

AURORA L. PEDROSO

**PRODUÇÃO DE *Pleurotus* spp EM RESÍDUO DA INDÚSTRIA DO
CIGARRO E AVALIAÇÃO DO SUBSTRATO EXAURIDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Ciência do Solo, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Felga Gobbi

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Teixeira da
Silva

CURITIBA

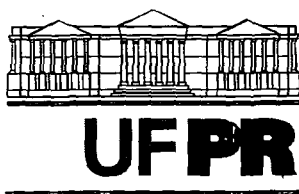
2003

PEDROSO, Aurora L..

Produção de *Pleurotus* spp em resíduo da indústria do cigarro e avaliação do substrato exaurido/Aurora L. Pedroso. Curitiba, 2003.
103 f.

Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná (UFPR).

1. - Fungo/Cogumelo 2. *Pleurotus*. 3. Resíduos da indústria do cigarro
4. Substrato 5. Fertilizante



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE SOLOS E ENGENHARIA AGRÍCOLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA: CIÊNCIA DO SOLO(MESTRADO)
Rua dos Funcionários, 1540-Curitiba/PR-80035-050-Fone/Fax 41-350-5648
E-mail: pgcisolo@ufpr.br

P A R E C E R

Os Membros da Comissão Examinadora, designados pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo" para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pela candidata **AURORA LUZIA PEDROSO**, sob o título "**Produção de Pleurotus spp em resíduo da indústria do cigarro e avaliação do substrato exaurido**", requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo" do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após haverem analisado o referido trabalho e argüido a candidata, são de Parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação, com o conceito "**A**", completando assim, os requisitos necessários para receber o diploma de **Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo"**.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", em Curitiba aos 20 de outubro de 2003.

Prof. Dr. Eduardo Felga Gobbi, Presidente.

Prof.ª. Dr.ª. Nadir Domingues Mendonça, Iª Examinadora.

Prof. Dr. José Cavassin Tosin, IIº Examinador.



“A humanidade não pode esperar que a terra produza mais. A humanidade precisa fazer mais com o que a terra produz”.

Gunter Pauli

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo Felga Gobbi, por ter acreditado e aceitado com tão boa vontade , a responsabilidade de orientar esta dissertação.

Ao colega Renato Rau, pelo exemplo de amigo, irmão e profissional, que tornou possível superar as dificuldades e realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Teixeira Silva, pelo carinho com que sempre nos recebeu nos momentos de dúvidas e insegurança.

As colegas do Laboratório de Biologia do Solo e Engenharia Agrícola do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, Ana Pelagia Kudla e Helda Lubazinsk, pelo apoio na realização das análises.

Aos colegas do TECPAR, do Laboratório de Fertilizantes e de Desenvolvimento de Biológicos, Tobias Almeida, Ubirajara C. Schier e José M. Adonski, pelo apoio e sugestões durante as pesquisas.

Ao amigo da Conspizza, Sr. Angelo Pizzato pela amizade e presteza no fornecimento das amostras.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná -TECPAR, pelo subsídio e financiamento das análises.

Aos meus filhos Rodrigo A Pedroso, João Paulo Pedroso de Melo e ao meu primo Adriano Pedroso Veiga, pela produção das fotografias e paciência na informática.

Aos meus irmãos pelo carinho , amizade e companheirismo .

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus país, Alcy Miguel Pedroso e Nazarena Proença Pedroso, por terem me apresentado ao mundo, com a mensagem de amor a Deus, que nos deu fé para acreditar e força para seguir nossos caminhos .

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xix
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 FUNGO E COGUMELO	4
2.2 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	6
2.3 PLEUROTUS	10
2.3.1 Morfologia	10
2.3.2 <i>Pleurotus pulmonarius</i> e <i>Pleurotus sajor-caju</i>	11
2.3.3 Ciclo de Vida	13
2.3.3.1 Fase vegetativa	13
2.3.3.2 Fase reprodutiva	14
2.3.4 Situação de Cultivo no Mundo	15
2.3.5 Composição Química dos Corpos de Frutificação	16
2.3.5.1 Água	16
2.3.5.2 Carboidratos e fibras	17
2.3.5.3 Proteínas e aminoácidos livres	17
2.3.5.4 Lipídios	17
2.3.5.5 Vitaminas e minerais	18
2.3.5.6 Componentes aromáticos	18
2.3.6 Exigências de Cultivo	19

2.3.6.1	Água	19
2.3.6.2	Fonte de carbono	19
2.3.6.3	Nitrogênio	20
2.3.6.4	Relação de carbono e nitrogênio (C/N)	21
2.3.6.5	pH	21
2.3.6.6	Lipídeos, sais minerais e vitaminas	21
2.3.6.7	Temperatura	22
2.3.6.8	Luz	22
2.3.7	Tecnologia do Cultivo de <i>Pleurotus</i>	23
2.3.7.1	Manutenção das cepas	24
2.3.7.2	<i>Spawn</i>	24
2.3.7.3	Pasteurização e esterilização	24
2.3.7.4	Semeadura	25
2.3.7.5	Incubação	26
2.3.7.6	Produção e colheita	26
2.4	APLICAÇÃO DO SUBSTRATO EXAURIDO	28
2.5	FERTILIZANTES	29
2.5.1	Macronutrientes	29
2.5.2	Micronutrientes	30
2.5.2.1	Metais pesados	30
2.5.2.1.1	Metais pesados no solo	33
2.5.2.1.2	Metais pesados nos alimentos	34
2.6	FUMO – <i>Nicotiana tabacum</i>	34
2.6.1	A Origem do Fumo	35
2.6.2	Tipos de Fumo	36
2.6.3	Nicotina	41

3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	MATÉRIA-PRIMA E FORNECEDORES	43
3.1.1	Amostragem	43
3.1.2	Seleção do resíduo do cigarro	44
3.1.3	Efeito do tempo de ebulição 98 °C	44
3.2	CEPAS ESTUDADAS	44
3.2.1	Preparo do BDA	32
3.2.2	Preparo do meio Agar Extrato de Fumo	32
3.3	ESTUDOS FISIOLÓGICOS	45
3.3.1	Estudo do Efeito da Temperatura	45
3.3.2	Estudo do Efeito do pH	45
3.4	SELEÇÃO DAS CEPAS EM AGAR EXTRATO DE FUMO (AEF) EM PLACAS	45
3.5	PREPARO DA SEMENTE <i>SPAWN</i>	48
3.6	PREPARO DO SUBSTRATO EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO - FES	48
3.7	FRUTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUBSTRATO	50
3.8	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	50
3.8.1	Determinação Analítica de Metais	51
3.8.2	Determinação da Nicotina no resíduo de fumo.....	53
3.8.3	Determinação do Nitrogênio no resíduo de fumo.....	54
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	SELEÇÃO DO RESÍDUO DO CIGARRO FUMO E PAPEL	44
4.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITROGÊNIO NA AMOSTRA DO RESÍDUO DE FUMO.....	46

4.3	SELEÇÃO DAS CEPAS DE <i>Pleurotus</i> A BASE DE AGAR EXTRATO DE FUMO (AEF)	47
4.4	AVALIAÇÃO DO pH NO CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO DE <i>PLEUROTUS</i> SUBMETIDOS AO AGAR EXTRATOD E FUMO.....	50
4.5	EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO DE <i>PLEUROTUS</i> SUBMETIDOS AO AGAR EXTRATOD E FUMO	51
4.6	SELEÇÃO DAS CEPAS DE <i>Pleurotus</i> spp, EM SUBSTRATO MASSA (FES)	52
4.7	AVALIAÇÃO DA FRUTIFICAÇÃO	53
4.8	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS ANALÍTICOS	58
4.8.1	Determinação do Nitrogênio na Massa, Filtrado, Cogumelo e Substrato Exaurido	59
4.8.2	Determinação do Potássio	60
4.8.3	Determinação do Fósforo	73
4.8.4	Determinação do Cálcio	74
4.8.5	Determinação do Magnésio	74
4.8.6	Determinação do Zinco	75
4.8.7	Determinação do Cádmiio	76
4.8.8	Determinação do Cobre	77
4.8.9	Determinação do Mercúrio	78
4.8.10	Avaliação das Determinações do Teor de Nicotina na Massa, Filtrado, Cogumelo e Substrato Exaurido	79
5	CONCLUSÃO	81
6	REFERÊNCIAS	82

7 ANEXOS 91

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1 – CARPÓFORO DO <i>Pleurotus</i> spp.....	8
FIGURA 2 – LAMELAS DO CARPÓFORO.....	8
GRÁFICO 1 – FLUXOGRAMA DA PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO EM AGAR BASE EXTRATO DE FUMO PARA PLACAS	33
GRÁFICO 2 – FLUXOGRAMA DA PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO (MASSA) FERMENTAÇÃO ESTADO SÓLIDO FES	37
FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS SIGNIFICATIVOS A 5% PARA O TESTE DE TUKEY NO TEOR DE NICOTINA ENCONTRADO NA AMOSTRA DO RESÍDUO DE FUMO	47
FIGURA 4 – <i>Pleurotus ostreatus</i> LPB 01	48
FIGURA 5 – <i>Pleurotus ostreatus</i> LPB 09	49
FIGURA 6 – <i>Pleurotus sajor-caju</i> LPB 20	49
FIGURA 7 – <i>Pleurotus ostreatus</i> LPB 22	49
FIGURA 8 – <i>Pleurotus ostreatus</i> LPB 23	49
FIGURA 9 – <i>Pleurotus ostreatus</i> LPB 24	50
FIGURA 10 – CEPA LPB – 20 NO SUBSTRATO FUMO (TESTE)	53
FIGURA 11 – CEPA LPB 20- NA SERRAGEM	53
FIGURA 12 – MANUTENÇÃO DAS CEPAS	55
FIGURA 13 – PRODUÇÃO DA SEMENTE	55
FIGURA 14 – INÍCIO DA COLONIZAÇÃO DO SUBSTRATO SÓLIDO.....	55
FIGURA 15 – SUBSTRATO SÓLIDO COLONIZADO TOTALMENTE.....	55
FIGURA 16 - ABERTURA DOS SAQUINHOS	56
FIGURA 17 - FORMAÇÃO DOS PRIMÓRDIOS	56

FIGURA 18 - INÍCIO DA FORMAÇÃO DE CARPÓFOROS.....	57
FIGURA 19 - INICIO DA FORMAÇÃO DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO	57
FIGURA 20 – CORPO DE FRUTIFICAÇÃO.....	57
FIGURA 21 – CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO TOTALMENTE DESENVOLVIDOS	57
FIGURA 22 – <i>Pleurotus sajor-caju</i>	57
FIGURA 23 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITROGÊNIO COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS MÉDIOS NA QUANTIDADE DE NITROGÊNIO NO COGUMELO, MASSA, FILTRADO E SUBSTRATO EXAURIDO	60
FIGURA 24 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POTÁSSIO COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS MÉDIOS SIGNIFICATIVOS A 1% PARA O TESTE DE TUKEY NA QUANTIDADE DE POTÁSSIO NO COGUMELO, MASSA, FILTRADO E SUBSTRATO EXAURIDO	61
FIGURA 25 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÓSFORO COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS MÉDIOS SIGNIFICATIVOS A 1% PARA O TESTE DE TUKEY NA QUANTIDADE DE FÓSFORO NO COGUMELO, MASSA, FILTRADO E SUBSTRATO EXAURIDO	62
FIGURA 26 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CÁLCIO COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS MÉDIOS SIGNIFICATIVOS A 1% PARA O TESTE	

DE TUKEY NA QUANTIDADE DE CÁLCIO NO COGUMELO, MASSA, FILTRADO E SUBSTRATO EXAURIDO	62
FIGURA 27 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MAGNÉSIO COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS MÉDIOS SIGNIFICATIVOS A 1% PARA O TESTE DE TUKEY NA QUANTIDADE DE MAGNÉSIO NO COGUMELO, MASSA, FILTRADO E SUBSTRATO EXAURIDO	63
FIGURA 28 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ZINCO COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS MÉDIOS SIGNIFICATIVOS A 1% PARA O TESTE DE TUKEY NA QUANTIDADE DE ZINCO NO COGUMELO, MASSA, FILTRADO E SUBSTRATO EXAURIDO	64
FIGURA 29 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CÁDMIO COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS MÉDIOS SIGNIFICATIVOS A 1% PARA O TESTE DE TUKEY NA QUANTIDADE DE CÁDMIO NO COGUMELO, MASSA, FILTRADO E SUBSTRATO EXAURIDO	65
FIGURA 30 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COBRE COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS MÉDIOS SIGNIFICATIVOS A 1% PARA O TESTE DE TUKEY NA QUANTIDADE DE COBRE NO COGUMELO, MASSA, FILTRADO E SUBSTRATO EXAURIDO	65
FIGURA 31 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MERCÚRIO COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E DESVIOS MÉDIOS SIGNIFICATIVOS A 1% PARA O TESTE	

DE TUKEY NA QUANTIDADE DE MERCÚRIO NO COGUMELO, MASSA, FILTRADO E SUBSTRATO EXAURIDO	66
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS ANALÍTICOS DO RESÍDUO DE CIGARRO (FUMO E PAPEL) EM (mg.kg ⁻¹)	45
TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO MÁXIMA PERMITIDA DE METAIS PESADOS (mg/kg) EM LODOS DE ESGOTO CONSI- DERADOS ACEITÁVEIS PARA USO AGRÍCOLA	46
TABELA 3 – COMPARATIVO DA VARIAÇÃO DE NICOTINA E NITROGÊNIO TOTAL QUANDO SUBMETIDO A EBULIÇÃO 98° C	47
TABELA 4 – SELEÇÃO DAS CEPAS DE <i>Pleurotus</i> spp. EM AGAR EXTRATO DE FUMO	48
TABELA 5 – EFEITO DO pH SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO DAS CEPAS DE <i>Pleurotus</i> spp. APÓS 10 DIAS A 24°C	50
TABELA 6 – EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO DAS CEPAS DE <i>Pleurotus</i> spp. APÓS 10 DIAS, PH 6,5	51
TABELA 7 – SELEÇÃO DAS CEPAS DE <i>Pleurotus</i> spp., EM SUBSTRATO MASSA, APÓS 31 DIAS DE COLONIZAÇÃO ...	52
TABELA 8 – EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DO <i>Pleurotus</i> EM SUBSTRATO ELABORADO COM O RESÍDUO DE FUMO	54
TABELA 9 – CONDIÇÕES AMBIENTAIS ÓTIMAS OBTIDAS PARA	

A FORMAÇÃO DE PRIMÓRDIOS E DESENVOLVIMENTO
DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DO

<i>Pleurotus sajor-caju</i> LPB20	54
TABELA 10 – AVALIAÇÃO DAS DETERMINAÇÕES DOS TEORES DE MACRONUTRIENTES	58
TABELA 11 – AVALIAÇÃO DAS DETERMINAÇÕES DOS TEORES DE MICROELEMENTOS.	59
TABELA 12 – AVALIAÇÃO DOS ELEMENTOS TÓXICOS	59
TABELA 13 – TEORES DE NICOTINA NOS SUBSTRATOS E COGU- MELOS PÓS-FRUTIFICAÇÃO	67

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

- C/N - relação carbono-nitrogênio
- N - nitrogênio
- Cm - centímetro
- EB% - Eficiência Biológica %
- FES - Fermentação no Estado Sólido
- FS - Fermentação Submersa
- g - grama
- g/L - grama por litro
- kg - quilograma
- LPB - Laboratório Processos Biotecnológicos
- mg - miligrama
- mL - mililitro
- % - porcentagem
- °C - grau Celsius
- SEAB – Secretaria de Estado Da Agricultura e do Abastecimento
- AFUNBRA – Associação dos Fumicultores do Brasil
- ZERI – *Zero Emissions Research Initiative*
- Cd - Cádmió
- As - Arsênio
- Zn - Zinco
- K - Potássio
- Cu - Cobre
- Hg - Mercúrio
- Mn - Manganês
- Al - Alumínio
- Ca - Cálcio
- Fe - Ferro
- P - Fósforo
- Mg - Magnésio

RESUMO

Os avanços tecnológicos dependem de diversos componentes do sistema que a natureza organizou e existem poucos capazes de igualar a magia e o desempenho dos fungos. Baseado nessa característica foi avaliada a possibilidade de produzir cogumelo do gênero *Pleurotus*, mediante o desenvolvimento da metodologia pelo processo de Fermentação no Estado Sólido usando resíduos da indústria do cigarro. Foi verificado a possibilidade de degradação ou diminuição de componentes tóxicos, como nicotina e metais pesados, tanto para o uso do cogumelo como do substrato exaurido para reincorporar ao solo e reduzir a poluição ambiental. Inicialmente foi selecionada a melhor cepa de *Pleurotus* capaz de crescer em agar extrato de fumo avaliada pela velocidade de crescimento radial do micélio. Entre as seis cepas de *Pleurotus*, a cepa de *P. sajor caju* LPB 20 foi a que melhor se desenvolveu seguindo os processos de cultivo adaptado para o substrato de fumo. Os teores de nicotina quando submetidos a diferentes períodos de ebulição não variaram significativamente, tanto para a massa do fumo como para o filtrado do mesmo.

Os resultados das análises demonstraram que o teor de metais contidos no papel do cigarro são superiores ao contido no fumo, principalmente o zinco. As quantidades de macro e micronutrientes encontradas no substrato (massa), cogumelo e substrato exaurido aumentaram significativamente do substrato (massa) para o cogumelo, alcançando maiores médias no cogumelo com exceção do cálcio que apresentou os menores valores no cogumelo, aumentando significativamente no substrato exaurido. Zinco e cobre também seguiram o padrão descrito para a maioria dos nutrientes, já o cádmio e o mercúrio apontaram medias iguais estatisticamente para o filtrado, substrato e cogumelo, e no substrato exaurido foi obtido o maior valor.

Quanto as análises do nitrogênio, as quantidades encontradas no substrato (massa) no cogumelo e no substrato exaurido aumentaram significativamente do substrato (massa) para o cogumelo e apresentaram a mesma média estatística para o substrato (massa) e o substrato exaurido.

Conforme os dados observados nos testes da nicotina podemos concluir que o cogumelo *Pleurotus sajor-caju* degradou a nicotina ou a absorveu em níveis muito baixos, ficando abaixo do limite de detecção da técnica utilizada. Antes do preparo do substrato, o fumo apresentava-se com média de 0,19 g de nicotina por 100g de substrato. Após o processo de fermentação, tanto no cogumelo quanto no substrato exaurido, não foi detectada nicotina.

Finalmente observa-se que os dados investigados permitem concluir que o cogumelo *Pleurotus sajor-caju* LPB20 se adapta muito bem ao substrato elaborado com resíduo do fumo.

Nesse contexto, acredita-se que a produção de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* LPB20, utilizando essa metodologia, pode vir a ser uma boa opção para o aproveitamento do resíduo da indústria do cigarro. Apesar dos dados mostrarem uma possibilidade de uso, ainda é necessário desenvolver pesquisas no campo dos alimentos, fertilizantes e medicamentos.

ABSTRACT

The technological advances depend on the several components of the system that nature has organized and only a few of them are able to equal the magic and performance of fungi. Based on such characteristics, was evaluated the possibility of producing mushrooms from *Pleurotus* gender by developing a Solid State Fermentation method, using the cigarette industry residues. Was verified the possibility of degrading or diminishing toxic components such as nicotine and heavy metals, so as to use the mushrooms and the exhausted substrate, aiming its re-incorporation to the soil and the reduction of environment pollution. Firstly, the best *Pleurotus* breed was selected according to its ability of growing in tobacco agar extract and its mycelium radial growing rate. Among the six *Pleurotus* breeds, the *P. sajor caju* LPB 20 had the best development according to adapted cultivation processes for tobacco substrate. The contents of nicotine did not varied significantly in the tobacco mass or in its filtrate when submitted to different boiling periods.

The analysis results demonstrated that metal contents in cigarette paper are higher than those in tobacco, mainly zinc. The amounts of macro and micro-nutrients found in the substrate (mass), mushroom and in the exhausted substrate increased significantly from the substrate (mass) to the mushroom, excepting for calcium that presented the lowest values in mushroom and in the exhausted substrate increased significantly. Zinc and copper also followed the pattern described for most nutrients. Cadmium and mercury, by their turn, presented the same statistical averages for the filtrate, substrate (mass) and mushroom, the highest values were obtained in the exhausted substrate.

In the nitrogen analyses the amounts found in substrate(mass),mushrooms and in the exhausted substrate increased significantly from the substrate (mass) to the

mushroom and presented the same statistical averages for substrate (mass) and exhausted substrate.

From the data obtained in nicotine tests we can conclude that *Pleurotus sajor-caju* mushroom degraded nicotine or absorbed it at very low levels, standing below the detection limit of the technique used. Before composting, tobacco presented an average content of 0,19 g nicotine per 100g substrate. Nicotine was not detected after the fermentation process, neither in the mushroom nor in the exhausted substrate.

It was finally observed that data obtained allow to conclude that *Pleurotus sajor-caju* LPB20 mushroom has a very good adaptation to compost prepared from tobacco residue.

In this context, we believe that *Pleurotus sajor-caju* LPB20 mushroom production using that methodology can develop. Although the data show possibility its use, further researches are required in the fields of food, fertilizers and medicines.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de cogumelos comestíveis é considerado como um processo biotecnológico. Por definição, biotecnologia é entendida atualmente como sendo o uso de processos biológicos dentro de uma infra-estrutura de operações técnicas e de produção industrial (REHM e PRAVE, 1987).

O cultivo de cogumelos comestíveis tem se tornado, cada vez mais, uma prática importante na sociedade moderna. Isto ocorre devido ao fato deste processo biotecnológico produzir alimento de alto valor nutritivo a partir de resíduos agroindustriais, ou seja, possibilita o aproveitamento mais eficiente dos materiais, além de reduzir o volume de resíduos ou acelerar o processo de decomposição, os resíduos do cultivo de cogumelos comestíveis podem ainda ser utilizados como adubo porque com o intenso manuseio do solo para fins agrícolas é preciso sempre utilizar fertilizantes para a manutenção da produtividade.

Como os fertilizantes químicos ficam cada vez mais caros e seu uso contínuo e em grandes quantidades pode prejudicar o solo, uma opção é a utilização de resíduos animais e agrícolas como fertilizantes (MAZIEIRO, 1990).

Os cogumelos realizam a bioconversão, transformando os resíduos lignocelulósicos em alimento com alto valor protéico, possuem compostos bioativos com propriedades medicinais reconhecidas pelas culturas orientais, principalmente China e Japão (JONG e DONOVICK, 1989).

O cogumelo comestível *Pleurotus* é agente primário da decomposição da madeira, possuindo a habilidade de quebrar a cadeia de celulose e lignina, sem uma prévia preparação química ou biológica como a fermentação (ZADRAZIL, 1978), podendo representar para o cultivador uma economia nos custos do processo produtivo.

Os resíduos lignocelulósicos gerados pela agroindústria paranaense são bastante significativos, havendo a necessidade urgente de se procurar alternativas para o seu reaproveitamento. Alguns resíduos de culturas tais como bagaço de cana, serragem podem ser aproveitados integralmente na produção de cogumelos comestíveis e medicinais. Dentre outras culturas o Paraná apresenta para o cultivo do

fumo uma área de 33.910 ha. Com uma produção de 64.548 toneladas (SEAB, 2000).

Os resíduos relacionados com a indústria de cigarros no Brasil atingem cifras consideráveis, gerando problemas relacionados com o meio ambiente, principalmente devido ao seu teor de substâncias tóxicas advindas desde o seu cultivo (fungicidas) bem como no seu processamento industrial com a produção de cigarros.

As constantes apreensões de cigarros provenientes do comércio ilegal junto a fronteira do Brasil com o Paraguai, e/ou descartados pelo controle da qualidade dos produtores, são absorvidos pela a indústria de hidrossemeadura que utiliza apenas os filtros dos cigarros, na elaboração de uma pasta que serve como suporte para sementes de gramíneas, e que são pulverizadas nas encostas de rodovias, estádios de futebol e na recuperação de áreas ambientalmente degradadas. O problema é que o fumo e o papel descartados (cerca de 400 toneladas/mês) desencadeiam um passivo ambiental de difícil tratamento. É por este motivo que procuramos investigar finalidades para esse resíduos.

Como o fungo *Pleurotus* se utiliza de resíduos da agroindústria é provável que venha se desenvolver em substratos constituídos por resíduos gerados pela indústria do fumo que, apesar da existência de compostos tóxicos, tais como nicotina, e metais pesados, deverão ser merecedores de intensos estudos dirigidos ao seu aproveitamento como insumo na geração de soluções ambientais e alimento, desta forma, as análises da determinação do teor de nicotina, metais pesados, macro e microelementos, servirão de suporte para a avaliação, tanto do que pode ser útil, como do que pode ser nocivo como possíveis contaminantes inorgânicos, presentes em amostras dos cogumelos e do substrato exaurido, obtidas pelo processo de Fermentação no Estado Sólido usado no cultivo do *Pleurotus*.

A riqueza desses resíduos, a potencial valorização na produção de fungos comestíveis, principalmente do gênero *Pleurotus* spp. e a possibilidade do uso do substrato exaurido como fertilizante justificam a realização deste trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGO E COGUMELO

Os fungos são microrganismos eucariontes, aclorofilados, aeróbios. Todos os fungos são heterotróficos, assimilando as substâncias nutritivas por absorção após terem sido parcialmente degradadas por enzimas extracelulares. O reino fungi é subdividido em cinco classes: Chytridiomycetes, Oomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes e Basidiomycetes (SINGER, 1961; RAVEN, EVERT e CURTIS, 1978). Esses fungos desempenham um papel fundamental na reciclagem de carbono e de outros minerais encontrados em resíduos agro-industriais tais como: bagaço da cana-de-açúcar, palha de cereais, entulho das plantações de coco, palmeira, café, resíduos do algodão, jacinto d'água e o bambu (CHANG, 1981).

Os fungos crescem sobre a matéria orgânica, restos de vegetais e animais, assimilando-os e transformando-os em substâncias mais simples, passíveis de serem absorvidas pelos vegetais, permitindo assim a reciclagem dos elementos na natureza (BONONI, 1999).

Nos fungos é característica a presença de filamentos celulares, chamados hifas. O conjunto de hifas constitui uma espécie de tecido o micélio, que é responsável por todas as funções vegetativas do organismo. A membrana celular dos fungos é formada na maioria dos casos, por quitina e, em alguns outros, por celulose. (TRABULS, 1999).

Os fungos são importantes associações simbióticas de plantas vasculares em ambas as relações de mutualismo e parasitismo; constituem a avassaladora maioria dos patógenos de plantas e como tais possuem um tremendo impacto econômico; oferecem bons desenvolvimentos de sistemas genéticos para os biólogos moleculares (*Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*); e são cruciais para a fermentação e biotecnologia industrial (BRUNS, 1991).

Os cogumelos são os grandes fungos, isto é, formados por corpos grandes de frutificação classificados como Basidiomycetes (SINGER, 1995). Tecnicamente, segundo CHANG e MILES (1997), os cogumelos são corpos de frutificação distintos

que normalmente ocorrem em fungos da classe Basidiomycetes e, algumas vezes, na classe dos Ascomycetes.

De acordo com LINCOFF (1977), aproximadamente 50% dos cogumelos conhecidos são comestíveis, 18% medicinais, 10% venenosos e 22% permanecem com suas propriedades ainda indefinidas. Porém, o mais importante é o papel decompositor dos fungos na natureza, pois sem eles a reciclagem da matéria orgânica estaria prejudicada, dificultando as diversas formas de vida (STAMETS, 1995).

O cogumelo é um alimento de alto valor nutritivo com quantidades de proteínas quase equivalente a da carne, rico em vitaminas e de baixo teor de gorduras e carboidratos (CHANG, 1996). Entre aproximadamente 45.000 espécies descritas de cogumelos, cerca de 2000 são conhecidas como comestíveis, porém, apenas 25 são cultivadas e aceitas como alimento e somente 10 têm se tornado popular entre os países consumidores (BONONI, 1999).

No mercado brasileiro, pode-se encontrar mais freqüentemente o Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), Cogumelo do Sol ou Himematsutake (*Agaricus blazei* Murrill), Shiitake (*Lentinula edodes*) e Shimeji (*Pleurotus ostreatus*).

Além do seu alto teor de proteínas (18-32%) em base seca, algumas espécies são capazes de produzir certas substâncias com ação antitumoral (RIONDEL, 1981; CHANG, 1986; YANG, 1986). Sendo uma característica importante dos cogumelos a de possuírem compostos bioativos com propriedades medicinais, reconhecidas pelas culturas orientais, principalmente China e Japão (JONG e DONOVICK, 1982).

2.2 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Apesar do fato de que o papel da tecnologia moderna na civilização humana está melhorando e se expandindo cada dia mais, o ser humano ainda enfrenta três problemas básicos: escassez de alimento, contaminação ambiental e redução na qualidade de saúde, devido ao crescimento contínuo da população mundial. Atualmente 800 milhões de pessoas vivem na pobreza absoluta.

Por outro lado, tem-se observado que mais de 70% dos materiais de agricultura não são produtivos e têm sido desperdiçados nos processamentos. A cana

de açúcar representa apenas 17% do peso da biomassa da planta, enquanto que os 83% restantes são considerados bagaço rejeitado. Estes resíduos são geralmente queimados no local, enterrados ou deixados a céu aberto em lixões não planejados e sem controle. A Fundação ZERI do Brasil vem incentivando programas com a finalidade de evitar desperdícios (PAULI, 1997).

A matéria orgânica tem sido considerada há milênios como principal fator de fertilidade do solo. No Oriente, a prática da adubação orgânica realizada, pela restituição ao solo dos restos de cultura e pela incorporação de estercos e camas de animais, vem sendo realizada há muitos séculos (KIEHL, 1995). Esses resíduos são ricos em matéria orgânica, principalmente por celulose, hemicelulose e lignina denominados lignocelulósicos. Sua composição pode variar de acordo com o material, possuindo de 10 a 20% de lignina, 20 a 30% de hemicelulose e 50% ou mais de celulose (CHANG, 1980).

A celulose é o biopolímero mais abundante no planeta e o principal componente da parede celular das células vegetais. É um polímero linear de D-glucose ligadas por ligações glucosídicas, já a hemicelulose é um conjunto de polissacarídeos da parede celular que estão associados com a celulose e tecidos lignificados. É composta por vários açúcares como, hexoses, pentoses, ácidos urônicos e outros açúcares mais simples (RAJARATHNAM, 1992).

A lignina é um polímero de alto peso molecular, amorfo, tridimensional, heterogêneo, altamente interligado e de estrutura complexa (LIN, 1992). Sintetizada a partir de três precursores fenilpropanóides monoméricos: álcool sinapil, álcool coniferil e álcool cumaril. Estas unidades monoméricas são geralmente encontradas formando ligações covalentes (éter ou éster) com os polissacarídeos da parede celular (CHANG e MILES, 1998). Estas ligações são altamente resistentes à degradação química e poucos são os microrganismos que conseguem utilizar esta substância para a sua nutrição (CHANG e MILES 1998; MAZIERO 1990). A lignina é o segundo polímero mais abundante da biosfera.

Para RYPACEK (1966), os mais eficientes degradadores naturais de lignina são os fungos de podridão branca pertencentes à classe dos basidiomicetes e ascomicetes. Dependendo do tipo de podridão causada, os fungos podem ser divididos

em três grupos: fungos de podridão branca, fungos de podridão parda e fungos de podridão “mole”. Essa classificação deriva da coloração e do aspecto que as madeiras adquirem em fases avançadas de degradação.

Estes fungos também degradam celulose e hemicelulose e lignina. Sendo os únicos capazes de metabolizar completamente a molécula de lignina a CO₂ e água (CAPELARI, 1996).

Os fungos de podridão parda são basidiomicetes, nesta podridão a madeira adquire coloração amarronzada e consistência quebradiça. Na podridão parda os polissacarídeos são degradados, porém a lignina é apenas modificada, é necessária uma complexa interação de bactérias e fungos para a completa decomposição da lignina (CAPELARI, 1996).

Os causadores da podridão “mole” são principalmente ascomicetes e deuteromicetes que colonizam madeiras com excessiva umidade (RYPACEK, 1966).

Os basidiomicetes, formadores de cogumelos comestíveis, do grupo dos fungos da podridão branca, estão adaptados para se desenvolver sobre uma ampla variedade de resíduos lignocelulósicos que incluem diversos materiais como palhas de cereais, serragem e pedaços de madeiras, bagaços, resíduos de algodão e outros. (CHANG, 1989; CHANG, 1997 e KOHARI, 1997).

Os fungos da podridão branca, *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju*, apresentam um complexo enzimático que os tornam capazes de atuar sobre os principais componentes estruturais dos materiais lignocelulósicos, porque, produzem basicamente duas enzimas extracelulares: manganês peroxidase e lacase que têm sido associadas à despolimerização da molécula da lignina (CHANG, 1989; CHANG, 1997).

O *Pleurotus sajor-caju* é considerado um fungo comestível bastante versátil, que cresce sobre uma ampla variedade de resíduos agrícolas de diferentes composições (RAJARATHNAM, 1989 e CHANG, 1997).

A utilização de substratos lignocelulósicos por fungos comestíveis é dependente da produção e secreção de enzimas (celulases, hemicelulases e ligninases) que atuam sobre as moléculas de celulose, hemicelulose e lignina, liberando compostos de baixo peso molecular utilizados como nutrientes para o crescimento dos

fungos (CHANG, 1989; ZIMMERMANN, 1990; RYPACEK, 1996).

Alguns fungos principalmente o cogumelo *Phanerochaete chrysosporium* e o *Gloephyllum* sp. podem ser usados para a descontaminação de ambientes, num processo chamado de biorremediação (STAMETS,1995).

A palha de trigo é o substrato mais tradicional para o cultivo do *Pleurotus* na Europa. A produtividade alcançada por este substrato é boa o suficiente para não precisar de complementos para a elaboração do composto. A palha de arroz também é usada em grandes quantidades para o cultivo deste cogumelo, o sabugo de milho é usado em alguns países segundo HADAR (1992); BONONI (1999) e KOHARI (2000).

2.3 PLEUROTUS

O *Pleurotus* tem um histórico de cultivo recente, pois foi somente no início deste século que os alemães, à procura de uma fonte opcional de proteína para o período de guerra, desenvolveram o seu cultivo em troncos de árvores, simulando o *habitat* natural (LABORE e DELMAS, 1974).

Após a Segunda guerra mundial, é que teve início a utilização de serragem como substrato. LOHWAG (1952) investigou a possibilidade de se cultivar fungos decompositores de madeira em serragem e ressaltou que o *Pleurotus ostreatus* era o que havia se desenvolvido melhor. BLOCK (1959), por sua vez, à procura de uma utilização econômica da serragem, que era um resíduo muito comum na época incrementou o cultivo misturando farelo de aveia ou farelo de soja à serragem para a obtenção de uma melhor produtividade.

Segundo HOLMES (1983) o gênero *Pleurotus* está assim classificado:

REINO: Fungi

DIVISÃO: Eumycota

SUBDIVISÃO: Basidiomycotina

CLASSE: Hymenomycetes

ORDEM: Aphyllophorales

FAMÍLIA: Polyphoracea

GÊNERO: *Pleurotus*

ESPÉCIE TIPO: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer

2.3.1 Morfologia

O corpo de frutificação do *Pleurotus* possui duas estruturas básicas: o píleo (chapéu) e o estipe (pé ou talo) que estão apresentados na FIGURA 1.

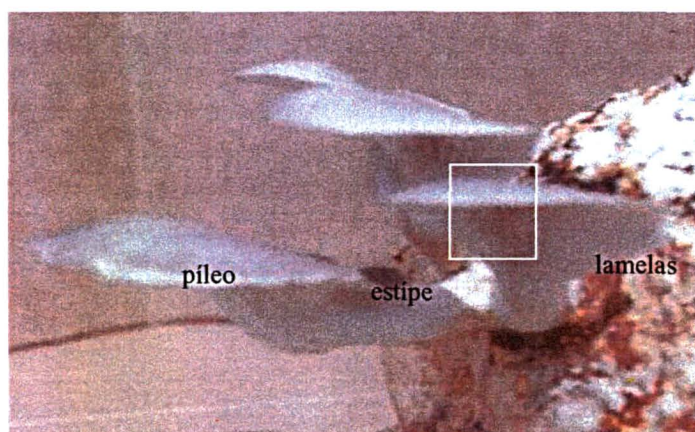


FIGURA 1 – Carpóforos do *Pleurotus* spp

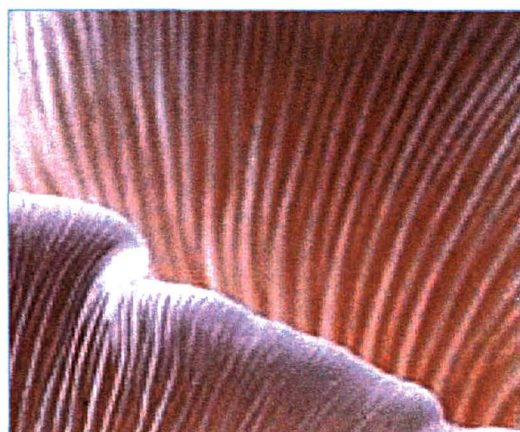


FIGURA 2 - Lamelas do carpóforo

O *Pleurotus* é um cogumelo grande, com chapéu de 6-8 cm de diâmetro com pé e talo longo e grosso de 4-5 cm de comprimento com formato de uma folha carnuda e nasce em pencas (FERREIRA, 1998).

O corpo de frutificação apresenta uma morfologia semelhante a ostra, por esta razão, estes fungos são geralmente denominados de cogumelo ostra (ZADRAZIL, 1978, RAJATHNAM e BANO, 1987).

As lamelas (Figura 2), originam-se próximas à porção distal do ponto de inserção do estipe se prolongam por toda a região inferior do píleo (DELMAS, 1989).

Para RAJARATHNAM e BANO (1987) e STAMETS (1995), estes cogumelos não possuem anel nem volva, algumas cepas formam corpos de frutificação em cachos; outras formam corpos de frutificação individuais.

2.3.2 *Pleurotus pulmonarius* e *Pleurotus sajor-caju*

Segundo STAMETS (1995), O cogumelo *Pleurotus pulmonarius* foi publicado pela primeira vez como *Agaricus pulmonarius* Fr. em 1821. Similar para *P. ostreatus* Jacq.:Fr. Kummer, e *P. populinus* Hilber.

De acordo com HILBER (1982), as tentativas de melhoramento genético das diversas linhagens levaram a uma descaracterização de muitas delas. Quando realizou testes de interfertilidade do *Pleurotus sajor-caju* com *Pleurotus pulmonarius*, o autor concluiu que o cogumelo comestível cultivado sob a denominação de *Pleurotus sajor-caju* era na verdade, o *Pleurotus pulmonarius*. Além disso, a descrição original da espécie não corresponde com a descrição do cogumelo que ora é comercializado sob esta designação (MAZIERO, 1990).

Segundo STAMETS (1995), as coleções da América do Norte mostram uma maior variedade de cores que as coleções da Europa. Dado a sua grande variedade de cores o *P. pulmonarius* hospeda uma larga complexidade de variedades, oferecendo aos cultivadores recursos para novas cepas. Muitas dessas cepas frutificam em cultura.

Essas espécies podem ser separadas por uma combinação de “*habitat*”, e aspectos macroscópico e microscópico. *P. pulmonarius* e *P. populinus* ambos compartilham a preferência por *aspen* (*Populus tremula*). *P. pulmonarius* geralmente apresenta uma pigmentação mais escura e tem esporos normalmente não maior que 10 μ de comprimento.

Nomes comuns: Indian Oyster, Phoenix Mushroom, “*Pleurotus sajor-caju*” (mal empregado pelos cultivadores).

Apesar das observações acima elaboradas devemos ressaltar que neste trabalho a denominação *Pleurotus sajor-caju* será mantida, pois dentro da área de cultivo de cogumelos este é o nome comumente utilizado.

Conforme EGER (1978), a taxonomia do gênero *Pleurotus* foi baseada na morfologia e afinidade entre as espécies. Atualmente, técnicas mais avançadas estão sendo adotadas, como estudos eletroforéticos de isoenzimas e análise de DNA na sistemática de fungos, na tentativa de esclarecer a taxonomia (RAJARATHNAM, 1987).

No Brasil existem muitas espécies nativas de *Pleurotus*, a maioria ainda não estudadas. São popularmente denominados de cogumelos ostra (devido à morfologia de seus píleos), cogumelos gigantes, caetetuba (MOLENA, 1986) e na colônia japonesa, hiratake (KOHARI, 2000).

Segundo YANG (1986), existem mais de 100 espécies no mundo, dentre as quais 14 cultiváveis. As principais espécies cultivadas são: *P. ostreatus*, *P. citrinopileatus*, *P. pulmonarius* / *P. sajor-caju*, *P. cystidiosus*, *P. sapidus*, *P. abalonus*, *P. salmoneo-stramineus*, *P. ferulae*, e *P. florida*.

2.3.3 Ciclo de vida

No cultivo do *Pleurotus* podem ser observadas duas fases: a fase vegetativa que corresponde à colonização do substrato e a fase reprodutiva onde são observados os corpos de frutificação e a liberação dos basidiósporos.

2.3.3.1 Fase vegetativa

A fase vegetativa é constituída pela união de pequenas células chamadas hifas, geradas pela multiplicação dos esporos. Estes se localizam nas duas faces da lamela. As hifas tem grande poder de multiplicação e originam diversas ramificações, que se entrelaçam em várias direções. Durante a colonização do substrato, o fungo secreta enzimas que degradam moléculas orgânicas de alto peso molecular em compostos orgânicos solúveis que são utilizados para a nutrição do microrganismo. Deste processo resulta o crescimento do micélio com formação de novas hifas que passam a colonizar todo o substrato.

Na fase vegetativa do cultivo artificial, o substrato pasteurizado é inoculado com “spawn” (semente feita com o micélio do *Pleurotus* mantida em grãos de cereais ou serragem). Após cerca de 20 a 30 dias, o substrato está totalmente coberto pelo micélio de coloração branca e com aspecto de algodão pronto para ser usado (CHANG, 1986; BONONI 1999; YANG 1986; FAN 1990).

2.3.3.2 Fase reprodutiva

A fase reprodutiva corresponde ao surgimento dos carpóforos. É a fase onde são observados os corpos de frutificação e a liberação de basidiósporos.

A diferenciação do micélio vegetativo em primórdios de corpos de frutificação é difícil de ser observada, uma vez que este gênero do basidiomicete não possui volva e anel. Acredita-se que a mudança nas condições de estímulos ambientais como umidade, luminosidade, temperatura e aeração favoreçam o aparecimento dos primórdios de frutificação que são semelhantes a cabeças de alfinete e representam os micélios. Estes não aumentam em tamanho e a porção aderente ao substrato torna-se delgada representando o estipe do cogumelo. A extremidade distal alarga-se e forma o píleo com margens lisas e planas. Quando o desenvolvimento do corpo de frutificação se completa, os esporos começam ser liberados e o cogumelo inicia o processo de desidratação (BONONI,1999).

Na natureza, os esporos lançados das lamelas dos carpóforos, ao encontrarem um material lignocelulósico como pedaços de madeira ou troncos de árvores, germinam e passam a formar o micélio o qual coloniza o substrato da mesma forma. (ZADRAZIL, 1978).

A reprodução sexuada ocorre através de esporos que são formados em estruturas chamadas basídios, localizados nas lamelas. Quando os esporos ficam maduros são liberados, podendo ser dispersos pela água da chuva, por insetos ou pelo vento.

Encontrando local favorável, onde existam matéria orgânica e umidade, começam a germinar e a produzir hifas. Essas hifas crescem e se multiplicam. Ao conjunto de hifas formadas damos o nome de “micélio primário”. Quando hifas compatíveis, provenientes de dois esporos com cargas genéticas diferentes (equivalentes a um masculino e um feminino) se encontram, em condições de umidade, temperatura e matéria orgânica favoráveis, elas se fundem, formam um zigoto ou ovo, que dará origem ao “micélio secundário”.

O micélio secundário possui núcleos provenientes dos dois esporos pais. As hifas do micélio secundário crescem, multiplicam-se, ramificam-se e vão constituir um

novo cogumelo. Portanto, o cogumelo que observamos e comemos é todo formado pelo micélio secundário.

A reprodução assexuada ocorre por proliferação de qualquer parte do cogumelo, ou seja, do micélio secundário. Por exemplo, quando um animal ou homem quebra um cogumelo, esses fragmentos, caindo em local favorável, poderão dar origem a novos cogumelos.

Para a produção da matriz ou micélio de cogumelos, em laboratório, procura-se imitar o que acontece na natureza (BONONI, 1983; 1999 e KOHARI, 2000).

2.3.4 Situação de cultivo no mundo

O *Pleurotus* foi cultivado em palha de cereal pela primeira vez por FALCK em 1917 (ZADRAZIL, 1984). Os principais países produtores de *Pleurotus* são China, Coréia do Sul, Itália, Taiwan, Alemanha e França (OLIVER, 1991). Também são cultivados em alguns países da África como Quênia, Zimbábue e África do Sul [36]. Japão, Tailândia, Vietnã e Estados Unidos também produzem *Pleurotus* (ROYSE, 1992).

Em 1994, foram produzidas 797.000 toneladas de *Pleurotus* (CHANG, 1977). A China foi responsável por 82% da oferta do mundo. Nos Estados Unidos, a produção de *Pleurotus* foi de 777 toneladas em 1995, 12% menos que no ano anterior. No Japão a maior produção de *Pleurotus* foi aproximadamente 36.000 toneladas em 1989, produzindo 24.000 toneladas em 1993 (ROYSE, 1996).

Com relação ao Brasil, o consumo de cogumelos é baixo. A produção nacional é cerca de 130 toneladas por ano (base 1995) de *Pleurotus* e o cultivo é artesanal. Os maiores produtores de cogumelos são os Estados do Rio de Janeiro e São Paulo (BARBOSA, 1996).

O mercado brasileiro está aderindo a este tipo de alimento. O crescente consumo está associado principalmente ao agradável sabor e aroma que confere aos pratos na culinária e recentemente pela busca de produtos "naturais", isento de agrotóxico e conservantes, com elevado teor protéico e vitamínico e com propriedades terapêuticas (FAN, 1996).

2.3.5 Composição Química dos Corpos de Frutificação

2.3.5.1 Água

Os frutos frescos contêm em média 80 a 90% de água (YANG, 1986). Este nível de água é necessário para manter a concentração osmótica na presença de compostos osmoticamente ativos que estão em quantidades significativas nas células do fungo. O alto conteúdo de água nos basidiocarpos é também justificado para auxiliar a geração e a descarga de basidiósporos segundo BARBOSA (1996).

2.3.5.2 Carboidratos e fibras

Os carboidratos representam a maior parte do peso seco dos cogumelos, sendo 26,8-44,4% no qual 14,5-21,2% é solúvel (YANG, 1986). As espécies contêm 1,7% de pentosanas e 32,3% hexosanas em base seca. O glicogênio também foi encontrado como fonte de armazenamento de energia. Os basidiomicetos possuem um polímero de N-acetilglucosamina (quitina fúngica) presente na parede celular da célula destes fungos (BANO, 1988).

As fibras variam de 7,4-27,6% nas diferentes espécies de *Pleurotus* atualmente, o teor de fibra fúngica comestível tem sido considerado importante na dieta humana por nutricionistas (WANG, 1993).

2.3.5.3 Proteínas e aminoácidos livres

Com relação aos cogumelos, 60 a 70% das proteínas são digeríveis (BANO, 1988). YANG (1986) verificou que *Pleurotus* contém 2,8 - 6,05% de nitrogênio total, por isso o teor de proteína entre 12,26 - 26,50%. CHANG (1981) indicou que no *Pleurotus* os aminoácidos essenciais ocupam 35,8%, sendo leucina 7,6%, valina 5,9%, treonina 5,1%, lisina 5,0%, isoleucina 4,9%, fenilalanina 4,2%, metionina 1,7% e triptofano 1,4%.

2.3.5.4 Lipídios

O conteúdo de lipídios de diferentes espécies de *Pleurotus* varia de 1,08-9,40% em base seca. O teor médio de lipídios encontrado nesta espécie de cogumelos foi de 2,85%. De acordo com o mesmo autor, os ácidos graxos livres, mono-, di- e triglicérides, esteróis, ésteres e fosfolipídios integram o teor de lipídios total. Dentre os ácidos graxos estão presentes o ácido oleico, palmítico e linoleico (RAJARATHNAM, 1987).

2.3.5.5 Vitaminas e minerais

O *Pleurotus* contém 0,4 mg da vitamina B₁ e 10,7 mg ácido nicotínico por 100 g do cogumelo fresco. LAU (1985) reportou que a vitamina C contém 7,4 mg/100g em base seca. HUANG (1985) descreveu ainda a presença de provitamina-D₂, provitamina-D₄ e γ -ergosterol em 0,13, 0,09 e 0,07%, respectivamente.

No cogumelo *Pleurotus* o teor de cinza ocupou 4,36% em base seca, nos quais K₂O, 64,25%; P₂O₅, 22,907%; MgO, 3,825%; Na₂O, 2,925%; Fe₂O₃, 2,56%; SO₃, 1,973%; CaO, 0,416% (FAN, 1996).

2.3.5.6 Componentes aromáticos

Os cogumelos comestíveis são conhecidos por seu único e sutil aroma. A composição e a quantidade de componentes do aroma podem variar entre as espécies e também podem ser influenciados por diferentes condições de cultura.

O álcool insaturado 1-octen-3-ol (composto volátil) é considerado o maior colaborador para o aroma característico presente na maioria das espécies de cogumelos comestíveis (EGER, 1978).

Através da análise de cromatografia e espectrofotometria de massa, GROSS e ASTHER (1988) encontraram nos extratos de cultivos submersos de *Pleurotus*, cerca de 40 compostos voláteis entre eles benzaldeído, acetofenona e cumarina que conferem um odor floral; compostos terpênicos: linanol, óxido de linanol e alfa-terpineol; álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas alifáticas.

2.3.6 Exigências de Cultivo

Fatores físicos e nutricionais são de vital importância para a produção de *Pleurotus* spp. As câmaras ou estufas onde os cogumelos são cultivados devem possuir iluminação adequada, níveis satisfatórios de oxigênio e taxas de dióxido de carbono inferiores a 1% para que possam ser produzidos cogumelos de tamanho uniforme para melhor comercialização (STAMETS, 1995).

2.3.6.1 Água

É indispensável para crescimento de micélio e formação de carpóforo uma vez que o mesmo contém 90% de água. A umidade do substrato deve ter cerca de 65% para o crescimento satisfatório de micélio (YANG, 1986). Porém, um excesso de umidade no substrato pode impedir as trocas gasosas do micélio ou proporcionar a proliferação de antagonistas e parasitas. A umidade no ar deve ser entre 85-95% para que ocorra frutificação (YANG, 1986).

2.3.6.2 Fonte de carbono

Carbono é uma fonte fundamental no meio de cultura para formar a estrutura da célula fúngica. O carbono pode ser obtido de polissacarídeos, monossacarídeos, ácidos orgânicos, aminoácidos, álcoois, compostos policíclicos, celulose, hemicelulose e lignina.

No resíduo vegetal as fontes principais são os polissacarídeos e a lignina. Outros compostos como lipídeos e proteínas também podem ser utilizados. Muitos estudos demonstraram que glicose, galactose, manose e frutose favorecem mais o crescimento de *Pleurotus* que arabinose e a xilose (YANG, 1986).

Durante o crescimento de micélio há um aumento de monossacarídeos redutores e após a frutificação há uma redução. A perda destes açúcares redutores provavelmente está associada à necessidade de energia para a formação dos corpos de frutificação (RAJARATHNAM, 1987). Outras fontes de carbono que poderiam ser utilizadas pelo *Pleurotus* são os óleos e ceras também presentes nos resíduos vegetais

(KOHARI, 2000).

2.3.6.3 Nitrogênio

A madeira, substrato natural do *Pleurotus*, não possui um conteúdo de nitrogênio muito alto. Portanto, teoricamente a necessidade deste nutriente por parte deste fungo não deveria ser muito grande. Mesmo assim, vários estudos foram realizados para se verificar a influência deste no crescimento e na produção de corpos de frutificação, resultados verificados por MAZIERO (1990).

GINTEROVÀ e LAZAROVÁ (1975) defendem a habilidade do *Pleurotus* em fixar nitrogênio atmosférico transformando-o em compostos orgânicos, pois alguns experimentos realizados em substratos não estéreis mostraram que o conteúdo total de nitrogênio aumentava.

KURTZMAN (1979) discutiu a provável impossibilidade de um organismo eucariota fixar nitrogênio, apesar de seus resultados demonstrarem também um aumento no conteúdo deste elemento após o crescimento do *Pleurotus*. O autor sugeriu a hipótese de que os esporos de bactérias fixadoras de nitrogênio são estimuladas a se desenvolver durante o processo de pasteurização gerando as bactérias responsáveis pela fixação do nitrogênio. Segundo CHANG (1993) não existe fungos que fixem o nitrogênio naturalmente. A fixação do nitrogênio se limita aos organismos procariontes. De acordo com DANAI (1989) o conteúdo de 1.0 – 1.5 % de nitrogênio é o mais recomendado para o crescimento do *Pleurotus* confirmando a hipótese de KAMRA e ZADRAZIL (1988) que um alto teor de nitrogênio no substrato não possibilita um bom crescimento do *Pleurotus*.

2.3.6.4 Relação de Carbono e Nitrogênio (C/N)

A relação C/N do substrato para o cultivo do cogumelo é extremamente importante (STAMETS, 1995). Se esta relação for inadequada, a colonização do substrato será lenta, e estará sujeita à contaminação e a frutificação será de baixo rendimento (MANU-TAWIAH, 1988).

A relação C/N de 12:1 a 16:1 para o cultivo do gênero *Pleurotus* em

substratos à base de rejeitos lignocelulósicos favorece maior eficiência biológica (CHANG, 1989).

Segundo KIEHL (1985), o fumo apresenta uma relação Carbono / Nitrogênio de 18:1.

A relação C/N da amostra do resíduo de fumo da Empresa de Hidrossemeadura Conspizza é de 16.83 : 1 (PEDROSO,2000).

2.3.6.5 pH

Sendo o pH da madeira, *habitat* natural do *Pleurotus*, ao redor de 5,0 a 6,0, é de se esperar que este valor seja o ideal para o fungo MAZIERO (1990).

O pH de crescimento normal de micélio de *Pleurotus* spp., é entre 3 a 7,5. No decorrer da colonização do substrato pelo *Pleurotus*, o substrato torna-se ácido resultante do metabolismo do fungo CHANG (1989). Mas a acidez final de substrato varia entre as espécies. O mesmo autor sugere que na preparação de substrato, o pH tem que ser ajustado a níveis elevados para melhor produção do fungo.

Não existe um consenso no valor ideal de pH. O *Pleurotus* spp., tende a mudar o pH onde está colonizando, no entanto, no final da colonização há um equilíbrio e o pH permanece constante, supõe-se então que este seja o pH ideal para a linhagem (KURTZMAN, 1984).

2.3.6.6 Lipídeos, sais minerais e vitaminas

Provavelmente os lipídeos são utilizados durante a formação do corpo de frutificação. De acordo com o mesmo autor o ácido graxo insaturado encontrado em maior proporção nos carpóforos é o ácido linolênico (NAIR, 1989).

Os sais de enxofre, fósforo, potássio, magnésio estimulam o crescimento de *Pleurotus* spp, Os sais de cálcio, cobre, ferro, manganês, molibdênio e zinco são os elementos traços que podem suplementar um meio de cultivo para estes cogumelos. Com relação às vitaminas, biotina e tiamina são as mais indicadas para serem incorporadas ao cultivo (CHANG, 1989).

2.3.6.7 Temperatura

A influência da temperatura, tanto no crescimento quanto na produção dos corpos de frutificação depende da espécie e das linhagens utilizadas, ou seja, cada espécie ou linhagem deve se encontrar dentro de uma temperatura ideal para o bom funcionamento e metabolismo do fungo segundo KOHARI (2000).

A temperatura para a formação de esporo de *Pleurotus* é ideal na faixa de 12 a 20°C, para a germinação do esporo é de 24 a 28°C e para o crescimento do micélio varia entre 3 e 35°C (YANG, 1986).

2.3.6.8 Luz

Não há necessidade de luz, para o crescimento do micélio de *Pleurotus* spp., porém, para formação do primórdio e desenvolvimento de carpóforos há necessidade CHANG (1989). O mesmo autor indicou que quando falta luz, a estipe torna-se comprida demais e ocorre deformação no chapéu; a escuridão total prejudica a formação dos primórdios deste fungo, porém a luz forte também atrapalha o desenvolvimento de frutificação deste fungo (BONONI, 1999 e YANG, 1986).

2.3.7 Tecnologia do Cultivo de *Pleurotus*

O cultivo de cogumelos comestíveis é uma tecnologia rentável na conversão de resíduos lignocelulósicos provenientes das agroindústrias. As espécies do gênero *Pleurotus* são capazes de oxidar o complexo polissacarídeo-lignina de resíduos de cereais sem tratamento químico prévio ou biológico nem exige compostagem como os cogumelos do gênero *Agaricus* (YANG, 1986 e SAVOI, 1994). Este método foi denominado Fermentação no Estado Sólido (FES) (GUIMARÃES, 1998 e SOCCOL, 1994).

Esse tipo de fermentação tem sido amplamente usado na Ásia para produção de alimentos fermentados, de queijo maturado e na compostagem de resíduos sólidos, produção de enzimas (amilases, proteases, pectinases e outras), produção de ácido cítrico, ácido L (+) láctico, etanol, giberelinas, antibióticos, toxinas, alcalóides e

aromas, além de produção de fungos comestíveis (SOCCOL, 1994; GUIMARÃES, 1988 e FAN, 1996).

O cultivo do *Pleurotus* é basicamente o mesmo para todas as linhagens, com exceção das temperaturas de frutificação.

Cultivos de *Pleurotus* pode ser dividido nas seguintes etapas: preparação do “spawn” (semente), compostagem ou fermentação; pasteurização; semeadura; incubação; produção e colheita (BONONI, 1999).

2.3.7.1 Manutenção das cepas

No laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Biológicos do Instituto de Tecnologia do Paraná as cepas de *Pleurotus* são mantidas em agar batata dextrose (BDA) sob refrigeração a 4 a 6 °C e repicadas semestralmente, de acordo com MANUTAWIAH (1988) e BONONI (1999). Para se preparar o “spawn” ou fazer o repique da cepa, o inóculo deve ser retirado da colônia de crescimento ativo que foi mantida no escuro em temperatura de 20 a 24°C por 5 a 6 dias, e colocado no centro da placa de Perto contendo o novo meio de cultivo. Após uma semana, o meio de cultura deverá estar coberto pelo micélio do fungo inoculado. O aspecto desse micélio é semelhante a um chumaço ralo de algodão branco. Se o aspecto for granuloso, esverdeado ou amarelado, significa que houve contaminação e a cultura deverá ser desprezada (BONONI, 1985).

2.3.7.2 “Spawn”

“Spawn” é definido como o meio através do qual o micélio de uma cultura cresceu e serve como semente ou inóculo para o substrato no cultivo de cogumelos. O inóculo, semente ou “spawn” é preparado em grãos de cereais ou serragem ou outros resíduos agro-industriais. O “spawn” é incubado em estufa a 24° C. Após colonização pelo micélio, o spawn está pronto para ser transferido ao substrato (CHANG, 1989).

2.3.7.3 Pasteurização e esterilização

A pasteurização é o tratamento térmico feito pela passagem de vapor de água através do composto. O objetivo da pasteurização é eliminar os microorganismos presentes no composto, que podem ser agentes competidores pela colonização do substrato, pois disputarão o mesmo alimento com o fungo inoculado, limitando o crescimento deste, ou então, agentes patogênicos. Geralmente, estes microorganismos competidores ou patogênicos da cultura do *Pleurotus* morrem quando expostos à temperatura superior a 55 °C por mais de 12-15 horas (YANG, 1989).

O cultivo também pode ser feito em substrato estéril. A esterilização é feita em autoclaves, elevando-se a temperatura à 121°C por 1-2 horas. Este processo é muito dispendioso para um cultivo industrial, mas em nível experimental é de muita importância, pois permite que se tenha absoluta certeza da ausência de outros microorganismos no substrato (BONONI, 1985).

2.3.7.4 Semeadura

O cultivo de *Pleurotus* pode ser de várias formas, sendo que a mais tradicional e a mais comum são a utilização de embalagens de polietileno (saquinhos plásticos de 35 x 20 cm), de preferência transparentes, pois facilitam a visualização do crescimento do micélio, além de possibilitar a localização de áreas de contaminação. O modo de vida natural do *Pleurotus* é de se desenvolver em superfícies verticais e não horizontais. Portanto, para se ter a formação de cogumelos com estética perfeita, é preciso que se respeite a posição de seu desenvolvimento.

A distribuição uniforme da semente no composto facilita a colonização do substrato e garante maior defesa contra o crescimento de contaminantes.

Após o ensacamento e inoculação, os saquinhos plásticos são fechados. Alguns produtores perfuram os saquinhos para que a colonização seja mais rápida. Como o *Pleurotus* resiste bem a altas taxas de CO₂ e como o perfuramento dos saquinhos plásticos significa maior probabilidade de contaminação, pois expõe o composto antes deste ser colonizado, recomenda-se que o procedimento de perfuração não seja realizado, salvo em condições de controle eficiente do nível de contaminação

da sala de incubação (FAN, 1990).

2.3.7.5 Incubação

Durante a fase de incubação, o micélio se desenvolve e coloniza todo o composto, formando uma massa branca e compacta. É um processo complexo, caracterizado por intensa atividade biológica, onde o micélio degrada o composto e retira os nutrientes, predispondo o fungo à frutificação (BONONI, 1985).

As moléculas de celulose, hemicelulose e lignina do composto são atacadas pelas enzimas do fungo, tais como a celulase e a lactase, que reduzem estas moléculas a fenóis e açúcares simples mais facilmente assimiláveis (RAJARATHNAM, 1989). Esta atividade enzimática perdura desde o início da colonização até à produção dos cogumelos, sendo que durante o período de crescimento do micélio a produção enzimática é maior .

A temperatura ideal para a incubação varia de acordo com a espécie, em média, para se obter uma colonização completa do substrato pelo micélio, o período de incubação será em torno de 15-20 dias, ou seja, após este período o composto deverá estar todo envolvido pelo micélio. Durante o processo de incubação não é necessário haver iluminação. O fator mais importante desta fase é a temperatura que deverá ser mantida em torno de 20 – 22 °C não sendo aconselhável amontoar os saquinhos (BONONI, 1999).

2.3.7.6 Produção e colheita

O final do período de incubação é caracterizado pela colonização total do substrato pelo micélio. Neste instante os saquinhos devem ser abertos e transferidos da sala de incubação para a sala de frutificação onde a temperatura deve estar entre 24 a 26°C e a umidade 85%, a abertura dos saquinhos pode ser feita de várias formas, sendo mais comum a retirada da camada plástica de uma das extremidades, expondo somente parte do composto colonizado. Pode-se também retirar todo o saquinho plástico. Com a abertura dos saquinhos ocorrem mudanças físicas, tais como trocas gasosas, umidade e luminosidade. A mudança súbita das condições físicas externas

estimula a formação dos primórdios, que se desenvolverão formando os corpos de frutificação (YANG, 1986).

Após a formação dos primórdios, a umidade relativa deve ser diminuída um pouco (por volta de 80%) para assegurar a qualidade dos cogumelos. Em torno de 4 a 7 dias os cogumelos estarão prontos para a colheita, dependendo da espécie e do substrato.

Algumas espécies de *Pleurotus* crescem em “cachos”, ou seja, vários cogumelos unidos na base do pé. É importante que a colheita seja de todo o cacho, que deve ser retirado, mesmo que haja alguns cogumelos ainda pequenos (CHANG, 1989). Para saber o momento certo para se colher o cogumelo, é preciso observar as margens do chapéu. Quando estas estiverem planas, é preciso que sejam colhidos, caso contrário, haverá a liberação dos esporos, que cairão sobre os cogumelos e, desta forma, perde-se em valor comercial, devido a má aparência resultante e envelhecimento dos cogumelos (YANG, 1986).

A manutenção da umidade deve ser feita durante todo o tempo para evitar o ressecamento do micélio, do composto e principalmente do cogumelo.

Durante o crescimento do cogumelo a temperatura também tem grande influência. Se muito alta, haverá a maturação precoce ou a morte do cogumelo; por outro lado, se muito baixa, retardará o desenvolvimento deste por vários dias (CHANG, 1989).

2.4 APLICAÇÃO DO SUBSTRATO EXAURIDO

Geralmente, após o cultivo dos cogumelos, os produtores eliminam o substrato exaurido, às vezes não sabendo da aplicabilidade desse substrato, principalmente como fertilizante orgânico (WANG, 1993 e CHANG, 1980), condicionador do solo (ATTHSANPUNNA, 1994), substrato para plantas ornamentais (CHONG, 1994), substrato para mudas de hortaliças (WANG, 1993).

Por ser submetido a uma fermentação por fungos do gênero *Pleurotus*, também pode ser utilizado no tratamento de solos infestados de nematóides (controle biológico), pois este gênero possui a capacidade predatória sobre estes helmintos

(BARRON, 1986).

O substrato degradado por algumas espécies de *Pleurotus* poderia ser explorado para a produção do próprio papel e papelão por apresentar um conteúdo de lignina 40-50% menor que outros resíduos lignocelulósicos. O processo seria realizado a custos menores quando comparado ao processo convencional e a poluição ambiental seria diminuída com a redução do uso de reagentes químicos que são empregados na biopulpação e branqueamento (SERMANNI, 1994 e HADAR, 1992).

O substrato após fermentação pode ser reciclado em composto para cultivo de *Agaricus* (RAJARATHNAM, 1989 e ZADRAZIL, 1984). Outras aplicações do substrato fermentado seriam para produção de enzimas, produção de biopolímeros de alta viscosidade com aplicação nas indústrias e cosmética. Podendo também ser destinado à geração de biogás por apresentar-se com sacarificação (RAJARATHNAM, 1989; BANO, 1993 e MEHTA, 1990).

O composto exaurido também pode ser utilizado como ração animal (GAMBLE, 1994 e ORTEGA, 1986) e ainda, pode ser utilizado em processos de bioremediação e limpeza de águas e solos contaminados com poluentes orgânicos (CHANG, 1997).

2.5 FERTILIZANTES

A preocupação por parte de todos os países com a vulnerabilidade do sistema de produção agrícola baseado no uso irracional de insumos modernos, vem levando todos a aderirem ao movimento em prol da agricultura sustentável onde a matéria orgânica é considerada como o principal fator de fertilidade do solo.

No oriente, a prática da adubação orgânica realizada pela restituição ao solo dos restos de cultura e pela incorporação de esterco é realizada há muitos séculos. Para que a matéria orgânica possa fornecer nutrientes às plantas necessita sofrer um processo de decomposição microbiológica, acompanhado da mineralização dos seus constituintes orgânicos (KIEHL, 1985).

Com o intenso manuseio do solo para fins agrícola é preciso sempre considerar o problema de seu empobrecimento quando medidas de reposição de

nutrientes e matéria orgânica não são adotadas (COSTA, 1994).

2.5.1 Macronutrientes

Segundo KIEHL (1985), os parâmetros para classificar as matérias-primas quanto a quantidade de macronutrientes são: fósforo com teor abaixo de 0,5 % de P_2O_5 é considerado baixo, com teor entre 0,5 a 1,5 % médio e com teor acima de 1,5% alto, potássio com teor inferior a 0,5% de K_2O baixo, com teor entre 0,5% e 1,5% médio e com teor maior que 1,5% alto, cálcio com teor inferior a 1,5% baixo, com teor entre 1,5% e 3,0% médio e com teor maior que 3,0 alto, magnésio com teor inferior a 1,5% baixo, com teor entre 1,5% e 3,0% médio e com teor maior que 3,0% alto, enxofre o autor considera que a relação nitrogênio enxofre (N/S) é semelhante à relação nitrogênio/fósforo (N/P), o que significa que a quantidade de enxofre no solo é mais ou menos igual à de fósforo.

2.5.2 Micronutrientes

Micronutrientes são os elementos químicos essenciais que as plantas necessitam em pequenas quantidades. Os elementos considerados micronutrientes são os seguintes: ferro (Fe), cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn), boro (B), molibdênio (Mo) e cloro (Cl). As principais fontes de micronutrientes para as plantas são os minerais e a matéria orgânica. Alguns desses elementos são tão pouco solúveis que na ausência do húmus, apesar das mínimas quantidades que as plantas necessitam, podem causar sintomas de deficiência. Através de reações de troca ou de mecanismos de complexação ou de quelação (KIEHL,1985).

2.5.2.1 Metais pesados

Metais ou metabólitos estão associados com poluição e toxicidade, mas também incluem alguns elementos que são essenciais para os seres vivos quando em baixas concentrações. Metais tóxicos é uma alternativa ao termo metais pesados sendo aplicável somente aos elementos não essenciais, como Pb, Cd, Hg e, não é apropriado

para os elementos que são biologicamente essenciais, como Co, Cu, Mn, Se e Zn (ALLOWAY, 1993).

Segundo GLÓRIA (1973) em geral quando a presença de metal pesado no resíduo não é excessiva e o pH do solo é mantido elevado (pH = 6,5) é possível a utilização do resíduo, mantendo-se, porém, uma atenção especial às doses aplicadas em função dos teores dos metais pesados existentes.

Conforme ALLOWAY (1993), o cádmio é uma descoberta relativamente recente, tendo sido descrito e descoberto em 1817, está em 67º lugar na ordem de abundância de elementos. Não possui função biológica e é altamente tóxico á plantas e animais, no entanto, os níveis naturais de Cd encontrados normalmente não causam toxicidade aguda. O maior risco á saúde humana provém da sua acumulação crônica nos rins, onde podem causar disfunção no córtex em concentrações acima de 200 mg/ Kg.

Como resultado da necessidade crescente do Cd pela indústria, a poluição ambiental deste elemento tem aumentado rapidamente nas últimas décadas. As fontes de contaminação do solo pelo Cd são a mineração e fusão do Cd e Zn; poluição atmosférica de indústrias metalúrgicas; disposição de lixo contendo Cd, como a incineração de *containers* plásticos e baterias.

O cobre é considerado um dos elementos essenciais mais importantes para plantas e animais. Os usos principais do Cu são na produção de fios e de suas ligas, bronze e latão. Na natureza o cobre forma sulfeto, sulfatos, carbonatos e outros compostos, e também ocorre, em ambientes redutores com metal nativo. O cobre se situa em 26º, logo atrás do Zn, em abundância na litosfera. A abundância média do cobre na litosfera esta em aproximadamente 70 mg/kg enquanto os valores reportados para a crosta terrestre variam de 24 á 55 mg/kg. Para os solos mundiais o valor de 20 mg/kg de Cu da literatura antiga mudou para 30 mg/kg. O cobre se encontra associado com a matéria orgânica do solo, óxido de Fe e Mn, argila e outros minerais.

Zinco é um traço essencial ao seres humanos, animais e plantas superiores. A descoberta da essencialidade do Zn para as plantas superiores em 1926 é atribuída á Sommer e Lipman.

As plantas superiores absorvem o Zn como um cátion divalente (Zn^{2+}), que age tanto como um componente metálico de enzimas ou como um cofator funcional,

estrutural ou regulador de um grande número de enzimas, como as desidrogenases, aldolases, isomerases, trophosforilases, RNA e DNA polimerases. Por causa destas funções o zinco está envolvido no metabolismo das proteínas e carboidratos.

A concentração de Zn nas plantas varia consideravelmente, como função de diferentes solos e fatores climáticos e também dos genótipos das plantas. Como uma aproximação geral, as seguintes faixas de concentração de Zn podem ser adotadas para o tecido de folhas desenvolvidas; (I) deficiente se menos que 10-20 mg/kg de matéria seca; (II) suficiente ou normal se estiver entre 25-150 mg/kg; (III) em excesso ou tóxica se acima de 400 mg/kg.

2.5.2.1.1 Metais pesados no solo

O problema da contaminação do ambiente por metais pesados alcança hoje grandes dimensões. Estudos comprovam que o desenvolvimento industrial, a modernização da malha viária e a mecanização da lavoura contribuíram, decisivamente, para o aumento da poluição ambiental por esses contaminantes.

Na agricultura, os metais podem estar presentes na composição de pesticidas e fungicidas e como contaminantes em fertilizantes (ALLOWAY, 1993).

O cádmio é um dos metais pesados mais preocupantes, principalmente devido à fácil absorção deste pelas plantas, acumulando-se a medida que sobe na cadeia trófica (GILLER e McGRATH, 1989).

Segundo KING e HAJJAR (1990), a concentração dos metais varia nos tecidos da planta observaram que as concentrações de zinco e de cádmio diminuíram das folhas mais baixas às mais altas na planta do fumo (*Nicotiana tabacum* L.). Em geral, os grãos contêm uma concentração menor de metais que as partes vegetativas da planta.

De acordo com KRUG (1992,2000), muitos desses metais dificilmente são reduzidos ao seu estado elementar, permanecendo conseqüentemente, em seu estado oxidado mais estável, o que explica a dificuldade de encontrá-los em estado puro ou livre na natureza. Além da toxicidade, um dos principais problemas por eles apresentados é a sua capacidade de formar complexos com as substâncias orgânicas,

tendendo a se fixar nos tecidos e serem excretados muito lentamente, devido a seu caráter cumulativo e a sua capacidade de translocação através da cadeia trófica.

2.5.2.1.2 Metais pesados nos alimentos

No processamento de alimentos, a contaminação se verifica através de aditivos químicos, coadjuvantes de processamento e partículas metálicas decorrentes da abrasão de equipamentos e embalagens (KRUG, 1992, 2000).

Sendo assim, não só o homem, mas também os animais estão expostos, permanentemente, ao risco de absorver metais pesados, tanto através da ingestão de alimentos sólidos e líquidos, quanto pela própria inalação.

2.6 FUMO – *Nicotiana tabacum*

Planta nativa do continente americano pertence à família das Solanáceas compreendendo todas as espécies do gênero *Nicotiana* designação dada por Lonitezer em homenagem a Jean Nicot, embaixador da França em Lisboa (NARDI, 1996). Segundo SEFFRIN (1950), Jean Nicot era acreditado junto a coroa portuguesa, voltou sua atenção ao tabaco, remetendo sementes da Solanácea à Maria de Médicis, rainha de seu país. Dessa maneira ter-se-ia introduzido a planta nas mais altas rodas, passando a ser denominada planta social ou planta da rainha cujo nome científico é *Nicotiana Tabacum* da qual é extraída uma substância chamada nicotina. É um vegetal herbáceo, de folhas grandes e coloração verde escura, podendo alcançar até 3 metros de altura (AKEHUST, 1973).

2.6.1 A Origem do Fumo

Seu uso surgiu aproximadamente no ano 1000 a.C. nas sociedades indígenas da América Central em rituais mágicos religiosos que tinha o objetivo de estabelecer uma comunicação com os deuses e receber sua inspiração purificando, protegendo e fortalecendo os ímpetus guerreiros. Ora considerado medicinal, ou contraditoriamente, combatido como nocivo à saúde. Produzido em larga escala em países que o adotaram

para cultivo e consumo, o tabaco tornou-se particularmente, no Brasil, uma cultura comum, em vários Estados, sobretudo, de forma altamente econômica, no Sul e Nordeste (SEFFRIN, 1995).

2.6.2 Tipos de fumo

Quase todo o tabaco atualmente cultivado no Brasil destina-se à produção de cigarros, charutos, fumo para cachimbo e fumo de corda, também chamado fumo de rolo, consumido, sobretudo, em zonas rurais. A obtenção de cada um desses tipos resulta de condições específicas de cultivo e beneficiamento. Geralmente o plantio inicial é feito em sementeiras, de onde as mudas são transferidas para o local definitivo ao atingirem uma altura média de vinte centímetros (AFUBRA, 2003).

De acordo com SEFFRIN (1995), a colheita é feita sempre manualmente, folha por folha, quando estas atingem a maturação, evidenciada pela mudança de cor, do verde para o amarelo. À medida que são colhidas, as folhas são enfiadas pelo pedúnculo num cordão fino e levadas para a secagem ou cura, primeira das duas etapas do beneficiamento, que pode ser feita em estufa ou pelo ar, em galpões

Diversas qualidades de fumo entram na composição dos cigarros, conforme o produto desejado. De uma mistura padrão participam vários subtipos, cada um com características peculiares de aroma, sabor, combustibilidade, etc. Nos cigarros leves e claros, por exemplo, o gosto definitivo é dado pela adição de adoçantes como cacau, mel e outros. Segundo KIEHL (1985), a composição química do fumo (base seca) apresenta: Matéria orgânica = 70,92%, Nitrogênio = 2,17%, Relação Carbono/Nitrogênio = 18/1, Fósforo em P_2O_5 = 0,51 Potássio em K_2O = 0,41.

2.6.3 Nicotina

A nicotina é um composto orgânico alcalóide do fumo, designação genérica de diversas plantas do gênero *Nicotiana*.

A nicotina pura foi obtida em 1828 e sua fórmula molecular é $C_{10}H_{14}N_2$. Só em 1904 a substância foi sintetizada em laboratório. Incolor e altamente tóxica, é um dos poucos alcalóides líquidos. Obtém-se nicotina dos resíduos da elaboração do fumo

por lixiviação com água acidulada, seguida de destilação por arrasto de vapor. De odor pouco agradável, escurece em contato com o ar (AKEHUST, 1973).

É empregada como vermífugo e também inseticida agrícola sob a forma de sulfato de nicotina. Pela oxidação da nicotina e tratamentos subseqüentes produz-se o ácido nicotínico, também chamado niacina ou fator P-P, droga usada no tratamento da pelagra e em certos casos substituída, com a mesma finalidade, pela nicotinamida ou vitamina B₃.

Por sua alta causticidade, a nicotina, se absorvida em dose elevada por via oral, provoca violentas sensações de queimadura, bem como náuseas, vômitos, diarreia etc. Solúvel em gordura tende a se concentrar em certos órgãos ou sistemas ricos em lipídios. O alcalóide afeta as mucosas das vias respiratórias superiores e provoca irritação na laringe, que se manifesta na forma de tosse matinal. Por sua volatilidade, a nicotina atinge o epitélio pulmonar, passa para o sangue e a urina e se fixa no sistema nervoso central, para determinar aceleração do ritmo cardíaco e elevação da pressão arterial (CIÊNCIA QUÍMICA, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente dissertação foi realizada no período de agosto de 2001 a outubro de 2003 no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Biológicos, Laboratórios de Alimentos e de Espectrometria do Instituto de Tecnologia do Paraná TECPAR, as cepas foram ativadas, preparadas e selecionadas no Laboratório de Biologia do Solo e Engenharia Agrícola do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.1 MATÉRIA-PRIMA E FORNECEDORES

- Resíduo do cigarro (fumo e papel) proveniente da Empresa Conspizza, localizada em Colombo - PR..
- Cepas do fungo do gênero *Pleurotus* provenientes do Laboratório de biotecnologia da Universidade Federal do Paraná
- Serragem de eucalipto e gesso provenientes da Chácara Quatro Barras – Quatro Barras PR.
- Farelo de trigo proveniente do Moinho Rio Negro LTDA – Pinhais – PR.

3.1.1 Amostragem

Com o propósito de obter um material que possa assegurar as reproduções experimentais, procedeu-se a coleta das amostras (fumo e papel) junto a Conspizza Ltda., que garantiu qualitativamente e quantitativamente, o suprimento do material. Ressalta o fato da referida empresa ser especializada no ramo de paisagismo e recuperação de terrenos degradados, usando o processo de hidrossemeadura de gramíneas. Esta empresa absorve os rejeitos gerados pelas fábricas de cigarros e também arremata lotes de cigarros apreendidos por ocasião de circulação fora dos padrões legais, aproveitando dos mesmos somente os filtros. Resultando um resíduo que totaliza aproximadamente 400 toneladas por mês, sendo 350 toneladas de fumo e

50 toneladas de papel.

Foram utilizadas nesse estudo as seguintes cepas de *Pleurotus* spp: *P. ostreatus* LPB 01, *P. ostreatus* LPB 09, *P. pulmonarius* identificado como *P. sajor-caju* LPB 20, *P. ostreatus* LPB 22, *P. ostreatus* LPB 23, e *P. ostreatus* LPB 24, provenientes da *Station de Recherche sur les Champignons* - Centro ORSTOM – França, do Instituto de Botânica de São Paulo e pertencentes ao Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná, sendo cedidas para a realização deste trabalho.

3.1.2 Seleção dos resíduos do cigarro (fumo e papel)

Após o desempacotamento, desmanche das carteiras e remoção do filtro dos cigarros, pela empresa de hidrossemeadura, o restante do material (fumo e papel) foi coletado, preparado e identificado, para a realização da determinação analítica de metais. Os critérios usados para a escolha do resíduo que iriam compor o substrato teste a ser usado no cultivo do *Pleurotus*, foram: a) - quantidade do resíduo descartado pela empresa de hidrossemeadura; b) – teores de metais nocivos segundo os resultados da análise química da determinação de metais. Os resultados são comparados mediante tabelas de limites de concentração máxima toleráveis de metais pesados (mg/Kg) . As tabelas para lodo de esgoto foram usadas pelo fato de não existir ainda tabelas que preconizem concentrações máximas permitidas de metais pesados nesse tipo de resíduo de cigarro.

3.1.3 Efeito do tempo de ebulição na amostra do resíduo do fumo

Após selecionado, foram pesados 2 kg de fumo e adicionado 10 litros de água destilada para a ebulição a 98°C por diferentes tempos , 30, 60, 120, 180 e 240 minutos para a avaliação dos teores da nicotina (Cromatografia em Fase Gasosa), e de nitrogênio (Método de Padrões Oficiais para Análise de Fertilizantes) antes e após a ebulição.

3.2 CEPAS ESTUDADAS

As seis cepas de *Pleurotus*, vindas do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná LPB 01, LPB 09, LPB 20, LPB 22, LPB 23, LPB 24 foram repicadas em meio básico, preparado com Agar Batata Dextrose comercial (BDA).

As referidas cepas de *Pleurotus* foram avaliadas em relação à velocidade de crescimento radial do micélio em agar extrato de fumo.

Os resultados do comportamento do crescimento radial do micélio das cepas de *Pleurotus* spp., em agar extrato de fumo, são referentes à média de três repetições. Todas as cepas cresceram no AEF. No entanto, as cepas selecionadas foram aquelas que obtiveram maior velocidade de crescimento radial e também apresentaram maior densidade micelial, um micélio mais vigoroso quando comparado com as demais cepas, significando que assimilam melhor este tipo de substrato.

3.2.1 Preparo do BDA

Foram pesadas 39 g do BDA para 1 litro de água e aquecido a 98°C por 15 minutos, após o aquecimento, foram distribuídos 10 ml em cada tubo de ensaio, que foram autoclavados a 121°C por 30 minutos. Após serem retirados da autoclave os tubos são mantidos inclinados e em temperatura ambiente por 24 horas, sendo usados para manutenção das cepas que seriam testadas em agar extrato de fumo, para a verificação da aceitabilidade do fungo ao fumo.

3.2.2 Preparo do meio Agar Extrato de Fumo

O meio agar extrato de fumo (AEF) em placas de Petri, foi preparado conforme o Fluxograma do processo de produção (GRÁFICO 1). Foram pesados 2kg de resíduos do cigarro (fumo), que após a adição de água destilada, procedeu-se seu cozimento por 30 minutos a 98° C. Sendo, em seguida filtrado, adicionando-se 39 g de agar para 1 litro do filtrado, tornando o meio sólido, distribuindo-se 15 ml por placa e esterilizando-se a 121° C por 30 minutos.

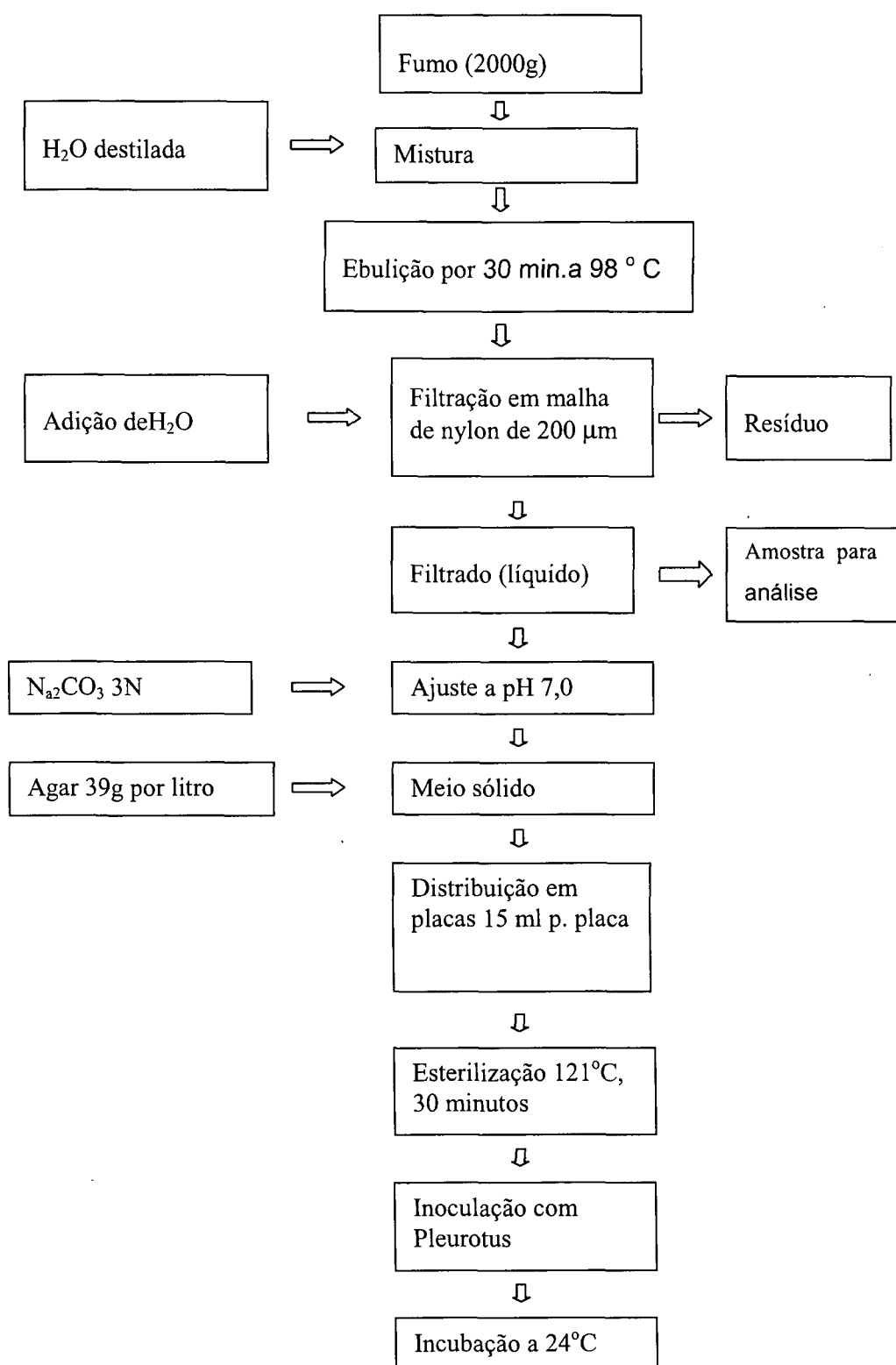


GRÁFICO 1 - Fluxograma da preparação do meio de cultivo em ágar extrato de fumo (AEF) para placas

3.3 ESTUDOS FISIOLÓGICOS

Foram realizados estudos visando a otimização do processo de cultivo no substrato elaborado com resíduo de fumo.

3.3.1 Estudo do Efeito da Temperatura

As placas inoculadas com o fungo *Pleurotus* foram incubadas as temperaturas de 20°C; 22°C; 24°C, 25°C e 35°C para chegar na temperatura ideal através da velocidade do crescimento radial do micélio.

3.3.2 Estudo do Efeito do pH

No Agar Extrato de Fumo os valores do pH foram ajustados com adição de Na₂CO₃ - 3 N para 5,0, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8, 0. O pH foi medido eletronicamente com o auxílio de um potenciômetro.

3.4 SELEÇÃO DAS CEPAS EM AGAR EXTRATO DE FUMO (AEF) EM PLACAS

Para a seleção das cepas foi usado o meio Agar Extrato de Fumo (AEF). A inoculação das cepas no meio (AEF) foi feita com uso de um disco de 5 mm de diâmetro contendo a cultura preservada em agar batata dextrose (BDA). As placas foram inoculadas na região central. As culturas foram incubadas em estufa a 24°C. A velocidade de crescimento foi avaliada medindo-se o diâmetro da colônia com paquímetro. O valor obtido dia a dia foi somado e dividido pelo n° total de dias de cultivo para obter a velocidade de crescimento radial em mm/dia. (MAZIERO, 1990)

A tolerância do fungo a nicotina é uma das condições necessárias para que o fungo possa atuar na presença do substrato (resíduo de fumo) a ser degradado. Esta tolerância pode ser avaliada pela capacidade de crescimento na presença da nicotina.

3.5 PREPARO DA SEMENTE “*SPAWN*”

Após o crescimento do fungo em placas com meio de cultura BDA foram preparados os frascos para a semente o “*spawn*”

Foram usados frascos de vidro, tipo conserva com tampa, e capacidade de 500 ml. Na tampa foram feitos furos de 5 mm de diâmetro, fechados com micropoli para melhor troca de oxigênio e melhor processo de autoclavação (pressão). Nestes frascos foram acondicionados substrato da serragem de eucalipto (89%) gesso 1% e farelo de trigo (10%) completando com água o que faltava para chegar a uma umidade de 60% e autoclavando durante 1 hora a 121°C. Após a esterilização e resfriamento, procedeu-se à inoculação dos frascos contendo serragem, com 3 discos de 5mm de micélio provenientes das culturas de *Pleurotus* anteriormente selecionadas. Os frascos foram, então, incubados em estufa à 24°C e após 20 dias, quando todo o substrato foi colonizado pelo micélio, estava pronta a semente ou *spawn*.

3.6 PREPARO DO SUBSTRATO SÓLIDO EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO - FES

A FES é um processo no qual o substrato insolúvel é fermentado com umidade suficiente, mas sem água livre e pode ser considerada como um sistema trifásico (sólido - líquido - gás) no qual a fase sólida está inteiramente ligada à fase líquida. A fase sólida é constituída pelo suporte de crescimento e pelo reservatório de água que fornece os nutrientes e a fonte de energia responsável pelo crescimento do microorganismo. A interface gás - líquido constitui uma barreira às transferências de calor e as trocas de oxigênio - gás carbônico. O preparo do substrato para Fermentação Estado Sólido (FES) é processado conforme descrito para o Agar Extrato de Fumo (AEF), apenas difere no momento da filtração (GRÁFICO 2), no AEF, se aproveita o filtrado líquido e no FES se aproveita a massa resultante do filtrado. No AEF o meio é distribuído em Placas de Petri e no FES a massa é acondicionada em saquinhos de polietileno.

Após resfriamento dos saquinhos, os substratos foram inoculados com o

“spawn” 10% e incubados em estufa controlada para temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante cerca de 40 dias até a completa miceliação do substrato (PEDROSO, 2002). Antes e depois de autoclavados os sacos contendo os substratos foram submetidos a uma pesagem. Após inoculação, os sacos foram novamente pesados para determinação da quantidade de inóculo e verificação da eficiência biológica.

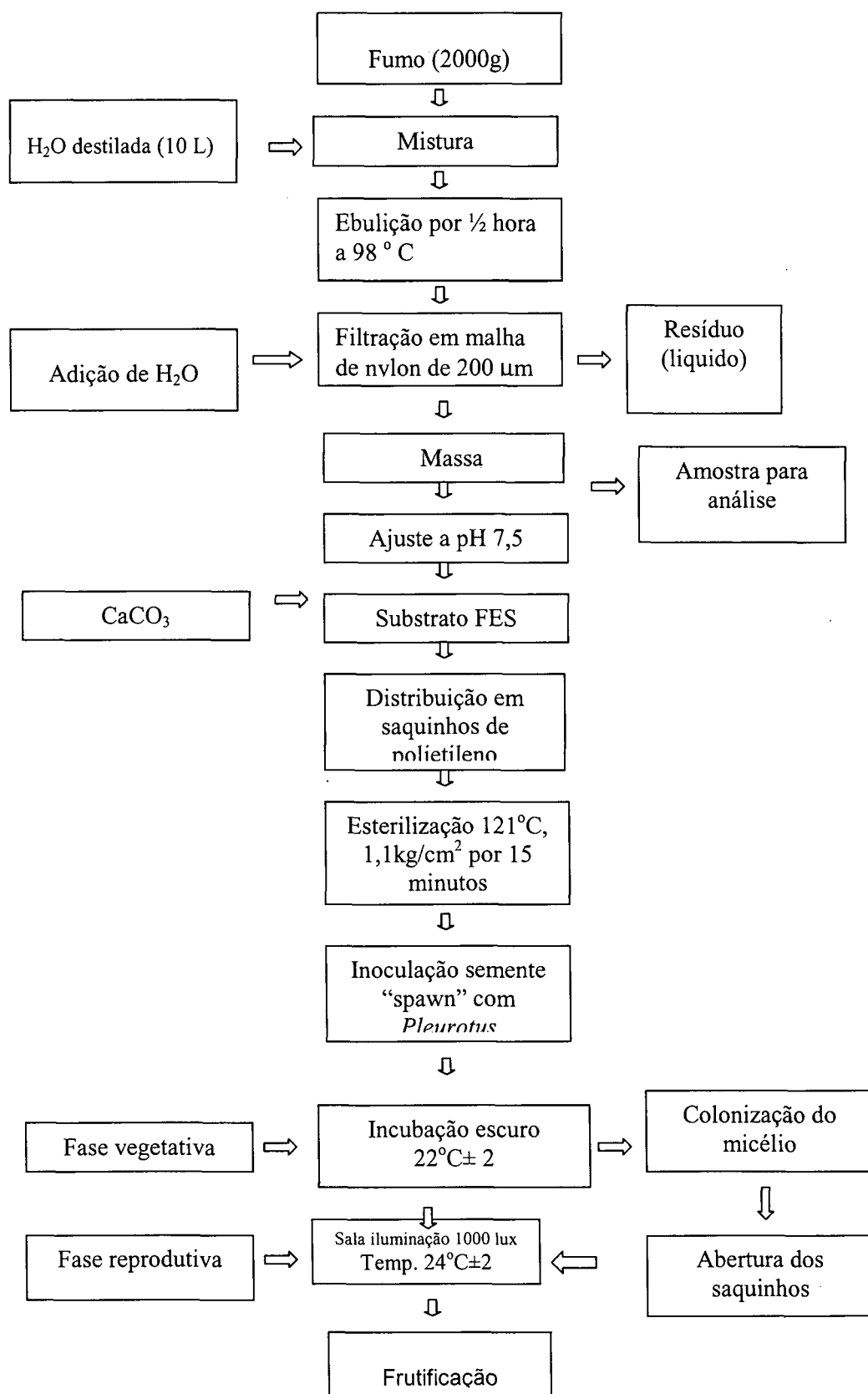


GRÁFICO 2 - Fluxograma da preparação do substrato (massa) Fermentação Estado Sólido FES

3.7 FRUTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO SUBSTRATO

A corrida do "*spawn*" efetuou-se no escuro até o substrato ser completamente colonizado pelo micélio fúngico, tornando-se totalmente branco.

Após a miceliação total do substrato (41 dias), os sacos foram abertos e transferidos da estufa ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) para uma sala de cultivo. Ficando mantidos em ambiente aerado, com temperatura controlada (24 a 25°C) e umidade 85%. Após 05 dias, os primórdios começaram a aparecer. Após a formação dos primórdios, a umidade relativa foi diminuída de 85% para 80% para assegurar a qualidade dos cogumelos. Em 4 dias os cogumelos estavam prontos para a colheita.

Os cogumelos coletados foram imediatamente pesados para a verificação da eficiência biológica (EB), calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{EB (\%)} = \frac{\text{peso de cogumelo fresco (g)}}{\text{peso do substrato seco inicial (g)}} \times 100$$

Obs: peso do substrato seco incluindo peso de *spawn* (CHANG, 1989; ROYCE, 1992 e BISARIA, 1983). Após a verificação da eficiência biológica os cogumelos assim como o substrato exaurido foram levados para o laboratório para a realização de análises.

3.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Tendo em vista a seqüência descrita anteriormente, do material filtrado após a ebulição 98°C , cultivo e pós cultivo, as amostras foram coletadas e identificadas como filtrado (líquido), massa (substrato sólido de fumo), cogumelo (produto do substrato do fumo) e do substrato exaurido (resíduo do substrato pós colheita do fungo) para serem enviadas aos laboratórios de análises.

3.8.1 Metodologia da determinação de metais

O monitoramento dos metais presentes nos resíduos do cigarro (fumo e

papel) foi realizado através de processos de mineralização aplicados às amostras com aquecimento pelo aparelho de Microondas Focalizado - mod. STAR-2 marca CEM Corporation, no qual ocorre um ataque ácido, disponibilizando os metais para análise e a qualificação e quantificação pelo Espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio induzido (ICP-AES) - modelo VISTA-PRO, Varian 2000.

As curvas de calibração obtidas são representadas pela equação da reta ou regressão linear, sendo a concentração de cada analíto dada pela equação:

$$\text{Conc. (mL}^{-1}\text{)} = A_0 + A_1 \cdot \text{IR}$$

Onde:

A_0 = coeficiente linear;

A_1 = coeficiente angular da regressão;

IR = intensidade relativa da emissão do analíto.

Devido a complexidade da matriz (fumo), utilizou-se o sistema microonda focalizado, por ser o melhor método de digestão de amostras, empregando a menor quantidade de reagentes, aliado a facilidade de mineralização de matrizes ricas em matéria orgânica.

Procedimento – Pesar em balança analítica exatamente 2 g do material (fumo) e colocar em tubo de microondas, tomando cuidado para que o mesmo não caia nas paredes do tubo. Colocar os tubos em banho de gelo e adicionar 5 ml de HNO_3 e 5 ml H_2O_2 deixando em repouso por aproximadamente 8 horas. Em seguida conectá-los no aparelho, adicionando inicialmente 10 ml de HNO_3 antes de iniciar o aquecimento.

Paralelamente ao material, preparar um branco analítico e uma amostra do material enriquecido para verificação da recuperação.

Após o término da mineralização, aguardar o resfriamento para a retirada dos tubos do equipamento. Filtrar os materiais para balão volumétrico de 50 ml ou 100mL, dependendo do limite do elemento a ser determinado.

Realizar as leituras dos elementos no equipamento de espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado axialmente.

Construir uma curva de calibração em microgramas por mililitro, para então determinar a concentração e microgramas por mililitro do analíto na solução do material.

Cálculos

$$C = \frac{L \times V}{P}$$

C: Concentração do elemento no material em microgramas por mililitros ou microgramas por grama.

L: Leitura da concentração do analíto em microgramas por mililitro obtida da curva de calibração

P: peso ou volume do material em gramas ou mililitro.

Cálculo da Recuperação:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{[L1 - (XL2 - LB)] \times 100}{CT}$$

L1 = Leitura do material enriquecido, mg/ml

XL2 = Média das leituras do material normal, mg/L

LB = Leitura do branco, mg/L

CT = Concentração teórica da solução final enriquecida, mg/ L.

Os resultados das análises foram avaliados tomando por base os parâmetros de limites máximos toleráveis preconizados para alimentos pela legislação brasileira vigente (ANEXO I) e a concentração máxima permitida de metais pesados mg/kg em lodos de esgoto considerados aceitáveis para uso agrícola.

3.8.2 Determinação da Nicotina no resíduo do fumo

Os teores de nicotina foram quantificados pela técnica instrumental de Cromatografia em Fase Gasosa, segundo a Instrução de Ensaio (IE LAMC-063/2002) do Laboratório de Medicamentos do TECPAR.

A preparação das amostras procedeu-se em concordância com a metodologia preconizada pela *Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis* (AOAC), 20 Ed. Cap. 3, 7.08, Horwitz, W. Washington, 1975.

Procedimento:

Pesaram-se 3 gramas da amostra, adicionando 40 ml de álcool isopropílico e

agitando por 1 hora. Em seguida, o material foi filtrado e transferido para balão volumétrico de 50 ml, completando-se o volume com o mesmo reagente.

Parâmetros instrumentais:

Coluna: HP1 (coluna cromatográfica de sílica fundida)

Gás carreador: Hidrogênio

Detector: Detector de Ionização de Chama

Pressão: 2,8 psi

Volume injeção: 2 μ L

Razão de decomposição: 1:10

Fluxo Hidrogênio: 45 ml/min

Fluxo ar sintético: 450 ml/min

Temperatura do Injetor: 250°C

Temperatura da Coluna: 180°C

Temperatura do Detector: 300°C

3.8.3 Determinação do Nitrogênio no resíduo do fumo

Métodos Padrões Oficiais para Análise de Fertilizantes (LANARV, 1982) elaborados pelo Laboratório Nacional de Referência Vegetal do Ministério da Agricultura.

Nitrogênio total

Método do ácido salicílico

Equipamento: Conjunto Digestor-destilador tipo Kjeldahl.

Procedimento:

- a) transferir uma quantidade da amostra (0,7g) para um balão Kjeldahl de 800 ml, juntar 40 ml de ácido sulfúrico em que foram dissolvidos 2 g de ácido salicílico, agitar para misturar perfeitamente e deixar, ao menos, 30 minutos em repouso, agitando de vez em quando;
- b) acrescentar 5g de Sulfato de sódio anidro. 2 g de zinco em pó fino, agitar, esperar 5 minutos e aquecer em fogo brando até cessar a espuma.;
- c) interromper o aquecimento, juntar 0,7 de óxido de mercúrio e 15g de

sulfato de sódio anidro, em pó, e levar à ebulição até a solução torna-se clara, continuando por mais 30 minutos, no mínimo (2 horas para amostras contendo material orgânico);

- d) esfriar, juntar 200 ml de água, adicionar 25 ml de solução de tiosulfato e misturar;
- e) juntar 3-4 grânulos de zinco, inclinar o frasco de Kjeldahl, adicionar 3,5 ml de solução de hidróxido de sódio a 45% para cada ml de solução de ácido sulfúrico usada, sem agitar o frasco;
- f) ligar imediatamente o frasco Kjeldahl ao conjunto de destilação, cuja ponta do condensador deve se encontrar mergulhada em um erlenmeyer de 500mL que contenha uma quantidade provável de nitrogênio, e 5-7 gotas de vermelho de metila;
- g) misturar o conteúdo, imprimindo rotações ao frasco Kjeldahl e aquecer para destilar, recebendo, no mínimo, 150 ml de destilado na solução de ácido padronizado;
- h) retirar o frasco de erlenmeyer, lavar a ponta do condensador e titular o excesso de ácido com solução de hidróxido de sódio padronizada;
- i) fazer uma prova em branco em idênticas condições, usando 5 ml da solução de ácido sulfúrico 0,5 N ;
- j) calcular a porcentagem de nitrogênio, pela expressão:

$$\%N = \frac{\{(V_1 \times N_1) - (V_2 \times N_2)\} - \{(V_3 \times N_1) - (V_4 \times N_2)\}}{G} \times 1,4$$

Onde:

V_1 = Volume de ácido, expresso em mililitros, colocado para receber o nitrato (amostra)

N_1 = Normalidade do ácido.

V_2 = Volume de Hidróxido de sódio.

N_2 = Normalidade de Hidróxido de sódio

V_3 = Volume de ácido, expresso em mililitros, colocado para receber o nitrato.

V_4 = Volume de ácido sulfúrico, expresso em mililitros, gasto na titulação (prova em branco).

G= Massa da amostra, expressa em gramas.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado com duas repetições por amostra. A homogeneidade do experimento foi verificada pelo teste de Barlett e as diferenças entre médias foram asseguradas pelo teste de Tukey a 5% e 1% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DOS RESÍDUOS DO CIGARRO FUMO E PAPEL

Mediante a determinação de 20 analitos,(TABELA 1) revelou-se a existência de metais nos resíduos do cigarro (fumo e papel). Porém, muitos deles não foram encontrados em concentrações que pudessem demonstrar riscos em relação aos níveis tóxicos. A totalidade dos elementos se encontra dentro dos limites toleráveis àquelas preconizadas pela legislação brasileira para alimentos (ANEXO I) e, em tabelas internacionais de concentrações máxima permitida de metais pesados em lodos de esgoto considerados aceitáveis para uso agrícola (TABELA 2), não inviabilizando a utilização do resíduo de fumo na agricultura .

TABELA 1 – Resultados analíticos do resíduo de cigarro, fumo e papel em (mg.kg⁻¹)

ANALITO	FUMO	PAPEL
Arsênio (As)	ND 0,50	ND 0,50
Cádmio (Cd)	0,628 ± 0,012	0,11 ± 0,02
Cobre (Cu)	23,35 ± 0,4	87,8 ± 10,05
Zinco (Zn)	39,35 ± 0,82	461,6 ± 50,0
Mercúrio (Hg)	0,024 ± 0,001	0,031 ± 0,001
Cálcio (Ca)	23,500 ± 100	33,300 ± 0,2
Potássio (K)	74,500 ± 200	1600
Magnésio (Mg)	8,200 ± 300	130
Fósforo (P)	3,300 ± 100	900 ± 30,0
Antimônio (Sb)	ND 1,25	ND 1,25
Selênio (Se)	ND 2,50	ND 2,50
Estanho (Sn)	ND 1,25	ND 1,25
Prata (Ag)	ND 1,25	ND 1,25
Berílio (Be)	ND 0,050	ND 0,050
Bismuto (Bi)	ND 1,25	ND 1,25
Telúrio (Te)	ND 2,50	ND 2,50
Tálio (Tl)	ND 2,50	ND 2,50
Cobalto (Co)	ND 0,50	ND 0,50
Molibdênio (Mo)	ND 1,25	ND 1,25
Vanádio (V)	ND 1,25	ND 1,25

ND = Não detectado

Nos resultados apresentados na tabela 1, o fumo, por apresentar menores valores para metais considerados nocivos e maior quantidade de material descartado (350 toneladas/mês), foi escolhido para compor o substrato da produção do cogumelo nos próximos experimentos deste trabalho.

TABELA 2 – Concentração máxima permitida de metais pesados (mg/kg) em lodos de esgoto considerados aceitáveis para uso agrícola

País	Cd	Zn	Cu	Ni	Pb	Cr	Mn	Mo	Co	As	Se	Hg
Bélgica	10	2000	500	100	300	500	500	-	2	10	25	10
Canadá	20	1850	-	180	500	-	-	20	150	75	14	5
Dinamarca	8	-	-	30	400	-	-	-	-	-	-	6
Finlândia	30	5000	3000	500	1200	1000	3000	-	100	-	-	25
França	20	3000	1000	200	800	1000	-	-	20	-	100	10
Alemanha	20	3000	1200	200	1200	1200	-	-	-	-	-	25
Países Baixos	10	3000	1500	100	300	200	500	-	20	-	-	10
Noruega	10	3000	1500	100	300	200	500	-	20	-	-	7
Suécia	15	10000	3000	500	300	1000	-	-	50	-	-	8
Suíça	30	1000	1000	200	1000	1000	-	20	100	-	-	10

FONTE: (WEBBER,1983).

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITROGÊNIO NA AMOSTRA DO RESÍDUO DO FUMO

O resultado da determinação do teor do nitrogênio encontrado na amostra do resíduo de fumo foi de 1.0 % .

Segundo Kiehl (1985), o resíduo do fumo apresenta um teor de nitrogênio de 2.17% para Pedroso (2000), o teor do nitrogênio encontrado na amostra do resíduo de fumo da empresa de hidrossemeadura Conspizza foi 1.22% .

Nos resultados apresentados na TABELA 3, observou-se que os teores de nitrogênio e nicotina não sofreram alterações mesmo com ebulição 98° C por vários minutos mostrando que essas substancias não degradaram

TABELA 3 - Comparativo da variação da nicotina e nitrogênio total quando submetido a ebulição 98° C

Tempo de ebulição 98°C (minutos)	Nicotina (g/100g)	Nitrogênio (g/100g)
30	0,20	0,20
60	0,21	0,20
120	0,19	0,17
180	0,19	0,18
240	0,20	0,17

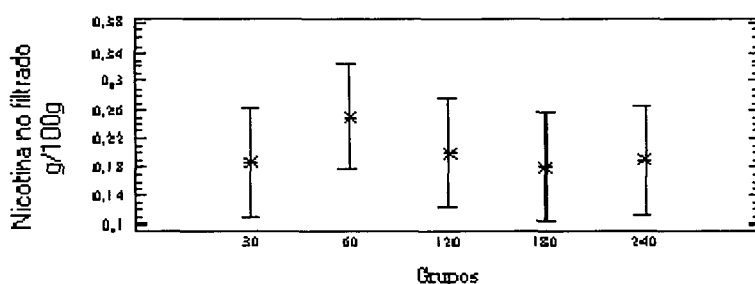


FIGURA 3 - Comparação entre médias e desvios significativos a 5% para o teste de Tukey no teor de nicotina encontrado na amostra do resíduo de fumo. podemos verificar o desvio médio significativo quando as barras se encontram, mostrando a certeza de que os grupos não diferem estatisticamente frente aos resultados da determinação dos teores de nicotina demonstrando que o tempo de ebulição não interfere nos teores de nicotina, as alterações foram pouco significativas, mesmo com ebulição 98°C por várias horas, essa substância permaneceu estável, mantendo constante os valores.

4.3 SELEÇÃO DAS CEPAS DO *Pleurotus* EM AGAR EXTRATO DE FUMO (AEF)

A TABELA 4 mostra que após 12 dias, a cepa *P.ostreatus* LPB 23 apresentou maior velocidade de crescimento radial, 9,01 mm/dia. Seguindo-se a cepa

P. sajor-caju LPB 20 com 8,48 mm/dia e a cepa *P. ostreatus* LPB 09 com 8,41 mm/dia. As placas BDA testemunhas tiveram seu desenvolvimento normal indicando a viabilidade das cepas do *Pleurotus* spp.

TABELA 4 - Seleção das cepas de *Pleurotus* spp. em Agar Extrato de Fumo

<i>Cepas –Pleurotus</i>	BDA - controle		Extrato de fumo	
	nº dias	Crescimento radial (mm/dia)	nº dias	Crescimento radial (mm/dia)
<i>P.ostreatus</i> LPB 01	11	9,05	12	8,30
<i>P.ostreatus</i> LPB 09	08	9,03	12	8,41
<i>P.sajor-caju</i> LPB 20	11	9,11	12	8,48
<i>P.ostreatus</i> LPB 22	10	9,21	12	7,71
<i>P.ostreatus</i> LPB 23	10	9,18	12	9,01
<i>P.ostreatus</i> LPB 24	09	9,16	12	8,21

Temperatura de incubação 24°C; pH inicial = 5,0.

Os dados contidos na TABELA 4 e nas FIGURAS 4, 5, 6,7, 8 e 9 mostra que crescimento radial do micélio, vigor do micélio e hifas mais desenvolvidas aparecem nas cepas que tem maior aceitabilidade ao (AEF). A foto foi feita aos 6 dias de desenvolvimento da cultura. As duas primeiras placas contém AEF (teste) e a terceira placa contém BDA (testemunha).

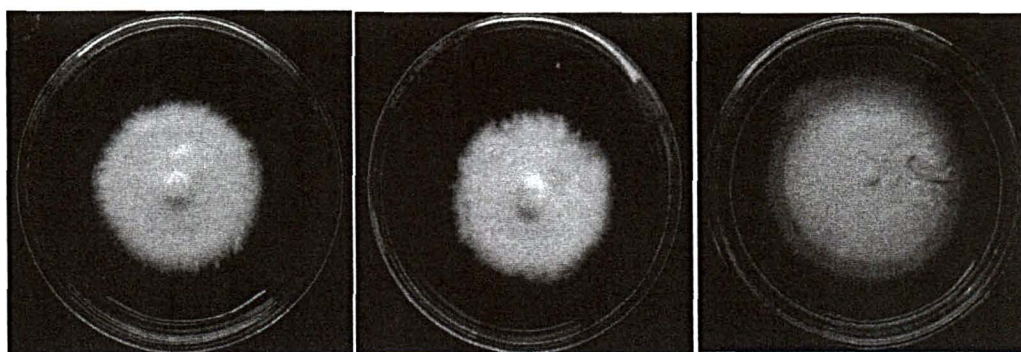


FIGURA 4 - *Pleurotus ostreatus* LPB 01

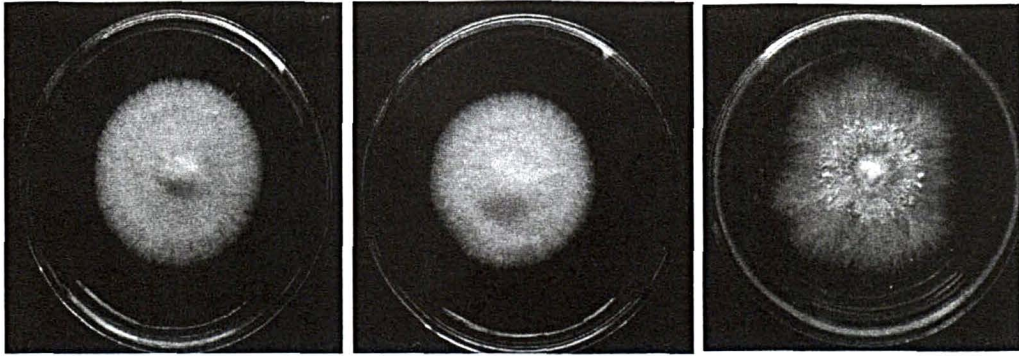


FIGURA 5 - *Pleurotus ostreatus* LPB 09



FIGURA 6 - *Pleurotus sajor-caju* LPB 20

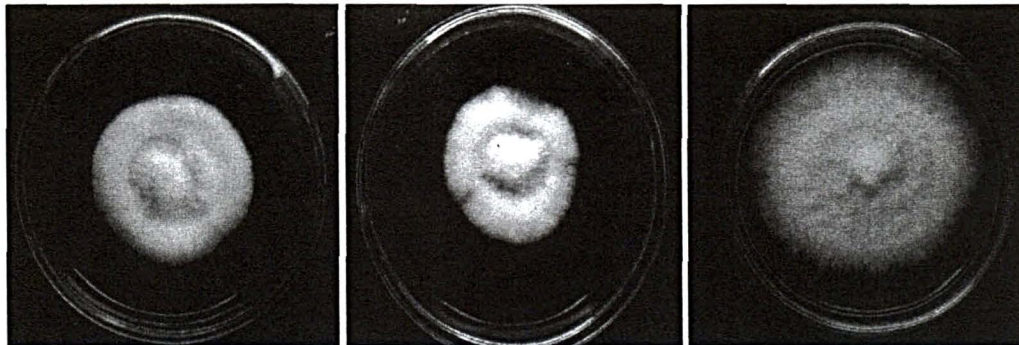


FIGURA 7 - *Pleurotus ostreatus* LPB 22

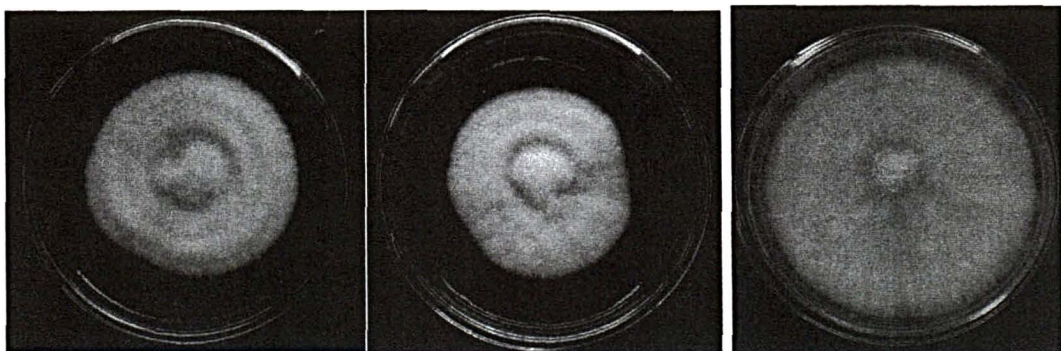


FIGURA 8 - *Pleurotus ostreatus* LPB 23

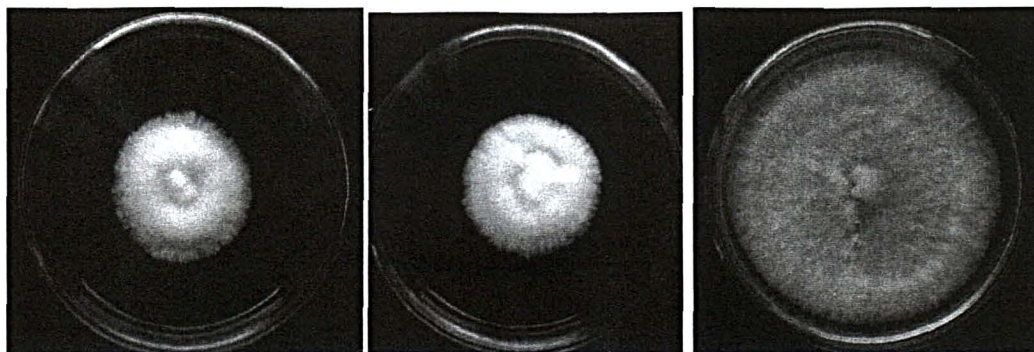


FIGURA 9 - *Pleurotus ostreatus* LPB 24

4.4 AVALIAÇÃO DO PH NO CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO DO *Pleurotus* SUBMETIDO AO AGAR EXTRATO DE FUMO

Após 10 dias do início da cultura, a verificação do pH ideal para o crescimento radial do micélio das cepas de *Pleurotus* spp. selecionadas (LPB 09, LPB 20 e LPB 23) conforme TABELA 5, foi realizada a partir do pH 5,0. Os resultados do comportamento do crescimento radial do micélio em agar extrato de fumo, das cepas de *Pleurotus* spp, são referentes a média de três repetições.

TABELA 5 - Efeito do pH sobre o crescimento radial do micélio das cepas de *Pleurotus* spp. após 10 dias a 24°C

Velocidade de crescimento radial (mm/dia)				
Cepas	pH	LPB 09	LPB 20	LPB 23
		(mm/dia)	(mm/dia)	(mm/dia)
	5,0	6,8	6,8	8,1
	6,0	8,2	7,1	8,0
	6,5	7,9	8,0	8,3
	7,0	4,9	5,1	5,9
	7,5	5,0	3,1	4,8
	8,0	6,0	3,7	6,2

Podemos observar que as maiores taxas de crescimento radial do micélio (mm/dia) ocorreram na faixa de pH entre 6,0 - 6,5. Sendo que, no pH de 6,5 apresentou os melhores valores de crescimento radial (mm/dia). Escolhendo-se esse valor de pH para os experimentos seguintes.

4.5 EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO DO *Pleurotus* SUBMETIDO AO AGAR EXTRATO DE FUMO

Para a verificação da temperatura ideal de crescimento radial de micélio das cepas de *Pleurotus* spp. escolhidas (LPB 09, LPB 20 e LPB 23), as placas inoculadas tiveram o pH inicial ajustado para 6,5 (TABELA 6).

Os resultados do comportamento do crescimento radial do micélio em agar extrato de fumo, das cepas de *Pleurotus* spp, são referentes a média de três repetições.

TABELA 6 - Efeito da temperatura sobre o crescimento radial do micélio das cepas de *Pleurotus* spp. após 10 dias do início da cultura, pH 6,5.

Temperatura (°C)	Velocidade de crescimento radial (mm/dia)		
	LPB 09	LPB 20	LPB 23
	(mm/dia)	(mm/dia)	(mm/dia)
20	7,4	6,3	6,8
22	8,3	8,4	8,1
24	9,6	8,4	9,0
26	8,4	8,0	9,9
30	5,1	6,9	4,0

Observou-se que nas temperaturas de 22 - 26°C ocorreram as melhores velocidades de crescimento radial de micélio para todas as cepas. Sendo este intervalo utilizado para os próximos ensaios.

Os resultados, que foram confirmados por ZADRAZIL (1976), mostraram que no intervalo 20 a 30 °C é que se obteve melhores resultados. Acima de 30°C parece haver um efeito nocivo sobre o crescimento do micélio.

O *P. sajor-caju*, por sua vez, resiste até uma temperatura de 47°C por algumas poucas horas (KURTZMAN e ZADRAZIL, 1984).

4.6 SELEÇÃO DAS CEPAS DE *Pleurotus* spp EM SUBSTRATO MASSA (FES)

As cepas selecionadas (LPB 09, LPB 20 e LPB 23) conforme resultados anteriores foram, então, cultivadas no substrato sólido do resíduo de cigarro (fumo).

O substrato teste foi preparado com o resíduo do fumo e o substrato testemunha foi preparado com a serragem de eucalipto sendo os dois substratos acondicionados em saquinhos de polietileno e identificados (s-01 a s-07) de acordo com a TABELA 7.

TABELA 7 - Seleção das cepas de *Pleurotus* spp., em substrato massa, após 31 dias de colonização

	Teste			Controle		
	Fumo (% colonização)			Serragem (% colonização)		
	LPB 09	LPB 20	LPB 23	LPB 09	LPB 20	LPB 23
S-01	90	80	-	100	100	100
S-02	50	80	-	100	100	100
S-03	50	80	50	100	100	100
S-04	-	80	50	100	100	100
S-05	-	80	-	100	100	100
S-06	-	80	-	100	100	100
S-07	-	80	-	100	100	100

Os resultados da TABELA 7 mostram claramente a afinidade e tolerância da cepa LPB 20 ao resíduo do fumo. A data da inoculação do “spawn” foi considerada o 1º dia da colonização micelial. Trinta e um dias depois, todos os sacos contendo o substrato testemunha encontravam-se completamente colonizados (100%), sendo todos abertos para o início da frutificação. No substrato teste (fumo), no entanto, apenas a cepa do *Pleurotus sajor-caju* LPB 20 mostrava-se com crescimento homogêneo, apresentando (80%) do substrato colonizado, sendo completamente colonizados aos

quarenta e um dias do início da cultura quando foram abertos para a frutificação.

Verificamos que a fase vegetativa, ou seja, fase de crescimento micelial, no substrato testemunha (serragem) foi de 31 dias para todas as seis cepas testadas; e de 41 dias para a cepa LPB 20 no substrato teste (fumo).

Observa-se na TABELA 7, que apenas a cepa LPB 20 se desenvolveu bem no substrato teste, sendo que as outras cepas LPB 09 e LPB 23, não cresceram ou tiveram pouco desenvolvimento. Sendo selecionada a cepa *Pleurotus sajor-caju* LPB 20 por apresentar melhor desempenho, ou seja, possuir melhor crescimento em substrato sólido a base de fumo, para os estudos posteriores. As FIGURAS 10 e 11 mostram uma colonização de 50% do micélio nos saquinhos teste elaborados com o substrato do resíduo do fumo que chamamos de substrato massa e 80% para os saquinhos testemunhas elaborados com serragem. A foto foi feita aos 28 dias de cultivo.



FIGURA 10 - Cepa LPB - 20 no substrato fumo (Teste)

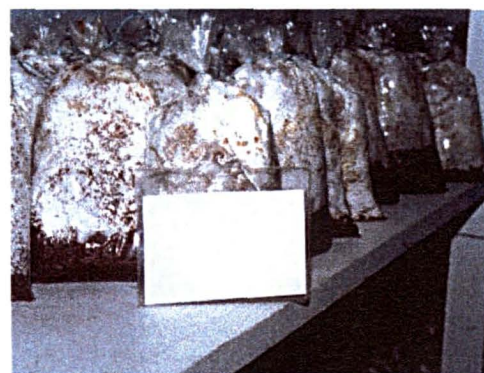


FIGURA 11 - Cepa LPB 20 – na serragem (testemunha)

4.7 AVALIAÇÃO DA FRUTIFICAÇÃO

Após a completa colonização, o substrato tornou-se totalmente branco procedendo-se a abertura e transferência dos saquinhos para a sala de frutificação os resultados dos experimentos obtidos anteriormente foram utilizados para os cultivos experimentais. O primeiro sinal de frutificação para o substrato teste ocorreu após 41 dia da inoculação. No 46º dia foi feita a primeira, no 56º dia foi feita a segunda e no

70° dia a terceira colheita. Os testes demonstram que o substrato de fumo produz três fluxos de corpos de frutificação com uma eficiência biológica de 65,2 %. Para o substrato testemunha o primeiro sinal de frutificação ocorreu após 31° dia da inoculação. No 35° foi feita a primeira colheita no 46° a segunda e no 60° a terceira. O substrato testemunha apresentou Eficiência biológica de 71,6 (TABELA 8).

TABELA 8 – Eficiência Biológica do *Pleurotus* em substrato elaborado com o resíduo do fumo

Substrato	MS total	Primeira colheita	Segunda colheita	Terceira colheita	Eficiência biológica
Teste	100g	31,2g	23,6g	10,4g	65,2 %
Testemunha	200g	80,0g	38,3g	24,9g	71,6%

MS -material seco

Na TABELA 9 podemos observar as condições ambientais ótimas obtidas para a formação de primórdios e desenvolvimento dos corpos de frutificação do *Pleurotus sajor-caju* LPB 20 no substrato elaborado com o resíduo do fumo.

TABELA 9 - Condições ambientais obtidas para a formação dos primórdios e desenvolvimento dos corpos de frutificação do *Pleurotus* no substrato elaborado com o resíduo do fumo

Condições ambientais	Colonização do substrato	Formação de primórdios	Desenvolvimento dos corpos de frutificação
Temperatura (°C)	22-24	22-26	26
Umidade relativa do ar (%)	60-65	90	85
Luminosidade (luz)	Escuro	1000-1500	1000-1500
Duração (dias)	41	4-5	4-6

A sequência das FIGURAS 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20 a seguir, mostram as fases do desenvolvimento do micélio até os corpos de frutificação do *Pleurotus sajor-caju* LPB 20 no substrato fumo.

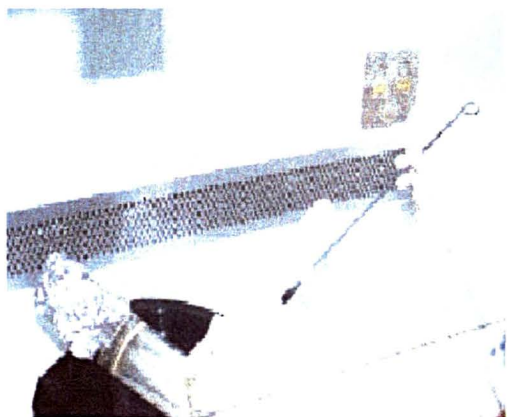


FIGURA 12 – Manutenção das cepas

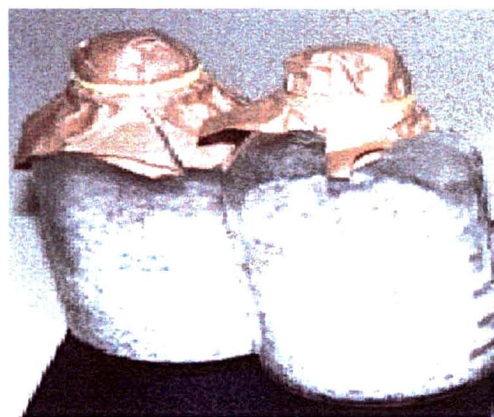


FIGURA 13 – Produção da semente

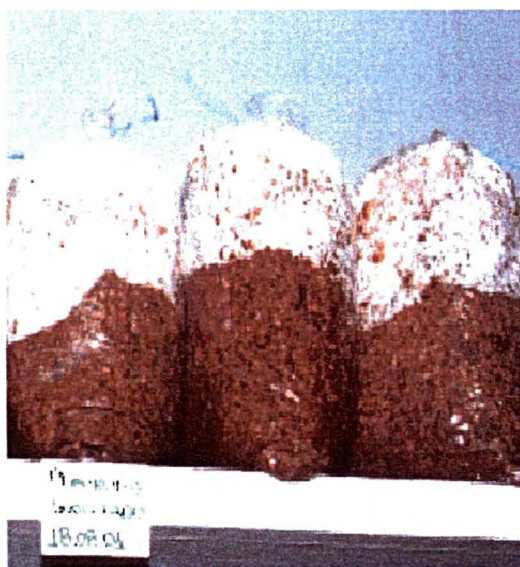


FIGURA 14 – Início da colonização do substrato sólido

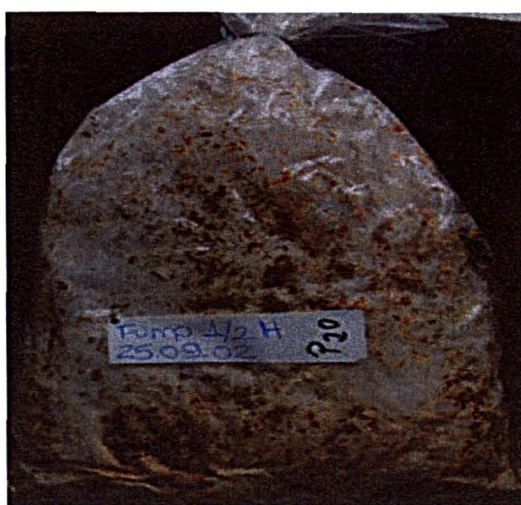


FIGURA 15 - Substrato sólido colonizado totalmente



FIGURA 16 - Abertura dos saquinhos após completa colonização do substrato



FIGURA 17 - Formação dos primórdio



FIGURA 18 - Início da formação de carpóforos



FIGURA 19 – Formação do corpo de frutificação



FIGURA 20 – Corpo de frutificação



FIGURA 21- Corpo de frutificação totalmente desenvolvido



FIGURA 22 – *Pleurotus sajor-caju*

4.8 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS ANALÍTICOS

Foram investigados os teores de metais presentes no substrato **massa** (fumo), no **filtrado** (líquido), nos **cogumelos**, e no **substrato exaurido** resultantes dos processos da Fermentação no Estado Sólido (FES) .

Em função dos resultados obtidos, verificou-se a viabilidade da utilização dos resíduos do cigarro (fumo) para obtenção de substrato na produção de cogumelos, tomando os parâmetros de limites máximos toleráveis preconizados pela legislação brasileira vigente (ABIA, 1988) (ANEXO 1), assim como, foi avaliada a possibilidade do uso do substrato exaurido como fertilizante agrícola (WEBER, 1983; ALLOWAY, 1993; KABATA-PENDIAS, 1984) (TABELA 1).

Nos resultados mostrados na TABELA 10 observou-se que os teores de macronutrientes contidos no substrato exaurido estão classificados como baixo e médio.

TABELA 10 - Avaliação das determinações dos teores de macronutrientes no substrato exaurido segundo (KIEHL 1985) parâmetros para classificar as matérias primas no substrato exaurido

MACRONUTRIENTES	TEORES		
	Baixo Abaixo de 0.5%	Médio De 0.5% a 1.5%	Alto Acima de 1.5%
K_2O_5		1.0%	
P_2O_5	0.08%		
Ca		1.5%	
Mg	0.2%		

Os resultados mostrados na TABELA 11 mostram os microelementos em pequenas quantidade tornando-os elementos essenciais.

TABELA 11 - Avaliação das determinações dos teores de microelementos no substrato exaurido segundo parâmetros da tabela de concentrações máxima permitida de metais pesados em lodos de esgoto considerados aceitáveis para uso agrícola.

MICROELEMENTO	Concentração máxima de metais pesados mg/Kg	Substrato exaurido mg/Kg
Cu	1000	12.75
Zn	1000	17.25

Os resultados apresentados na TABELA 12 são comparativos de limites de tolerância de metais pesados para alimentos e fertilizantes. O cogumelo mostra resultados para Cd baixos, já para Hg os resultados estão no limite máximo de tolerância. O substrato exaurido apresenta resultados baixos e pode ser recomendado para o uso agrícola.

TABELA 12- Avaliação dos elementos tóxicos

Elemento	Para alimento mg/ Kg		Para fertilizante – mg/Kg	
	Limites da Portaria 685/98	no cogumelo	Limites da Legislação	No substrato exaurido
Cd	1.00	0.12	8	0.30
Hg	0.01	0.01	5	0.05

4.8.1 Determinação do teor de Nitrogênio na Massa, Filtrado, Cogumelo e Substrato Exaurido

Os dados da FIGURA 23 nos comparativos entre as médias demonstram os teores de nitrogênio na massa, filtrado, cogumelos e substrato exaurido, destacando alterações significativas a 1% para o teste de Tukey nos teores de nitrogênio no cogumelo em comparação com a massa, que apresentava teores mais baixos no início do cultivo.

Alguns autores chegaram a preconizar a habilidade do fungo *Pleurotus* em fixar nitrogênio atmosférico transformando-o em compostos orgânicos, pois alguns

experimentos realizados em substratos não estéreis mostraram que o conteúdo total de nitrogênio aumentava após o crescimento do *Pleurotus*. (GINTEROVÁ e LAZAROVÁ, 1987). Segundo CHANG (1985), não existe fungos que fixem nitrogênio naturalmente.

KURTZMAN (1979), sugeriu a hipótese de que os esporos de bactérias fixadoras de nitrogênio são estimuladas a se desenvolver durante o processo de pasteurização gerando as bactérias responsáveis pela fixação do nitrogênio.

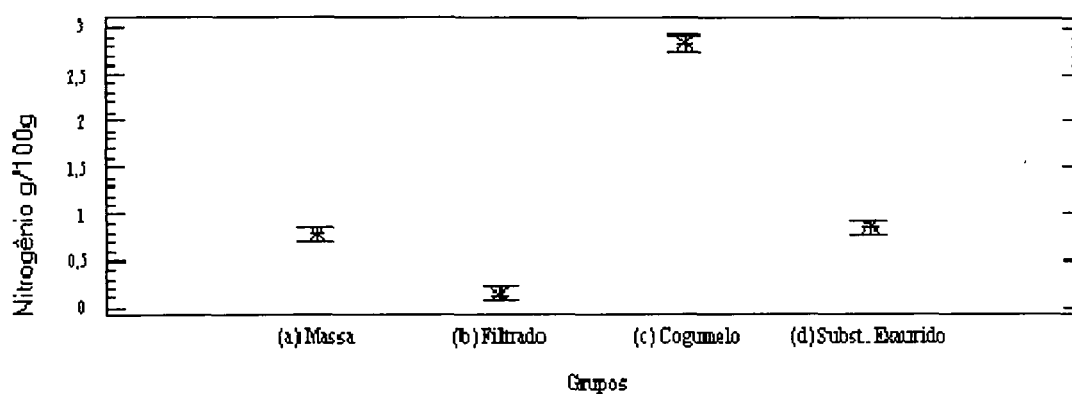


FIGURA 23 – Determinação do teor de nitrogênio - Comparação entre médias e desvios médios na quantidade de nitrogênio no cogumelo, massa, filtrado e substrato exaurido.

4.8.2 Determinação do Potássio

Os resultados no teor de potássio (FIGURA 24) mostram um aumento significativo, tanto no cogumelo como no substrato exaurido, quando comparado com o teor de Potássio no substrato no início do cultivo.

No substrato exaurido, de acordo com os parâmetros para classificar as matérias primas quanto à quantidade de macronutrientes em fertilizantes, conforme (KIEHL 1985), citados no item 2.5.1, os valores do potássio apresentaram um teor médio.

Entretanto, uma discussão visando se o teor de potássio neste substrato é suficiente para determinada cultura, fica comprometida na determinação de pelo menos mais três variáveis:

- Exigência de potássio na cultura;

- pH do solo;
- Formas químicas em que este macronutriente se encontra no substrato exaurido;

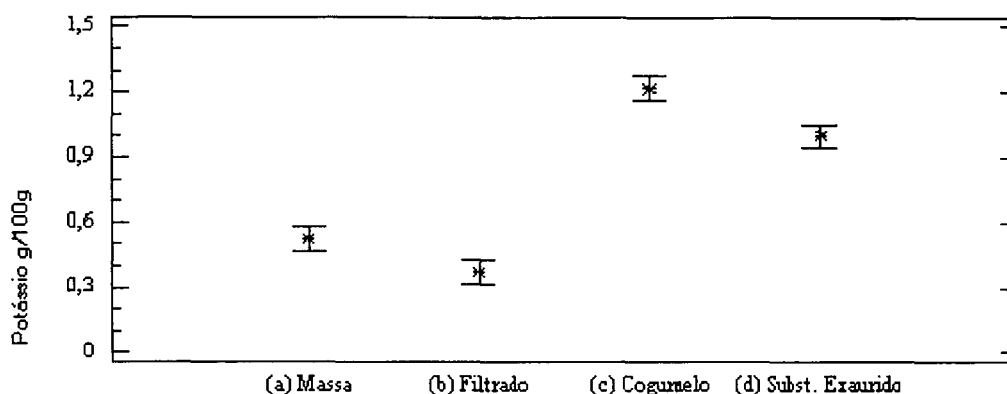


FIGURA 24 - Determinação do teor de potássio - Comparação entre médias e desvios médios significativos a 1% para o teste de Tukey na quantidade de potássio no cogumelo, massa, filtrado e substrato exaurido.

4.8.3 Determinação do Fósforo

Os resultados nas determinações do fósforo (FIGURA 25), mostraram, teores aumentados significativamente no cogumelo quando comparado com o substrato no início do cultivo.

No substrato exaurido os parâmetros (KIEHL 1985), não foram avaliados pelo fato de não se ter conhecimento da forma que está o Fósforo não podendo então determinar a forma disponível para a planta, ficando também na dependência de outras variáveis como pH do solo e exigência da cultura.

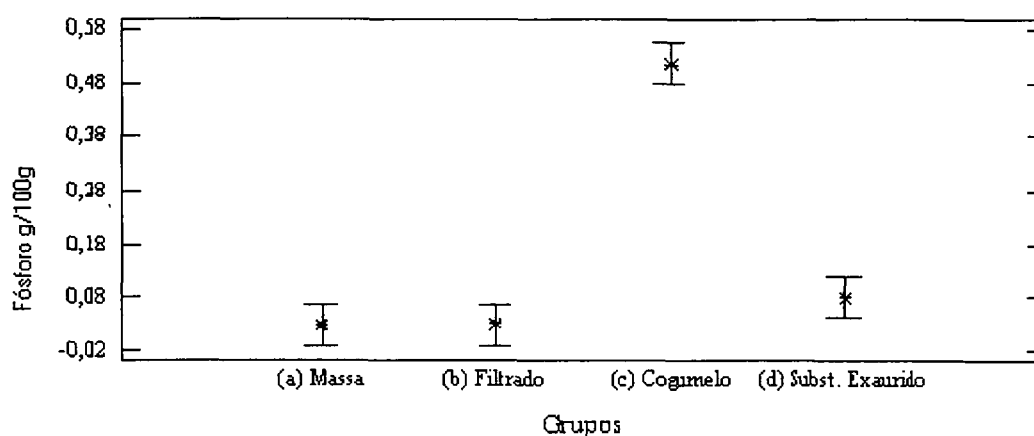


FIGURA 25 - Determinação do teor de fósforo - Comparação entre médias e desvios médios significativos a 1% para o teste de Tukey na quantidade de fósforo no cogumelo, massa, filtrado e substrato exaurido

4.8.4 Determinação do Cálcio

Nas determinações do cálcio (FIGURA 26), os resultados apresentam valores aumentados significativamente no substrato exaurido quando comparado com os valores dos substratos no início do cultivo.

No substrato exaurido, os parâmetros citados no item 2.5.1 (KIEHL 1985), os valores do cálcio apresentam-se com teores médios.

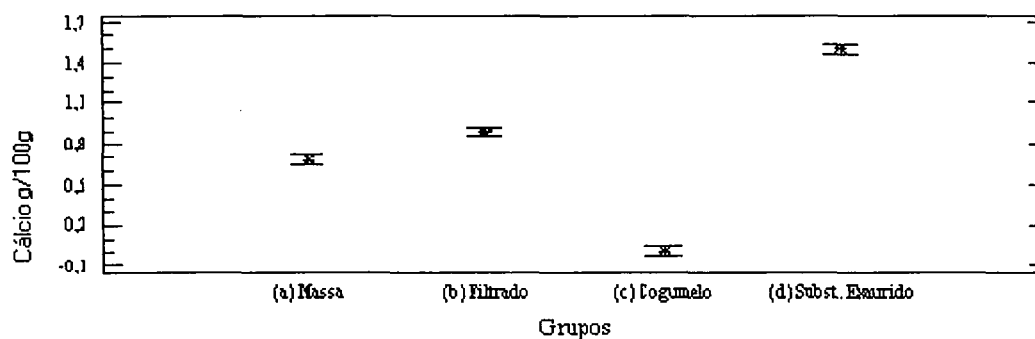


FIGURA 26 – Determinação do teor de cálcio - Comparação entre médias e desvios médios significativos a 1% para o teste de Tukey na quantidade de cálcio no cogumelo, massa, filtrado e substrato exaurido.

4.8.5 Determinação do Magnésio

Na FIGURA 27, os resultados das determinações do Magnésio apresentam valores aumentados significativamente no substrato exaurido quando comparado com os valores dos substratos no início do cultivo.

No substrato exaurido, os parâmetros citados no item 2.5.1 (KIEHL 1985), os valores do magnésio apresentam-se com teores altos.

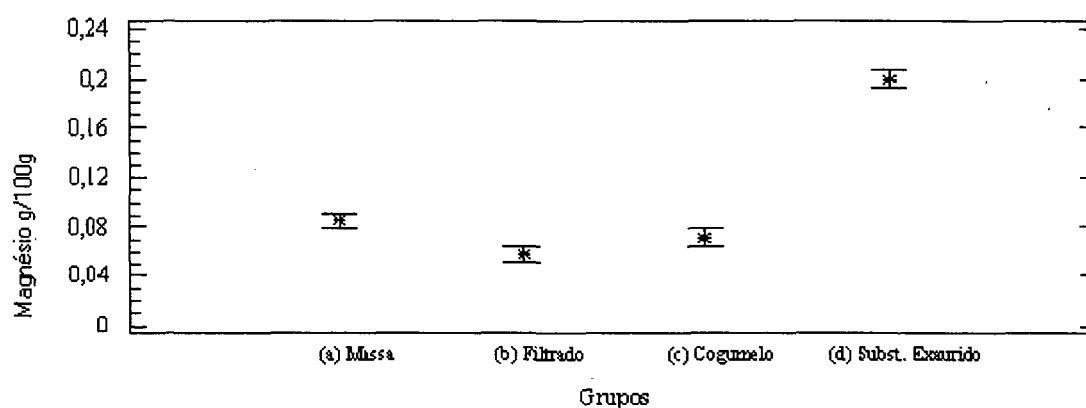


FIGURA 27 – Determinação do teor de magnésio - Comparação entre médias e desvios médios significativos a 1% para o teste de Tukey na quantidade de magnésio no cogumelo, massa, filtrado e substrato exaurido.

Conforme parâmetros Kiehl 1985, citados no item 2.5.1, o elemento se apresenta com teores baixos, dependendo das variáveis citadas no item 4.8.2.

4.8.6 Determinação do Zinco

As concentrações apresentadas na FIGURA 28 mostram valores aumentados significativamente para o zinco no cogumelo e no substrato exaurido, quando comparado com os valores apresentados no início do cultivo.

No substrato exaurido os resultados do zinco quando comparados com os valores da TABELA 1 (WEBBER 1983), os teores do zinco mostram valores muito baixos, tornando-o um elemento essencial.

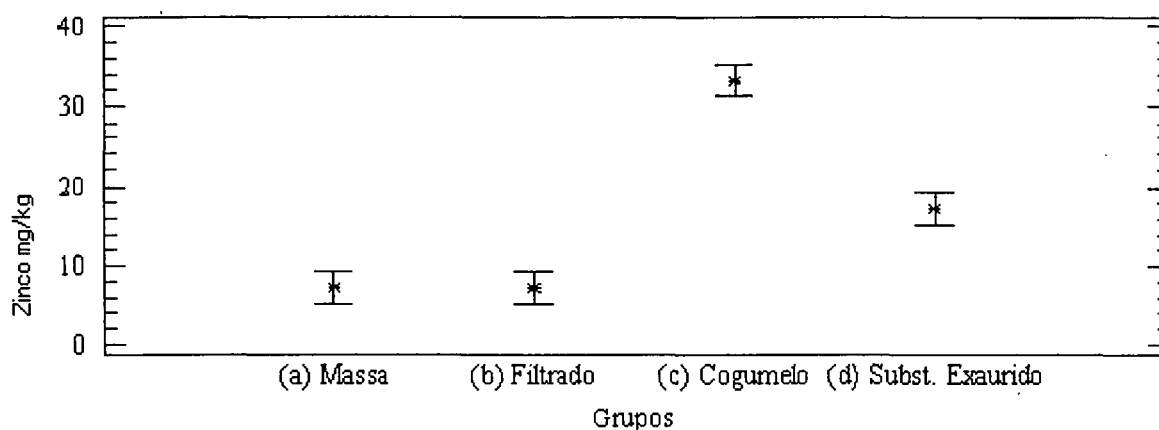


FIGURA 28 - Determinação do teor de zinco - Comparação entre médias e desvios médios significativos a 1% para o teste de Tukey na quantidade de zinco no cogumelo, massa, filtrado e substrato exaurido.

4.8.7 Determinação do Cádmiio

As concentrações apresentadas na FIGURA 29 mostram valores aumentados significativamente para o cádmio no substrato exaurido, quando comparados aos valores apresentados pelo substrato no início do cultivo.

No substrato exaurido, as avaliações da concentração do cádmio, os valores foram considerados baixos, quando comparados com a TABELA 1 (WEBBER, 1983), de concentração máxima permitida de metais pesados em lodo de esgoto, considerados aceitáveis para uso agrícola. Não apresentando toxicidade para o solo. No cogumelo também não apresentou toxicidade quando comparado com valores conforme (ANEXO 1).

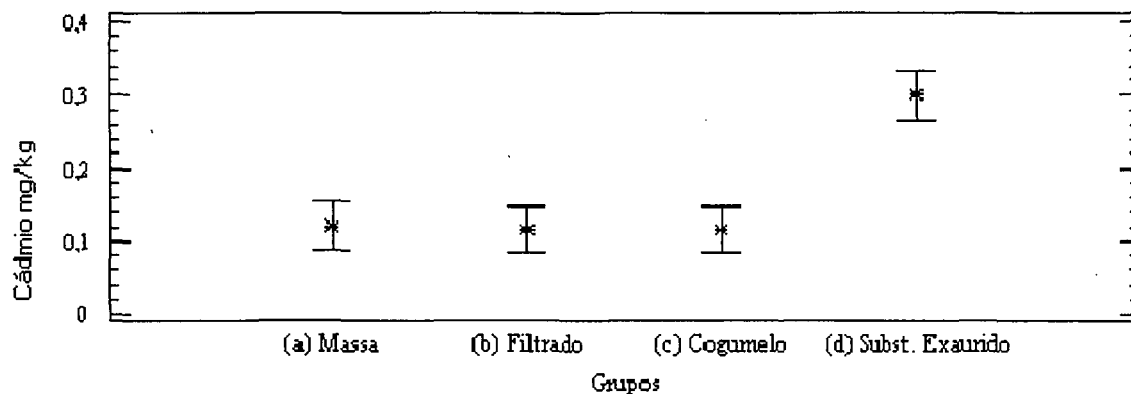


FIGURA 29 – Determinação do teor de cádmio - Comparação entre médias e desvios médios significativos a 1% para o teste de Tukey na quantidade de cádmio no cogumelo, massa, filtrado e substrato exaurido.

4.8.8 Determinação do Cobre

Nas concentrações apresentadas na FIGURA 30, os resultados mostram valores aumentados significativamente para cobre no cogumelo.

No substrato exaurido, os valores foram considerados baixos, quando comparados com a TABELA 1 (WEBBER 1983), tornando-o elemento essencial.

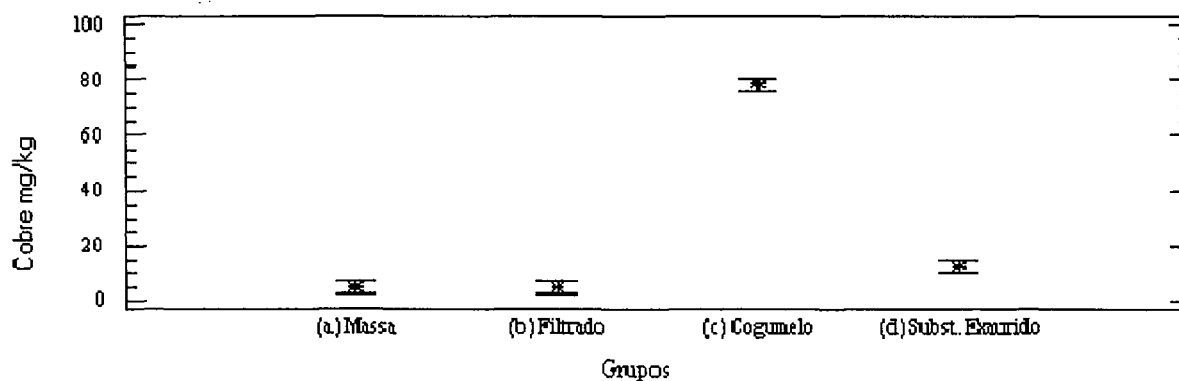


Figura 30 – Determinação do teor de cobre - comparação entre médias e desvios médios significativos a 1% para o teste de Tukey na quantidade de cobre no cogumelo, massa, filtrado e substrato exaurido.

4.8.9 Determinação do Mercúrio

Nas determinações do mercúrio, os valores apresentaram-se significativamente aumentados no substrato exaurido (FIGURA 31), quando comparados com os valores do substrato no início do cultivo.

No substrato exaurido, os resultados verificados para o mercúrio, estão abaixo dos determinados na TABELA 1 (WEBBER 1983), na apresentando toxicidade ao solo.

No cogumelo os valores foram comparados conforme portaria (ANEXO 1), não apresentando toxicidade como alimento.

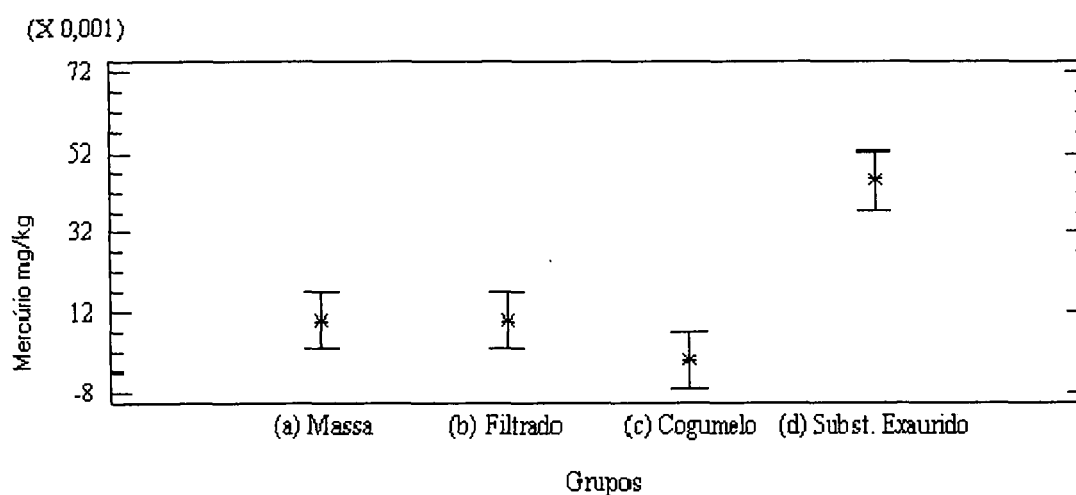


FIGURA 31 – Determinação do teor de mercúrio - comparação entre médias e desvios médios significativos a 1% para o teste de Tukey na quantidade de mercúrio no cogumelo, massa, filtrado e substrato exaurido.

4.8.10 Avaliação das Determinações do teor de Nicotina na Massa, Filtrado, Cogumelo e Substrato Exaurido

Com dados obtidos na TABELA 13, pode-se concluir que o cogumelo *Pleurotus sajor-caju* degradou a nicotina ou absorveu em níveis muito baixos, ficando abaixo do limite de detecção da técnica utilizada. Antes da compostagem, o fumo

apresentava-se com uma média de 0,18g de nicotina por 100g de substrato. Após o processo de fermentação, tanto no cogumelo quanto no substrato exaurido, não foi detectado nicotina.

TABELA 13 - Teores de nicotina nos substratos e cogumelos pós-frutificação

Processos	Nicotina em g/100g
Fumo cru	0,19 ± 0,01a
Substratos sólidos	0,18 ± 0,02a
Cogumelos <i>Pleurotus</i>	ND
Substratos Exauridos	ND

NOTA: ND = não detectado em nível de 1ppm.

Números seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que resíduos da indústria do cigarro podem ser valorizados com a produção de cogumelos *Pleurotus sajor-caju*.

- Das seis cepas de *Pleurotus* testadas , o *Pleurotus sajor-caju* LPB20 foi a que apresentou maior velocidade de crescimento e melhor frutificação demonstrando uma boa adaptação ao substrato constituído com o resíduo do fumo.

- O cogumelo *Pleurotus sajor-caju* pode absorver com eficiência elementos como , nitrogênio , potássio, fósforo, zinco e cobre presentes no resíduo do fumo sendo demonstrado pelas análises das concentrações de macro e microelementos encontrados no substrato massa, no cogumelo, e no substrato exaurido, que mostraram uma significativa elevação nos teores desses elementos no cogumelo. Após a colheita dos cogumelos o substrato exaurido apresentou quantidades elevadas de cálcio e magnésio , em relação as concentrações iniciais determinadas no substrato massa, podendo ser aproveitado para uso agrícola por apresentar baixa concentração de cádmio e mercúrio atendendo tabelas internacionais de limites de tolerância para metais pesados encontrados e aprovados para o uso do lodo de esgoto na agricultura.

- A nicotina que inicialmente apresentava-se com altos teores, não foi detectada nos corpos de frutificação do cogumelo nem no substrato exaurido após o processo de fermentação do resíduo fumo e cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju*, demonstrando a possibilidade de degradação da nicotina.

- O cogumelo *Pleurotus sajor-caju* produzido a partir do substrato fumo e de acordo com as análises realizadas pode oferecer condições de consumo humano. No entanto análises mais aprimoradas seguindo as exigências das tabelas da legislação de alimentos vigente são necessárias.

- O resíduo fumo de acordo com a metodologia empregada, e os resultados obtidos apresentam um grande potencial como fertilizante agrícola.

6 REFERÊNCIAS

AKEHUST, B. C. *El tabaco*. (Trad.) SAURI, E. R. **Agricultura tropical**. Barcelona: Editora. Labor, S. A., 1973.

ALEXOPOULOS C.J.; MIMS C. W. e BLACKWELL M.. *Mycology* (4th Ed.). New York: John Wiley and Sons, 1996.

ALLOWAY, B. J. *Heavy metals in soils*. New Delhi: Blackie Academic & Professional, 1993. 399 p. 1993.

AMERICAN SOCIETY FOR METAL - ACM HANDBOOK. Material Characterization, v.10 p 31 -42, 1986.

AOAC - *Association of official analytical chemists: official methods of analysis*, Washington: 20 Ed., Horwitz, W., 1975

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. Compêndio da legislação de alimentos – Atos do Ministério da Saúde, Aditivos incidentais, tab.II, v.1, cap. 03 resolução n. 4,1988.

ATTHASANPUNNA, P. e CHANG, S. T. *The magic of mushroom*. Paris: Unesco Courier, v.6, p.16-18, 1994.

BANO, Z. *Pleurotus mushroom*. Part II, *Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food* *CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Cleveland, 27(2):87-157, 1988.

BARBOSA, M. C. **Aproveitamento de resíduos de casca de mandioca para produção de *Pleurotus***. (Dissertação de mestrado), UFPR, 1996.

BANO, Z.; SHASCHIREKHA, M. e RAJARATHNAM, S. *Improvement of the bioconversion and biotransformation efficiencies of the oyster mushroom (*P. sajor-caju*) by supplementation of its rice straw substrate with oil seed cakes*. *Enzyme Microbial Technology, Survey*, 15:985-989, 1993.

BARRON, G.L.; THORN, R.G. *Destruction of nematodes by species of Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 65, n.4, p.774-778, 1986.

BERMUDEZ, R C. E TRABA, J. A. *Produccion de Pleurotus sp cfr. Florida sobre residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba*. In: *Micologia Neotropical Aplicada*, 7:47-50, 1994.

BISARIA, R. and MADAN, M: *Mushrooms: potential protein source from cellulosic residues*, *Enzyme Microb. Technol.*, 5:251-259, 1983.

BONONI, V.L.R. e CAPELARI, M. **É fácil cultivar cogumelos**. In: *Manuais Práticos Vida*. São Paulo: Editora Três, 32p. 1985.

BONONI, V.L.R. e RODRIGUES, B.M. **Cogumelos Comestíveis**. São Paulo: Instituto de Botânica, 16p. 1983.

BONONI, V.L.R. e CAPELARI, M. e MAZIERO, R. e TRUFEM, S.F.B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2º ed., São Paulo: Ícone, 1999.

BRUNS, T. D., WHITE, T. J. e TAYLOR, J.W. *Fungal molecular systematics*. *Annual Review of Ecology and Systematics*. . 22: 525-564. 1991.

BOSS, C B; FREDDEEN, K. J. *Concepts, Instrumentation, and techniques in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*. Perkin Elmer Corporation, USA, 1989.

CAPELARI, M. *Pleurotus ostreatus roseus* Sing. no Brasil . XXXVII Congresso Internacional de Botânica Resumos, Ouro Preto, 1986.

CAPELARI, M. e MAZIERO, R. **Fungos macroscópicos do Estado de Rondônia, região dos rios Jarú e Ji - PR** . [s.l.]: Hoehnea 15:28-36, 1988.

CAPELARI, M. **Atividade biodegradadora e cultivo de três espécies comestíveis de basidiomicetos: *Pleurotus* spp. e *Agrocybe perfecta* (Rick)Sing**. São Paulo, 1996. 154p. (Tese Doutorado em Ciências Biológicas na Área de Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

CHANG, S. T. *Mushrooms as human food*. *Bioscience*, Washington, v. 30, n.6, p.399-401, 1980.

CHANG, S. T. *The cultivation and nutritional value of p. sajor-caju european j. of applied microbiology and biotechnology*, Berlin 12:58-62, 1981.

CHANG, S. T. *Bioconversion technology: composting and production of microbial and metabolites*. In: WORKSHOP SUL-AMERICANO SOBRE USOS ALTERNATIVOS DE RESIDUOS DE ORIGEM FLORESTAL E URBANA. Curitiba. **Anais....** Colombo: EMBRAPA-Florestas, set. , p. 71-82. 1997

CHANG, S. T. e MILES, P.G. *A new look at cultivated mushrooms*. *Bioscience*. Washington, v.34, n. 6, p.358-362.1984.

CARUSO, J. A.; WOLNIK, K. e FRICKE, F. *Inductively coupled plasma in analytical atomic spectrometry: injection of gaseous sample into plasmas*. VHC, p.487-525, 1987.

CHANG, S. T. e MILES, P. *Edible mushroom and their cultivation*. CRC Press Inc., Florida, 1989.

CHANG, S. T. e MILES, P. *Biologia de las Setas Fundamentos básicos e acontecimientos actuales*. In: World Scientific, 1993.

CHANG, S. T. *Mushroom research and development - equality and mutual benefit*. *Mush. Biol. Mush. Prod.* 2:1-10, 1996.

CHONG, C. e RINKER, D. L. *Use of spent mushroom substrate for growing containerised woody ornamentals: na overview*. *Compost Science and Utilization*, Emmaus, v.2, n.3, p.45-53, 1994.

COSTA, M. B. B. et al **Adubação orgânica**. São Paulo: Icone, 1994.

DANAI, O.; LEVANON, D. e SILANIKOVE, N. *Cotton straw silage as a substrate for Pleurotus sp. Cultivation*. *Mushroom Sci.* 12(2):81-90.1989.

DELMAS, J. *Les champignons et leur culture flamarion, la maison rustique*. Paris: Departamento de Ingeniería Agrícola., 1989.

EGER, G. *Biology and breeding of Pleurotus in the Biology and cultivation of edible mushrooms*. New York: Academic Press, 1978.

FAN, L.F. e DING, C.K: *Handbook of mushroom cultivation*. Jiangxi Science and Technology Publishing House, Jiangxi, China, 1990.

FAN, L. *Theory on high efficiency of field production of Agaricus bisporus*. Acta Agriculturae Zhejiangensis 10:211-215, China, 1996.

FASSEL, V A. e WENDT, R. H. *Induction-Coupled Plasma Spectrometric Excitation*. Source Analytical Chemistry, v. 37, p..920-922, 1965.

FERREIRA, J. E.F. **Produção de cogumelos**. 1ª edição. Rio Grande do Sul: Guaíba Agropecuária, 1998

FILHO, D. B. **Toxicologia humana e geral**. 2ª edição. São Paulo: Atheneu, 1988.

GAMBLE, G. et al. *Biodegradation of lignocellulose in bermuda grass by white rot fungi analyzed by solid-state C^{13} nuclear magnetic resonance*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. .60, n. .9, p..3138-3144, 1994.

GARRET, S. D. *Soil fungi and soil fertility*. Oxford: Pergamon Press, 1976.

GENERAL GUIDELINES FOR MICROWAVE SAMPLE PREPARATION. CEM Corporation, 1988.

GILLER, K. e MCGRATH, S. M. *Metals and microbes*. .New Scientist, v.124, p.31-32, 1989.

GINÉ, M.F. **Análises químicas por espectrometria de plasma com detetor de massa**. In: . XXXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE QUIMICA, ABQ, apostila do curso 02, 1996.

GINTEROVÀ, A. e LAVAROZÀ, A. *Amino acid composition of wood-rotting fungi (Pleurotus) and total amino acid balance of the cultivating system*. Food Chem. 23:35-41, 1987.

GLÓRIA, N. A. **Resíduos industriais como fonte de matéria orgânica**. Rio de Janeiro: IAA, 1973.

GREENFIELD, S; JONES, I. L e BERRY, C. T. *High- pressure plasmas as spectroscopic emission source*. Analyst, v. 89, p.713-720, 1964.

GROSS, B. e ASTHER, M. *Arômes de basidiomycètes: caractéristiques, analyses et productions*. In: *SCIENCES DES ALIMENTS*, 9:427-454, 1989.

GUIMARÃES, A. G. e LINARDI, V. R. **Produção de celulases por fermentação sólida em diferentes substratos celulósicos**. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 31(3): 379-385, 1988.

GUNDE-CIMERMAM, N.G. e CIMERMAM, A. *Pleurotus fruting bodies contain the inhibitor of 3-hidroxy-3methylglutaryl-coenzyme reductase*. *Lovastatin*. *Experimental Mycology*, San Diego, v. 19, p. 79-82, 1987.

HADAR, Y. e KEREM, Z. *Utilization of lignocellulosic waste by the edible mushroom Pleurotus*. *biodegradation*, Dordrecht, 3:189-205, 1992.

HARTLEY, R.D.; FORD, C. W. *Phenolic constituents of plant cell walls and walls biodegradability*. In: Lewis. N.G.; Paice; M.G. *Biogenesis and biodegradation of plant cell polymers*, ACS Symposium Series, v. 399, p. 137-145, 1989.

HAWKSWORTH D. L. *The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation*. *Mycological Research*. 95: 641-655, 1991.

HILBER, D. *Gattung Pleurotus (Fr.) Kummer unter besonderer berücksichtigung des Pleurotus eryngii formenkomplexes*. *Bibl.Mycol.* 87:1-448. 1982

HILBER, O. *Valid, Invalid and confusing taxa of the genus Pleurotus*, *Mushroom Sci.*12(2); 241-248, 1989.

HOLMES, S. *Outline fo plant classification*. London: Longman, 1983.

HUANG, B. H. ; YUNG, K. H. e CHANG, S. T. *The sterol composition of V. volvacea and other mushrooms*. *Mycologia*, 77:959, 1985.

JONG, S. C. e DONOVICK, R. *Antitumor and antiviral substances from fungi. Advances*. In *Applied Microbiology*, San Diego, v. 34, p.183-261, 1989.

KABATA-PENDIAS, A. PENDIAS, H.. *Trace Elements in soils and plants*. .CRC Press, Boca Raton, Fla 1984.

KAMRA, D.N. e ZADRAZIL, F. *Microbial improvement of lignocellulosic in animal feed production*. London: Elsevier Applied Science, 122p. 1988.

KAUFERT, F. *The production of asexual spores by Pleurotus corticatus*. Mycologia 27:333-340, 1935.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo: Ceres, 1985.

KIEHL, E. J. **Manual de compostagem, maturação e qualidade do composto**. Piracicaba: E.J. Kiehl, 1998.

KING, L. D; HAJJAR, L. M. *The residual effect of Sewage Sludge on heavy metal content of Tobacco and Peanuts*. Journal of Environment Quality, v. 19, p. 738 – 748, 1990.

KINGSTON, H. M. e JASSIE, L. B. *Introduction to microwave sample preparation*. Acs. Washington, 1988.

KOHARI, E. K.; AMAZONAS, M. A. L. A. e CARVALHO, F. J.P. C. **Potencial de crescimento micelial do fungo Pleurotus sajor-caju em serragem e casca de pinus spp. E resíduo de infusão de erva-mate**. In. Workshop Sul-Americano sobre Usos Alternativos de Resíduos de Origem Florestal e Urbana. **Anais...**, Curitiba, p.150-155, 1997

KOHARI, E. K. **Produção do cogumelo comestível Pleurotus ostreatus em resíduos lignocelulósicos e avaliação das características do substrato Exaurido visando sua utilização como fertilizante orgânico**. (Dissertação de mestrado), UFPR, Curitiba, . 2000.

KURTZMAN, R. H. *Nutrition of Pleurotus sapidus effects of lipids*. Mycologia 68:286-295, 1976.

KURTZMAN, R. H. e ZADRAZIL, F. *Physiological and taxonomic considerations for cultivation of Pleurotus mushrooms*. Tropical Mushrooms, Hong Kong, The Chinese Univ. Press, 1984.

KRUG, J. F. In: III ENCONTRO NACIONAL SOBRE CONTAMINANTES INORGÂNICOS. 21-23 de out., 1992. Instituto Adolf Lutz, São Paulo, 1992.

KRUG, J. F. In: III WORKSHOP SOBRE PREPARO DE AMOSTRAS. 23-27, out., 2000. Universidade Federal de São Carlos, 2000.

LABORDE, J. e DELMAS, J. *Le Pleurote: un nouveau champignon comestible cultivé* Dissier Pleurote, Sation de Recherches sur les champignons, INRA, p.39-46, 1974.

LAJUNEN, L. H. *Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission*. royal society of chemistry. p.117-125, England, 1992.

LANARV: Métodos padrões para análise de fertilizantes elaborado pelo Laboratório Nacional de referência vegetal do Ministério da Agricultura, 1982.

LAU, O. W.; SHIU, K. K. e CHANG, S. T. *Determination of ascorbic acid in vegetables and fruits by differential pulse polarography*. In: J. Sci. Food Agric., 36:733, 1985.

LINCOFF, G. e D. H MITCHEL, D. H. *Toxic and Hallucinogenic mushroom Poisoning: A Handbook for Physicians and Mushroom Hunters*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1977.

LIN, S. Y. e DENCE, C. W. *Methods in lignin chemistry*. Germany: Springer-Verlag, 1992.

LOZANO, J. C. 1990 *Produccion comercial del champinon (Pleurotus ostreatus) en pulpa de coffee*. Fitopatologia Colombiana, 14:42-47, 1990.

MAMOUN, M.; e DELMAS, J. *Croissance végétative et initiation fructifère in vitro de Pleurotus cornucopiae: effets des ions acétate et ammonium comparés à d'autres sources carbonées et azotées* Agronomie. Paris 4:(9)849-859, 1984.

MANU-TAWIAH, W. e MARTIN, A. M. *Nitrogen source and the growth respnse of Pleurotus ostreatus mushroom mycelium*. Canadian Institute of Food Science Technology Journal, Ottawa, 21:(2)194-199, 1988.

MARTINEZ, C. D.; SOTO, C. e GUZMAN, G. **Cultivo de *Pleurotus ostreatus* en pulpa de café com paja como substrato**. In: Revista Mexicana de Micologia 1:101-108, 1985.

MATUSIEWICZ, H.; STURGEON, R. E. e BERMAN, S. S. *Trace elements analysis of biological material following pressure digestion with Nitric Acid-Hydrogen Peroxide and Microwave Heating*. In: Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v.4, p.323-327, 1989.

MAZIERO, R. **Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* sp.** (Dissertação de Mestrado), Instituto de Biociências da USP, 1990.

MEHTA, V.; GUPTA, J. K. e KAUSHAL, S. C. *Cultivation of Pleurotus florida mushroom on rice straw and biogas production from the spent straw*. World J. of Microbiology and Biotechnology. Oxford, 6:366-370, 1990.

MICROSOFT ENCARTA'95. *The Complete Interactive Multimedia Encyclopedia: Nicotine*. Funk e Wagnall's Corporation, 1994.

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

NAIR, N. G. *Lipid profile of P. sajor-caju*. In: **Annals** of Applied Biology, Warwickshire, 114(1):167-176, 1989.

NAKASHIMA, S.; STURGEON, R. E.; WILLIE,S.N. e BERMAN, S. S. *Acid digestion of marine sample for trace elements analysis using microwave*. Heating. Analyst, v.113, p.159, 1988.

NARDI , J. B. **O fumo brasileiro no período colonial**. São Paulo: [s.ed.], 1996.

OKHUDYA, J. A.; ETUGO, I. J. *Studies of the cultivation of Pleurotus tuber-regium na edible mushroom*. Bioresource Technology, Essex, 44:01-03, 1993.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

OEI, P. *Mushroom cultivation with special emphasis on appropriate techniques for developing countries*. Tool publication, 1996.

OLIVER, J. M. e LABOREDE, J. *La culture des champignons*. Paris: Armand Colin, 1991.

OLIVEIRA, E. Solubilização de Amostras de Alimentos. In: IV ENCONTRO NACIONAL SOBRE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS, 1994: São Paulo. **Anais**, São Paulo, SP: Instituto Adolfo Lutz, 1994.

OLIVEIRA, E. **Espectrometria de emissão Atômica (ICP-AES)**. Universidade de São Paulo, USP, Laboratório de Espectrometria de Emissão Atômica (apostila), 1996.

ORTEGA-CERRILLA, M. E. et al. *Efecto de la inoculación del hongo comestible Pleurotus ostreatus en la composición química y digestibilidad de la paja de cebada*. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, Caracas, v. 36, n.2, p.345-350, 1986.

PAULI, G. **Upsizing: como gerar mais renda criar mais postos de trabalho e eliminar a poluição.** Trad. Andrea Caleffi, Porto Alegre: Fundação ZERI Brasil, L&PM, 1998.

PEDROSO, A. L.; RAU, R.; SILVA, E. T. e GOBBI, E. F. **Avaliação do resíduo do cigarro (fumo e celulose) para crescimento do fungo *Pleurotus* sp.** In: Resumos do VII SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, **Anais...**, Maringá p.081,2002.

PRANCE, G. T. *The use of edible fungi by amazonian indians. advances.* In Economic Botany 1:127-139, 1984.

RAJARATHNAM, S. e BANO, Z. *Pleurotus mushrooms. part I A: morphology, life cycle, taxonomy, breeding and cultivation, crc critical reviews.* In: FOOD SCIENCE AND NUTRITION, 26:157-223, 1987.

RAJARATHNAM, S. e BANO, Z. *Pleurotus mushrooms. part III. biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. critical reviews.* In: FOOD SCIENCE AND NUTRITION, 28(1):31-113, 1989.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; e BANO, Z. *Biopotentialities of the basidiomycetes.* Advances in Applied Microbiology, San Diego, v. 37, p.233-361, 1992.

RAVEN, P.; EVERT, R. e CURTIS, H. *Biology of plants* Trad. VOYEUX, P. 2ª. ed., Rio de Janeiro: Dois, 1978.

REHM, H.J.; e PRAVE, P. *Biotechnology history, processes and products.* VCH Publishers, New York: p.344, 1987.

ROYSE, D. J. *Recycling of spent shiitake substrate for production of the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju** Applied microbiology and biotechnolog. Berlin, 38:179-182,1992.

ROYSE, D. J. *Specialty mushrooms: cultivation on synthetic substrate in the USA and Japan. Interdisciplin.* In: Sci. Rev., 20:1-10, 1995.

RUSSEL, J. B. **Química geral.** São Paulo: McGraw-Hill, 1982.

RYPACEK, V. *Biologie holzzerstörenden Pilze.* VEB Gustav Fisher: Verlag, Jena, 1966.

SAVOIE, J. M. ; MINVIELLE, N. ; CHALAU, N. Estimation of wheat straw quality for edible mushroom production and effects of a growth regulator. *Bioresource Technology*, Essex, 48:149-153, 1994.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – Departamento de Economia Rural, IBGE,2000.

SEFFRIN, G. **O fumo no Brasil e no mundo**. asil , Santa Cruz do Sul: AFUBRA - Associação dos Fumicultores do Brasil, 9 -10, 1995

SERMANNI, G. G.; D'ANNIBALE, A. e DI LENA, G. *The production of exo-enzymes by L. edodes and P. ostreatus and their use for upgrading corn straw*. *Bioresource Technology*, Essex, 48:173-178, 1994.

SINGER, R. *Mushrooms and truffles*. London: Leonard Hill Ltd, 1961.

SOBAL, M.; MORALES, P.; MARTINEZ-CARRERA, D. *Efecto del pH sobre el crecimiento de diversas cepas mexicanas y extranjeras de hongos comestibles en el laboratorio*. *Micologia Neotropical Aplicada*, México, v.2, p.19-39, 1989.

SOCOL, C.R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico. Biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e Basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus***. (Tese de Livre-Docência). UFPR, Curitiba, 228p, 1994.

STAMETS, P. *Growing gourmet and medicinal mushroom*. 3ª ed., Berkeley Ten speed press, 574 p. 1999.

STURION, G.L; OETTERER, M. **Utilização da folha de bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.)** In: CIÊNCIA E TECNOLOGIA ALIMENTÍCIA, v. 15, n..2, p. 194-200, 1995.

THOMPSON, M.; PAHLAVANPOUR, B. e WALTON, S.. J. *Simultaneous determination of trace concentrations of arsenic, antimony, bismuth, selenium and tellurium*. In *Aqueous Solution by Introduction of the Gaseous Hydrides into a Inductively Coupled Plasma Source for Emission Spectrometry – Part I: Preliminary Studies*. *Analyst*, v..103, p. 568-579, 1978.

THOMPSON, M. e WALSH, J. N. *Handbook of inductively coupled plasma spectrometry*. 2nd, New York, 1989.

TRABULS, R. L.; ALTERTHUM, F.; CANDEIAS, N.A.J. e GOMPERTZ, F. O. *Microbiologia*. 3ª ed., São Paulo: Atheneu, 1999.

TOYOMASU, T. e MORI, K. *Intra and interspecific protoplast between some Pleurotus species*. In: *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, Tokyo, v. 51, n3, p. 935-937, 1987.

WANG, N. L. *Edible fungi, cyclopedia of China*. In: Chinese Agricultural Publishing House, Beijing, 1993.

WEBBER, M. D.; KOKE, A. e TJEL, J. C. *A review of current sludge use guidelines for the control of heavy metal contamination in soils*. [s.l.], [s.ed.], 1983.

YANG, X. M. *Cultivation of edible Mushroom in China*. In: Agriculture Printing House, Beijing, China, 1986.

ZADRAZIL, F. *Cultivation of Pleurotus in: The biology and cultivation of edible mushroom.*, New York: ed: CHANG, S. T. & HAYES, W. A. Academic Press, 1978.

ZADRAZIL, F. e KURTZMAN, R. H. *The biology of Pleurotus cultivation in the tropics* New York: Tropical Mushroom Academic Press, 1984.

ZIMMERMANN W. M. *Degradation of lignin by bacteria*. In: *Journal of Biotechnology*, v. 13, p. 119-130, 1990.

ZHUANG, G.; MIZUNO, T. e SHIMADA, A. *Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom P. sajor-caju*. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* Tokyo, 57:901-906, 1993.

Referências da Internet:

www.cienciaquimica.hpg.ig.com.br/interessante/toxicologia.htm - Nicotina, 07/2003.

www.afubra.com.br/port/link21.html - Fumo, 07/2003

www.geomagna.com.br/news135.htm - Nicotina, 07/2003.

Disponível em: <http://www.uol.com.br/encmusical/> . Acesso em: 25 jun. 2003

7 ANEXOS

ANEXO I - CONTAMINANTES INORGÂNICOS

Portaria nº 685/98 de 27.08.98 da SVS/MS (D.O.U 28.08.98), REPUBLICADA no (D.O.U 24.09.98), e Tabela II ADITIVOS INCIDENTAIS DO DECRETO Nº 55.871/65 de 26.03.65.

CONTAMINANTES INORGÂNICOS	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ENCONTRADOS	LIMITE MAXIMO DE TOLERÂNCIA (ppm)	
ANTIMÔNIO	Bebidas alcoólicas fermentadas	0,20	
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	0,20	
	Refrescos e refrigerantes	0,20	
	Sucos de frutas e xaropes naturais	1,00	
	Outros alimentos	2,00	
ARSÊNICO	Bebidas alcoólicas fermentadas	0,20	
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	0,10	
	Refrescos e refrigerantes	0,20	
	Sucos de frutas e xaropes naturais	0,50	
	Gorduras vegetais	0,10	
	Açúcares	1,00	
	Caramelos e balas	1,00	
	Ovos e produtos de ovos	1,00	
	Peixes e produtos de peixes	1,00	
	Outros alimentos	1,00	
CÁDMIO	Bebidas alcoólicas fermentadas	0,50	
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	0,20	
	Refrescos e refrigerantes	0,20	
	Sucos de frutas e xaropes naturais	0,50	
	Outros alimentos	1,00	
CHUMBO	ORIGEM ANIMAL	"IN NATURA"	INDUSTRIALIZADO
	Carnes	0,50	1,00
	Aves	0,20	1,00

CHUMBO	Pescado	2,00	2,00
*(cont.)	Leite	0,05	0,05
	Derivados do Leite		
	Queijo	1,00	
	Manteiga	0,10	
	Outros	0,20	
	Ovos	0,10	0,20
	ORIGEM VEGETAL		
	Bulbos	0,50	0,50
	Raízes e tubérculos	0,50	0,50
	Cereais	0,50	0,50
	Hortal iças	0,50	0,50
	Leguminosas	0,50	0,50
	Frutas (exceto sucos,néctares, cristalizados ou glaceados)	0,50	0,50
	Sucos e néctares de frutas	0,40	
	Frutas cristalizadas ou glaceadas	1,00	
	Oleaginosas	0,20	0,20
	ESPECIFICOS		
	óleos e gorduras		0,10
	Margarina		0,10
	Refrescos e Refrigerantes		0,20
	Bebidas alcoólicas		0,50
	Cacau (exceto manteiga de cacau e chocolate adoçado)		2,00
	Manteiga de cacau		0,50
	Chocolate adoçado		1,00
	Chocolate não adoçado		2,00
	Açucar (sacarose)		2,00
	Dextrose (glicose)		2,00
	Frutose		0,50
	Xarope de glicose		2,00
	Lactose		2,00
	Café torrado e moído		1,00
	Alimento infantil		0,20

CHUMBO	Caseína e caseinatos		2,00
*(cont)	OUTROS	0,80	0,80
COBRE	Bebidas alcoólicas fermentadas		5,00
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas		10,00
	Refrescos e refrigerantes		5,00
	Sucos de frutas e xaropes naturais		30,00
	Outros alimentos		30,00
CROMO	Qualquer alimento		0,10
ESTANHO	Qualquer alimento		250,00
MERCURIO	Peixes, crustáceos e moluscos		0,5
	Qualquer outro alimento		0,01
NIQUEL	Bebidas alcoólicas fermentadas		0,10
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas		3,00
	Refrescos e refrigerantes		0,10
	Sucos de frutas e xaropes naturais		3,00
	Produtos hidrogenados		4,00
	Outros alimentos		5,00
SELENIO	Alimentos líquidos		0,05
	Alimentos sólidos		0,30
ZINCO	Bebidas alcoólicas fermentadas		5,00
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas		5,00
	Refrescos e refrigerantes		5,00
	Sucos de frutas e xaropes naturais		25,00
	Outros alimentos		50,00