

Ricardo Luiz Vieira

Bioconversão de resíduos lignocelulósicos em proteínas: O cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Patologia: área microbiologia, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof.ª Dra. Ida Chapaval Pimentel
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Curitiba
2001

BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS EM PROTEÍNA: O
CULTIVO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS DO GÊNERO *PLEUROTUS*

por

RICARDO LUIZ VIEIRA

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof^a Ida Chapaval Pimentel
Departamento de Patologia - Setor de Ciências Biológicas

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Setor de Tecnologia - Prof. Titular da Divisão de Biotecnologia

Curitiba, 11 de dezembro de 2000.

AGRADECIMENTOS

Ao físico Leandro Rodrigues de Souza, pela amizade e experiência compartilhada ao longo do desenvolvimento deste trabalho, desde o isolamento das linhagens até os experimentos finais de frutificação.

Ao micólogo André de Meijer, cujo belíssimo trabalho como naturalista no Estado do Paraná inspirou as decisões iniciais e reforça até hoje minhas opções pelas veredas da micologia.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade de aprimoramento profissional; a Fan Leifa, pelas orientações sobre cultivo e fornecimento das linhagens comerciais para controle e a Prof. Ida Chapaval Pimentel, pela amizade oportunidade de desenvolver esta monografia.

À Dra. Maria Angela Lopes Amazonas, pelo fornecimento de grande parte da bibliografia, sem a qual este trabalho não seria possível.

À minha família e a todos os meus amigos e colegas, pelo apoio e incentivo, e a DEUS pela saúde e disposição para transpor as dificuldades.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA.....	03
1. BIOLOGIA DOS COGUMELOS.....	03
2. VALOR NUTRICIONAL.....	04
3. A CIENCIA DOS COGUMELOS.....	08
3.1. Microbiologia.....	09
3.2. Fermentação.....	09
3.3. Engenharia ambiental.....	10
4. BIOTECNOLOGIA DOS COGUMELOS.....	10
4.1. Definição.....	11
4.2. Histórico.....	12
4.3. Aplicações Biotecnológicas.....	12
4.3.1. Bioconversão de Resíduos Orgânicos em proteínas comestíveis.....	12
4.3.2. Composto (substrato) esgotado.....	13
4.3.3. Compostos medicinais.....	15
4.3.4. Produção comercial de enzimas.....	21
4.3.5. Produção de cogumelos e genética molecular: usos na biotecnologia.....	22
5. NATUREZA BIOLÓGICA E MELHORAMENTO GENÉTICO DE <i>PLEUROTUS</i>.....	22
6. OBJETIVOS.....	25
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
7.2 MÉTODOS DE CULTIVO.....	27
7.2.2. PRODUÇÃO DE COGUMELOS.....	28
7.3. SUBSTRATOS UTILIZADOS.....	29
7.4. DESIGN EXPERIMENTAL.....	30
7.5. RESULTADOS.....	31
8. DISCUSSÃO.....	31
9. CONCLUSÃO.....	32
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTA DE TABELAS

Produção mundial das principais espécies de cogumelos comestíveis.....	02
Produção mundial de cogumelos (FAO).....	02
Conteúdo de proteína crua, carboidratos, gordura e fibra em 6 espécies cultivadas..	05
Composição de aminoácidos de 4 espécies mais representativas.....	07
Balanço composicional para o substrato definitivo.....	29
Produção de carpóforos dos isolados sobre o substrato definitivo.....	31
Eficiência biológica total das cepas em substrato definitivo.....	31
Figuras	
Frutificações do Isolado 1 em substrato definitivo.....	39

BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS EM PROTEÍNAS ATRAVÉS DO CULTIVO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS DO GÊNERO *PLEUROTUS*

RESUMO

A gigantesca fonte de materiais na forma de resíduos lignocelulósicos representa um grande potencial para o desenvolvimento do cultivo de cogumelos, que produzem alimentos de alta qualidade além de micomedicinais e tônicos com notáveis benefícios para a saúde. Além disso, se administrado de maneira correta, pode gerar uma indústria com emissões zero. O objetivo deste trabalho foi manter em cultura vários isolados de *Pleurotus laciniato-crenatus* e efetuar testes de competição entre os isolados e cepas comerciais de *Pleurotus* spp. Para determinar o desempenho das cepas foram efetuadas corridas micelianas em bolsas de polipropileno contendo substratos formulados com diversos resíduos lignocelulósicos pausteurizados, dentre estes, serragem de eucalipto, proveniente da indústria madeireira e os resíduos da agroindústria do café, como as cascas e a borra provenientes do processamento dos grãos. Foram realizadas as formulações que representassem um melhor balanço para o crescimento miceliano. A eficiência biológica foi mensurada através da biomassa dos carpóforos produzidos e dividida pela biomassa seca do substrato. Os resultados obtidos com os isolados selvagens foram bastante semelhantes aos das cepas comerciais, representando um potencial para aplicação destas cepas na criação de matrizes alternativas, tanto para a produção de cogumelos comestíveis quanto para o saneamento ambiental a serem aplicadas em nossa região, diminuindo assim o risco decorrente da introdução de microrganismos alóctones em ambientes tropicais. Para trabalhos posteriores sugere-se a combinação de novos isolados destas e de outras espécies de macrofungos neotropicais para a investigação dos potenciais biológicos e medicinais destes organismos através da bioconversão de resíduos lignocelulósicos.

INTRODUÇÃO

A vida na terra apenas é possível porque ocorre a reciclagem da matéria, de extrema importância para os sistemas vivos. A respeito do carbono, estima-se que o processo fotossintético produz anualmente cerca de 1.5×10^{11} toneladas de material vegetal seco, do qual cerca de 50% está na forma de celulose (GOTTSCHALK, 1988). Isto representa uma fixação de cerca de 6% do CO₂ atmosférico. Este processo é dividido igualmente pelos fotossintetizantes aquáticos e terrestres. A celulose é um polissacarídeo vegetal que é utilizado como fonte de energia por numerosos e diversos microrganismos, incluindo fungos e bactérias, que ocupam uma variedade de habitats (LJUNGDAHL, 1985).

Para os humanos, a biomassa na forma de lignina e celulose representa uma maneira de se estocar e explorar a energia solar representada por esta gigantesca fonte de materiais (CHARTIER, 1981). Entretanto, este recurso renovável precisa ser antes convertido em formas aplicáveis. A hidrólise enzimática das celulasas microbianas possui vantagens sobre os demais processos químicos (PARISI, 1989), especialmente em se evitar a poluição ambiental. Os processos enzimáticos uma vez isolados e disponíveis são recomendados para uma série de aplicações, como processar amido, produzir ração animal ou fermentação alcoólica de grãos. Por todas estas razões, o interesse na produção microbiana de celulasas têm crescido exponencialmente.

Sistemas celulolíticos funcionalmente completos podem ser obtidos de uma diversidade ampla de organismos, que incluem bactérias aeróbias e anaeróbias (LAMED, 1988; WILSON, 1992), fungos de podridão parda (WOOD, 1988), fungos anaeróbios (BARICHIEVIC, 1990) e fungos de podridão branca (UZCATEGUI *et al.*, 1991). Dentre todos estes sistemas, apenas os últimos são capazes de produzir um meio seguramente vantajoso para aplicações comerciais, que é a produção de cogumelos comestíveis (GLASSER, 1981; EMEJUAINÉ, 1981; BUSWELL, 1983), uma vez que grande parte dos resíduos vegetais encontra-se associado à lignina, um biopolímero de acesso decomposicional exclusivo dos fungos de podridão branca.

AS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE COGUMELO CULTIVADAS

O cultivo de cogumelos é uma atividade economicamente significativa e de rápida expansão na indústria global (FLEGG *et al.*, 1985; CHANG, 1993).

Tradicionalmente, tem ocorrido no sudeste da Ásia, incluindo de um lado China e Japão, e Europa, América do Norte e Australasia do outro. A produção asiática consiste de diversas quantidades, com vários diferentes cultivares, e poucos com uma alta produção, dominados pelo *Lentinula edodes* (shiitake), *Pleurotus* spp. (cogumelo ostra), e *Volvariella volvacea* (cogumelo da palha) (CHANG & MILES, 1991). A indústria europeia e americana tem produzido, até muito recentemente, *Agaricus bisporus*, o champignon, quase que exclusivamente (Tabela 1). Embora uma extrema variedade de outros cogumelos são cultivados em quantidades significativas, a principal mudança foi a difusão do cultivo dos “cogumelos asiáticos” nos anos 80 e 90 dentro do mercado ocidental e a enorme expansão na produção do *Pleurotus* spp. (CHANG, 1993).

Tabela 1 – Produção mundial das principais espécies (peso fresco, em megaton.).

Organismo	1986	1991
<i>Agaricus bisporus</i>	1,215	1,590
<i>Lentinula edodes</i>	0,320	0,526
<i>Volvariella volvacea</i>	0,178	0,253
<i>Pleurotus</i> spp.	0,169	0,917
<i>Auricularia</i> spp.	0,119	0,465
<i>Flamulina velutipes</i>	0,100	0,187
Total	2,176	4,273

Fonte: Chang, 1993. O valor total inclui a produção de outras espécies menores. *Lentinula edodes* era até recentemente *Lentinus edodes*, mas a sistemática molecular mostra que este organismo é distinto dos demais membros do gênero *Lentinus*.

Um retrato moderno do cultivo de cogumelos no mundo é bastante incerto. O Boletim da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) mostra um forte crescimento anual na tonelagem total produzida até 1996, sendo que desde então tem se estabilizado com crescimento moderado segundo fontes mais recentes (Tabela 2). Estes dados são substancialmente menores do que aqueles dados por CHANG & MILES (1989), entretanto, quaisquer que sejam os valores totais, a indústria dos cogumelos tem mostrado um crescimento vertiginoso, com uma extensa produção, uma indústria altamente competitiva e em expansão através de muitos países.

Tabela 2: Produção mundial de cogumelos (peso fresco, megaton.) : Dados da FAO

Ano	1981	1986	1991	1996	1997	1998
Produção	1,124	1,409	1,804	2,084	2,095	2,100

Fonte: Anos selecionados, de <http://Apps.FAO.ORG/default.htm>

No Brasil, o consumo de cogumelos é baixo. A produção nacional de cerca de 130 toneladas ano (base 1995) de *Pleurotus* é artesanal. Dentre os maiores estados produtores deste cogumelo estão Rio de Janeiro e São Paulo (URANO, 1996), com os produtores utilizando linhagens exóticas. Sendo este um dos países mais ricos do mundo em termos de biodiversidade e recursos naturais renováveis, apresenta ainda inúmeras vantagens, tais como o clima tropical e subtropical, extenso território geográfico e ainda uma economia basicamente agrícola, o que o torna potencialmente um dos maiores produtores de biomassa vegetal do planeta.

Desta forma, o cultivo de cogumelos encontra um terreno fértil para desenvolvimento neste país, onde se pode gerar uma indústria auto-sustentável, livre de emissões poluentes e de baixo investimento por parte dos empreendedores, podendo ser num futuro próximo uma fonte de empregos e renda alternativa, principalmente para diversos agricultores sujeitos a riscos por flutuações no preço das safras. Além do mais, estes aproveitam uma porcentagem insignificante da biomassa produzida pelas colheitas. Sabendo-se que a biodiversidade brasileira é uma fonte de recursos a ser melhor conhecida e estudada, podemos dizer que existe um grande potencial de aplicação dos fungos basidiomicetos nativos a ser pesquisado, adaptando espécies à domesticação. Entretanto, é necessário que tais pesquisas sejam direcionadas para resolver problemas de nossas regiões, utilizando espécies de nossos ecossistemas para o cultivo ou saneamento ambiental, diminuindo assim, os riscos decorrentes da introdução de microrganismos alóctones em ambientes tropicais (BONONI, 1999).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.A BIOLOGIA DOS COGUMELOS

Dos cerca de 12.000 fungos que produzem corpos de frutificação carnosos e macroscópicos, incluem uma estimativa de aproximadamente 2000 espécies comestíveis. Na sua grande maioria são compostos pelos Basidiomicetos, com notáveis exceções para as Morelas e as Trufas, que são Ascomicetos. Ascomicetos e Basidiomicetos são divisões “superiores” do reino Fungi, constituídas por organismos modulares (HARPER et al., 1986). A fase vegetativa, através da qual é o maior tempo do seu ciclo de vida, se caracteriza pelo estado micelial filamentosos, septado-reticulados, onde cada septo possui um complexo poro de comunicação, responsável pela delimitação das suas unidades

funcionais: as *hifas*. As hifas são células cilíndricas com a parede rígida e elástica, composta principalmente por quitina. As hifas apresentam-se inicialmente no estado monocariótico haplóide. Esta se origina após a dispersão e germinação de um esporo, que forma um longo tubo emergente que pode se originar imediatamente após a queda, ou o esporo pode permanecer dormente por longos períodos à espera de condições favoráveis. Este tubo, por sua vez, cresce e se divide em várias ramificações formando o sistema radial conhecido como micélio. Em uma placa de petri de laboratório, o micélio se desenvolve em uma superfície lisa de ágar, formando colônias circulares, cujo diâmetro vai aumentando em uma razão constante, da mesma forma que penetra o ágar. Na natureza, condições menos uniformes de crescimento resultam em condições menos uniformes do micélio, entretanto, o crescimento também se espalha pela superfície e penetra o substrato. Os nutrientes presentes no substrato, tanto no laboratório quanto na natureza, são absorvidos e suportam o crescimento. Com a exaustão dos nutrientes, a produção de esporos é iniciada, para uma dispersão ou um período de dormência, ou ambos. Existe uma infinidade de formas em que este processo é ativado, mas os esporos normalmente nascem nas hifas, ou sobre elaborados corpos de frutificação com tecidos multi-hifais, que podem ser desenvolvidos para melhorar uma dispersão aérea ou subterrânea.

O micélio dos fungos superiores apresentam em geral uma característica de dicariose. Nos Ascomicetos, esta fase é mais efêmera do que nos Basidiomicetos, onde este estado é mantido praticamente toda a fase absorptiva pelas divisões sincronizadas dos dois núcleos com o auxílio das *clamp connections*, ou conexões em fibulas. Estas projeções citoplasmáticas em forma de gancho podem inclusive ser observadas ao microscópio óptico, para confirmação de dicárions. Através do estado dicariótico que é possível a reprodução sexuada, que culmina com a formação do carpóforo. Neste sítio é que ocorrerá a fusão nuclear e a meiose, resultando em novos esporos haplóides. Nos Ascomicetos, a produção dos esporos é endógena, e ocorre nos *asci*, enquanto que nos basidiomicetos a produção é exógena, e ocorre nos *basidia* (GRIFFIN, 1997).

2. VALOR NUTRICIONAL

Sobre este tópico se apresentará alguma informação sobre as **propriedades nutricionais dos cogumelos**. Por muito tempo os cogumelos tem sido consumidos por seu sabor diferenciado e textura fina. Com a comercialização da produção dos cogumelos, o cultivador queria certificar que os cogumelos eram seguros para o consumo, o quer dizer,

não contém nenhuma substância tóxica, tais como quantidades excessivas de íons de metais pesados, assim como indicar a presença de substâncias desejáveis, tais como proteínas, gorduras, carboidratos, fibra, vitamina e sais minerais. Atualmente está disponível uma extensa informação dos nutrientes encontrados em várias espécies de cogumelos comestíveis.

Estes valores provêm de análises químicas dos cogumelos. Outras coisas, como a digestibilidade e disponibilidade para nutrição humana, não são consideradas. Na tabela 2.1, são dados os valores de proteína, carboidratos totais, gordura, fibra e o valor energético expresso em kcal/100g de massa seca das seis principais espécies de cogumelos cultivados. Deve-se observar que a proteína é determinada tomando-se o valor total de nitrogênio e multiplicando por um fator de 4.38. Este é o fator que dá o valor protéico mais próximo do real, que seria de 6.25, usualmente utilizado para determinar o conteúdo de proteína que contém cerca de 16% nitrogênio. A razão para se utilizar um fator de 4.38 com os fungos é que estes possuem a parede celular composta de quitina, um polímero formado por N-acetilglucosamina, que contém uma grande quantidade de nitrogênio indigerível.

Tabela 2.1 - Conteúdo de proteína crua, carboidratos, gordura e fibra em seis espécies de cogumelos comestíveis cultivados no mundo.

Cogumelo	Proteína (% peso seco)	Carboidrato (total) % peso seco	Gordura % peso seco	Fibra % peso seco	Valor energético (Kcal 100 g) peso seco	Referências
<i>Agaricus bisporus</i>	23.9-34.8	51.3-62.6	1.7-8.0	8.0-10.4	328-381	Crisan & Sands, 1978
<i>Auricularia spp.</i>	4.2-7.7	79.9-87.6	0.8-9.7	11.9-19.8	357-384	Crisan & Sands, 1978
<i>Flammulin a velutipes</i>	17.6	73.1	1.9	3.7	378	Crisan & Sands, 1978
<i>Lentinula edodes</i>	13.4-17.5	67.5-78.0	4.9-8.0	7.3-8.0	387-392	Crisan & Sands, 1978
<i>Pleurotus ostratus</i>	10.5-30.4	57.6-81.8	1.6-2.2	7.5-8.7	345-367	Crisan & Sands, 1978
<i>Volvariella volvacea</i>	21.3-43.0	50.9-60.0	0.7-6.4	4.4-13.4	254-374	Crisan & Sands, 1978

Um dado interessante é o conteúdo protéico relativamente alto. O valor protéico médio para as seis espécies, apresenta uma porcentagem protéica de 20%. Entretanto existe uma grande variação no conteúdo protéico entre as espécies, desde 4,2-7 % para *Auricularia* até 21,3-43 % para *Volvariella volvacea*. Diferenças entre cepas da mesma espécie se estabelecem por uma amplitude dos valores reportados nesta tabela. Uma comparação entre o conteúdo protéico dos cogumelos e outros tipos de alimentos é apresentado CHANG(1980), onde se observa que enquanto o conteúdo protéico é inferior ao da carne, a maioria das espécies apresentam um conteúdo protéico igual ou superior ao repolho, e também superior ao trigo e o arroz, que são a base dietética de grande parte da espécie humana. Além do que, a análise do conteúdo de aminoácidos essenciais para o homem, incluindo a lisina e leucina, revela a presença de todos em quantidades muito superiores às fontes nutricionais regulares, onde não se encontram todos e principalmente estes dois aminoácidos(tab.2-2)(CHANG, 1980).

Direcionando-se para o conteúdo das hifas, observa-se que estas contém uma grande quantidade de carbono. Portanto, não é de se admirar que os cogumelos frescos contenham uma grande quantidade de carboidratos. Também as fibras, presentes na forma de quitina, se encontram em quantidades relativamente altas. A tabela 2-1 revela que os valores de carboidratos em peso seco variam entre 51% em *V. volvacea* até 88% em espécies de *Auricularia*. De modo similar, os valores para a fibra, expressados em porcentagem de peso seco, variam entre 4% para *Flamulina velutipes* até 20% para espécies de *Auricularia*. Os carboidratos estão presentes na forma de vários compostos, de acordo com CRISAM e SANDS(1978). Em *Agaricus bisporus* este compostos estão presentes na forma de hexoses, pentoses, metil pentoses, dissacarídios, amino açúcares, açúcares ácidos e alcoólicos. BANO e RAJARATHNAM(1982) reportam que em *Pleurotus flabellatus* os carboidratos solúveis continham significativamente mais hexoses (32,3%) do que pentoses, e indicam que isto deve ser similar para praticamente todas as demais espécies de cogumelos.

A importância das fibras na dieta é enfatizada pelos nutricionistas e o conteúdo de fibras é indicado hoje em muitas embalagens de alimentos. Quando comparado as quantidades de fibras entre os cogumelos e os demais alimentos conclui-se que apresentam uma boa quantidade de fibras.

Tabela 2.2 - Composição essencial de aminoácidos de espécies mais representativas

Aminoácidos	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Volvariella volvacea</i>
Leucina	329-580	348	390-610	248-356
Isoleucina	200-366	318	266-267	193-261
Valina	112-420	261	309-326	298-414
Triptofan	91-143	Nd	61-87	86-112
Lisina	357-527	174	250-287	427-650
Treonina	243-366	261	264-290	209-307
Fenilalanina	186-340	261	216-233	159-285
Metionina	41-126	87	90-97	78-94
Histidina	0-179	87	87-107	-----
Arginina	268-529	348	306-334	-----
Total de aminoácidos essenciais	1827-3576	2045	2239-2638	1698-2469
Fonte	Crisan & Sands, 1978	Crisan & Sands, 1978	Crisan & Sands, 1978	Crisan & Sands, 1982

O conteúdo de gordura encontrados nos cogumelos varia desde 0.7% até 9.7% na base seca. CRISAM e SANDS(1978) reportam que a gordura crua contém uma representação de todos os compostos de lipídios, incluindo ácidos livres de gordura, monoglicerídeos, diglicerídeos, esteróis e fosfolipídeos.

Pelo menos 72% do total de ácidos graxos se encontram insaturados em cada uma das seis espécies. Esta é uma característica nutricional favorável, uma vez que esta forma de gordura é essencial para nossa dieta, em detrimento dos ácidos saturados, danosos para a saúde e encontrados em uma grande variedade de alimentos consumidos atualmente. Enquanto que a proteína animal encontra-se em quantidade superior à dos fungos, esta contém ácidos graxos saturados em grandes quantidades, podendo ser um fator comprometedor da saúde humana.

A importância das vitaminas é bastante conhecida na dieta humana.. Tem sido bem documentadas as enfermidades resultantes da deficiência de certas vitaminas. Exemplos incluem o escorbuto e o beribéri. Os cogumelos são uma boa fonte de vitaminas. Entre estas, incluem aquelas hidrossolúveis(tiamina, riboflavina, niacina, biotina e ac. ascórbico).

Todavia é bastante variável a composição dos diferentes tipos de vitaminas entre as espécies comestíveis, estando o ácido ascórbico ausente em algumas espécies, como *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* (CRISAN e SANDS, 1978). Além do mais, estes valores podem variar de acordo com o período de desenvolvimento do cogumelo, podendo alterar os resultados das análises dependendo se foram feitos em cogumelos secos, frescos ou enlatados, além da variabilidade entre os diferentes métodos de análise empregados. Outra fonte de variação é a idade dos cogumelos frescos, podendo variar as quantidades ao longo do tempo de armazenamento.

Os minerais presentes na área do substrato são absorvidos pelo micélio e transportados ao carpóforo produtor de esporos. Dentre os principais elementos, o potássio está em maior quantidade em todos os cogumelos comestíveis cultivados assim como outros elementos em abundância tal como o fósforo, cálcio e o sódio (LIU & CHANG, 1982). A quantidade de potássio e cálcio, essencial para nutrição, é muito superior nos cogumelos do que a encontrada nos vegetais consumidos (EL-KATTAN, 1991). O ferro é o único elemento presente em quantidades pequenas ou traços. A pergunta mais importante em relação aos elementos em menores quantidades se refere aos metais pesados, tais como chumbo, mercúrio e cobre, cuja presença em quantidades excessivas pode ser nociva à saúde humana. A esse respeito deve-se demonstrar que estes elementos não estão presentes em quantidades excessivas no substrato ou na água utilizados, bem como observar se não estão sendo acumulados em quantidades consideráveis nos carpóforos.

Até 1995, todas estas provas têm indicado que o nível de elementos tóxicos nos cogumelos está bem abaixo dos limites aceitos como seguros pelas organizações internacionais (*p.ex.* FAO e OMS) responsáveis pela padronização dos níveis considerados seguros para estes elementos. Atualmente se tem reportado a presença de outros elementos nocivos, tais como mercúrio em carpóforos de *Ganoderma*, e cádmio em *Lentinula*. Sugeriu-se que a fonte de contaminação provavelmente seria a água utilizada, uma vez que estes cogumelos eram produzidos em áreas fortemente industrializadas, onde os efluentes geralmente são desprezados na água.

3.A CIÊNCIA DOS COGUMELOS

A disciplina que trata dos fundamentos e da prática do cultivo dos cogumelos é conhecida como ciência dos cogumelos. Ainda que os cogumelos tenham sido produzidos intencionalmente por 1.200 anos (CHANG e MILES, 1987), desde quando se

iniciou o cultivo de *Auricularia* na China, esta parte da ciência dos cogumelos que se interessa pelos fundamentos – a compreensão do processo – é de origem muito moderna. Certamente que houve muitos avanços significativos na prática do cultivo desde seu início, mas pode ser considerado apenas como uma arte de cultivar. O estabelecimento dos fundamentos requer uma investigação sistemática. Esta deve incluir tanto os estudos científicos como os aspectos práticos do cultivo.

A ciência dos cogumelos atualmente é derivada de outras ciências modernas e está estritamente envolvida com outros campos do conhecimento: **microbiologia, fermentação e engenharia ambiental.**

3.1. MICROBIOLOGIA

O cogumelo é originado por um conjunto de hifas filamentosas que podem ser estudadas através de técnicas microbiológicas. Além do mais, o processo de compostagem envolve a atuação de microorganismos, bem como eventuais pragas que possam se manifestar.

Através das técnicas microbiológicas é possível manejar os micélios, fazendo-se a seleção prévia das cepas viáveis, bem como os isolamentos das gerações de esporos, para que se efetuem cruzamentos direcionados para manifestação de características desejáveis. As mesmas técnicas também são empregadas na obtenção de culturas puras, no preparo do *spawn* e na fase de inoculação no composto final. Portanto, tudo deve ser realizado de acordo com as condições mais estéreis possíveis, para que se assegure um micélio puro, livre de contaminantes indesejáveis.

O processo de compostagem também envolve diferentes grupos de microorganismos em diferentes fases do processo. O conhecimento da microbiota específica é necessário para desenvolver uma compostagem adequada, e requer uma prática e conhecimentos em microbiologia.

2. FERMENTAÇÃO

O composto é uma mescla de materiais orgânicos ricos em nutrientes que tem sido convertido em uma meio estável através das atividades fermentativas de muitos microorganismos. Este meio é seletivo para o crescimento de espécies particulares de cogumelos e menos favorável para desenvolvimento de outras espécies de

microorganismos rivais. O processo de estabilização do meio para um composto desejado é chamado de **fermentação no estado sólido**.

O processo envolve uma sucessão controlada de microorganismos no substrato. Tanto por razões econômicas quanto técnicas, o processo de compostagem não é desenvolvido sob condições estéreis, como demais processos de fermentação microbiana.

3. ENGENHARIA AMBIENTAL

A produção e o desenvolvimento de um cogumelo cultivado em um determinado composto implica principalmente em duas fases distintas: vegetativa e reprodutora. As condições ambientais de temperatura, luminosidade, aeração e umidade podem variar entre estas duas fases. Portanto, para que o produtor possa obter o resultado desejado é necessário que se faça o controle destas condições. Este controle pode ir desde técnicas manuais das mais simples até o emprego de computadores e dispositivos eletrônicos. De modo geral, os fatores ambientais podem ser definidos como:

a) A temperatura ideal para o desenvolvimento do basidioma é inferior ao desenvolvimento vegetativo.

b) Um aumento na concentração ambiental de CO₂ pode melhorar o crescimento vegetativo, mas por outro lado inibe a formação dos basidiomas.

c) Para algumas espécies a luminosidade pode inibir o crescimento vegetativo e em outras pode induzir a formação de primórdios de basidiomas.

d) Há uma necessidade maior de nitrogênio para produção de esporos do que para o crescimento vegetativo.

e) A umidade do composto e a umidade atmosférica são fatores críticos tanto para o crescimento vegetativo quanto para o desenvolvimento dos cogumelos.

4. BIOTECNOLOGIA DOS COGUMELOS

A biotecnologia tem existido desde quando o homem empregou pela primeira vez leveduras para produção de vinho ou pão. O homem primitivo não entendia nada de fermentação, mas sabia como empregar os processos biotecnológicos para obtenção de produtos desejáveis. Todavia, mais corretamente, estamos empregando a biotecnologia como um conceito moderno porque agora compreendemos a função dos microorganismos

nos processos de fermentação antes mencionados, e, a partir do trabalho clássico de Pasteur, cerca de 150 anos atrás, a química deste processo tem sido trabalhada de forma cada vez mais detalhada.

4.1.DEFINIÇÃO

O termo **biotecnologia** está sendo utilizado sem antes ser definido. Certamente é muito mais difícil encontrar uma definição para biotecnologia que se ajuste a todas as situações. Simplificando, a biotecnologia aplica informação científica e de engenharia a organismos vivos, ou às atividades destes organismos, para obtenção de certos produtos de valor para o homem em quantidades úteis. Uma descrição mais detalhada que se aplica hoje foi dada por Schneiderman (1985) e apresentada por Chang & Miles (1989): “Biotecnologia indica aqueles processos que produzem quantidades comerciais de substâncias úteis para o homem por meio de utilização de microorganismos, células de plantas, células de animais ou parte de células, como as enzimas. A biotecnologia é também a construção de microorganismos, células, plantas e animais que possuem alguma razão útil, por meio de fusão de células, recombinação do DNA e outros métodos à parte dos processos tradicionais de produção. A aplicação da biologia molecular para compreender o funcionamento das células e dos organismos para que suas atividades desejáveis sejam reforçadas ou alteradas, é outro aspecto da biotecnologia.”

Se tem assinalado que a Biologia dos Cogumelos consta de dois componentes principais. A **ciência dos cogumelos**, que se preocupa com a produção e abrange a tecnologia de compostagem e a engenharia ambiental, assim como a biologia dos cogumelos; e a **Biotecnologia dos Cogumelos**, que abarca todos os produtos derivados dos cogumelos bem como a tecnologia de fermentação e o gerenciamento e marketing (CHANG e MILES, 1992).

4.2.HISTÓRICO

Pode-se imaginar facilmente que o homem, desde seus fundamentos, utilizou os cogumelos como alimento. Têm reconhecido através do registro fóssil que este grupo de organismos se estabeleceu no Cretáceo Inferior (aproximadamente 130 milhões de anos), muito antes da raça humana se estabelecer no planeta. Podemos observar hoje que muitos animais se alimentam dos cogumelos, e o homem primitivo provavelmente *não*

se comportaria de modo diferente, e certamente estava consumindo cogumelos como alimento.

De qualquer forma, qual a relação com o uso dos derivados dos cogumelos com o homem? Um primeiro pensamento sugeriria que esta origem seria relativamente recente, entretanto sabe-se que existe uma larga história de emprego dos cogumelos para fins medicinais. Liu (1993), entre outros, tem declarado que *Ganoderma* tem sido apreciado na China pelas suas propriedades medicinais por mais de dois mil anos. *Ganoderma* não é uma espécie carnosa comestível, de modo que sua aplicação tem sido exclusivamente como tônico ou medicinal. Os efeitos medicinais não eram *coincidentes* com o fato de ser utilizado como alimento, como no caso de outras espécies como *Lentinula edodes*. Quer dizer, sabemos que as pessoas tem utilizado *Ganoderma* exclusivamente para fins medicinais por mais de dois mil anos.

4.3.APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

4.3.1. BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS EM PROTEÍNAS COMESTÍVEIS

Uma característica muito atrativa do cultivo de cogumelos, principalmente em países em desenvolvimento, é o fato de que os cogumelos produzem quantidades relativamente grandes de proteína de alta qualidade sobre um substrato que consiste de materiais desprezados. Enquanto que a qualidade da proteína dos cogumelos não é tão alta como a proteína animal, a sua produção é muito mais eficiente. O cogumelo é produzido diretamente em dejetos lignocelulósicos (palha, serragem, bagaço, borra de café, cascas de sementes, resíduos de algodão da indústria têxtil, etc.), enquanto que os animais devem ser alimentados com grandes quantidades de ração e forragem por um longo período de tempo, além de exigirem cuidados veterinários. Outras características que favorecem a produção de cogumelos estão no fato de necessitar de um pequeno espaço de terra e o investimento no capital inicial ser bastante baixo em relação aos demais empreendimentos. Os países em desenvolvimento são de economia basicamente agrícola, de modo que os dejetos lignocelulósicos estão disponíveis em grandes quantidades, além de uma grande provisão de mão de obra. Principalmente nos países em desenvolvimento, a dieta humana é freqüentemente deficiente de proteínas.

Por um lado parece que a produção de cogumelos poderia prover uma panacéia de soluções para os problemas nutricionais dos países em desenvolvimento, mas

isto não é tão simples. Pelo outro lado, pode ser que os cogumelos produzidos não sejam consumidos localmente, devendo ser exportados para mercados estrangeiros prontamente disponíveis. Além do mais, os agricultores locais podem não conhecer as complicações da produção dos cogumelos. Para este fim, deve existir apoio do governo para auxiliar no treinamento dos cultivadores, prover micélios adequados e assistir ao mercado. Desta forma, um grande potencial se apresenta, sendo que alguns países em desenvolvimento já começaram a explorá-lo, enquanto em outros apresenta-se apenas como possibilidade. Não se pode negar que de um modo ou de outro, que a bioconversão de resíduos lignocelulósicos é um dos conceitos mais excitantes na agricultura moderna.

4.3.2.COMPOSTO ESGOTADO

A substrato que resta após a colheita se conhece como **composto esgotado**. Este se acumula em grandes quantidades e a primeira pergunta que surge é o que se pode fazer com ele. Certamente não é desejável deixá-lo como possível fonte de contaminação, pois sabe-se que resta ainda uma certa quantidade de lignina e celulose somados ao próprio micélio e seus produtos metabólicos, capazes de manter atividade biológica ulterior.

O primeiro uso, bastante óbvio, é que talvez após a colheita do último cogumelo, o substrato possa ser suplementado para se produzir mais cogumelos dessa mesma espécie, ou ainda servir de suplemento para outras espécies de cogumelos que exigem condições ambientais diferentes. Têm-se utilizado na Província de Hebei, na China, o composto de *Volvariella volvacea* para produção de outono de *Pleurotus sajor-caju*. (CHANG, 1981)

Atualmente o composto esgotado tem sido empregado de três maneiras distintas, a saber: Como forragem para o gado, como condicionador do solo e em biocorreção.

a) Forragem para o gado

O que limita a utilização de resíduos lignocelulósicos como forragem para animais é a limitada digestibilidade do material. A principal causa é a presença da lignina, principal barreira para as enzimas hidrolíticas alcançarem a celulose e reduzi-la a polissacarídeos utilizáveis. Se a lignina é removida ou reduzida em quantidade, o material

pode ser digerido com maior eficiência pelo gado. Em outras palavras, a digestibilidade é dependente da delignificação.

Uma vez que os fungos de podridão branca são o único grupo capaz de produzir as enzimas necessárias para uma degradação deste material, nestes estão incluídos os cogumelos comestíveis, como *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes* e o medicinal *Ganoderma lucidum*. Tendo em vista o valor nutritivo acumulado no micélio mais a atividade delignificadora, o composto esgotado tem sido uma boa fonte de alimentação para diversos animais de granja.

MATHEUS(1999) tem ressaltado que a delignificação de certas madeiras do sul do Chile é produzida em tal quantidade sob condicionais naturais por *Ganoderma applanatum*, ou por espécies de *Armillaria*, que a madeira pode ser utilizada diretamente como forragem para o gado. Esta madeira delignificada é conhecida como “Palo podrido”. Em alguns casos tem se demonstrado *in vitro* que a digestibilidade da madeira aumentou de 3 para 77%.

A delignificação dos materiais em compostos desejados é uma área de ativo crescimento. Considerada aqui como **fermentação no estado sólido**. Sob condições anaeróbias, a fermentação da palha de trigo à 50% por 48 h era tão efetiva, que esta era tão eficiente como a esterilização.

b) Como condicionador do solo ou fertilizante

Têm-se observado que o composto esgotado, agregado a terra de agricultura ou de jardim, pode atuar como um eficaz condicionador de solo ou fertilizante que promove um grande rendimento das colheitas de certos cultivares vegetais. CHANG e YAU(1981) demonstraram que quando o composto esgotado do cogumelo da palha (*Volvariella volvacea*) foi agregado a terra, o rendimento dos tomates aumentou sete vezes. Acredita-se que este tipo de fertilizante possa promover o acesso das plantas ao nitrogênio, carbono e demais micro elementos, e ainda, mais importante, o substrato promove a formação do húmus. O húmus é fundamental para melhorar a aeração do solo, a retenção de água e a manutenção das estruturas pedológicas. Esta é uma utilização para o composto esgotado que tem uma grande aceitação por parte dos fazendeiros, uma vez que este tipo de fertilizante é absolutamente livre dos resíduos químicos presentes nos fertilizantes tradicionais.

c) Como correção biológica

Correção biológica refere-se ao processo de corrigir situações nocivas ou potencialmente nocivas de meios orgânicos. Estas situações nocivas abrangem águas contaminadas com pesticidas orgânicos, ou outros materiais que possam estar contaminados com poluentes orgânicos com natureza xenobiótica, de difícil manejo.

Tem sido ressaltado por BUSWELL(1995) que existem dois tipos básicos de biocorreção em grande escala. Um depende das atividades da microbiota efetiva pela qual as condições *in situ* para crescimento microbiano e biodegradação são otimizadas. No outro método, a área contaminada é isolada com os potenciais microorganismos que tem sido selecionados por suas capacidades de degradar os contaminantes que se encontram presentes. Tais microorganismos devem ser capazes de crescer e se desenvolver sob estas condições adversas, assim como devem apresentar não-patogenicidade de qualquer natureza.

A experimentação com as propriedades biocorretoras do composto de cogumelos esgotado esta ainda em suas primeiras etapas, entretanto os resultados são comprometedores. REGAN(1994) tem mostrado que o composto esgotado pode ser utilizado para corrigir soluções que contenham xenobióticos, absorvendo o pesticida da solução aquosa. Adicionalmente, o composto contaminado pode servir como fonte para outros microorganismos degradadores de xenobióticos.

A capacidade dos basidiomicetos em degradar os compostos xenobióticos deve-se à semelhança das estruturas orgânicas sintéticas com os compostos presentes na lignina, principalmente os compostos aromáticos. A biocorreção por fungos de podridão branca pode solucionar problemas de correção de certos contaminantes, incluindo os fenóis policlorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, policlorato dienzo-p-dioxina e DDT. Um exemplo é a aplicação dos micélios de podridão branca nos tratamentos de biopulpação da indústria papelreira (MATHEUS, 1999).

4.3.3.COMPOSTOS MEDICINAIS

Atualmente sabe-se que os fungos em geral apresentam um grande potencial industrial, seja na área alimentícia ou farmacêutica. Na área farmacêutica, o desenvolvimento tem sido assombroso, principalmente em pesquisas na China e no Japão, relacionadas aos polissacarídeos produzidos pelos basidiomicetos. Os cogumelos são

utilizados diretamente como alimento em tratamentos, ou então, são extraídos metabólitos de ação biológica a partir dos micélios produzidos em cultura submersa ou basidiomas. O estudo dos basidiomicetos produtores de polissacarídeos com atividades imunofarmacológicas vem sendo realizado desde o final da década de sessenta, sendo crescente o interesse em algumas espécies de cogumelos, devido a atributos tônicos e medicinais observados e isolados. A natureza destes compostos tem sido amplamente testada com intuito de avaliar as propriedades medicinais, sendo que nos últimos dez anos apenas esta indústria têm movimentado a cifra US\$ 4,5 bilhões no mundo.

A terminologia empregada para definir os grupos de substâncias de interesse presentes nos cogumelos classifica-se em (CHANG, 1993):

a) Nutracêuticos

O termo refere-se aos alimentos funcionais que se consomem como parte da dieta normal. Os cogumelos, como foi discutido anteriormente, possuem valores nutricionais desejáveis para uma boa manutenção da saúde, sendo que as substâncias responsáveis por estes efeitos podem ser mencionadas como nutracêuticos (p.ex., vitaminas).

b) Nutricêuticos

Um termo diferente, mas parecido, se utiliza para uma nova classe de compostos que tem sido extraídos tanto do micélio vegetativo quanto dos basidiomas de diversas espécies de cogumelos. Os nutricêuticos possuem atributos tanto medicinais quanto nutricionais. Se tem observado que os nutricêuticos podem exibir características tais como: antitumorais, imunomoduladores e propriedades hipocolesterolêmicas. Em consequência, estes compostos quando extraídos e isolados podem ser consumidos como suplementos alimentícios, servindo tanto para prevenção como para tratamento de várias enfermidades.

Os nutricêuticos mais amplamente utilizado atualmente são aqueles derivados do *Ganoderma*. Este grupo de substâncias teve o desenvolvimento biotecnológico em mais rápida expansão. Atualmente existem mais de 20 marcas de nutricêuticos de *Ganoderma* sendo que haviam somente 10 um ano antes. Estas marcas provém da China, Japão, Taiwan e Estados Unidos e manufaturas em Singapura.

Os estudos desenvolvidos para investigação dos efeitos medicinais de *Ganoderma* tem encontrado propriedades desejáveis, dentre as quais algumas têm sido atribuídas à este cogumelo por muitos anos. Os compostos envolvidos são os polissacarídeos e os

triterpenóides. As aplicações medicinais para estes compostos incluem alguns dos seguintes benefícios: redução da pressão sanguínea e da glicemia, funções hemoprotetoras, imunomoduladoras e antitumorais.

Existe muita pouca probabilidade de efeitos tóxicos tanto para os nutracêuticos quanto para os nutracêuticos, uma vez que estes compostos estão presentes em cogumelos comestíveis e medicinais utilizados por muito tempo. Não obstante, tendo em vista os recentes trabalhos sobre a presença de íons de metais pesados em quantidades excessivas em marcas de tabletes nutracêuticos de *Ganoderma* procedentes da China, é necessário que se executem provas de rotina nos produtos, para certificar-se de que os limites de metais pesados estejam dentro dos limites seguros. Uma vez excedidos, se deve determinar qual a fonte de contaminação para modificar o procedimento de produção, afim de obter cogumelos seguros. Este controle é benéfico para toda a indústria, uma vez que níveis indesejáveis de elementos tóxicos poderia comprometer a indústria toda ao descrédito. Desta forma é necessário um controle e monitoramento do padrão pelas agências especializadas.

A alta pressão exigida pelo mundo moderno acarreta muitas vezes situações de estresse, exigindo um alto esforço do corpo, onde o resultado pode ser a debilitação do sistema imune humano. Desta forma, muitas doenças tem surgido e se desenvolvido como consequência de uma baixa resistência à virulência dos agentes agressores. Existem algumas evidências de que o consumo de determinados cogumelos como alimento funcional resulta em um tratamento benéfico para as enfermidades oportunas, bem como o consumo de produtos biologicamente ativos para uma melhora da resposta imunológica, causando um aumento da resistência e em alguns casos, até a regressão da enfermidade.

c) Fármacos

Quando determinada substância que apresenta propriedades medicinais é isolada dos cogumelos como um produto natural, é referida como fármaco. Os fármacos possuem um uso médico específico, sendo indicado e utilizado como tratamento seguindo-se determinações médicas específicas.

Os polissacarídeos ou glicanos são polímeros de monossacarídeos interligados por ligações glicosídicas, com estrutura linear ou ramificada, homogênea ou heterogênea, podendo assim, apresentar um peso molecular variando desde de milhares a milhões de Daltons. Os polissacarídeos podem estar ligados a outros componentes

químicos, com proteínas, onde a proteína é o componente principal, formando as glicoproteínas; ou os proteoglicanos, onde a cadeia principal é formada por um polissacarídeo. Pode-se ainda ligar-se a lipídios (lipossacarídeos). As ligações químicas entre os monômeros, a composição, o tipo e a quantidade de ramificações determinam as propriedades físicas e as atividades biológicas destas moléculas.

A propriedade medicinal que tem sido mais intensamente investigada, é a atividade antitumoral, e é também aonde se têm obtido o maior êxito. A maioria dos polissacarídeos produzidos por basidiomicetos que apresentam atividade antitumoral são β -(1-3)-glucanos com ramificações β -(1-6). Abaixo segue-se uma lista dos cogumelos que desenvolvem algum polissacarídeo com algum efeito medicinal antitumoral, entre outras atividades biológicas interessantes(MILES e CHANG, 1997):

- *Auricularia auricula* (L.) Underwood
- *Collybia confluens* (L.) Kummer
- *Falmulina velutipes* (Curt. Ex Fr.) Sing
- *Ganoderma applanatum* (pers.) Pat
- *Ganoderma lucidum* (Leyas ex. Fr.) Karst
- *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler
- *Pholiota nameko* (T.Ito) S.Ito et Imai
- *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm
- *Schizophyllum commune* Fr.
- *Grifola frondosa*
- *Tremella fuciformis* Beck
- *Tricholoma matsutake*

Como foi dito anteriormente, os polissacarídeos aumentam a resposta imunológica. CHIHARA(1993) tem declarado que o objetivo mais importante da pesquisa do câncer deveria ser o de aumentar o tempo de vida dos neoplásicos, diminuir seu sofrimento e em seguida alcançar um cura completa para o câncer propriamente dito. Chihara argumenta a favor do aumento das defesas do hospedeiro contra os tumores através de substâncias que denomina **HDP** (Host deffense potencializer), dentre as substâncias presentes neste grupo, destaca-se o **lentinan**[®]. Este polissacarídeo é produzido pelo *Lentinula edodes*, e possui ligações do tipo β -(1-3)-glucano, com ramificações β -(1-6)-glucanopirose. Estudos extensivos têm sido feito com lentinano, obtido originalmente

dos carpóforos de *L. edodes* por extração com água quente. Deste extrato, que inibiu completamente o sarcoma 180 em ratos, se isolou este polissacarídeo que apresentava esta marcada atividade antitumoral. Chihara sugere que o lentinan opera como potencializador da defesa do hospedeiro devido a sua capacidade de estimular a reposta do sistema imune por maturação, diferenciação e proliferação de células do sistema imune, incluindo ativação dos macrófagos, dos linfócitos T citotóxicos e seus produtos de secreção, tais como fator de necrose de tumor. A produção destas células é normalmente reduzida com a presença de células tumorais. O lentinan também eleva o nível de interleucina 1 (IL-1), que atua sobre a diferenciação dos linfócitos.

Outro polissacarídeo comercializado é o **krestin®**, que é referido na literatura como PKS, extraído do micélio de *Trametes versicolor* (sin.: *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel.). As propriedades químicas do PKS foram reportadas por SAKAGAMI e TAKEDA(1993). O PKS é administrado por via oral em tratamento de câncer do aparelho digestivo, de mama ou de pulmão. Polossacaropeptídeo (PSP) foi também isolado do micélio de *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., com uma composição bastante similar à do PKS, diferindo pelo balanceamento de alguns monossacarídeos, como a arabinose, manose e fucose. Foi também descrito como modificador da resposta biológica contra o câncer, e também a resposta imunológica na presença de quimioterápicos e imunossuppressores.

Outra proteína polissacárida foi isolada de uma espécie de *Tricholoma*. Tem sido chamada de PSPC(complexo proteína polissacarídeo). Este composto isolado do micélio apresentou propriedades anti-tumorais.

No caso de *Ganoderma lucidum* e algumas outras espécies deste gênero, as propriedades medicinais estão mais completamente conhecidas. Dentre estas destacam-se os efeitos anti-tumorais. Assim como para os demais cogumelos, estes efeitos são devidos à presença de polissacarídeos. Geralmente a fração ativa dos GP (*Ganoderma* polissacarídeos) é o β -glucan, que possui um amplo efeito estimulante sobre os tecidos hematopoéticos, pela liberação final de citocinas, linfocinas e interleucinas(WANG *et al.*, 1994) com propriedades anti-tumorais já mencionadas. Estas propriedades associadas às demais propriedades do polissacarídeo e sua baixa toxicidade, fazem deste um poderoso medicamento particularmente atrativo para aqueles pacientes submetidos à quimioterapia, radioterapia e cirurgias severas.

Entretanto, um artigo clínico recente de Cleveland (YOUNG, 1996) afirma que as citocinas podem ser prejudiciais para o tecido cardíaco. Existem algumas evidências de que a presença das citocinas interleucina-1, interleucina-2 e fator de necrose do tumor

alfa (TNF-3) tem sido identificados como iniciadores de inflamação para reparação dos tecidos e da conseqüente falha do tecido cardíaco. Assim, apesar dos efeitos benéficos das citocinas sobre os tumores, deve-se levar em conta a relação com as falhas do coração. Portanto, estas substâncias não devem ser indicadas para tratamento de todos os pacientes neoplásicos.

Chihara também demonstrou que o lentinano aumenta a resistência do hospedeiro contra infecções virais bem como fungos, protozoários e bactérias. O lentinano e suas formas sulfatadas também exibem uma potente atividade anti HIV, inibindo a replicação viral e a fusão celular.

Outra substância isolada dos cogumelos também tem mostrado uma atividade antiviral como conseqüência da produção de **interferon** (BUSWELL & CHANG, 1992). Estudos em *Ganoderma lucidum* indicam que os ácidos triterpênicos atuam na membrana das células, modificando a susceptibilidade viral, inclusive ao HIV. LIU(1995) estudou o efeito de 13 frações de extratos de *Ganoderma lucidum*, observou que um exibia uma atividade inibidora da transcritas reversa (Jong, 1992).

O cogumelo *Agaricus blazeii* Murril é uma espécie endêmica do Brasil. Tem sido intensivamente cultivada na China e Japão, e agora se estabelece também no Brasil, principalmente no estado de São Paulo e região norte do estado do Paraná. Esta espécie tem sido comercializada com fins medicinais, especialmente pela ação anticancerígena (MIZUNO *et al.*, 1990). A origem desta espécie é ainda incerta, bem como sua classificação. Atualmente, diversas instituições brasileiras estão desenvolvendo projetos com o intuito de classificar as propriedades anti-tumorais do chamado “cogumelo do sol”. Problemas como estes, demandam de estudos comparados com outras espécies morfológicamente afins, dependendo de técnicas de biologia molecular para uma caracterização mais completa.

A relação dos níveis mais altos de colesterol no sangue com enfermidades cardiovasculares é bem conhecida. Diminuir a concentração de colesterol no sangue é uma meta médica desejável para prevenção deste tipo de enfermidade. Substâncias que possuem este efeito biológico são chamadas de **hipocolesterolêmicas**. Um dos efeitos medicinais reportados em *Lentinula edodes* foi este, com base pela ingestão regular por pacientes humanos, que associado a este efeito havia também a redução da pressão sanguínea (SUZUKI y OSHIMA, 1976). Outro estudo clássico foi desenvolvido por KANEDA & TOKUDA, 1966, onde ratos alimentados exclusivamente com clara de ovo, até atingirem níveis extremos de colesterol, foram em seguida submetidos a uma dieta contendo 5% de

peso seco de shiitake, mostraram após 10 semanas uma queda de 24% dos níveis de colesterol. Estes mesmos resultados também foram observados em *Auricularia polytricha* e *Flammulina velutipes*, porém com um efeito ligeiramente menor. As propriedades hipocolesterolêmicas são atribuídas à aceleração do metabolismo do colesterol, principalmente estimulado pela **eritadenina**, que mostra um efeito nos níveis de colesterol, triglicerídeos e fosfolípidos. O cogumelo ostra *Pleurotus*, também demonstrou uma atividade hipocolesterolêmica, sendo isoladas outras substâncias, como a **lovastatina**, que atua como um precursor do mevalonato, reduzindo o acúmulo de colesterol.

Apesar dos fungos serem bem conhecidos pela produção de importantes compostos antibióticos, como p.ex. a penicilina, a presença de antibióticos nos cogumelos ainda não está bem documentada. COCHRANE (1978) revisou a situação para os cogumelos comestíveis e outros basidiomicetos com produção de antibióticos antibacterianos. BENDICT & BRADY (1972) enfatizaram que os poliacetilenos são comuns em diversos basidiomicetos superiores, incluindo espécies comestíveis de *Pleurotus* e *Tricholoma*. Desde então tem sido relacionados uma lista de compostos de outra natureza com propriedades antibacterianas, incluindo compostos fenólicos, purinas e pirimidinas, quinonas e terpenóides, comumente encontrados nestes organismos (VOGEL *et al.* 1974). Efeitos antifúngicos também tem sido reportados entre os cogumelos comestíveis. A cortinellina, composto encontrado em *Lentinula edodes*, pertence a este grupo de substâncias (HERMAN, 1962). Outros cogumelos comestíveis também tem sido reportados como produtores de substâncias fungistáticas, como *Coprinus comatus* (BOHUS *et al.* 1961) e *Oudemansiella mucida* (MUCILEK *et al.* 1969).

4.3.4. PRODUÇÃO COMERCIAL DE ENZIMAS

Um importante uso industrial para os fungos está na produção comercial de certas enzimas. Para os cogumelos, as principais enzimas estão relacionadas com a degradação de materiais lignocelulósicos. Tais enzimas, como as manganês-peroxidases e lacases, são as principais na degradação do glucano e da celulose, e podem ser empregadas na preparação do substrato, efetuando as alterações desejadas. Certas enzimas podem ainda ser empregadas juntamente com demais microorganismos efetivos envolvidos no processo de fermentação no estado sólido, facilitando a colonização daqueles micélios desejados e até mesmo, dispensar a pasteurização.

4.3.5. PRODUÇÃO DE COGUMELOS E GENÉTICA MOLECULAR: USOS NA BIOTECNOLOGIA

As forças condutoras dos estudos da genética molecular dos cogumelos cultivados constam de três aspectos. Primeiro, porque provavelmente os cogumelos que consumiremos em poucos anos serão geneticamente modificados (construídos), para eventuais resistências contra patógenos bacterianos ou acumular grandes quantidades de proteína durante a fase de estocagem. Isto não parece que acontecerá tão rápido, pois, como a transformação ainda não é um procedimento de rotina para estes fungos e a aceitação do consumidor para alimentos geneticamente alterados não é muito entusiasmada, para não se dizer positivamente negativa. Apesar disso, pesquisas na área serão conduzidas.

Segundo, os métodos moleculares têm revelado relações de similaridade entre as cepas, a ser definidas com uma resolução e clareza ainda não disponíveis formalmente. Os custos para o desenvolvimento das cepas poderão ser mais facilmente sustentados se o produto final pode ser comercialmente protegido.

Terceiro, porque o crescimento e a frutificação destes fungos é uma área muito pouco conhecida da microbiologia, e que está encontrando um avanço mais veloz por parte de estudos moleculares do que pelos métodos tradicionais de genética e fisiologia. A melhor compreensão da maneira como estes organismos crescem e se desenvolvem é um conhecimento necessário tanto para implementação do cultivo quanto para melhoria das cepas (WITHEFORD & THURSTON, 2000).

5. NATUREZA BIOLÓGICA E MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PLEUROTUS*

O gênero *Pleurotus* é cosmopolita. Segundo SINGER, 1975 está dividido em 4 seções com um total de 39 espécies. Entretanto, a definição de espécie, principalmente neste gênero, é bastante controversa, e pode ser considerada uma tentativa (EGER, 1978). Outros estudos envolvendo a especiação em basidiomicetos indicam que esta é fortemente influenciada pelas suas características genéticas, e pelo controle genético de dois importantes eventos do ciclo de vida: o cruzamento e a frutificação. Os parâmetros de especiação – variação, seleção e isolamento – são influenciados por isto. No gênero *Pleurotus* o cruzamento e a frutificação de várias espécies e linhagens podem ser estudadas em condições de laboratório. Artigos relatando sobre o problema da frutificação

e especiação foram publicados por ANDERSON & WANG (1972), CAILEUX *et al.* (1981), EGER *et al.* (1976) e Li (1980). Estudos mais recentes de bioquímica e biologia molecular vem sendo desenvolvidos com intuito de elucidar a sistemática (MAY and ROYSE, 1988) onde são medidos os padrões de migração de isoenzimas e também amplificação de fragmentos de DNA r e mitocondrial (LARRAYA, L. M. *et al.*, 2000).

Eles estavam associados à família Tricholomatacea, e mais recentemente à família Lentinacea, ordem Agaricales, Classe Basidiomicetes. Eles crescem naturalmente principalmente em zonas temperadas ou em estações mais frias das áreas subtropicais, como destruidores de materiais lenhosos, incluindo raízes, troncos e galhos de arvores mortas, e às vezes como parasitas em plantas vivas, como no caso de *Pleurotus eryngii*. (BRESINSKI *et al.*, 1987).

A morfologia geralmente apresenta o estípite excêntrico e o píleo com a forma de concha, espatulada e linguiforme, razão pela qual é chamado de cogumelo ostra. As lamelas podem ser mais ou menos decurrentes, com coloração ou não, e a superfície do estípite pode ser tomentosa ou lisa. Possuem uma fragrância e sabor deliciosos. A textura é leve e a coloração variada, incluindo o azul escuro, rosa salmão, creme-marrom, amarelo ou tão branco quanto o micélio. Da mesma forma, os esporos podem variar de cor, indo desde um cinza escuro até o branco, passando pelos tons de creme e rosa. As mudanças na coloração podem sofrer variações de acordo com fatores ambientais, como p. ex., luz e temperatura. O tamanho pode variar de 5 a 30 cm de diâmetro e, em geral, o cogumelo é menor em materiais lenhosos e maior em palha de cultivares agrícolas.

Pleurotus ostreatus (Jacq. Ex Fr.) Kummer é a espécie mais conhecida dentre os cogumelos ostra. Outras espécies comumente cultivadas incluem: *P. sajor-caju* (Fries) Sing. (Cogumelo ostra cinza ou cogumelo cauda de fênix); *P. cystidiosus* O.K. Miller (cogumelo abalone); *P. ostreatus* var. Florida nom. prov. Eger (cogumelo ostra branco); *P. citrinopileatus* Sing.; *P. flabellatus* (Berk. And Br.) Sacc. e *P. sapidus* (Schulzer) Kalchbremer. O *Pleurotus albidus* (Berk) Pegler., sinônimo, *Pleurotus laciniatocrenatus* (Speg.) Speg. e *P. araucariicola* (Rick) Singer é uma espécie neotropical (sul-americana), com frutificações praticamente o ano todo, de ampla distribuição nas regiões subtropicais e temperadas (Brasil, Uruguay, Paraguay e Argentina). Entretanto, deve ser extremamente difícil identificar isolados com base nas suas características morfológicas, uma vez que as descrições dos autores é bastante vaga. A melhor maneira de evitar confusão poderiam ser testes apropriados de cruzamento entre a cepa em questão e cepas referência.

Em cada basídio ocorrem normalmente 4 basidiósporos. Ocasionalmente tem sido observados 5 ou mais. Têm sido demonstrado que *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* e espécies relacionadas são claramente heterotáticas e tetrapolares. Diferenças entre o vigor e a taxa de crescimento entre vários isolados haplóides eram evidentes, de modo que as possibilidades para desenvolvimento de cepas de alta qualidade e produtividade através de programas de melhoramento é promissora.

As fontes de carbono preferidas para o crescimento micelial são o amido, glucose, frutose, maltose, manose, sacarose, pectina, celulose e lignina. O etanol também pode ser utilizado como uma fonte de carbono para o crescimento micelial, entretanto outros ácidos orgânicos têm se mostrado prejudiciais para o crescimento do micélio. As fontes de nitrogênio utilizadas pelo micélio do *Pleurotus* são peptona, farinha de soja, milho moído, extrato de levedura, sulfato de amônia, asparagina, serina, alanina e glicina. A utilização de uréia é limitada. As temperaturas para crescimento do micélio são cerca de 24 a 28 C. e a variação de pH entre 5.5 e 6.5. A tolerância do micélio para pressão de CO₂ é alta. Os micélios de *Pleurotus* spp. podem crescer ainda sobre uma pressão de dióxido de carbono de 15 a 20 %. Apenas com concentrações de CO₂ acima de 30 % é que o crescimento miceliano diminui.

Embora o micélio do *Pleurotus* pode tolerar altas concentrações de CO₂, o corpo de frutificação do cogumelo ostra não suporta alto CO₂. Quando as concentrações na casa de frutificação ultrapassam 600ppm(0,06 %), os estípetes se alongam e o desenvolvimento do píleo será reprimido (ZADRAZIL, 1978).

As necessidades de luminosidade do micélio são diferentes ao longo dos vários estágios de crescimento. O crescimento miceliano não necessita de qualquer tipo de luz, e o cultivo em lugares escuros tem sido melhor do que luminosos. A formação dos primórdios, por sua vez, necessita de luz. A formação requer uma luminosidade de cerca de 50 a 500lux de intensidade durante 12 h.

Uma vez que o crescimento de *Pleurotus* é comparativamente mais fácil e possui uma ampla adaptatividade, seu cultivo têm sido desenvolvido pelo mundo inteiro, com uma produção crescente nos últimos anos. As técnicas de cultivo têm sido implementadas e agora são simples e baratas. Uma ampla quantidade de resíduos vegetais que contém os requerimentos nutricionais – serragem, palha, bagaços, sabugos de milho, algodão, folhas e cascas de banana, arroz e café – podem todos ser usados para o crescimento de *Pleurotus*, com uma produção de cogumelos sem o requerimento materiais enriquecidos ou processados.

Entretanto, *Pleurotus* spp. possuem algumas características que são adversas, e as quais podem ser transpostas pelo melhoramento. *Pleurotus* spp. tem um carpóforo gimnocárpico, o que quer dizer que, durante o seu desenvolvimento as lamelas nunca são cobertas por um véu. Os esporos são então produzidos tão logo a primeira lamela é gerada. Então, um número tremendo de esporos é liberado por cada carpóforo antes da colheita. Em *Agaricus bisporus*, os esporos tem sido veículos de contaminação viral, de forma que a colheita deve ser realizada antes da abertura do véu, reduzindo drasticamente a dispersão viral. Entretanto, em *Pleurotus* um vírus emergente poderia causar um desastre. Outra questão é que a descarga de esporos gerada pode ser prejudicial para os trabalhadores nas casas de frutificação, causando frequentemente alergias e problemas respiratórios (FLORENCE, 1986)

Outra característica que pode se melhorar é a questão de que alguns carpóforos podem apresentar uma textura muito fina e frágil, dificultando um transporte para o comércio. O que pode ser pior ainda é o fato da população onde se está produzindo o cogumelo não ter uma boa aceitação.

Para vencer estes desafios, pesquisa no melhoramento da qualidade e cruzamentos para obtenção de variedades não produtoras de esporos, bem como programas educacionais de nutrição serão necessários para expansão deste grupo de cogumelos na dieta normal das pessoas de todo o mundo.

6.OBJETIVOS

A fase experimental foi desenvolvida de acordo com as seguintes etapas: (i) manutenção de cepas de *Pleurotus albidus* (Berk.) Speg. e (ii) teste de competição dos isolados em substrato formulado de resíduos agro-industriais.

O principal objetivo é avaliar o desempenho das cepas nativas de *Pleurotus albidus* em relação a cepas comerciais em requerimentos nutricionais e ambientais mínimos, como seleção prévia para trabalhos posteriores .

7.MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental foi desenvolvida no decorrer do segundo semestre de 2000, nos LABORATÓRIO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS, Setor de Tecnologia Química e MICROBIOLOGIA, no Departamento de Patologia Básica.

7.1.OBTENÇÃO DOS MICÉLIOS

Inicialmente, foram isoladas a partir de carpóforos silvestres as seguintes cepas de *Pleurotus albidus* (Berk.) Singer, sinônimo *Pleurotus laciniatocrenatus* (Speg.) Pegler: (**Plal01**) Bosque João Paulo II, 20/V/1997, em galhos decíduos de *Araucaria angustifolia*; (**Plal02**) Cristo Rei, 18/X/1998, sobre caule de palmeira (monocotiledônea); (**Plal05**) Fragmento de floresta ombrófila mista no Município de Araucária, 07/VI/1999, também sobre galhos de *Araucária angustifolia* e (**Plal06**), Mata nativa do CNPF-Embrapa no Mun. de Colombo, 15/VII/1999, sobre material lenhoso de arbórea nativa. A espécie foi indentificada com base em suas características macro e microscópicas.

O isolamento foi efetuado empregando-se BDA, onde fragmentos de tecidos internos do carpóforo foram repicados sobre a superfície do meio sob o fluxo laminar, então incubados à 21-24 °C. Após uma certa segurança da pureza do micélio, este foi transferido para os tubos BDA, e incubados à 4 °C, para conservação das linhagens.

Duas linhagens comerciais, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Socol, do Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR, foram usadas como controle para os testes de competição: **P.09**(*Pleurotus ostreatus*) e **P.22**(*Pleurotus sajor-caju*).

7.2.MATERIAIS

Placas de petri;
 tubos de ensaio;
 câmara de fluxo laminar;
 estufa bacteriológica;
 bico de bunsen;
 pinça fina;
 estilete;
 meio de cultura batata-ágar-dextrose(BDA), da marca MERK;
 sementes de trigo sem fungicida;
 cascas e borra de café;
 serragem de eucalipto;
 CaCO₃;
 sacos de pano;
 bolsas de polipropileno (0,5 L volume- 5 µm de espessura);
 termohigrometro;
 vaporizador;
 astes de bambu;
 sombrite;
 plástico para casa de vegetação(2x3m);

7.2.MÉTODOS DE CULTIVO

7.2.1.PREPARO DO SPAWN

A principal preocupação na hora do preparo do *spawn* envolve o isolamento e a manutenção das cepas estáveis para que correspondam às expectativas dos cultivadores. Uma cepa fraca será insatisfatória, não importam quão boas estejam as condições do material do *spawn* ou da casa de incubação propriamente. Certos princípios para a obtenção de cepas vigorosas e como fazer as seleções apropriadas são citadas em CHANG, (1978).

Uma quantidade imensa de materiais podem ser usados, sendo ou não os mesmos do substrato definitivo, com diversos tipos de combinações e *balanceamentos* para a produção do *spawn*. Tem havido uma certa tendência em enfatizar que a suplementação

do *spawn* com determinados tipos de substrato (ROYSE, 1985). Na verdade, o substrato é meramente o veículo para o transporte da cepa em um meio conveniente até o substrato definitivo. Todavia, o substrato para o *spawn* não influencia no hábito de crescimento do micélio tão extensivamente. Alguns *spawns* podem crescer (correr) mais rápidos do que outros, entretanto, pode não significar um aumento significativo da EB (CHANG, 1989). BARBOSA (1996) demonstrou que o inóculo suplementado com 2% de extrato de levedura pode aumentar a EB de 45 para 58%, utilizando o mesmo rejeito. Entretanto, na escolha do substrato para o *spawn*, o custo e a disponibilidade do material devem ser levadas em conta. O substratos escolhidos para produção do *spawn* neste ensaio foram sementes de trigo e cascas de arroz, e outro com o substrato definitivo. Segue uma descrição da preparação.

Os grãos e as cascas foram misturados e cozidos sob o vapor do autoclave durante cerca de 20 min, até inflar mas não arrebentar. O excesso de água é drenado. Carbonato de Cálcio (2% m/m) e misturado. As bolsas de polipropileno são completadas até $\frac{3}{4}$ do volume com o substrato não pressionado e fechados com uma rolha de algodão e barbante. As bolsas são então autoclavadas por 30 min a 121 °C e esfriadas. As bolsas são inoculadas com os micélios das culturas puras em BDA incubadas em temperatura própria. Quando o micélio preencher toda a superfície bem como penetrar todo o substrato, o *spawn* estará pronto. A inoculação e a incubação do substrato deve ser feita sob condições estritamente assépticas. Qualquer contaminação por esporos de fungos ou bactérias que flutuam ao redor da atmosfera de incubação pode comprometer completamente o rendimento do *spawn*. Para evitar isto, precauções cuidadosas devem ser tomadas.

7.2.2. PRODUÇÃO DE COGUMELOS

Existem vários tipos de métodos para o cultivo dos cogumelos ostra. A nossa produção controlada de fungos encontra um paralelo no mundo inseto, onde térmitas vivem exclusivamente pelo fato de estarem “cultivando” fungos. Usando o fungo como uma chave, eles “destrancam” a matéria vegetal indigerível, e usam os produtos da decomposição como principal fonte de nutrição.

Como atualmente produzimos uma série de produtos lignocelulósicos indigeríveis, podemos direcionar a sua decomposição para a produção de alimentos, fármacos e reciclagem de nutrientes, evitando as soluções mais usuais, que podem ser o incineramento ou despejos em afluentes.

Uma grande variedade de materiais lignocelulósicos agro-industriais tem sido empregados como substrato para fermentação no estado sólido por *Pleurotus*, com praticamente todos mostrando resultados promissores. Dentre estes, incluem os resíduos da indústria do café. A razão para que seja possível utilizar com sucesso diferentes resíduos vegetais, ao invés de exclusivamente toras, foi definitivamente estabelecida após o desenvolvimento da **técnica do cultivo em bolsas**. Os diferentes substratos podem seguir uma formulação de acordo com CHANG (1989).

Os ingredientes são misturados e imediatamente ensacados sem pressão, evitando fermentações que podem ser promovidas. A pasteurização é um processo que pode ser feito em sacos de pano, sob vapor d'água entre 15 e 30 min. Após o resfriamento, iniciar a inoculação do *spawn*. Para este procedimento, os autores recomendam uma quantidade de inóculo de 2 a 25 %, de acordo com o tempo de colonização desejado.

7.3.SUBSTRATOS UTILIZADOS

Os grãos foram obtidos no Mercado Municipal de Curitiba. As cascas de arroz foram adquiridas em uma Arrozeira comercial de Colombo. A serragem (*Eucaliptus duni*) foi gentilmente fornecida pela EMBRAPA Florestas-Colombo. As cascas e a borra de café foram obtidas nos estoques presentes para ensaios do Laboratório de Processos Biotecnológicos.

Os ingredientes foram misturados segundo a tabela 7.1, seguindo o modelo de CHANG(1989).

Tabela 7.1 - Balanço composicional para o substrato definitivo:

Material	%(m/m)
Casca de café	50
Serragem	25
Borra de café	25
CaCO ₃	2
Água	75

O substrato definitivo é preparado de acordo com o seguinte procedimento: Após a pasteurização de todos os ingredientes em sacos de pano, é misturado a proporção de 1% de CaCO₃, previamente esterilizado. O material é então transferido para as bolsas de plástico sob condições assépticas e juntamente com inóculo fragmentado entre 2 a 20%,

sendo então lacrados e agitados para promover uma boa mistura do inóculo com o substrato. Ao vedar a boca das bolsas, recomenda-se utilizar também rolhas de algodão, que promoverá uma colonização mais veloz do micélio (ROYSE, 1985, ZADRAZIL, 1982).

As bolsas podem então ser transferidas para uma incubadora escura, até o crescimento (corrida do *spawn*) completo, onde se observa o micélio preenchendo todo o volume de substrato. Após esta fase, as bolsas são então abertas em casa de frutificação, onde a umidade deve ser mantida entre 80-95%, a temperatura entre 18-26 °C e o fotoperíodo de 12 h diárias (ZADRAZIL, ROYSE, 1985) . O aparecimento dos cogumelos se dá cerca de 24 h após o aparecimento dos primórdios, devendo ser colhidos no máximo em 48 h .

Atualmente já se possui uma tecnologia para produção industrial mecanizada (ZADRAZIL, 1978), onde se pode manter mais facilmente as condições assépticas, assegurando uma produção eficiente, livre de contaminantes.

7.4. DESIGN EXPERIMENTAL

Para determinar o desempenho dos isolados, a massa do substrato seco foi anotada. Após o preparo, a inoculação do *spawn* foi de cerca de 3%. Os sacos foram sendo pesados sucessivamente, afim de se medir o ganho de biomassa. Após a corrida do *spawn* , as frutificações foram pesadas, onde se determinou a variação da Eficiência Biológica, de acordo com a proporção:

$$EB = \text{Peso fresco dos cogumelos} / \text{peso seco do substrato} \times 100$$

Foram inoculadas cinco bolsas para cada linhagem durante a corrida do *spawn* no substrato definitivo. As bolsas foram incubadas em estufa escura até a corrida completa do *spawn*. A etapa de frutificação foi realizada em uma câmara experimental de acordo com o modelo apresentado por CHANG (1989) , sendo incubadas em temperatura ambiente, de modo a se observar um desempenho com requerimentos mínimos, onde a umidade foi mantida com auxílio de um vaporizador para jardim , e controlada por um termohigrômetro.

8.RESULTADOS

Foi possível observar que o comportamento micelial das cepas nativas sobre os substratos selecionados foi bastante semelhante ao das cepas controle, nos ensaios de competição com os requerimentos ambientais mínimos.

A maior fonte de variação foi observada no tempo da corrida do *spawn*, onde as cepas mostraram uma grande diferença, mesmo entre os controles. A eficiência biológica das linhagens nativas mostrou um bom desempenho,

Tabela 8.1. Produção de carpóforos (E.B.) de *Pleurotus albidus* sobre casca de café, borra de café e serragem de Eucalipto.

Cepas	Colheitas: E.B.% (dias)	2	3	4	Peso médio dos carpóforos(g)
Pl al 1	28 (0)	22 (14 ±5)	10 (22 ± 3)	3 (7 ±2)	10,22
Pl al 2	39 (0)	11 (21 ±4)	4 (16 ±7)		12,12
Pl al 5	25 (0)	19 (20 ±9)	7 (35 ±9)	4 (5)	8,11
Pl al 6					- -
P.09	42 (0)	22 (12)	8 (15)	5 (23)	13,31
P.22	45 (0)	27 (7)	10(5)		14,2

Tabela 8.2. Eficência biológica total das cepas em serragem, casca e borra de café

Cepas	Plal 1	Plal 2	Plal 5	Plal 6	P.09	P.22
EB total	63	54	53	0	72	82

9.DISCUSSÃO

A produção de inicial com 39% de EB para a cepa Pl al 2, mostrou que um desempenho com uma média aceitável, muito próximo das primeiras produções das cepas comerciais (43%). A EB média para as espécies foi de 56 %, com Plal 01 mostrando a maior EB total (63 %). Estes resultados são bastante promissores, pois nenhuma fonte de nitrogênio foi adicionada tanto no preparo do *spawn* quanto no substrato definitivo, bem como os requerimentos ambientais foram mínimos. A cepa Plal 6 não desenvolveu carpóforos, embora o micélio colonizou todo o substrato em tempo semelhante.

Um dos principais problemas para a experimentação foram as condições de incubação do *spawn* na primeira fase, que se sujeitou a variação ambiental de temperatura e umidade baixas durante o período. Este fator prejudicou o desempenho de todas as linhagens, apesar do procedimento de seleção de cepas vigorosas ser seguido (CHANG, 1989). O insucesso nos primeiros experimentos de produção de *spawn* podem ser atribuídos a diversos fatores, tais como: possível perda de vigor das cepas de *Pleurotus*, contaminação do *spawn* ou deficiência de água no meio, causada por dessecação durante a incubação (CHANG, 1989).

Tanto nas demais repetições do *spawn* em trigo quanto em substrato definitivo de casca e borra de café, os micélios tem se mostrado vigorosos. Embora não se conseguiu obter uma amostra esperada, os resultados obtidos mostraram uma média na EB das cepas nativas significativa para demonstrar o potencial das cepas. Estas mostraram uma mesma capacidade tanto para o crescimento, quanto para desenvolver carpóforos nos substratos escolhidos sem diferenças significativas entre as médias. Entretanto, em produções comerciais, possivelmente estes resultados podem ser muito diferentes, tanto para uma maior produtividade quanto para um desempenho inferior. Diversas variáveis de interesse, como o tempo da corrida do *spawn* e diferenças entre a eficiência biológica com *spawn* suplementado ou não, necessitam de mais repetições experimentais, de modo que uma produção contínua de ciclos de corrida e colheita pode ser empregada, com as condições ambientais controladas, para se obter uma quantidade de frutificações necessárias para uma amostra mais significativa num ensaio de E.B., segundo ROYSE (1985).

10. CONCLUSÃO

Conseguiu-se observar que as cepas nativas mostram um grande potencial para domesticação, apresentando um comportamento muito semelhante aos controles, podendo ser cultivados em uma infinidade de resíduos agrícolas e agro-industriais. Estes prospectos representam um potencial para trabalhos ulteriores, de modo que os esforços para domesticação podem ser continuados, obtendo-se mais cepas selvagens isoladas e efetuando cruzamentos entre estas, afim de se caracterizar os alelos de compatibilidade presentes nas populações dicarióticas de *Pleurotus albidus*. Desta forma, programas de

melhoramento genético podem ser desenvolvidos para obtenção das cepas vigorosas afim de disponibilizar um *spawn* de qualidade para os produtores.

Estudos posteriores para otimização da produção da semente-inóculo, de melhoramento das características desejáveis bem como de produção de enzimas, fármacos e aromatizantes a partir de resíduos da indústria são sugeridos para trabalhos futuros com *Pleurotus* spp.

O cultivo de cogumelos é muito interessante do ponto de vista *em* que se têm como conhecimento experimental, entretanto, para um cultivo comercial, é necessário que o aparecimento dos cogumelos seja em ritmos cíclicos das chamadas “floradas”. Para isso, condições ambientais devem ser mantidas durante o período de colheita, dependendo das preferências do consumidor e dos valores de mercado. Os métodos de colheita devem ser seguidos de acordo com os métodos recomendados, mantendo os padrões de qualidade.

Um grande aumento no número de espécies cultivadas nos anos 80 e 90 correspondem a dramática aceleração na produção mundial de cogumelos. Ainda tem sido mínima a parcela em relação às demais, entretanto reflete o grande interesse dos consumidores de cogumelos comestíveis às novas variedades, uma vez que os cientistas dos cogumelos têm feito um grande esforço para domesticar novas espécies silvestres para satisfazer esta necessidade.

Seguindo-se as observações iniciais e a experimentação nas principais fases do cultivo, um crescimento e desenvolvimento posterior da ciência dos cogumelos virá através de hipóteses, que poderão ser submetidas a testes, com base em observações e dados experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, N. & WANG, S. S.; 1972. A genetic analysis of sporocarp production in *Pleurotus sapidus*. *Mycologia* 64:521-528.
- BANO, Z. & RAJARATHNAM, S.; 1982. *Pleurotus* mushroom as nutritious food. In Chang, S.T. and Quimio, T.H. (eds.). *Tropical mushrooms: Biological nature and cultivation methods*, The Chinese University Press, Hong Kong.
- BARICHIEVICH, E. B. and CALZA, R. E.; 1990 *Applied and Enviromental Microbiology* 56:43-58.
- BARBOSA, M. C. S., ; 1996, Bioconversão de resíduos lignocelulósicos no estado do Paraná, cultivo de cogumelos nativos do gênero *Pleurotus*, Tese de mestrado do departamento de tecnologia química da UFPR.
- BENEDICT, R. and BRADY, L. R.; 1972. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. *J. of Pharmaceutical Sciences*, 61:1820-1822.
- BOHUS, G.; GLAZ, E. and SCHREIBER, J.;1961. Antibiotic action of higher fungi on resistant bacteria and fungi. *Acta Biologia Academia Scientiarum Hungarica*, 12:1-12.
- BONONI, V. L.(org.); 1999. *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. Bononi,V. L.(org.). São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria do Estado do Meio Ambiente.pp.107-131.
- BOYLE, C. D. ; 1995. Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade a organupollutants in soil. *Canadian J. of Microbiology*, 41(4-5):345-353.
- BRESINSKI, A.; FISCHER, M.; MEIXNER, B. & PAULUS, W.; 1987. Speciation in *Pleurotus*. *Mycologia* 79(2):234-245.
- BUSWELL, J. A.; 1983. Fungal degradation of lignin. In: Arora, D. (ed.) *Handbook of Applied Mycology*. CRC Press, Delhi, p.425-428.
- BUSWELL, J. A. and CHANG, S.T., 1993. Edible Mushrooms: Applications and properties ni *Genetics and Breeding of edible mushrooms* ed. Chang,S.T., Buswell, J.A. and Miles, P. G. . Gordon and Breach, Philadelphia, 297-324.
- BUSWELL, J. A., 1995. Potential of substrate mushroom for biocorrection purposals. *Mushroom News*, 443:28-34.
- CAILEUX, R.; DIOP. A. & JOLY, P. ; 1981. Relations d'infertelité entre quelques représentants de *Pleurotus* de Ombelifires. *Bull. Soc. Mycol. France* 97: 97-124.

- CHANG, S. T. 1998. A global strategy for the bioconversion of lignocelulosic biomass – the challenge of a “non-green revolution”.
- CHANG, S. T. and MILES, P. G., 1987, Historical record of early cultivation of *Lentinus* in China. *Mushroom Journal of tropics*. 7, 31.
- CHANG, S. T., 1980. The human food and mushrooms. *BioScience*, 30:339-401.
- CHANG, S. T. and MILES, P. G., 1989. Edible mushrooms and their cultivation. CRC press. Boca Raton. Florida.
- CHANG, S. T. and MILES, P. G. , 1992. Mushroom biology – a new discipline. *Mycologist* 6:64-65.
- CHANG, S. T.; 1993. Mushroom biology: the impact over mushroom production and mushroom products, , in *Mushroom biology and Mushroom products*, (CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A. & CHIU, S. W., eds.) The Chinese University Press, Hong Kong, pp. 3-20.
- CHANG, S. T. and YAU, C. K., 1981, Biological nature and life cycle of *Volvariella volvacea*. *Am. J. of Bot.*, 58:552-561.
- CHARTIER., P. in *Energy from biomass* (Palz, W.; Chariter, P. and Hall, D. , eds.) Elsevier Applied Science, London, 1981, p.22-23.
- CHIHARA, G. 1992. Immunopharmacology of Lentinan isolated of *Lentinula edodes*: its application as a host defense potentiator. *International J. of Oriental medicine*. 17(2):57-77.
- CHIHARA, G. 1993. Medical Aspects of lentinan isolated from *Lentinus edodes* . in *Mushroom Biology and Mushroom products* (Chang, S.T., Buswell, J.A. and Chiu, S.W. : eds.) Chinese University Press, Hong-Kong, pp.261-266.
- CHOCHRANE, K. W.; 1978. Medical effects, in *The Biology and Cultivation of edible mushrooms* (CHANG, S. T. & HAYES, W. A. , eds.) Academic Press, New York and London, pp. 261-266.
- CRISAN, E. V. & SANDS, A.; 1978. Nutritional Value, in *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (CHANG, S. T. & HAYES, W. A., eds.) Academic Press, New York and London, pp. 137-165.
- EGER, G.; EDEN, G. & WISSING; 1976. *Pleurotus ostreatus*-breeding potential of a new cultivated mushroom. *Theor. Appl. Gen.* 47:155-163.
- EGER, G. ; 1978. Biology and Breeding of *Pleurotus*, in *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (CHANG, S.T. & HAYES, W.A, eds.) Academic Press, New York and London, pp.

- EL-KATAN, M. H. ; HELMY, Z. A., EL-LEITHY, M. A. And ABDELKAWI, K. A., 1991. Studies on cultivation methods and mushroom chemistry composition . *Mushroom J. of the Tropics*.
- EMEJUAINNE, S. & OGUNBI, O.; 1981. *Global Impacts of microbiology*. Academic press, New York and London.
- FLEGG, P. B. & MAW, G. A., 1976. Mushroom and their possible contribution to the world protein needs. *Mushroom J.* 48: 396.
- FLEGG, P. B. , SPENCER, D. M. & WOOD, D. (eds.) 1985. *The Biology and Technology of Cultivated Mushrooms*. John Wiley, Chichester.
- FLORENCE, S., TOOGOOD, J. H. and ANDERSON, J., 1986. Mushroom picker's lung disease associated with *Pleurotus ostreatus*. *Journal Allergy Clinical Immunology* 77:169
- GLASSER, W. G., 1981. Potential roles of lignin in tomorrow's utilization technologies. *Forest Prod. J.* 31:24-31.
- GOTTSCHALK, G. in *Biochemistry and Genetics of Cellulose degradation* (AUBERT, J. P., BEGUIM, P. & MILLET, J.,eds.) Academic Press, London, 1988, pp. 3-10.
- GOW, N. A. R. and GADD, M. (eds.) 1995. *The Growing Fungus*, Chapman & Hall, Glasgow and London.
- GRIFFIN, D. H., 1994. *Fungal Physiology*. 2nd edition. Wiley-Liss, Inc. New York.
- HERMAN, H. 1962. Eine Antibiotisch wirkam substanz aus *Coritnellus shiitake*, *Naturwissenschaftler*, 49:452.
- HARPER, J. L., ROSEN, R. B. and WHITE, J. (eds.) (1986). The growth and form of modular organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Soc. Of London, Series B*, 313, 1-250.
- KANEDA, T. & TOKUDA, 1966. Effects of various mushrooms extracts preparations on mouse level of cholesterol. *J. of Nutrition* 90:371-376.
- LAMED, R. & BAYER, E. A. 1988. *Advances in Applied Microbiology* 33:1-46
- LARRAYA, L. M.; PÉREZ, G.; RITTER, E.; PISABARRO, A. G. & RAMÍRES, L.; 2000. Genetic linkage Map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. And Env, Microbiol.* 66(12): 5290-5300.
- LINDEQUIST, U.; 1995. Structure and Biological Activity of tripterpenes, polysaccharides and other constituents of *Ganoderma lucidum*. In *Recent Advances in Ganoderma lucidum*

research. (KIM, B. K. ; KIM, I. H. and KIM, Y. S., eds.) Pharmaceutical Soc. Of Korea. Seoul, 61-91.

LIU, F., OOL, V. E. C. & CHANG, S. T.; 1995. Antitumor components of culture filtrates from *Tricholoma* sp. *World J. of Microbiology and Biotechnology*, 11: 486-490.

LIU, G. T. ; 1993. Pharmacologic and clinical approaches for *Ganoderma*, in *Mushroom biology and Mushroom products*, (CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A. & CHIU, S. W., eds.) The Chinese University Press, Hong Kong, pp. 267-273.

LJUNGDAHL, L. G. and ERIKSSON K. E., 1985. in *Advances in Microbial Technology*. Vol. 8. (MARSHALL, K. C., ed.) Plenum Press, New York. pp. 237-299.

LI, S-T. ; 1980. Studies on tolerance to elevated temperature in *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fries) Kummer. *Bibl. Mycol.* 76:1-86.

MATHEUS, D. R. & OKINO, L. K.; 1999. *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. Bononi, V. L.(org.). São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria do Estado do Meio Ambiente. pp.107-131.

MIZUNO, T., SAITO, H., NISHITOBA, T. and KAWAGISHI, H. 1995. Antitumor-active substances from mushrooms. *Food Review International*, 11:23-61.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R. ; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H. SHIMURA, K.; SUMIYA, T. and ASUKARA, A. 1990. Antitumor activity and some properties of water insoluble portion of hetero-glicans of "himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazeii* Murril. *Agricultural and biological Chemistry*. 54(11):2889-2896.

MUSILEK, V.; CERNA, V. J.; SASEK, V. SEMERDIZIEVA, M. and VONDRACEK, 1969. Antifungal and antibiotics of the basidiomicete *Oudemansiella mucida*. Isolation and mushroom cultivation. *Folia Microbiologica* (Praga), 14:377-387.

PARISI, F. 1989. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 38:53-86.

REGAN, R. W.; 1994. Uses for SMS like matrix for degradation of pesticides. *Compost Science and Utilization*, 2:56-62.

ROYSE, D. J.; 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia* 77:756-762.

SAKAGAMI, H. and TAKEDA, M.; 1993. Diverse biological activity of PKS (krestin), a protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* in *Mushroom biology and Mushroom products*, (CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A. & CHIU, S. W., eds.) The Chinese University Press, Hong Kong, pp. 267-273.

SCHNEIDERMAN, E. L.; 1985. Society between University and Industrial Biotechnology. *ASM News*, 51(6):264.

SPEGAZZINI, C. Fungi Argentinii. Anales de la Sociedad Científica Argentina. Buenos Aires. 1880-1882, Linnaeus Press. Reprint Amsterdam. Holland, 1971.

SINGER, R.; 1950. Type studies on Basidiomicetes. *Lilloa* 23:147-246.

SINGER, R.; 1953. Type studies on Basidiomicetes. *Lilloa* 26:57-259.

SINGER, R. ;1975. "The agaricales in modern taxonomy". 3rd ed. J. Cramer, Valduz.

SUZUKI, S. and OSHIMA, S.; 1976. Effects of shii-take(*Lentumula edodes*) on human cholesterol. *Mushroom Science*. Part infections: 463-467.

URANO, H. H.; 1996. *Produção de Pleurotus*. Carta enviada a Prefeitura Municipal de Mogi das Cruzes-SP, em 9 de fevereiro.

UZCATEGUI, E.; RUIZ, A.; MONTESINO, R.; JOHANSSON, G. and PETERSON, L. G. ; 1991. *J. Biotechnology*. 19:271-286.

VOGEL, F.S.; MCGARRY, S. J.; KAMPER, L. A. K. and GRAHAM, D. J.; 1974. Bacteriostatic properties of compounds related with spore production on *Agaricus bisporus* mushrooms. *Am. J. Pathology*, 76:165-174.

WANG, S. Y.; HSU, M. L.; LEE, S. S.; HONG, C. Y. and SHIAO, M. S.; 1994. The role of *Ganoderma lucidum* on imunopotencialization: effects on citocin production since macrophage and linfocite T. in *Abstracts of '94 Symposium on Ganoderma research*. Beijing Medical University, 56-57.

WHITEFORD, J. R. & THURSTON, C. F.; The Molecular Genetics of Cultivated Mushrooms. *Advances in Microbial Physiology* V.42: 1-23, Academic Press, London, 2000

WILSON, D. B.; 1992. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12:45-63.

WOOD, T. M.; McGRAE, S.; WILSON, C. A.; BHAT, K. M. and GOW, L. A.; 1988. in *Biochemistry and Genetics of Cellulose degradation* (AUBERT, J. P., BEGUIM, P. & MILLET, J.,eds.) Academic Press, London, 1988, pp. 3-10.

YANG, Q. Y. *Et al.*; 1992. Antitumor and immunomodulating activities in the polysacharide -peptide (PSP) of *Coriolus versicolor*. *Immunol. Immunopharmacol.* 12,29-34.

ZADRAZIL, F. ; 1978. Cultivation of *Pleurotus*, in *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (CHANG, S. T. & HAYES, W. A., eds.) Academic Press, New York and London, pp. .



Foto 1 – Frutificações do *Pleurotus laciniato-crenatos* (Pl. al. 01) cultivadas em substrato de casca de café, borra de café e serragem de Eucalipto.

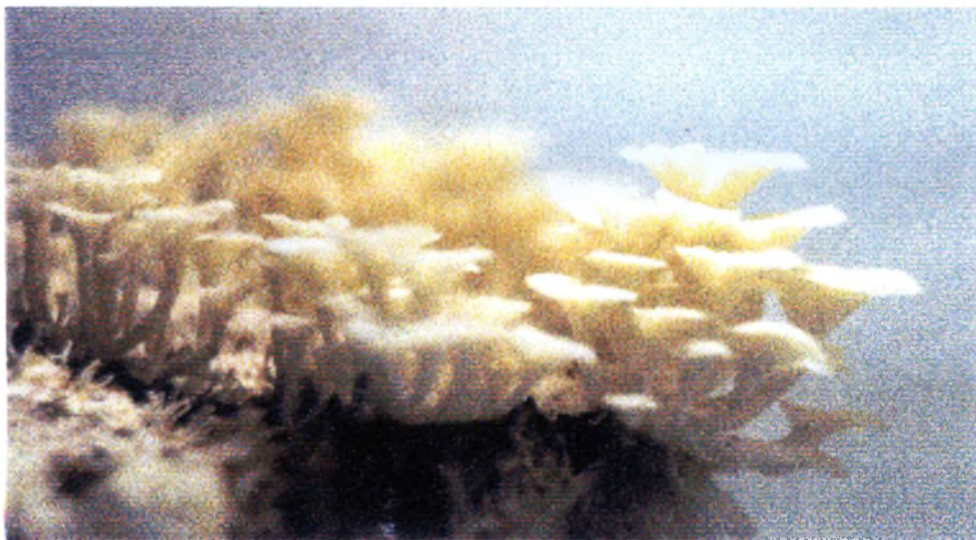


Foto 2 – Frutificação do *Pleurotus laciniato-crenatus* (Pl. al. 01), vista lateral.