

# CULTIVO DE *Pleurotus pulmonarius* EM ÓLEO VEGETAL RESIDUAL DE UMA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA DE MARINGÁ-PR

*Pleurotus pulmonarius* GROWING IN VEGETABLE OIL WASTE OF A FOOD INDUSTRY OF MARINGÁ-PR

JULIANO ROBSON GENERO<sup>1</sup> (in memoriam), DAIANE PEREIRA CAMACHO<sup>2</sup>, BRUNA POLACCHINE DA SILVA<sup>3</sup>

1. Biomédico, Aluno do Curso de Especialização em Análises Clínicas da Faculdade Ingá-PR (in memoriam); 2. Biomédica, Doutora em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina, Docente e Coordenadora de Pós-Graduação *Lato sensu* em Análises Clínicas da Faculdade Ingá-PR; 3. Biomédica, Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Maringá, Docente do curso técnico em biotecnologia do SENAI – Maringá.

\* Rua Vereador Nelsom Abraão, 80, Zona 05, Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87015-230. [brunapol@hotmail.com](mailto:brunapol@hotmail.com)

Recebido em 31/03/2016. Aceito para publicação em 09/05/2016

## RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidor mundial de óleo vegetal, acarretando em grandes volumes de óleo residual, que se descartado inadequadamente polui o meio ambiente. Esta poluição pode ser evitada com o descarte adequado e reaproveitamento deste óleo, como na produção de sabões, massa de vidraceiro, ração animal e biodiesel. Outra forma de aproveitá-lo é utilizá-lo como fonte de carbono no cultivo de fungos, como os do gênero *Pleurotus*, os quais são secretores de enzimas como lacase e lipase, além de sua biomassa possuir atividade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral. Deste modo, nosso objetivo foi estabelecer as condições de cultivo de *Pleurotus pulmonarius* em óleo vegetal residual de uma indústria alimentícia, a fim de produzir grande quantidade de biomassa e reduzir o óleo presente no meio. Para tanto o fungo *P. pulmonarius* foi cultivado na presença de 3% ou 6% de óleo, ou glicose (controle), com ou sem agitação (120 rpm), por 2, 4 e 8 dias. Nossos resultados demonstram que *P. pulmonarius* é capaz de se desenvolver na presença de 3% de óleo vegetal residual, de modo agitado, e consumir 90% deste, sendo seu cultivo em óleo um modo viável de produção de biomassa fúngica.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pleurotus pulmonarius*, óleo residual, biorremediação.

## ABSTRACT

Brazil is a major producer and consumer of vegetable oil, resulting in large amounts of residual oil which is disposed improperly pollute the environment. This pollution can be prevented with proper disposal and recycling of this oil, as in the production of soaps, putty, animal feed and biodiesel. Another way to enjoy it is to use it as a carbon source in the cultivation of fungi such as the genus *Pleurotus*, which are secreting enzymes such as laccase and lipase, as well as their biomass possess antioxidant activity, antimicrobial and antitumor. Thus, our

objective was to establish the *Pleurotus pulmonarius* cultivation conditions residual oil from a vegetable food industry in order to produce large amounts of biomass and reduce the oil present in the middle. For both *P. pulmonarius* fungus was cultured in the presence of 3% or 6% oil, or glucose (control) with or without agitation (120 rpm) for 2, 4 and 8 days. Our results demonstrate that *P. pulmonarius* is capable of desenvolverna presence of 3% residual vegetable oil, stirred mode, and consume 90% of this, and its cultivation in oil way of a viable fungal biomass production.

**KEYWORDS:** *Pleurotus pulmonarius*, residual oil, bioremediation.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de óleo vegetal, produzindo no ano de 2014 180.384 toneladas de óleo vegetal/dia. O Estado do Paraná tem a segunda maior capacidade instalada de processamento no setor com 35.745 toneladas/dia, o que representa 20% do total nacional<sup>1</sup>. Óleos vegetais são amplamente utilizados pela população brasileira, seja para uso doméstico, comercial ou industrial, perfazendo uma produção anual de três bilhões de litros de óleo vegetal comestível. Deste total, apenas 2,5% é reutilizado para alguma finalidade, enquanto que o restante é indevidamente descartado, pela população e indústrias, nos solos, corpos d'água, rede de esgotos, ou ainda, incinerados. Seu descarte pela rede de esgoto provoca o entupimento das tubulações e aumento em até 45% nos custos de tratamento, quando descartado nos rios cria uma barreira, que dificulta a entrada de luz e oxigenação da água, comprometendo assim a base da cadeia alimentar aquática e contribuindo para a ocorrência de enchentes. Além disso, a decomposição do óleo de cozinha emite metano na atmosfera, um gás altamente explosivo e que contribui para o efeito

estufa<sup>2</sup>.

Os óleos e gorduras vegetais são predominantemente triésteres de ácidos graxos mono e poli-insaturados e glicerol, chamado triacilgliceróis. Com o aquecimento do óleo no processo de fritura, uma série de reações produz numerosos compostos de degradação, sendo identificados mais de 400 compostos químicos diferentes em óleo de fritura. As alterações físicas mais frequentemente são aumento da viscosidade, alteração da cor e formação de espuma. Já as alterações químicas são o aumento de ácidos graxos livres, compostos carbonílicos, produtos de alto peso molecular, diminuição das insaturações, entre outras<sup>3</sup>. Mesmo com estas alterações o óleo vegetal residual ainda possui alto valor energético, que hoje é pobremente explorado, sendo utilizada para a produção de sabões, massa de vidraceiro, ração animal e biodiesel<sup>4,2,5,6</sup>. Outra forma de aproveitá-lo é utilizá-lo como fonte de carbono no cultivo de fungos filamentosos.

Fungos da podridão branca são basidiomicetos com habilidade de reciclar o carbono na natureza, sendo capaz de degradar completamente a lignina em dióxido de carbono, por serem capazes de sintetizar um grupo de enzimas extracelulares oxidativas (ligninolíticas), principalmente a peroxidase e a lacase<sup>7</sup>, além das enzimas xilanases e lipases, o que os tornam capazes de colonizar uma ampla variedade de substratos<sup>8</sup>. Dentre os basidiomicetos estão os do gênero *Pleurotus*, como o *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Pleurotus sajor-caju*, todos comestíveis. Tanto os *Pleurotus* quanto suas enzimas são uma alternativa eficiente para a biorremediação de poluente recalcitrantes, pois possuem habilidade em degradar e mineralizar substâncias químicas tóxicas, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, atrazina e organofosforados<sup>9,10</sup>. Além de produzirem grande quantidade de enzimas, os *Pleurotus spp.* são um excelente alimento nutracêutico estando entre os fungos mais cultivados do mundo, possuindo atividade antioxidante, utilizada pelo corpo humano no combate a radicais livres responsáveis pelo agravamento de patologias como câncer e doenças cardiovasculares<sup>11,12,13,14,15,16</sup>.

Na produção de medicamento e alimentos nutracêuticos costuma-se utilizar o basidioma fúngico, sendo esta forma 80-85% da produção de fungos medicinais, contudo, o basidioma é de difícil e demorado cultivo assim, se faz necessário novas formas de obtenção destes fungos, com os mesmos benefícios à saúde aliado a um cultivo rápido e em grande escala<sup>12</sup>. Deste modo, o cultivo de fungos submersos pode ser uma boa estratégia, pois se obtêm as enzimas secretadas no meio reacional e também a biomassa micelial para a produção de alimentos nutracêuticos e fármacos. Nesse sentido a escolha das condições de cultivo e principalmente a composição do meio de cultura são fatores de extrema importância na produção de biomassa e de enzimas. Na fermentação

em estado líquido ou submersa o crescimento microbiano ocorre em meio líquido, geralmente agitado, podendo ter dispositivos de aeração e controle da temperatura. Já os meios contêm necessariamente uma fonte de nitrogênio, tanto orgânico quanto inorgânico, e uma de carbono. Dentre os compostos nitrogenados comumente usados estão os hidrolisados enzimáticos de proteínas (peptonas), aminoácidos, ureia, nitrato e sais de amônia. Já as fontes de carbono são a frutose, manose, glicose, galactose, celobiose, maltose, sacarose, lactose, dextrina e amido. Assim, o presente trabalho teve por objetivo estabelecer as condições de cultivo de *Pleurotus pulmonarius* em óleo vegetal residual pós-fritura de uma indústria alimentícia, sendo o meio composto por 3 ou 6% de óleo, ou glicose, e os frascos cultivados de modo estático ou agitado, a fim de produzir grande quantidade de biomassa e reduzir o óleo presente no meio de cultivo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### O Cultivo em BDA:

Foi utilizado o isolado de *Pleurotus pulmonarius* CCB19, gentilmente cedido pelo Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual de Maringá e cultivado no Laboratório de Microbiologia do curso Técnico em Biotecnologia – SENAI - Maringá. Os fungos foram mantidos em tubos inclinados através de repiques sucessivos em ágar batata dextrose. Os inóculos foram obtidos através do cultivado fungo em placas de Petri contendo o mesmo meio a 28°C por 7 dias.

### Pré-cultivo:

O meio basal de cultivo era composto por: 18 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 200 g.L<sup>-1</sup> de extrato de batata, e 0,1% de extrato de levedura. Os meios foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 121 °C. Três discos de ágar-batata-dextrose com 10 mm de diâmetro cada um, completamente colonizados pelo fungo, foram picados e transferidos para 35 ml de meio basal em Erlenmeyer de 125 ml. As culturas foram desenvolvidas por 5 dias em mesa agitadora a 120 rpm.

### Cultivo no resíduo:

Os cultivos submersos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 100 mL de meio basal composto por: 7,0 g.L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, 7,0 g.L<sup>-1</sup> peptona, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O e 1,0 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. A este meio foi adicionado óleo vegetal residual nas proporções de 3% e 6% ou glicose (30g.L<sup>-1</sup>), esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Sob condições estéreis, 5g de massa micelial foi transferida para cada frasco e estes foram divididos em dois grupos, sendo um cultivo realizado estaticamente e outro sob agitação a 120 rpm. Cada grupo foi composto por frascos contendo glicose (controle), 3% ou 6% de óleo e os cultivos foram de-

se desenvolvidos por 2, 4 e 8 dias.

**Obtenção da massa micelial seca:**

Após 2, 4 e 8 dias os cultivos foram interrompidos e a massa micelial obtida por filtração à vácuo, sendo posteriormente seca em estufa a 55°C até peso constante.

**Determinação do óleo residual:**

Após 2, 4 e 8 dias de cultivo os filtrados obtidos, após a separação da massa micelial, foram submetidos ao método Bligh-dyer<sup>17</sup> para determinação do óleo residual. Os filtrados foram colocados em funil de decantação e a eles foram adicionado 10 ml de clorofórmio, 20 ml de metanol e 10 ml de solução de sulfato de sódio 1,5%. Depois de tampados estes foram agitados e deixado em repouso para a separação das camadas de forma natural. Após descartada a camada superior, foi retirado 20 ml da camada inferior (clorofórmio) e colocado em becker de 50 ml previamente pesado. Aproximadamente 1g de sulfato de sódio anidro foi adicionado e a mistura agitada para remover traços de água, sendo retirada a água com auxílio de uma pipeta. O becker foi colocado em estufa a 80°C para evaporar o clorofórmio (15 a 20 minutos), resfriado em dessecador e pesado em balança analítica.

**Dosagem da lacase:**

A atividade da lacase foi mensurada com 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) em 50 mM de tampão acetato de sódio pH 4.0, sendo a oxidação do ABTS determinada pelo aumento da absorbância a 420 nm ( $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade enzimática foi determinada a 40°C e expressa em unidade enzimática internacional ( $U = \mu\text{mol} \times 10 \text{ min}^{-1}$ ).

**Análise estatística:**

Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como porcentagem de redução de óleo e média de biomassa seca, analisados por teste T student ( $p < 0,05$ ) no programa estatístico GraphPrism6.

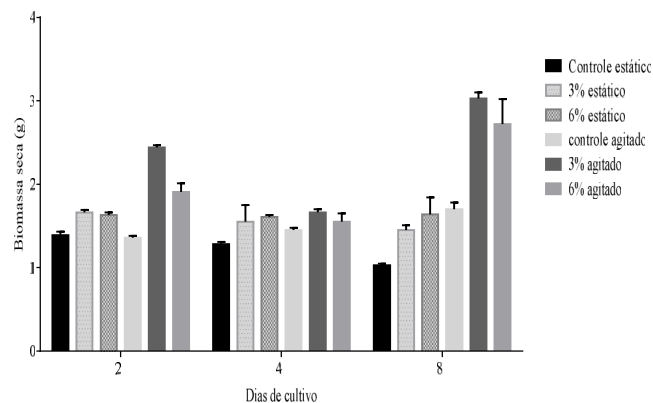
**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Quando o fungo *Pleurotus pulmonarius* foi cultivado na presença de 3% ou 6% de óleo vegetal residual ou glicose, com os cultivos interrompidos após 2, 4 e 8 dias de cultivo, observamos que os cultivos conduzidos sob agitação (120 rpm) produziram uma quantidade maior de biomassa fúngica em relação aos cultivos estáticos. Dentre os cultivos agitados, o que apresentou maior quantidade de biomassa foi o cultivo agitado na presença de 3% de óleo, após 8 dias de cultivo, com média de  $3,03 \pm 0,07 \text{ g}$  de biomassa seca (Figura 1).

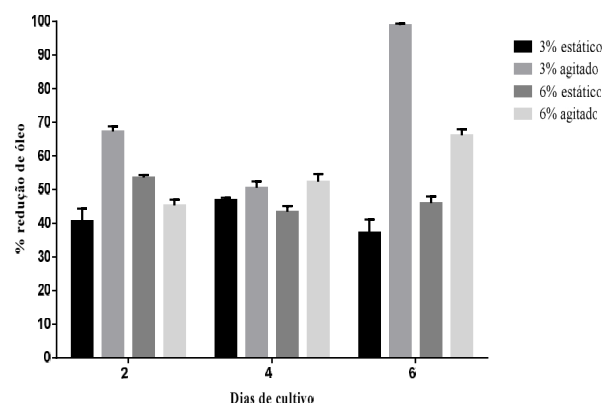
Ao analisarmos a porcentagem de óleo vegetal consumida pelo fungo podemos identificar que o mesmo apresentou maior redução na quantidade de óleo presente nos frascos contendo 3% de óleo residual após 8 dias

de cultivo (Figura 2). Também podemos perceber que em todos os frascos agitados ocorreu um consumo maior do óleo em relação aos cultivos estáticos.

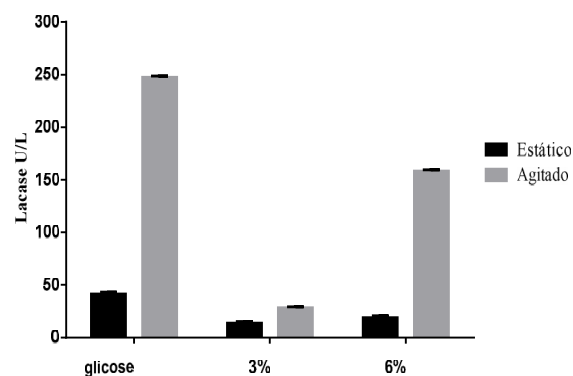
Quando buscamos compreender o metabolismo do fungo dosamos a enzima lacase, pois sabe-se que esta é uma das enzimas do metabolismo de *Pleurotus sp.*



**Figura 1.** Biomassa seca de *Pleurotus pulmonarius* em cultivo estático e agitado (120 rpm) com 3% ou 6% de óleo vegetal residual ou glicose (controle).



**Figura 2.** Comparação entre a porcentagem de redução do óleo presente no meio após cultivo de *Pleurotus pulmonarius* com 3% e 6% de óleo de modo estático e agitado (120 rpm).



**Figura 3.** Produção de lacase pelo fungo *Pleurotus pulmonarius* na presença de óleo vegetal residual nas concentrações de 3% e 6%, cultivado sob agitação (120 rpm), por 8 dias.

Em nossas dosagens observamos que houve uma inibição da síntese da enzima lacase na presença do óleo, observamos também que a agitação influenciou, pois no grupo controle a agitação aumentou consideravelmente a produção de lacase pelo *P. pulmonarius* (Figura 3).

#### 4. DISCUSSÃO

Após análise nas diferentes concentrações e tempo de processo, observamos que o fungo *Pleurotus pulmonarius* conseguiu se desenvolver na presença de óleo vegetal residual, tendo o modo de cultivo, estático ou com agitação, e a porcentagem de óleo presente no meio, 3% ou 6%, influenciado seu desenvolvimento. Ao observarmos a figura 1, concluímos que todos os fungos cultivados de modo estático apresentaram um desenvolvimento constante e inferior aos cultivos agitados. Acreditamos que, no cultivo estático houve a formação de duas camadas no interior dos frascos de cultivo, o óleo sobre a água, deste modo as células que mantiveram contato com o óleo superficial conseguiram metabolizá-lo, e assim se dividirem, enquanto que as células que permaneceram na parte inferior do frasco, não tiveram acesso a fonte de carbono, portanto, não conseguiram realizar seu metabolismo. Isto também pode ser concluído ao observarmos a redução do óleo presente no meio, o que foi maior nos cultivos agitados (figura 2). Deve-se considerar também que, a presença do óleo sobre o meio de cultivo estático dificultou a transferência de ar para o meio, o que segundo Kavanagh (2011)<sup>18</sup> é essencial para o metabolismo fúngico da fonte de carbono. Já os cultivos mantidos em constante agitação, tiveram contato com a fonte de carbono e aeração e, por conseguinte, houve um maior crescimento, sendo obtido a maior quantidade de biomassa após 8 dias de cultivo agitado (figura 1). Dessa forma, o crescimento da massa micelial sofreu grande influência da agitação, sendo esta necessária ao processo.

O período de cultivo também influenciou fortemente o crescimento micelial e redução de óleo no meio. Do segundo para o quarto dia de cultivo (figura 1), podemos observar que houve um decaimento no crescimento fúngico, contudo, houve um crescimento significativo após 8 dias. Assim como observado em estudos feitos por Macedo *et. al* (2002)<sup>19</sup> onde o fungo *Aspergillus versicolor* passou por fase de adaptação ao degradar óleo cru em solo, podemos concluir que tenha ocorrido o mesmo com *P. pulmonarius*, e que ele apresentou uma fase de adaptação ao meio de cultura devido a dificuldade em metabolizar o óleo vegetal residual. A concentração da fonte de carbono interfere diretamente no crescimento dos fungos, o que pode ser observado por nós ao constatarmos que nos cultivos apresentando 3% de óleo residual houve um crescimento fúngico significativamente maior do que em relação ao contendo 6%.

Confortin (2006)<sup>20</sup> ao estudar o fungo *Pleurotus sa-*

*lor-caju* PS- 2001 sobre a influência de diferentes fontes de carbono com ou sem óleo de soja, constatou que em um meio de cultivo contendo 5 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 1 mL.L<sup>-1</sup> óleo de soja, o fungo não utilizou a sacarose como fonte de carbono e sim o óleo presente no meio, comprovando que fungos do gênero *Pleurotus* são capazes de se desenvolver em meio contendo óleo, o que também foi constatado em nossos experimentos com *Pleurotus pulmonarius*. Entretanto a concentração de óleo presente no meio deve ser considerada, pois como já analisamos grandes quantidades de óleo leva a formação de uma camada sobre o cultivo o que dificulta a oxigenação e o acesso à fonte de carbono. Sabendo disso, buscamos a maior concentração possível de óleo no meio, sendo o resultado obtido apresentado na figura 2.

Ao cultivarmos o *P. pulmonarius* na presença de óleo nas proporções de 3% e 6% do meio de cultivo, sob agitação, este apresentou uma maior redução de óleo no meio quando na concentração de 3% (figura 02). Acreditamos que isto ocorreu devido à capacidade de secreção enzimática do fungo, pois como foi colocada a mesma quantidade de biomassa inicial, a produção enzimática foi suficiente apenas para metabolizar os 3% de óleo presente no meio. Também devemos considerar que em nosso experimento o meio era pobre em nutrientes, assim o fungo não se manteve viável por mais tempo para uma melhor absorção do óleo, diferente dos resultados obtidos por Cazarolli (2013)<sup>21</sup>, que utilizou os fungos *Pseudallescheria boydii*, *Paecilomyces variotti* e *Scedosporium aurantiacum*, todos ascomicetos, e observou que ao aumentar a concentração de nutrientes no meio conseguia metabolizar uma concentração limite de óleo de 10%. Por mais que esta porcentagem de óleo consumida seja maior que a obtida por nós, acreditamos que nosso experimento apresentou ótimo resultado, pois foi utilizado apenas fontes básicas de nutrientes, com custos menores que os sais utilizados por ele, além do tempo de cultivo, que em nosso experimento foi de 8 dias, enquanto que ele precisou de vinte e oito dias para obter seus resultados com os três isolados fúngicos.

Ao analisar o melhor tempo necessário para o consumo do óleo observamos que houve uma queda no quarto dia e posterior aumento no 8º dia, sendo este o melhor período. A partir deste resultado podemos considerar duas hipóteses, ou o fungo se multiplicou neste período tendo maior número de células para metabolizar o óleo, o que não foi confirmado, visto que a biomassa manteve-se constante ao longo do tempo de cultivo (figura 01), ou a reação enzimática sob o óleo se processa em um período inferior a 8 dias, o que deixaria disponível as mesmas enzimas para atuarem sobre novo substrato. Nesse sentido dosamos a enzima que comumente é secretada em maior concentração pelo *P. pulmonarius*, a lacase. A maior secreção de lacase na presença de óleo foi obtida com 6% deste, contudo a maior redução de

óleo presente no meio foi na presença de 3% (figura 03), o que nos leva a concluir que não é a lacase a principal responsável pela degradação do óleo presente no meio. A secreção de lacase após 8 dias de cultivo foi influenciada pela agitação, assim o grupo estático apresentou uma produção de lacase inferior ao grupo agitado, sendo este resultado já observado por outros pesquisadores, os quais constataram que a agitação influencia positivamente a produção enzimática<sup>22</sup>.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos concluímos que o fungo *Pleurotus pulmonarius* é capaz de se desenvolver em meio contendo óleo vegetal residual de indústria alimentícia, sendo este desenvolvimento influenciado pela concentração de óleo que deve manter-se em torno de 3% do volume total do meio de cultivo, e, que este cultivo deve ser conduzido sob agitação constante. O período de cultivo também influencia a redução de óleo, sendo o período de 8 dias o de maior redução. Podemos também constatar que a enzima responsável pelo metabolismo do fungo não foi a lacase, assim podemos sugerir que outras enzimas, como a lipase tenham sido secretada pelo fungo, sendo necessária a dosagem desta enzima. Deste modo concluímos que a utilização do fungo *P. pulmonarius* na reciclagem do óleo vegetal residual é viável, visto que ele consegue se desenvolver e consumir o óleo em um meio com poucos nutrientes e em um período curto de tempo o que viabiliza seu uso comercial.

## REFERÊNCIAS

- [01] FAEP. Federação da Agricultura do Estado do Paraná, 2015. [acesso 25 set. 2015] Disponível em: <http://www.sistemafaep.org.br/crece-capacidade-para-processar-oleo-vegetal-pais.html>.
- [02] ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais, 2012. [acesso 25 set. 2015] Disponível em: <http://www.oleosustentavel.org.br/?page=curiosidades>.
- [03] CORSINI MS, JORGE N, MIGUEL AMRO, VICENTE E. Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de fritura. *Quím. nova*, 2008; 31(5): 956-961.
- [04] FILHO ST, SANTOS ASS, ALMEIDA TM, SILVA ER. Tecnologia ambiental aplicada ao gerenciamento e processamento do óleo vegetal residual no estado do Rio de Janeiro, REGET/UFESM, 2013 Out 15(15): 3026-3035.
- [05] FERNANDES RKM, PINTO JMB, MEDEIROS OM, PEREIRA, CA. Biodiesel a partir de óleo residual de fritura: alternativa energética e desenvolvimento sócio-ambiental. XXVIII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO. A integração de cadeias produtivas com a abordagem da manufatura sustentável; 2008; outubro 13 a 16; Rio de Janeiro, RJ, engep; 2008.
- [06] RABELO RA, FERREIRA OM. Coleta seletiva de óleo residual de fritura para aproveitamento industrial, 2008. [acesso 25 set. 2015] Disponível em: <http://www.ucg.br>.
- [07] PERALTA RM, OLIVEIRA AL, ELER G J, SOARES A A, BRACHT A. Functional properties of edible and medicinal mushrooms. *Curr Trends in Microbiol*, Rev 2008; 4: 45-60.
- [08] BALDRIAN P, VALASKOVA V, MERHAUTOVA V, GABRIEL J. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Res Microbiol*, 2005; 156: 670-676.
- [09] Novotny C, Svobodova K, Erbanova P, Cajthaml T, Kasinath A, Lang E, Sasaek V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme products and degradation rate. *Soil Biol Biochem* 2004; 1-7.
- [10] Rodríguez E, Nuero O, Guillén F, Martínez AT, Martínez M J. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of lacase and versatile peroxidase. *Soil Biol Biochem* 2004; 36(6): 909-916.
- [11] KHATUN S, ISLAM A, CAKILCIOGLU U, GULER P, CHATTERJEE NC. Nutritional qualities and antioxidant activity of three edible oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.). *NJAS* 2015; (73): 1-5.
- [12] Llaurado G, Morris HJ, Ferrera L, Camacho M, Castan L, Lebeque Y, Beltran Y, Cos O, Bermúdez RC. In-vitro antimicrobial activity and complement/macrophage stimulating effects of a hot-water extract t from mycelium moth oyster mushroom *Pleurotus* sp. *Innov. Food Sci. Emerg Technol*. 2015; 30: 177-183.
- [13] Morris HJ, Hernández E, Llaurado G, Tejedor MC, Sancho P, Herraez A. In vitro anti-proliferative effects on NB4 human leukemia cells and physicochemical screening of *Pleurotus* sp. (higher Basidiomycetes) mycelia from Cuba. *Int J Med Mushrooms*, 2014; 16: 239-245.
- [14] Baggio CH, Freitas CS, Marcon R, Werner MFP, Rae GA, Smiderle FR, Sasaki GL, Iacomini M, Marques MCA, Santos ARS. Antinociception of  $\beta$ -D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition, *Int. J. Biol Macromolec*. 2012; 50: 872-877.
- [15] Chang S, Wasser SP. Tehriole of culinary-medicinal mushroom son human welfare with a pyramid model for human health. *Int J Med Mushrooms* 2012; 14: 95-134.
- [16] Nitschke J, Modick H, Busch E, Rekowski RW, Altenbach HJ, Molleken H. A new colorimetric method to quantify  $\beta$ -1,3-1,6-glucans in comparison with total  $\beta$ -1,3-glucans in edible mushrooms, *Food Chem* 2011;127: 791-796.
- [17] Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-917.
- [18] Kavanagh K. *Fungi:biology and applications*. 2ª ed. Ireland:Wiley-Blackwell; 2011.
- [19] Macedo RC, Berbert VHC, Lemos SLJ, Trindade OVP, Rizzo ACL. Biorremediação de solos impactados por óleo cru utilizando fungos filamentosos, 2002; 285-294.
- [20] Confortin FG, Produção de biomassa fúngica da linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer em

- cultura submersa. [tese] Rio Grande do Sul:Universidade de Caxias do Sul, 2006.
- [21] Cazarolli JC. Aplicação de fungos filamentosos em biodiesel de linhaça, soja e oliva. [tese] Rio Grande do Sul:Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
- [22] Buchs J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biocheml Eng J.* 2001 Mar; 7(2):91-98.