil - *Pleurotus* spp e outras espécies desidratadas. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 50, n. 1, p. 102-108, 2000.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 792–809, 2013.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4 ed. revisada e ampliada. Campinas, SP: UNICAMP, 2011. Disponível em [http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf?arquivo=ta co\\_4\\_versao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=ta%20co_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf). Acesso em: ago. 2016

TERRY, L. A. *et al.* Non-structural carbohydrate profiles in onion bulbs influence taste preference. **Information and Technology for Sustainable Fruit and Vegetable Production**, v. 15, n. 9, p. 33–39, 2005.

THAKUR, B. R. *et al.* Chemistry and uses of pectin — a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47–73, 1997.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

URBEN, A.F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, P. 186, 2004

VALACHOVIC, P.; PECHOVA, A.; MASON, T. J. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 2, p. 111–117, 2001.

VELÁZQUEZ-CEDENO, M. A.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 201–207, 2002.

WISBECK, E. *et al.* Maintenance culture medium and inoculum based on peach palm leaves for *Pleurotus* spp. production. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1–7, 2016.

WEINMANN, H. Determination of total available carbohydrates in plants. **Plant physiology**, v. 22, n. 3, p. 279, 1947.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventing disease through healthy environments: Towards an estimate of the environmental burden of disease**. 2006. Disponível em: [http://www.who.int/quantifying\\_ehimpacts/publications/preventingdisease.pdf](http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/preventingdisease.pdf). Acesso em: dez. 2016.

WOLFF, E. R. S. *et al.* Antimicrobial and antineoplastic activity of *Pleurotus ostreatus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2–3, p. 402–412, 2008.

XAVIER-SANTOS, S. *et al.* Screening for pectinolytic activity of wood-rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. **Folia microbiologica**, v. 49, n. 1, p. 46–52, 2004.

YOU, C. *et al.* Potential hydrophobic interaction between two cysteines in interior hydrophobic region improves thermostability of a family 11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 5, p. 861–870, 2010.

YUDKIN, W. H. Hydrolytic and phosphorolytic enzymes. In: BOURNE, G. H.; KIDDER, G. W. (Eds). **Biochemistry And Physiology of Nutrition**. Vol. 2. New York: Academic Press Inc, 1953. p. 231-266.

ZADRAZIL, F.; BRUNNERT, H. Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 183–188, 1981.

ZHANG, R.; LI, X.; FADEL, J. . Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, p. 277–284, 2002.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 825–830, 2000.