



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**ELABORAÇÃO DE UM PRODUTO DE PANIFICAÇÃO À BASE DE
CRUEIRA E COGUMELO COMESTÍVEL**

ANA RITA GAIA MACHADO

Manaus-AM

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

ANA RITA GAIA MACHADO

**ELABORAÇÃO DE UM PRODUTO DE PANIFICAÇÃO À BASE DE
CRUEIRA E COGUMELO COMESTÍVEL**

Plano de dissertação de mestrado apresentado para
Qualificação no Programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos da Universidade Federal do
Amazonas, na área de concentração em Ciência de
Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira

Manaus-AM

2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira
Universidade Federal do Amazonas
(Orientadora)

Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
Universidade Federal do Amazonas
(Titular)

Profa. Dra. Rosana Antunes Palheta
Instituto Federal do Amazonas- Campus Zona Leste
(Titular)

Profa. Dra. Lídia Araújo
Universidade Federal do Amazonas
(Titular)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus que me deu o dom da vida e me abençoou desde o primeiro suspiro com a família que tenho;

Aos meus pais que me deram-me palavras de amor e gestos de compreensão, para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje;

A minha família, acreditou em mim, me incentivaram ao crescimento profissional e que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis ao longo desta caminhada;

Aos meus amigos de perto e de longe, que me arrancaram sorrisos e deram abraços apertados nos momentos de descontração e quando eu mais precisei;

Aos formandos, amigos e colegas de mestrado que me ajudaram direto e indiretamente a conquistar este sonho com risadas, lágrimas e abraços;

Aos meus mestres e professores, que me deram o conhecimento científico da ciência que sou verdadeiramente apaixonada, além disso, me apoiaram, escutaram, incentivaram e compreenderam;

A minhas amigas Mircella Marialva e Lorisa Simas que me ajudaram a desenvolver a prática e a escrita deste trabalho;

A minha orientadora, Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira e minha co-orientadora Dra Maria Francisca Simas Teixeira que juntas me ensinaram, capacitaram e buscaram a elaboração e realização deste trabalho.

“A vida é feita de momentos, hoje eu ESCOLHI vive-los”

RESUMO

A crescente exigência do consumidor por alimentos funcionais com excelente qualidade sensorial e nutricional está proporcionando a busca por novos ingredientes que atendam às exigências dos consumidores, destacando-se os cogumelos que, devido às suas propriedades farmacológicas e nutricionais, contribuem para melhoria da qualidade de vida do homem. O objetivo desse trabalho foi avaliar o rendimento e a qualidade nutricional de *L.citrinus* cultivado em duas misturas de agrosíduos disponíveis na Amazônia para desenvolvimento de um produto de confeitaria à base de crueira e como forma de disponibilizar um produto fonte de fibras e com qualidade proteica desejável para alimentação humana. Nos cultivos em CC+Li, a produtividade de *L.citrinus* foi significativa, os basidiomas apresentaram boa qualidade nutricional, com teor de proteínas, aminoácidos essenciais e fibras superior aos valores observados nos cultivos em CC+FA. A concentração de minerais foi superior em CC+FA, não sendo constatada diferença significativa da eficiência biológica e produtividade quando comparado a CC+Li. Para o preparo dos três produtos de confeitaria foi utilizado crueira e, substituindo esse resíduo da mandioca por *L. citrinus* 15% e 25% (p/p) nas respectivas formulações. O resultado dessa pesquisa mostra que a casca de cupuaçu, pode ser aproveitada como principal substrato para produção de *L. citrinus* **em região de clima tropical** e os três produtos de confeitaria apresentaram características viáveis para consumo, entre estes, o produto contendo crueira e *L. citrinus* 25% (p/p) apresentou característica morfológica adequada e qualidade nutricional significativa, com destaque para o conteúdo fibra, proteína de macro e microminerais. Os resultados desta pesquisa mostraram a viabilidade da produção de cogumelo comestível, uma forma de aproveitamento de resíduo agroindustrial proveniente da Região Amazônica.

Palavras-chaves: *Lentinus citrinus*, bolos, alimentos funcionais, produtos de panificação

ABSTRACT

The growing consumer demand for functional foods with excellent sensory and nutritional quality is providing the search for new ingredients that meet consumer demands, especially the mushrooms that due to its nutritional and pharmacological properties, contribute to improving the quality of life of man. The aim of this study was to evaluate the yield and nutritional quality of cultivated *L.citrinus* in two mixtures agrowaste available on Amazon for development of a confection to crueira base and as a way to provide a product source of fiber and protein quality desirable for human consumption. Of cultures in CE + Li, the *L.citrinus* productivity was significant, the basidioma showed good nutritional quality protein, essential amino acids and higher fiber to those observed in cultures CE + RB. The mineral concentration was higher in CE + RB not being observed significant difference in the biological efficiency and productivity when compared to CE+ Li. For the preparation of the three confectionery was used crueira and replacing these cassava residue by *L. citrinus* 15% and 25% (w / w) in the respective formulations. The result of this research shows that cupuaçu exocarp, can be utilized as the primary substrate for production of *L. citrinus* in tropical climate region and the three confectionery presented viable characteristics for consumption, among these, the product containing crueira and *L. citrinus* 25% (w / w) showed adequate morphological characteristic and significant nutritional quality, especially the fiber content, macro protein and trace minerals. The results have shown the feasibility of edible mushroom production, a form of agrowaste utilization from the Amazon region.

Key-words: *Lentinus citrinus*, cakes, functional foods, bakery products

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Fluxograma de processo de beneficiamento de raízes com descrição das etapas (azul), entradas (verde) saídas	15
Figura 2 –Fluxograma do processo de produção do produto.....	22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Produtos de confeitaria enriquecidos com farinhas de frutas, goma xantana e soro de leite	17
Quadro 2 -Utilização e os benefícios da farinha de mandioca na indústria alimentícia. Fonte: Ukwuru; Egbonu, 2013	18
Quadro 3 -Valor nutricional e compostos ativos de cogumelos comestíveis	19
Quadro 4 -Espécies de cogumelos com suas características funcionais	20

LISTA DE TABELAS

Tabela1 – Caracterização físico-química da crueira	16
Tabela 2 –Critérios de inclusão e exclusão para os provadores para análise sensorial	27

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Mandioca e seus produtos	14
2.2. Produtos de confeitaria	16
2.3. Cogumelos comestíveis como fonte de nutrientes.....	18
2.4. <i>Lentinus citrinus</i> Walley & Ramello	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E METÓDOS	22
4.1 Matéria prima.....	22
4.1.2. Cogumelo Comestível.....	22
4.1.3. Crueira.....	22
4.2. Produção do Cogumelo Comestível.....	23
4.2.1. Produção da Matriz primária	23
4.2.2 Produção de <i>L.citrinus</i> em resíduo agroindustrial	23
4.2.2.1. Preparação dos grãos de cereais para produção do <i>spawn</i>	23
4.2.2.2. Produção de Spawn por fermentação semi-sólida	23
4.2.2.3. Produção do Spawn por Fermentação em meio líquido	24
4.2.3. Fermentação Semi-Sólida	24
4.2.3.1. Produção dos basidiomas em resíduo agroflorestal	24
4.3. Desidratação da biomassa <i>in natura</i>	24

4.4. Determinação da composição centesimal da biomassa desidratada	17
4.5. Avaliação da qualidade microbiológica dos basidiomas e do produto final de confeitaria à base de crueira e cogumelo comestível.....	25
4.5.1. Preparação das diluições	25
4.5.2. Determinação de bolores e leveduras	25
4.5.3. Análise de coliformes totais, termotolerantes, Salmonela sp. e Staphylococcus aureus ..	25
4.6. Desenvolvimento do produto de confeitaria suplementado com basidioma de L. citrinus .	26
4.6.1. Ingredientes.....	26
4.6.2. Formulação do produto	26
4.8. Análise Sensorial	27
4.9. Análise Estatística.....	27
CAPÍTULO 1 - Nutritional value and proteases of <i>Lentinus citrinus</i> produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region	28
CAPÍTULO 2 - Elaboração de produto de confeitaria sem glúten formulado com farinha de crueira e cogumelo comestível.....	50
5. CONCLUSÃO	62
6. REFERENCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

Consumidores preocupados com a prevenção da saúde estão cada vez mais procurando alimentos saudáveis com qualidade sensorial e nutricional para manutenção do seu bem estar. Esta condição está promovendo a realização de pesquisas para descoberta de novos componentes naturais biologicamente ativos possam atender a estas exigências do mercado (BADARÓ, 2009). Desse modo, diversas matérias-primas ou biocompostos estão sendo utilizadas na elaboração de produtos de panificação e massas alimentícias para modificar ou enriquecer a qualidade nutricional destes alimentos (GUIMARAES et al, 2010; ZAVAREZE, 2010).

Dentre a diversidade de produtos pertencentes à alimentação da população nativa amazônica, a crueira, um resíduo grosseiro formado por pedaços de casca e raiz após a peneiragem da mandioca na casa de farinha, comumente vem sendo descartado ou apenas utilizado como ração animal e na preparação de minguais e biscoitos (ZOLDAN, 2006).

Além da crueira, a fécula é outro subproduto entre os 200 derivados da mandioca que está substituindo o trigo no desenvolvimento de produtos de panificação, tal como biscoito doce, pão de forma e pão de queijo, todos apresentaram boa aceitação de consumo (VIEIRA et al, 2010, SOARES-JUNIOR et al., 2010; APLEVICZ, 2006).

Outra alternativa alimentícia pouco explorada na Região Norte são as espécies de cogumelos comestíveis, fungos que promovem a melhoria da qualidade de vida do homem. Estes macrofungos classificados na ordem Agaricales tem características nutricionais semelhantes a diversos produtos vegetais e animais, ou seja, fonte de proteínas, polissacarídeos, minerais e fibras. Além dessas qualidades nutricionais, os cogumelos comestíveis fornecem compostos bioativos, como antioxidantes, antibióticos e enzimas que potencializam suas características sensoriais e funcionais (SMITH, SULLIVAN, 2004; FURLANI, GODOY, 2005).

Pesquisas realizadas demonstraram que cogumelos promovem o melhoramento nutricional, assim como, podem enriquecer produtos alimentícios melhorando, entre outras características, o sabor e a textura. Na literatura estão disponíveis dados que demonstram produtos com características aceitáveis pelo consumidor, como mingau de arroz, bolo convencional e pão a base de *Pleurotus sajor-caju* em pó (AISHAH; ROSLI, 2013), hamburger de *Agaricus brasiliensis* (LEMOS, 2009), pão enriquecido com micélio liofilizado de *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata*, *Hericium erinaceus* e *Phellinus linteus* (ULZIJARGAL et al, 2013). Sheikh et al. (2010) produziu formulações de bolos com trigo adicionado de diferentes concentrações de uma espécie de cogumelo ostra (*Pleurotus sp.*).

Considerando-se a importância do consumo de cogumelos e o aproveitamento de subproduto da cadeia produtiva da farinha de mandioca, a realização deste trabalho teve a finalidade de elaborar um produto à base de crueira, isento de glúten e lactose e enriquecido com basidiomas de *Lentinus citrinus* como forma de disponibilizar um produto funcional com qualidade nutricional desejável, numa perspectiva de melhoria da condição de saúde e inserção este produto na alimentação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mandioca e seus subprodutos

A mandioca é uma planta dicotiledônea, da família *Euphorbiaceae* e gênero *Manihot*, originária das Américas. Este gênero apresenta um grande número de espécies, mas, a única cultivada para fins alimentícios é a *Manihot esculenta* Crantz que pode ser da variedade brava ou mansa, devido ao teor de glicosídeos cianogênicos (que liberam o ácido cianídrico) presente (SOUZA; MENEZES, 2004).

A qualidade culinária de raízes frescas é um parâmetro importante na seleção de variedades de mandioca de mesa. A identificação dessa qualidade envolve fatores variados e complexos por constituir-se de um conjunto de características físicas, químicas e sensoriais, algumas das quais são determinadas objetivamente, como teores de cianeto, amido e fibra, e tempo de cocção e, outras, subjetivamente, como sabor, consistência e textura da polpa cozida (BORGES et al, 2002).

Essa planta é utilizada nos mais diversos campos da atividade econômica, destacando-se seu uso na alimentação humana, principalmente pelas populações dos países em desenvolvimento, que são os seus maiores produtores e consumidores (DIAS, 2002).

No preparo de produtos derivados da mandioca de mesa, como mandioca cozida, frita, bolo, purê, suflê, entre outros, o cianeto presente na polpa também é despreendido por volatilização atingindo níveis baixíssimos, tornando-os inócuo, em que na cocção e fritura proporcionam redução substancial do conteúdo de cianeto da polpa, variando pela cocção entre 56 e 80% e, pela fritura, entre 70 a 82% (BORGES et al, 2002).

No Brasil a produção de mandioca em 2011 foi estimada em 25,77 milhões de toneladas, não havendo diferenciação, na coleta desses dados, entre o destino da produção de raízes, se para a indústria ou para o consumo doméstico. Dentre os principais estados produtores destacam-se: Pará (18%), Paraná (16%), Bahia (11,48%), Maranhão (7%), Rio Grande do Sul (5%), que em conjunto são responsáveis por 57% da produção total do país. No Amazonas, a produção de mandioca foi de 1,05 milhões, correspondendo, somente, a 4% da produção total (IBGE, 2011).

A composição química das raízes de mandioca mostra que é a principal fonte de carboidratos para os consumidores, sendo, portanto, para converter a mandioca em mais produtos utilizáveis.

Os sistemas de produção e de transformação desta raiz e seus derivados apresentam grande diversidade tecnológica, variando-se desde os pequenos cultivos em quintal, à produção tradicional dos pequenos agricultores das zonas semi-áridas do Nordeste e regiões Amazônicas até as produções em larga escala das farinheiras da região Sul do Brasil, que utilizam a colheita semi-mecanizada. Contudo as regiões Norte e Nordeste destacam-se como principais consumidoras, sendo a produção essencialmente utilizada na dieta alimentar, na forma de farinha (ZOLDAN, 2006).

A industrialização da mandioca visando a produção de bens econômicos como farinhas e féculas desde o descascamento até a torrefação gera resíduos, líquidos e sólidos, que podem ser a água de limpeza das raízes, a casca ou película marrom, a água da prensagem da massa ralada, a água de extração da fécula, as fibras e a crueira (WOSIACKI; CEREDA, 2002).

A crueira é constituída por pedaços de raízes e entrecasca da mandioca, separados por peneiras antes da torrefação, conforme demonstra a figura 1 (NEVES et al, 2008).

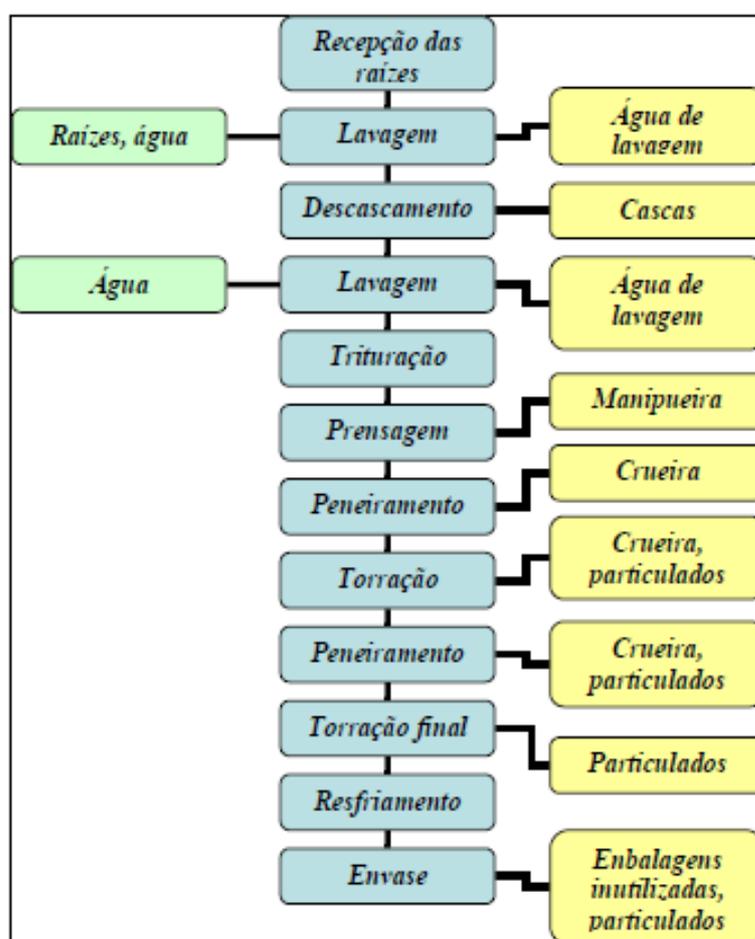


Figura 1. Fluxograma do processo de beneficiamento de raízes com descrição das etapas (azul), entradas (verde) e saídas (ZOLDAN, 2006).

Durante o processo de fabricação de farinha de mandioca, a massa é prensada, geralmente com o uso do tipiti, para a diminuição da umidade. A massa compactada é esfarelada antes da peneiração. Posteriormente, a massa é peneirada com retenção dos maiores fragmentos (cruera), resultando numa farinha mais uniforme, ou seja, a cruera é o fragmento ou o conjunto de fragmentos mais grosseiros da massa esfarelada de mandioca retido durante a peneiração (ZOLDAN, 2006).

A composição físico-química da cruera (tabela 1) demonstra que seu percentual de amido (81,1%) e fibras (7,39%) é elevado, o que pode se caracterizar como um bom elemento para ser utilizado na produção de produtos de confeitaria.

Tabela 1. Caracterização físico-química da cruera

Componentes	Média
Umidade (%)	15,5
% base seca	
Amido	81,1
Fibras	7,39
Cinzas	0,90
Proteínas	1,41
Matéria graxa	0,44
Açúcares solúveis totais	2,24

Fonte: NEVES et al., 2008

2.2. Produtos de confeitaria

Produtos de panificação e confeitaria são os alimentos formulados com trigo que estão disponíveis para consumo humano no formato de bolo, biscoitos, massas, entre outros. Estes produtos estão em constante modificação com o aparecimento e a comercialização de alimentos funcionais. As receitas desses produtos convencionais estão sendo alteradas frequentemente substituindo-se ou reduzindo-se o teor de trigo por outras matérias-primas alternativas para disponibilização de alimentos com características nutricionais a fim de atender a demanda dos diferentes grupos de consumidores como forma de contribuir com a melhoria da qualidade de vida (KIRINUS et al., 2010).

Além dos aditivos convencionais de confeitaria, diversos suplementos estão sendo adicionados à farinha de trigo na tentativa de inovar e enriquecer com outros nutrientes produtos já existentes no mercado, a exemplo de farinhas de frutos regionais, farinhas integrais, goma xantana e soro de leite (Quadro 1).

Produto	Benefício Nutricional	Fonte
Bolo com soro de leite	Enriquecimento com proteínas de excelente valor nutricional e baixo custo em relação ao leite.	Zavareze et al, 2010
Bolo de chocolate com farinha de Yacon	Aumento no teor de fibra alimentar na forma de frutanos, que possuem ação prebiótica e aos quais são atribuídos vários benefícios à saúde.	Padilha et al, 2010
Bolo com goma xantana	Substituição do glúten presente na farinha de trigo.	Preichardt et al, 2009
Bolo com farinha mista de aveia	Aumento do teor de fibras.	Borges et al 2006
Bolo com farinha de entrecasca de melancia	Aumento dos teores de fibra insolúvel.	Guimarães et al, 2010
Bolo com farinha de bagaço de maçã	Aumento da fibra solúvel na dieta, desempenhando um papel importante no tratamento da obesidade e, assim, reduzir a ingestão diária de calorias.	Coelho; Wosiacki, 2010
Bolo sem glúten com cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i>	Alimento complementa para portadores de doença celíaca.	Bassan et al, 2011
Panetone com farinha de pupunha	Aumento do teor de carboidratos, fibras, proteínas e carotenoides	Oliveira; Marinho, 2010

Quadro 1. Produtos de confeitaria enriquecidos com farinhas de frutas, goma xantana e soro de leite

A mandioca e seus resíduos podem ser alternativas para suplementação desses produtos, pois é um alimento fonte de energia, visto que os grãos mais nobres são usados na alimentação humana e de animais não-ruminantes, que apresentam melhor resposta à utilização deste tipo de alimento (MARQUES et al, 2000).

A farinha de mandioca de alta qualidade pode ser utilizada para produzir produtos alimentares seguros, nutritivos e aceitáveis, e que também necessitam serem ainda mais enriquecidos, a fim de satisfazer os requisitos nutricionais de pessoas de diferentes grupos etários e, também, para ser utilizada em programas de intervenção nutricional (AKINLONU, 2011).

Gomes, et al (2005) citam que o amido de mandioca tem muitas características marcantes, incluindo alta viscosidade de massa, alta transparências e congelamento de alta estabilidade, que

são vantajosos para muitas indústrias, principalmente a de alimentos, conforme demonstra o quadro 2.

Quadro 2. Utilização e os benefícios da farinha de mandioca na indústria alimentícia. **Fonte:** Ukwuru; Egbonu,

Produtos à base de mandioca	Utilização	Nível de inclusão de farinha de mandioca alta qualidade no produto (%)
Pão	Padarias	5-25
Biscoitos	Fábrica de biscoitos	10-50
Macarrão	Fábrica de massas	10
Bolos	Confeitarias	5-10
Semovita de milho	Restaurantes	18
Chips	Indústrias	Não especificado
Tortas	Confeitaria	10-100
Cookies	Confeitaria	10-100
Flocos	Confeitaria	Não especificado

Conforme Ukwuru; Egbonu (2013) vários tipos de alimentos tradicionais que são geralmente preparados a partir de farinha de trigo, farinha de arroz ou amido de milho são feitos com farinha de mandioca, como um substituto parcial ou total destes ingredientes, assim como a produção de bolos nas confeitarias.

O procedimento básico para a preparação do bolo é de mistura de ovo, açúcar e um agente de fermentação, em seguida a farinha de mandioca e margarina derretida são então adicionados e bem misturados em massa para a cocção durante 30 minutos. Contudo, torna-se necessária a realização de diferentes substituições da farinha de trigo por farinha de mandioca para que o bolo obtenha características sensoriais desejáveis (UKWURU; EGBONU, 2013).

2.3. Cogumelos comestíveis como fonte de nutrientes

Os cogumelos comestíveis são consumidos desde a idade antiga por serem considerados uma iguaria nobre e apresentarem valor nutricional e medicinal (GODOY, 2008). No Brasil, *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus blazei*, *Agaricus brasiliensis* e *Agaricus sylvaticus* são as espécies disponíveis para comercialização como alimento fonte de proteínas, fibras, lipídeos e de elementos minerais (FURLANI, GODOY, 2005; FORTES, NOVAES, 2006).

No quadro 3 estão apresentadas espécies de cogumelos comestíveis, o respectivo valor nutricional e os compostos bioativos que tem motivado o uso dessas espécies como suplementos dietéticos (GRACIOLLI, 2010).

Cogumelo	Valor Nutricional				Composto Ativo
	P	C	L	F	
<i>Agaricus bisporus</i>	39,32	5,24	0,45	18,2	Fenóis ²
<i>Agaricus brasiliensis</i>	45	38	3	28	Flo-a-β ¹
<i>Lentinus edodes</i>	17,5	5,37	4,3	44,9	Lentinana ¹
<i>Pleurotus ostreatus</i>	34,73	6,69	2,16	11,1	β-glucano ¹

Quadro 3. Valor nutricional e compostos ativos de cogumelos comestíveis. ¹Imunomodulador; ²Antioxidante P=proteína; C=carboidrato; L=lipídeo; F=fibra. Fonte: Furlani & Godoy (2005); Fortes & Novaes (2006), Lindequist et al, (2005); Synytsya, et al , 2008, Toro et al (2006).

Os suplementos alimentares são produtos alimentícios feitos com o propósito de serem ingeridos na forma de tabletes, farinha, géis, cápsulas de gel ou gotas líquidas e que forneçam vitaminas, minerais, ervas ou outro substrato botânico, aminoácidos ou outra substância dietética (incluindo um concentrado metabólico, extrato ou combinação de qualquer um dos componentes referidos acima). Os alimentos para fins dietéticos especiais são aqueles processados ou formulados para atender as necessidades de grupos específicos da população, devido a uma determinada condição fisiológica. (MORAES; COLLA, 2006).

Nas últimas décadas, o uso de suplementos dietéticos, como cogumelos e/ou de seus extratos estão em expansão em função das ações antitumorais, anticarcinogênicas, antivirais, antiinflamatórias, hipoglicemiantes, hipocolesterolêmicas, hipotensivas, inclusive estão sendo indicados como coadjuvantes do tratamento das neoplasias malignas, entre outras (FORTES; NOVAES, 2006).

Nos últimos anos, a procura de tecnologias mais produtivas e a introdução de cogumelos como alternativa alimentícia está em crescimento devido ao potencial protéico associadas às propriedades antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas desse macrofungo (FURLANI;GODÓI, 2005).

No Brasil há várias espécies de cogumelos consideradas medicinais por apresentarem propriedades funcionais, descritas na literatura científica (Quadro 4).

Cogumelo	Nome Popular	Propriedades Funcionais	Referência
<i>Agaricus blazei</i>	Cogumelo do sol	Efeito terapêutico; ação antitumoral; imunomoduladoras; antivirais e antimicrobiana.	Braga et al, 2005
<i>Auricularia polytricha</i>	Orelha-de-judeu	Efeito anticoagulante; hipocolesterolêmico; apresenta atividade antioxidante e estimula o sistema imunológico.	Tang et al, 2010
<i>Coprinus comatus</i>	-	Normaliza o nível de açúcar no sangue e possui atividade antiinflamatória.	Cogumelos, 2009
<i>Cordyceps sinensis</i>	-	Ação antitumoral, antioxidante e antidepressiva; hipoglicemiante.	Chiba et al, 2010
<i>Ganoderma lucidum</i>	Reishi	Efeito antioxidante; possui propriedades antimutagênicas e aumenta a resposta imunológica.	Cogumelos, 2009
<i>Grifola frondosa</i>	Maitake	Estimula o sistema imunológico	
<i>Hericiium erinaceus</i>	Juba-de-leão	Efeito antioxidante e antiinflamatório;	Wong et al, 2009
<i>Lentinus edodes</i>	Shiitake	Ações antitumorais e hipocolesterolêmico e potencial antimicrobiano e antioxidante.	Kitzberger et al, 2007

Quadro 4. Espécies de cogumelos com suas características funcionais

2.4. *Lentinus citrinus* Walley & Ramello

O gênero *Lentinus* foi classificado por Fries, publicado validamente em 1925, e classificado na ordem Agaricales, família Pleurotaceae. Em 1972, Locquin o classificou na família Lentinellaceae (MORENO, 1975).

Nos estudos realizados por Putzke (2002), após uma revisão do material depositado em herbários brasileiros envolvendo os gêneros *Lentinus* e *Pleurotus*, esse cientista elaborou lista e chaves para as espécies confirmadas. Nesse período ficou constatado que *Lentinus* está representado, aproximadamente, por 14 espécies nativas e a distinção entre *Pleurotus*, representado por pelo menos 15 espécies.. A partir dessa investigação científica, *Lentinus* teve a seguinte posição taxonômica: Reino Fungi; Filo Basidiomycota; Ordem Agaricales; Família Lentinaceae. Esse gênero tem representantes comestíveis e de importância econômica, como exemplo *L. citrinus*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Fabricar e avaliar um produto de confeitaria isento de glúten e com características sensoriais agradáveis aos consumidores.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir o cogumelo comestível *Lentinus citrinus* por fermentação semi-sólida em resíduo agroindustrial de casca de cupuaçu e farelo de arroz;
- Determinar a composição físico-química e microbiológica dos basidiomas, da farinha de crueira e do produto elaborado;
- Avaliar o efeito desses ingredientes na composição nutricional e nas características sensoriais do produto final.

4. MATERIAL E METÓDOS

4.1. Matérias Primas:

4.1.2. Cogumelo comestível

A espécie selecionada para este estudo foi *Lentinus citrinus* DPUA 1535, cedida pela Micoteca DPUA (Coleção de Culturas), da Universidade Federal do Amazonas-UFAM e da Rede de Coleções de Culturas de Microrganismos do Norte e Nordeste do Brasil-RENNEBRA e produzida conforme o fluxograma descrito na figura 2.

4.1.3. Crureira

A crueira foi adquirida nas casas de farinha de mandioca do município de Manacapuru-AM. No laboratório da Universidade Federal do Amazonas, foi desidratada em estufa de ar circulante a 40°C até peso constante e posteriormente triturada e acondicionada em frasco de vidro hermeticamente fechado. Este produto, demonstrado na figura 2, foi submetido à análise da composição centesimal e a análise microbiológica, conforme citado nos itens 4.4 e 4.5, respectivamente.

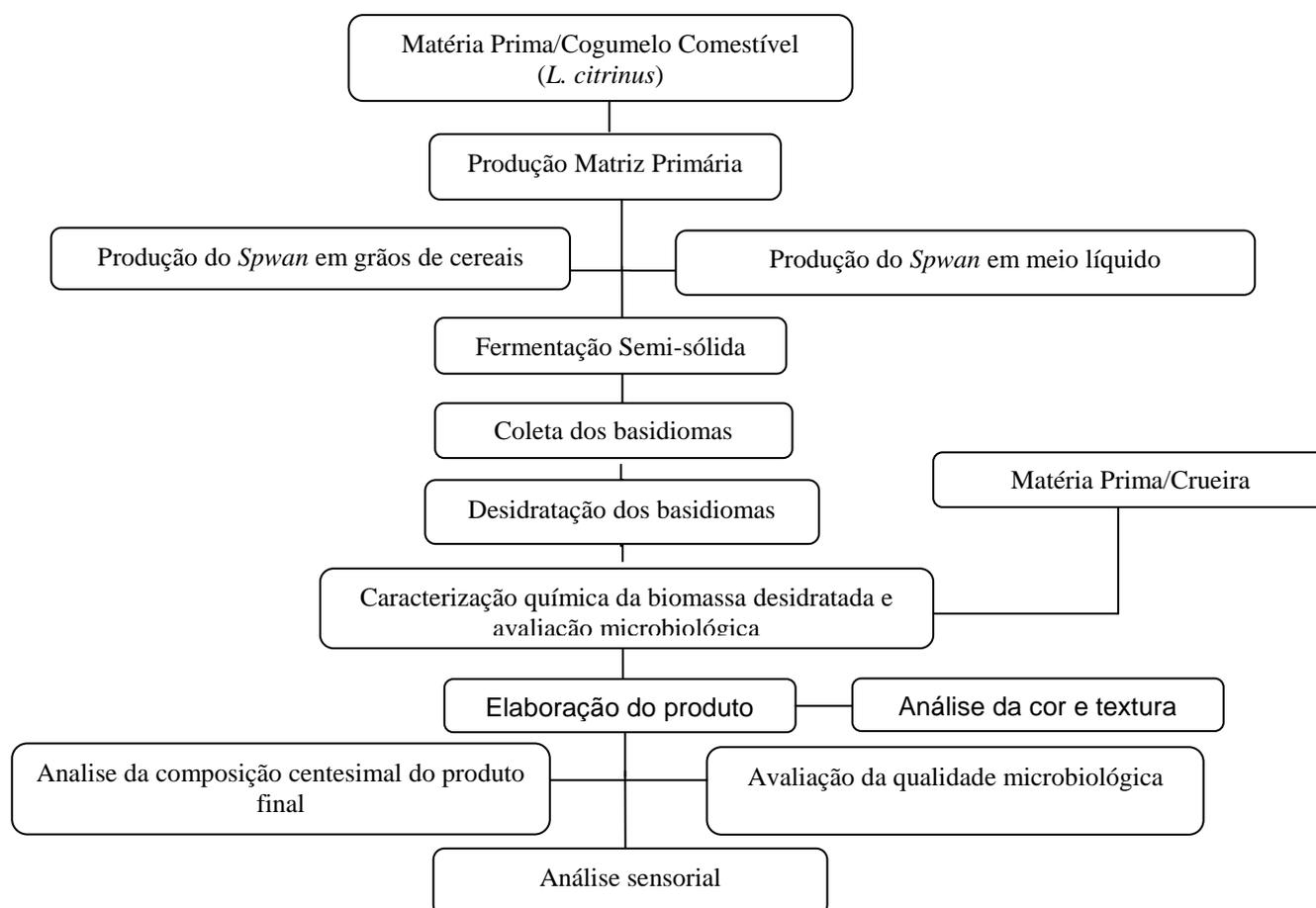


Figura 2. Fluxograma do processo de obtenção do produto de confeitaria à base de crueira e cogumelo comestível

4.2. Produção do cogumelo comestível

4.2.1. Produção da Matriz primária

O cultivo da matriz foi realizado em Ágar Batata Dextrose adicionado de Extrato de Levedura 0,5% (p/v) – BDA, em placa de Petri de 90x15mm. Com cuidados assépticos, o basidioma de *L. citrinus* foi transferido de um disco micelial de 10 mm para a superfície de BDA. As culturas foram incubadas a 25°C, por 8 dias, em ausência de luz.

4.2.2. Produção de *L. citrinus* em resíduo agroindustrial

Para a obtenção dos basidiomas foi produzido *Spawn* em grãos de cereais e, em meio líquido, por fermentação submersa, com a finalidade de se verificar, dentre esses métodos, aquele que proporcionará melhor rendimento biológico (g de cogumelo fresco/3kg/fluxo).

Ao término da produção os basidiomas totalmente desenvolvidos foram contados e separados daqueles que apresentarem deformidades em suas características morfológicas para ser determinado o peso médio dos corpos de frutificação (peso médio de cada fluxo/número de basidiomas), comprimento, largura e espessura dos píleos e hastes (mm), eficiência biológica, produtividade e taxa de produção de acordo com Ahmed et al (2013).

4.2.2.1. Preparação dos grãos de trigo para produção do *spawn*

O *spawn* foi produzido de acordo com a metodologia descrita por Rollan (2003). Os grãos de trigo adquiridos no comércio local foram lavados e deixados em imersão em água. Após 12 h, o excesso da água foi retirado e, em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito 1% (v/v) por 30 minutos. Ao término do tratamento, os grãos foram pré-cozidos por 15 minutos. O excesso de água foi retirado e, nos grãos, adicionado carbonato de cálcio (3,5g/Kg de grão, em relação ao peso dos grãos desidratados). Os grãos acondicionados em frascos de vidro com tampa rosqueável, contendo um furo central, tamponado com algodão cardado, foram esterilizados a 121 °C, por 60 minutos.

4.2.2.2. Produção de *Spawn* por fermentação semi-sólida

Cada frasco, contendo os grãos de cereais esterilizados, preparados conforme item 4.2.2.1., foi inoculado com 12 discos da matriz primária, produzida de acordo com o item 4.2.1. A fermentação em estado estacionário foi realizada a 25°C, sem luminosidade, até a completa miceliação dos grãos. (ROLLAN, 2003).

4.2.2.3. Produção do *Spawn* por Fermentação em meio líquido

Dos cultivos de *L. citrinus* (item 4.2.1) foram retirados discos medindo 10 mm para serem inoculados em 50 mL de GYP [glicose- peptona com extrato de levedura 0,5% - (p/v)]. A fermentação foi conduzida a 25° C, 150 rpm. Após cinco dias, a biomassa na forma de *pellets* foi separada do sobrenadante por filtração, em crivo de alumínio (diâmetro = 75 mm), para inoculação no resíduo agroindustrial.

4.2.3. Fermentação Semi-Sólida

4.2.3.1. Produção dos basidiomas em resíduo agroflorestal

A produção de *L. citrinus* foi realizada em resíduo agroflorestal (CC= Casca de Cupuaçu e FA= farelo de arroz), concentração 2:1, umidade 60%, em base seca. A mistura de substrato (3kg) foi acondicionada em embalagens de polietileno, transparentes, medindo 28 cm x 45 cm. A esterilização do substrato foi feita a 121°C, por uma hora, em três dias consecutivos. A fermentação foi realizada a 25°C até completa miceliação do substrato, em ambiente sem luz, umidade ambiente 80%, perfurando-se as embalagens após 72 horas. Após a indução dos primórdios a 12°C, os cultivos foram expostos à luz difusa por 12 horas, 25 °C, em ambiente com umidade 90% .

4.3. Desidratação da biomassa *in natura*

Ao término do ciclo de crescimento, os basidiomas foram colhidos e, posteriormente, submetidos à desidratação (40°C) até alcançarem umidade final em torno de 5%. Em seguida, os basidiomas foram triturados em processador para serem utilizados nos próximos testes.

4.4. Determinação da composição centesimal da biomassa desidratada

A biomassa triturada foi embalada em potes de vidro, hermeticamente fechados, para a determinação da composição centesimal:

- Umidade: determinada por dessecação em estufa com circulação de ar a 60 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante (A.O.A.C, 2006).
- Proteína total: determinada pela concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro *Kjeldahl* e aplicando o fator de conversão 4,28. Para o substrato, o fator de conversão foi 6,25.
- Cinzas (resíduo mineral fixo): determinado por incineração do material em mufla a 550 °C-660 °C até obtenção de peso constante (A.O.A.C, 2006).

- Lipídios: determinado de acordo com o método descrito por Bligh and Dyer (1959).
- Fibras:
- Carboidratos totais: estimados por diferença entre o somatório das porcentagens de umidade, proteína, lipídios, cinzas (LATINFOODS 2002, NEPA 2006).
- Energia: a energia total metabolizável = (4kcal/g de proteína) + (4kcal/g carboidratos totais) + (9kcal/g de lipídeos), preconizados pelo Latinfoods 2002; Nepa 2006.

4.5. Avaliação da qualidade microbiológica dos basidiomas e do produto final de confeitaria à base de crueira e cogumelo comestível

As condições higiênico-sanitárias da biomassa desidratada de *L. citrinus* e do produto alimentício foi realizada de acordo com a metodologia preconizada pela a RDC nº12, da ANVISA, citado por Silva (2007). Também foi verificada a presença de bolores e leveduras, embora não seja exigida pela legislação (WHO, 1998).

4.5.1. Preparação das diluições

Para a análise microbiológica, 25 g de basidioma desidratado ou do produto alimentício foi homogeneizada com 225 ml de água peptonada, em vortex, por 2 minutos. A partir dessa diluição, foram preparadas as diluições sucessivas até 10^{-3} , em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v). Dessas diluições 10^{-1} a 10^{-3} foram retirados diferentes volumes para determinação de bolores e leveduras, coliformes totais, termotolerantes e *Salmonella* sp.

4.5.2. Determinação de bolores e leveduras

De cada diluição, obtida conforme item 4.5.1., foram retirados 200 µL para serem semeados por toda superfície de ágar Rosa Bengala adicionado de cloranfenicol 0,001% até total absorção no meio. As placas, em triplicata, foram incubadas a 25°C, por sete dias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de produto (UFC/g) (Silva et al., 2007).

4.5.3. Análise de coliformes totais, termotolerantes, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*

Na determinação do Número Mais Provável (NMP.g⁻¹) de coliformes totais, termotolerantes e *Salmonella* sp, de cada diluição foram retirados 1000 µL para inoculação em séries de três tubos contendo 9 mL de caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India), com tubo de Duhran invertido. Os tubos foram incubados a 35°C, por 24-48 horas. A partir dos tubos com

leitura positiva (formação de gás) foram realizados os testes confirmativos para coliformes totais em caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India) a 35°C, por 24-48 horas e coliformes termotolerantes em caldo *Escherichia coli* (EC) (Himedia®, Mumbai-India) a 45°C, por 24 horas. Os valores de NMP.g⁻¹ foram calculados de acordo com Silva et al. (2007).

A análise para verificação da presença de *Salmonella sp.* dos tubos com formação de gás mantidos a 35 °C, com auxílio de uma alça de platina foi tirada uma alíquota e inoculado em Ágar Verde Brilhante (VB) (Himedia®, Mumbai-India) a 35°C, por 24 horas. As colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos para identificação de *Salmonella* (Silva et al., 2007).

Para a quantificação de *Staphylococcus aureus* coagulase positivas, das diluições 10⁻¹ a 10⁻³ foram retirados 100 µL e inoculados em 15 mL de Ágar Manitol Salgado, fundido e resfriado até 45°C. Após a homogeneização e solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37°C. A leitura foi realizada após 24 e 48 horas de incubação. O resultado positivo foi determinado pela mudança da coloração do meio de vermelho para amarelo (fermentadoras de manitol). Para a confirmação das colônias coagulase positivas, três colônias que promoveram a mudança de coloração do meio foram selecionadas conjuntamente com 3 três colônias atípicas para o teste de coagulase. Com alça de platina estas colônias foram transferidas, separadamente, para 2 ml de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), em tubos de ensaio com tampa rosqueável e mantidas a 37°C. Após 24 horas, 300 µL desse Caldo BHI fermentado foram transferidos para 300 µL de plasma de coelho, em tubos esterilizados. Estes tubos-teste foram incubados a 37°C por 6 horas. O resultado positivo foi determinado pela presença do coágulo (REIS, 2010)

4.6. Desenvolvimento do produto de confeitaria suplementado com basidioma de *L. citrinus*

4.6.1. Ingredientes

Para a produção do produto de confeitaria foram utilizados a biomassa desidratada e triturada de *L.citrinus* (item 4.3), a farinha de crueira (item 4.6), leite, manteiga, açúcar, leite e ovos. Todo o processamento do produto foi realizado no laboratório de Tecnologia do Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas.

4.6.2. Formulação do produto

Para a elaboração do bolo de crueira e cogumelo foram feitas três diferentes formulações em que as concentrações de leite, manteiga, açúcar e ovos foram fixas e os percentuais de crueira e cogumelo irão variar: ① bolo controle (sem a adição de cogumelo em sua formulação); ② bolo

contendo 15% de cogumelo em substituição à crueira (p/p); ③ produto contendo 25% de cogumelo em substituição à crueira (p/p).

4.8. Análise Sensorial

As amostras do produto foram elaboradas 12 horas antes da realização da análise sensorial. Na análise sensorial foram avaliados os atributos, aroma, sabor, cor, textura e aceitação geral, de acordo com a escala hedônica de 5 pontos (FERREIRA, 2000). O recrutamento foi realizado, verbalmente, entrevistando os provadores antes da análise sensorial. Os candidatos foram escolhidos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão descritos na tabela 2. Como degustadores foram selecionados 50 julgadores não treinados.

Tabela 2. Critérios de inclusão e exclusão para seleção dos provadores para análise sensorial.

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
De 18 á 80 anos	Alérgico aos materiais de teste
De ambos os sexos	Com resfriado
Apreciadores de bolo	Diabéticos
Não fumantes	Gestantes

Cada amostra foi servida, individualmente, em prato descartável, contendo aproximadamente 5g do produto, água no intervalo de uma degustação para outra.

Aos provadores foi entregue uma ficha de avaliação sensorial, (Apêndice A), adaptado por Ferreira et al (2000), correspondente a cada amostra e duas cópias do termo de consentimento livre esclarecido, sendo uma cópia para o provador e a outra para equipe do projeto.

4.9. Análise Estatística

Em todos os experimentos os dados foram submetidos à análise estatística descritiva (Tabelas, gráficos e distribuição de frequência em classes), de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), utilizando o programa Minitab versão 16.0.

CAPÍTULO 1

Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region

Food Technology and Biotechnology

1 **Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid**
2 **state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region**

3
4 Ana Rita Gaia Machado¹, Maria Francisca Simas Teixeira^{2*} Larissa de Souza Kirsch²
5 Maria da Conceição Loureiro Campelo³ & Ila Maria de Aguiar Oliveira¹

6
7 ¹Federal University of Amazonas-UFAM, Pharmaceutical Science College, Manaus, AM,
8 Brazil.

9 ²DPUA Culture Collection-UFAM, Federal University of Amazonas, Manaus, AM,
10 Brazil;

11 ³Western Amazonas Embrapa, Department of Laboratory Management-LASP, Manaus,
12 AM, Brazil.
13

14 **Summary**

15 *Lentinus citrinus* was cultivated on cupuaçu exocarp (*Theobroma grandiflorum*) mixed
16 with litter (CE+LI) or rice bran (*Oryza sativa*) (CE+ RB) (2:1 w/w) to investigate the
17 nutritional composition and proteolytic potential of the fruiting body produced.
18 Significance values of yield were determined on both formulations. In CE+LI, the
19 biological efficiency of the mushrooms was 93.5% and the content of fat (4.5%), fiber
20 (11.0%), protein (27.0%) and amino acids were higher when compared with CE+RB.
21 Among the amino acids, the amount of glutamic acid, aspartic acid, arginin, alanin,
22 arginine and leucine were high. The biological efficiency on CE+RB reduced to 84.2% and
23 based on the nutritional value, carbohydrates (53.59%), energy (324.33 kcal) and minerais
24 like zinc, iron, copper, potassium and phosphorus were higher in this formulation. Among
25 the used substrates, the proteolytic activity from the fruiting body was significant in CE+Li
26 (463.55 U/mL) with optimal enzyme activity at 50°C in neutral and alcaline pH with
27 maximum stability at 30°C and at alkaline pH.

28
29 **Keywords:** *Lentinus citrinus*, basidiomata, nutritional value, proteases, solid state
30 fermentation

31
32
33

* Corresponding author: Phone: +55 92 3305-4284; E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

1 **Introduction**

2 Edible mushrooms are considered healthy food rich in protein, dietary fiber, reduced fat
3 content and a broad spectrum of bioactivity, particulars that enable the inclusion of these
4 fungi in human diet (1-3).

5 Among the mushrooms, the genus *Lentinus* Fr., represented by about 63 species, are
6 known as saprobecosmopolitan basidiomycetes of occurrence in tropical and temperate
7 areas (4). Many of these macrofungi have distinct flavor and are foods with high amount of
8 protein, fibers, minerals, vitamins and reduced lipid content (5,6).

9 *Lentinus edodes* occupies a prominent place in world consumption of mushrooms when
10 compared to other commercialized species (7). Besides this species, *Lentinus cladopus*
11 Lév., *Lentinus crinitus*, *Lentinus glabratus* Mont., (L.), *Lentinus subnudus* Fr., *Lentinus*
12 *velutinus* Fr., *Lentinus cubensis* Berk and MA Curtis, *Lentinus strigosus* (Schwein) Fr. are
13 other examples recorded as edible mushrooms (5,8-11).

14 Other representatives of the genus *Lentinus* like *L. crinitus* and *L. citrinus* produce
15 proteases, *Lentinus tigrinus* produces esterases (12-14). *Lentinus edodes* and *L. strigosus*
16 synthesize compounds with immunomodulatory activity and properties to chemotherapy of
17 Leishmaniasis and Chagas disease, respectively (4,14,15).

18 Literature data show that between the bioactive compounds produced by *Lentinus*,
19 proteases have an important regulatory role in nature with emphasis on morphogenesis,
20 physiology and metabolism of mushrooms. Besides, proteolytic enzymes have applications
21 in food processing, bakery, juices and cheese production. These properties contributed to
22 the promotion of the predominance of these biocatalysts in the enzymes world market
23 estimated in billion of dollars (16-19).

24 Proteases are a complex group with different substrate specificity, active site, catalytic
25 mechanism, optimal pH and temperature and stability profile (20,21).

26 In many ecosystems mushrooms play an important role in the decomposition of organic
27 matter. The white rot fungi cleavage cellulose, hemicellulose and lignin in wood, while
28 others, like brown rot fungi, only cleavage cellulose and hemicellulose (17, 22).

29 Mushroom production as a sustainable alternative can contribute to reducing of organic
30 waste and minimize the content of environmental pollutants. They also can aggregate value
31 to low-cost products as agrowastes (22-26).

32 In Amazon, agrowastes as cupuaçu exocarp, litter and rice bran exist in abundance, they
33 are little explored but have important nutritional characteristics for using in edible

1 mushrooms cultivation (27). The aim of this study was to analyze the yield performance,
2 nutritional quality and proteolytic potential of *Lentinus citrinus* fruiting bodies produced in
3 lignocellulosic substrates.

4 5 **Material and Methods**

6 *Mushroom strain*

7 *Lentinus citrinus* DPUA 1535 obtained from DPUA Culture Collection, Federal University
8 of Amazonas–UFAM, Brazil, was maintained on potato dextrose agar (PDA)
9 supplemented with 0.5% (w/v) yeast extract, at 25°C for 8 days in the absence of light.

10

11 *Mushroom Production*

12 The spawn was produced in wheat grain pre-cooked for 15 minutes and then added to
13 calcium carbonate (3.5 g/kg grain, dry basis). In flasks of glass, with screw cap containing
14 a central hole capped with a cotton plug, 300g of these grains were stored and sterilized at
15 121°C for 15 minutes. After cooling, each flask was inoculated with 12 mycelial agar
16 discs. The cultures were maintained at 25 °C in absence of light until the completion of
17 growth of mycelium on substrate (28).

18 The production of *L. citrinus* was performed in substrates 2:1 ratio (dry basis, w/w):
19 CE+RB (cupuaçuexocarp+rice bran) and CE+Li (cupuaçuexocarp+litter), 60% moisture.
20 Samples of 3 kg of each substrate mixtures were filled in uncolored polyethene bags
21 measuring 28 cm x 45 cm. The substrates were sterilized at 121°C during 60 minutes for
22 two consecutive days. After cooling, the bags were inoculated with the spawn (10% w/w),
23 and incubated at 25°C in absence of light, 80% moisture. When the mycelium had
24 completely covered the substrates, the induction of primordia was made at 12°C, 90%
25 moisture, with alternating light every 12 hours and fruiting body production at 25°C, 80%
26 humidity, with alternating light every 12 hours. For each substrate mixture, fifteen
27 repetitions were performed. The mushrooms were collected for determination of biological
28 efficiency (g of fresh mushroom / dry substrate weight x 100), productivity (g of fresh
29 mushroom/fresh substrate weight x 100) and production rate (biological efficiency/days
30 crop) as described by Ahmed 23.

31

32

33

1 *Proximate Composition*

2 The fruiting bodies of *L. citrinus* were analysed for moisture content, crude fat, crude
3 protein, ash and carbohydrates. The moisture was determined by drying, in a forced air
4 circulation oven at 40°C, until stable weight (29), crude protein fractions by micro
5 Kjeldahl method (29), using 4.38 as conversion factor. Quantification of crude fat was
6 determined by *Bligh and Dyer* method, ash by incineration of the material, in a muffle
7 furnace at 550-660°C, until constant weight (29). Crude fibers by digestion of acid-base
8 according to Weende (29), total carbohydrates were estimated by difference (100g-total
9 grams of moisture, protein, fat and ash) and total energy was calculated using the
10 conversion factor Atwater, both recommended by NEPA (30).

11 The determination of minerals was performed according to the proposed by Embrapa
12 methods (31). The samples were dried in a forced air circulation oven at 40°C and then
13 submitted to acid digestion in HNO₃ + HClO₄ (3:1 ratio). Phosphorus content was
14 determined by Ultraviolet-visible spectroscopy. Calcium, magnesium, potassium, copper,
15 iron, manganese and zinc contents were determined by atomic absorption
16 spectrophotometry (AAS). All analyzes were performed in triplicate. The amounts of
17 macronutrients (Ca, P, Mg and K) were calculated in g.kg⁻¹ and micronutrients (Fe, Cu,
18 Mn, and Zn) in mg.kg⁻¹.

19 The amounts of amino acids were performed by high performance liquid chromatography
20 (HPLC). The samples were submitted to hydrolysis with 6N hydrochloric acid (HCl)
21 followed by derivatization of amino acids with phenylisothiocyanate (PITC) and separation
22 of the phenylthiocarbamyl derivative amino acids in reversed phase column with UV
23 (Ultraviolet) detection at 254 nm. The quantification was performed by multilevel internal
24 calibration with α -aminobutyric acid (AABA) as internal standard for total amino acids.
25 The determination of tryptophan was performed after hydrolysis with pronase enzyme and
26 color reaction with p-dimethylamino benzaldehyde (DAB) according to Spies (32).

27

28 *Extraction of Mushroom*

29 The enzymatic extract of *L. citrinus* (dehydrated) was obtained through water extraction
30 (distilled water, 1:10 ratio) and buffer extraction (0.2M Tris-HCl, pH 7.2, 1:10 ratio). The
31 samples were submitted to constant agitation of 150 rpm on orbital shaker (Certomat MO)
32 at 25°C for 24 hours followed by vacuum filtration on Whatman filter paper no 1.

33

1 *Protease assay*

2 Proteolytic activity

3 Proteolytic activity was determined according to methodology described by Leighton (33).

4 A mixture containing 0.15 mL of crude extract and 0.25 mL of substrate [1% (w/v)
5 azocasein in 0.2M Tris-HCl buffer, pH 7.2) was incubated for 60 minutes. The reaction
6 was interrupted by addition of 10% (w/v) trichloroacetic acid and centrifuged (8000 rpm)
7 for 15 minutes at 4°C. One unit of proteolytic activity was defined as the amount of
8 enzyme that produces a 0.01 increase of absorbance in one hour at 440 nm.

9

10 Effect of pH and temperature on activity and stability

11 To assay optimum pH, proteolytic activity was determined at 25°C with different pH
12 ranges using the following 0.2 M buffer solutions: citrate-phosphate (5.0 and 6.0), Tris-
13 HCl (7.0 and 8.0) and glycine-NaOH (9.0 and 10.0). Optimum temperature was
14 determined by incubating the enzyme extract at different temperatures ranging from 25°C
15 to 70°C and assaying the activity at the pH determined as optimum.

16 For the pH stability, the crude extract was dispersed (1:1) in the following 0.2M buffer
17 solutions: citrate-phosphate (5.0 and 6.0), Tris-HCl (7.0 and 8.0) and glycine-NaOH (9.0
18 and 10.0) and maintained at optimum temperature for 0, 30, 60, 90 and 120 minutes. In
19 thermal stability, the extracts were incubated at different temperatures ranging from 25°C
20 to 70°C for 0, 30, 60, 90 and 120 minutes. All samples were prepared in triplicate.

21

22 *Statistical analysis*

23 The results were statistically analyzed at a significance level of 95% by Tukey's test
24 carried out with MiniTab program, version 16.0.

25

26 *Results and Discussion*

27 *L. citrinus* micelium colonized completely the substrates, cupuaçu exocarp mixed with
28 litter (CE+Li) and cupuaçu exocarp mixed with rice bran (CE+RB), and no significant
29 difference in the number of mushrooms and in the weight of *in natura* biomass in both
30 substrates were observed (Table 1). These data are in agreement with those reported by
31 Milles and Chang (16).

32 *Lentinus* and *Pleurotus* are fungi that grow on substrates with low content of nitrogen in
33 the range from 0.03 to 1%. The agrowastes cupuaçu exocarp, rice bran and litter used for

1 cultivation of *L. citrinus* in this study are substrates that contain 0.29%, 1.2% and 0.21% of
2 nitrogen, respectively.

3 After inoculation, the development of primordia occurred in 15 and 23 days in CE+Li and
4 CE+RB, respectively. The formation of *Lentinus citrinus* fruiting bodies occurred in 19
5 days (CE+Li) and in 27 days (CE+RB). The first harvest of mushrooms in all substrates
6 was taken around 4 days. In CE+Li, regardless of production flows, the amount of fresh
7 weight was 145g.

8 The biological efficiency and productivity in CE+Li were 93.5% and 24.17%, respectively.

9 These values did not differ significantly when compared to the same variables determined
10 in cultivations using CE+RB. The exception observed was between the values of
11 production rate that was significant in CE+Li (Table 1). Literature data show that the
12 efficiency of mushrooms production is directly related to the genetic characteristics of each
13 species, as well as the structure, nutritional quality of the substrate and conditions of
14 cultivation. Furthermore, the supplementation of the substrate with cereal brans or the use
15 of new combinations may promote increased productivity and biological efficacy of the
16 fungus (35, 36).

17 The following morphological characteristics of *L. citrinus* fruiting bodies after harvest
18 were observed: the diameter was averaging 3.7 x 3.8 cm (CE+RB) and 2.4 x 2.5 cm
19 (CE+Li) and the stipe measured 3.50 cm (CE+RB) and 2.8 cm (CE+Li) showing
20 significant differences between them. The dimensions of mushrooms influence on their
21 weight and yield and these parameters are also positively correlated with productivity,
22 content of carbohydrates and proteins (23,37).

23

24 Table 1

25

26 Moisture content of the mushrooms grown in CE+Li and CE+RB was 10.94% and
27 11.88%, respectively. Protein content was 27% in CE+Li cultivation and 25.92% in
28 CE+RB (Table 2). These results are close to the ones found in *Pleurotus ostreatus* that
29 showed 28-31% of protein in dry basis (23).

30 Fat content in CE+RB was 3.33% and 4.50% in CE+Li (Table 2). This value is close to the
31 result obtained by Alam et al. (38) using *Pleurotus florida* (4.30 to 4.50%). Other similar
32 results were reported for species of edible mushrooms sources of low lipids content that are
33 usually constituted of more unsaturated fatty acids than saturated ones. Unsaturated fatty

1 acids are beneficial because of their prophylactic action in cholesterol and triglycerides
2 reduction (16,17,39,40).

3 *L. citrinus* ash levels were 4.90% and 4.95% in CE+RB and CE+Li, respectively. In
4 CE+RB, carbohydrate content was 53.59% and fiber 6.30% and in CE+Li, carbohydrate
5 content was 41.41% and fiber 11.30% (Table 2). These fibers values are close to those
6 described for *Pleurotus florida* (11.5%) and are higher than *Lentinus tuberregium* (3.6%)
7 fiber content. Fibers are essential nutrients that comprise a healthy diet and have a
8 preventive action in reducing cholesterol (16, 17). Energy content represented 324.33
9 kcal/100g in CE+RB and 314.14 kcal/100g in CE+Li, dry basis (Table 2).

10 Singh and Singh (40) reported that species of mushrooms that have low calories and high
11 protein content can be compared to food sources of essential nutrients to organism, as raw
12 rice (7.2 g/100g), wheat (9.8 g/100g), egg (13.0g/100g) some vegetables and milk
13 (25.0g/100g) (42). The concentration around 27% of protein and 59% of carbohydrate
14 shows that these nutrients are the main constituents of *L. citrinus* mushroom.

15

16 Table 2

17

18 Mineral content in CE+RB had good values of potassium, phosphorus, iron, sodium, zinc
19 and copper (Table 3). In CE+Li cultivation, calcium and sodium were predominant. The
20 amount of sodium was 446mg/kg¹ in dry basis or 4.46 mg/10g in wet basis. These values
21 are lower than the ones determined by Brazilian administrative rule no. 24/1998, which
22 deals with the classification of foods in relation to sodium quantitative: "foods classified as
23 no sodium content present levels equal to or less than 5mg Na/10g of solids" (43). Data
24 presented by Gucia et al. (44) showed that in *Boletus edulis*, potassium content was on
25 average 25 to 29g/kg⁻¹ in the pileus and 20-40% in the stipe when compared with the
26 previous value.

27 Mushrooms can be considered sources of K, P, Cu and Zn, which are, among the mineral
28 nutrients, essential to the human body acting as regulators and/or co-factors for many
29 enzymes (45). Singh and Singh (40) reported the existence of a large variation of mineral
30 content in mushrooms of the same species due to genetic variation, substrates and
31 cultivation technologies that affect its composition. In combination, the variation in the
32 content of minerals probably reflects the mineral composition of the substrate used in
33 different cultivations (46).

1 Table 3

2

3 Amino acids content of *Lentinus citrinus* grown in CE+Li and CE+RB showed a total of
4 27.0 and 20.1 g/100g, respectively (Table 4). The most abundant components between the
5 essential and nonessential amino acids were leucine (2.07 mg/100 g) and glutamic acid
6 (4.41 mg/100 g) in CE+Li with a difference of 55% and 9.2%, respectively, of these
7 components when compared to CE+RB. The values presented in this study are higher than
8 those found by Lee et al. (47) with *Agrocybe chaxingu*. Singh et al. (47) reported that
9 mushrooms with high protein content also show high levels of essential amino acids.
10 Tryptophan (0.37 mg/100g) and serine (1.52 mg/100g) concentrations were lower in
11 CE+Li than in CE+RB (1.83 and 0.41 mg/100g, respectively). The total amount of
12 essential amino acids was 36% higher in CE+Li (Table 4). These results are considered
13 significant when compared to those made by Lee et al. (47) with *Agrocybe chaxingu* (2.70
14 g/100 g), *Pleurotus ostreatus* (2.38 g/100g) and *Flammulina velutipes* (1.66 g/100g).
15 According to Singh and Singh (41), mushrooms produce extracellular enzymes that affect
16 the increase of its nutritional value. In the present work, the mushrooms cultivated in
17 CE+Li had high qualitative protein content due to the presence of essential amino acids in
18 its composition (leucine, isoleucine, valine, threonine, methionine, tryptophan and
19 phenylalanine) and by its protein content (48).

20

21 Table 4

22

23 Protease activity was determined using the mushrooms crude extracts obtained from
24 extraction in sterile distilled water and in buffer 0.2M Tris-HCl, pH 7.2. Among these
25 extracts, the enzyme activity was significantly higher in the aqueous extract of the
26 mushroom produced in CE+Li (463.55 U/mL). On the same substrate, when was used
27 buffer in the extraction, the proteolytic activity was 6.04% lower.
28 The extracts from the mushrooms produced in CE+RB showed proteolytic activities of
29 246.88 U/mL (distilled water) and 365.55 U/mL (buffer). Comparing the substrates used
30 for growing of *L. citrinus*, cupuaçu exocarp mixed with litter (CE+Li) was the substrate
31 which promoted the development of mushrooms with a greater quantity of proteases. There
32 are several parameters that affect the production of enzymes; however, a major factor is the
33 source of nitrogen (49). In this study, the type of substrate promoted an influence in

1 protease quantity. It probably happened because of the relation with the protein content of
2 the substrates used in the bioprocess, since the mean value of the proteolytic activity was
3 determined in the substrate composed by cupuaçu exocarp mixed with litter (CE+Li).
4 The crude extract selected to partial characterization of proteases was that one obtained
5 from *L. citrinus* cultivated in CE+Li (Figures 1 and 2). The optimal pH (Figure 1A) was
6 determined in pH 7.0 and 9.0 (470.3 U/mL and 453.0 U/mL, respectively). In the study
7 by Cui et al. (50), *in natura* mushrooms proteases of *Pleurotus citrinopileatus* showed an
8 optimal pH of activity at pH 10.0. Proteases with optimal activity at neutral and alkaline
9 conditions have potential use as detergent additives in leather processing, silver recovery,
10 medical purposes, food processing, animal feed production and in chemical industries as
11 well as for the treatment of agro-industrial wastes (51-53).
12 The optimal temperature (Figure 1B) for protease activity was determined at 50°C (660.0
13 U/mL). Similar data have been shown in extracts from *in natura* mushrooms of *P.*
14 *citrinopileatus* (50°C), *Hypsizygus marmoreus* (50°C) and *Termitomyces albuminosus* (60
15 °C) (50, 54, 55).

16

17 Fig. 1

18

19 *L. citrinus* proteases showed better stability at pH 7.0 and 9.0 retaining more than 100% of
20 its initial activity for 90 minutes (Figure 2A). At pH 10.0, however, the relative activity
21 decreased to almost 70% in 30 minutes and decreased after 90 minutes. Nishiwaki et al.
22 (56) obtained a stability of 70% in *Grifola frondosa* proteases at pH range from 4.5 to 8.5
23 after incubation at 30°C for 30 minutes.

24 Thermal stability (Figure 2B) showed that the enzymes were active at all temperatures with
25 higher activity at 30°C during 60 minutes (112.7% of residual activity). At 25°C and 40°C
26 the activity was maintained in 98.5% and 97.8% for 60 minutes, respectively. At 50°C and
27 60°C was observed 54.1% and 14.5% of enzyme activity, respectively. Different results of
28 protease characterization were obtained by Kirsch et al. (57) using the crude extract of *L.*
29 *citrinus* produced in liquid medium. In the same culture conditions these proteases
30 expressed optimal activity at pH 7.0 and 40°C. These enzymes were stable at pH 5.0, 6.0
31 and 7.0 with retention of 85% of activity after 90 minutes. Thermal stability was observed
32 at 25°C and 40°C with retention of activity higher than 85%.

33

1 Fig.2

2

3 **Conclusion**

4 The results of this research indicate that cupuaçu exocarp with litter or cupuaçu exocarp
5 with rice bran can be used as alternatives substrates for *L. citrinus* cultivation and
6 production of proteases. *Lentinus citrinus* edible mushrooms cultivated in substrates
7 containing vegetable wastes have nutritional property for inclusion in the human diet as an
8 innovative product source of protein, essential amino acids and fiber. They can be
9 consumed *in natura*, dried or as supplement of food products. The proteases extracted from
10 these mushrooms expressed optimal activity in neutral and alkaline pH and at 50 °C
11 showing maximum stability in alkaline pH and at 30 °C. Therefore, this study also reveals
12 potential use of *L. citrinus* proteases for industrial application.

13

14

15 **Acknowledgments**

16 The authors wish a special thank to the financial support from CAPES (Coordenação de
17 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

18

19 **References**

- 20 1. T.H. Bang, H. Suhara, H. Doi, H. Ishikawa, K. Fukami, G.P. Parajuli *et al.*, Wild
21 Mushrooms in Nepal: Some Potential Candidates as Antioxidant and ACE-Inhibition
22 Sources, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 11 (2014).
- 23 2. P.C.K. Cheung, Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber:
24 Preparation and health benefits, *Food Science and Human Wellness*, 2 (2013) 162-166.
- 25 3. J.V.C. Orsine, L.M. Brito, M.R.C.G.N. Novas, Edible mushrooms: use, conservation,
26 nutritional and pharmacological characteristics. *Rev. HCPA*, 4 (2012) 452-460.
- 27 4. B.B. Cota, L.H. Rosa, E.M.S. Fagundes, O.A. Martins-Filho, R. Correa-Oliveira, A.J
28 Romanha *et al.*, A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus*
29 inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. *Mem. Inst. Oswaldo*
30 *Cruz*, 3 (2008) 263-270.
- 31 5. N.S. Atri, S.K. Sharma, R. Joshi, A. Gulati, Nutritional and Nutraceutical Composition
32 of Five Wild Culinary-Medicinal Species of Genus *Pleurotus* (Higher Basidiomycetes)
33 from Northwest India, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1 (2013) 49-56.

- 1 6. S.C. Karunarathna, Z.L. Yang, R.L. Zhao, E.C. Vellinga, A.H. Bahkali, E. Chukeatirote
2 *et al.*, Three new species of *Lentinus* from northern Thailand, *Mycological progress*, 4
3 (2011) 389-398.
- 4 7. M.E. Balbi, F. Fabeni, L.M. Lazinski, A.C.S. Melo, H.F. Souza. Aminoacid profile and
5 nutritional analysis of Shitake mushrooms (*Lentinus edodes*, Agaricaceae), *Visão*
6 *Acadêmica*, 4 (2013) 49-61 (in portuguese).
- 7 8. O. Fidalgo, G.T. Prance, The ethnomycology of the Sanama Indians, *Mycology*, 68
8 (1976) 201–210.
- 9 9. O. Fidalgo, J.M. Hirata, Etnomicologia Caiabi, Txicão e Txucarramãe, *Rickia*, (1979)
10 1–5.
- 11 10. M. Kadiria, A.H. Arzaib, Cultivation of *Lentinus subnudus* Berk (Polyporales:
12 Polyporaceae) on woodlogs, *Bioresource Technology*, 1 (2004) 65-67.
- 13 11. E.L. Zent, S. Zent, T. Iturriaga, Knowledge and use of fungi by a mycophilic society
14 of the Venezuelan Amazon, *Economic Botany*, 2 (2004) 214-226.
- 15 12. L. de S. Kirsch, A.C. Pinto, T.S. Porto, A.L. Porto, M.F.S. Teixeira, The influence of
16 different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by
17 *Lentinus citrinus* Walleyet Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetideae), *Int. J. Med.*
18 *Mushrooms*, 2 (2011) 185-92.
- 19 13. J. Sabotič, T. Trček, T. Popovič, J. Brzin, Basidiomycetes harbour a hidden treasure of
20 proteolytic diversity, *Journal of Biotechnology*, 2 (2007) 297-307.
- 21 14. L. Tahir, M.I. Ali, M. Zia, N. Atiq, F. Hasan, S. Ahmed, Production and
22 Characterization of Esterase in *Lentinus tigrinus* for Degradation of Polystyrene, *Polish*
23 *Journal of Microbiology*, 1 (2013) 101-108.
- 24 15. E.M. Souza-Fagundes, B.B. Cota, L.H. Rosa, A.J. Romanha, R. Corrêa-Oliveira, C.A.
25 Rosa *et al.*, In vitro activity of hypnophilin from *Lentinus strigosus*: a potential prototype
26 for Chagas disease and leishmaniasis chemotherapy, *Braz. J. Med. Biol. Res*, 11 (2010)
27 1054-1061.
- 28 16. S.T. Chang, P.G. Miles: *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect,*
29 *and environmental impact*, CRC Press, (2004).
- 30 17. J. Manjunathan, V. Kaviyaran, Nutrient composition in wild and cultivated edible
31 mushroom, *Lentinus tuberregium* (Fr.) Tamil Nadu., India, *Internacional Food Research*
32 *Journal*, 18 (2011) 784-786.

- 1 18. P. Singhal, V.K. Nigam, A.S. Vidyarthi, Studies on production, characterization and
2 Applications of microbial alkaline proteases, *International Journal of Advanced*
3 *Biotechnology and Research*, 3 (2012) 653-669.
- 4 19. T.R.B. Fonseca, J.F. Barroncas, M.F.S. Teixeira, Production in solid matrix and partial
5 characterization of proteases of edible mushroom in the Amazon rainforest, *Rev. Bra. de*
6 *Tec Agroindustrial*, 1 (2014) 1227- 1236 (in Portuguese).
- 7 20. W.C.A. Nascimento, M.L.L Martins, Studies on the stability of protease from *Bacillus*
8 sp. and its compatibility with commercial detergent, *Braz. J. Microbiol*, 3 (2006) 307-311.
- 9 21. A. Sumantha, C. Larroche, A. Pandey, Microbiology and Industrial Biotechnology of
10 Food-Grade Proteases: A Perspective, *Food Technol. Biotechnol*, 2 (2006) 211–220.
- 11 22. M.P. Albuquerque, R.M.N. Peil, J.S.N. Albuquerque, Mycelial growth of
12 *Lentinussajorcaju* (Fr.) Fr. and *Pleurotus* spp. in different agricultural wastes, *Bioscience*
13 *Journal*, 6 (2012) 895-902.
- 14 23. M. Ahmed, N. Abdullah, K.U. Ahmed, M.H.M.B. Bhuyan, Yield and nutritional
15 composition of oyster mushroom strains newly introduced in Bangladesh, *Pesq. Agropec.*
16 *Bras*, 2 (2013) 197-202.
- 17 24. M. Dahmardeh, Use of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) grown on different
18 substrates (Wheat an barley straw) and supplemente at various levels of spawn to change
19 the nutritional quality forage, *Intenational Journal of Agriculture and Forestry* 4 (2013)
20 138-140.
- 21 25. J.E. Smith, N.J. Rowan¹, S. Richard, Medicinal mushrooms: a rapidly developing area
22 of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities, *Biotechnology Letters*, 24
23 (2002) 1839–1845.
- 24 26. A. Omarini, V. Nepote, N.R. Grosso, J.A. Zygadlo, E.A. Omarini, Sensory analysis
25 and fruiting bodies characterisation of the edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and
26 *Polyporus tenuiculus* obtained on leaf waste from the essential oil production industry.
27 *International Journal of Food Science & Technology*, 3 (2010) 466–474.
- 28 27. T.A.C. Castillo, Basidiomycetes: physiological characterization, production and
29 biocompounds biomass in Amazonian agroforestry substrate, *PhD Thesis*, Federal
30 University of Amazonas, Brazil (2006) (in Portuguese).
- 31 28. G.M. Rollan: *Cultivo de setas y Trufas*, Mundi-Prensa, Madrid (2003).
- 32 29. Assotiation of official analytical chemists, AOAC Official Method 2005.18, AOAC
33 International, Washington, USA (2005).

- 1 30. NEPA, Table of Food Composition. Center for Studies and Research in Food,
2 *Unicamp, 105* (2006).
- 3 31. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*, Empresa Brasileira de
4 Pesquisa Agropecuária: EMBRAPA, Informação Tecnológica, Brasília, Brazil (2009).
- 5 32. J.R. Spies, Determination of tryptophan in proteins, *Analytical Chemistry, 12* (1967)
6 1412-1415.
- 7 33. T.J. Leighton, R.H. Doi, R.A.J. Warren, R.A. Kelln, The relationship of serine
8 protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*,
9 *Journal of Molecular Biology, 1* (1973) 103-122.
- 10 34. MINITAB (Minitab Statistical Software), LEAD Technologies, Inc. Version 16.0,
11 (2010).
- 12 35. A.L.A.D. Castro, P.C.D.A. Paiva, V.L. Banys, E.S. Dias, J.D. Santos, Evaluation of
13 the production of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer using waste from the textile processing
14 of cotton as a substrate, *Ciênc. Agrotec. Lavras, 5* (2007) 1286-1290 (in Portuguese).
- 15 36. L.P. Donini, E. Bernardi, E. Minotto, J.S. Nascimento. Growing *Shimejii* on elephant
16 grass substrate supplemented with different types of sharps, *Scientia Agraria, 1* (2009)
17 067-074 (in Portuguese).
- 18 37. A.A. Samuel, T.L. Eugene, Growth performance and yield of oyster mushroom
19 (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates composition in Buea South West Cameroon,
20 *Science Journal of Biochemistry, 2012* (2012) 1-6.
- 21 38. N. Alam, A. Khan, M.S. Hossain, S.M.R. Amin, L.A. Khan, Nutritional analysis of
22 dietary mushroom *Pleurotus florida* Eger and *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer,
23 *Bangladesh Journal of Mushroom, 1* (2007) 1-7.
- 24 39. S. Saiqa, N.B. Haq, A.H. Muhammad, A.A. Muhammad, R. Ata-Ur, Studies on
25 chemical composition and nutritive evaluation of wild edible mushrooms, *Iran J. Chem.*
26 *Chem. Eng. 3* (2008).
- 27 40. C. Sales-Campos, L.M. Araujo, M.T. Minhoni, M.C. Andrade, Centesimal
28 composition and physical-chemistry analysis of the edible mushroom *Lentinus strigosus*
29 occurring in the Brazilian Amazon, *An. Acad. Bras. Ciênc. 4* (2013) 1537-1544.
- 30 41. M.P. Singh, V.K. Singh, Biodegradation of vegetable and agrowastes by *Pleurotus*
31 *sapidus*: a novel strategy to produce mushroom with enhanced yield and nutrition, *Cell.*
32 *Mol. Biol. 1* (2012) 1-7.
- 33 42. TACO, Brazilian food composition table, *Nepa Unicamp, 14* (2011) (in portuguese).

- 1 43. ANVISA, Ministry of Health, Technical Regulation on supplementary nutrition
2 information, *Diário Oficial da União*, (1998) 115-122 (in portuguese).
- 3 44. M. Gučia, A.K. Kojta, G. Jarzyńska, E. Rafal, M. Roszak, I. Osiej *et al.*, Multivariate
4 analysis of mineral constituents of edible Parasol Mushroom (*Macrolepiota procera*) and
5 soils beneath fruiting bodies collected from Northern Poland, *Environ SciPollut Res*, 19
6 (2012) 416–431.
- 7 45. J. Falandysz, J. Borovička, Macro and trace mineral constituents and radionuclides in
8 mushrooms: health benefits and risks, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 97 (2013) 477–501.
- 9 46. S.R. Koyyalamudi, S.C. Jeong, S. Manavalan, V.B Balaram, G. Pang, Micronutrient
10 mineral content of the fruiting bodies of Australian cultivated *Agaricus bisporus* white
11 button mushrooms, *Journal of Food Composition and Analysis*, 31 (2013) 109–114.
- 12 47. K.J. Lee, I.J. Yun, K.H. Kim, S.H. Lim, H.J. Ham, W.S. Eum, *et al.*, Amino acid and
13 fatty acid compositions of *Agrocybe chaxingu*, an edible mushroom, *Journal of Food
14 Composition and Analysis* 2 (2011) 175–178.
- 15 48. M.P. Singh, V.K. Pandey, A.K. Pandey, A.K. Srivastava, N.K. Vishwakarm, V.K.
16 Singh. Production of xylanase by white rot fungi on wheat straw, *Asian Jr. of Microbiol.
17 Biotech. Env. Sc.* 4 (2008) 859-862.
- 18 49. G. Ravikumar, D. Gomathi, M. Kalaiselvi, C, Uma. Production, Purification and
19 partial characterization of laccase from the mushroom *Hypsizygus ulmarius*, *International
20 Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3 (2012) 355-365.
- 21 50. L. Cui, Q.H. Liu, H.X Wang, T.B. Ng, An alkaline protease from fresh fruiting bodies
22 of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*, *Applied microbiology and
23 biotechnology*, 1 (2007) 81-85.
- 24 51. M.A. Al-Shehri, M. Abdul-Rahman, S. Yasser, Production and some properties of
25 protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from TihametAseer, Saudi Arabia,
26 *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9 (2004) 1631-1635.
- 27 52. A. Gupta, Y. Zhang, J.D. Unadkat, Q.M. Gupta, HIV Protease inhibitors are inhibitors
28 but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), *Journal
29 of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1 (2004) 334-341.
- 30 53. A. Haddar, R. Agrebi, A. Bougatef, N. Hmidet, A. Sellami-Kamoun, M. Nasri, Two
31 detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis*A21: Purification,
32 characterization and potential application as a laundry detergent additive, *Bioresource
33 Technology*, 13 (2009) 3366-3373.

- 1 54. R.J. Zhang, Q.Z. Zhu, L.W. Gao, M. Wang, X.H. Xu, Y. Fang, The Study on Culture
2 Conditions of *Hypsizygus marmoreus* Producing Xylanase and Some Properties of
3 Xylanase, *Northern Horticulture*, 16 (2010) 076.
- 4 55. S. Zheng, H. Wang, G. Zhang, A novel alkaline protease from wild edible mushroom
5 *Termitomyces albuminosus*, *Acta Biochemica Polonica*, 2 (2011) 269-273.
- 6 56. T. Nishiwaki, S. Asano, T. Ohyama, Properties and substrate specificities of
7 proteolytic enzymes from theedible basidiomycete *Grifola frondosa*, *Journal of Bioscience*
8 *and Bioengineering*, 6 (2009) 605-609.
- 9 57. L. de S. Kirsch, V.C.S. Ebinuma, M.F.S. Teixeira, Mycelial Biomass and Biochemical
10 Properties of Proteases Produced by *Lentinus citrinus* DPUA 1535 (Higher
11 Basidiomycetes) in Submerged Cultivation, *International Journal of Medicinal*
12 *Mushrooms*, 5 (2013) 505–515.
- 13
- 14

1

Table 1. Characteristics and total yield of *Lentinus citrinus*.

Variables	Substrates	
	CE+RB	CE+Li
Number of mushrooms	95± 2,5 ^a	120± 2,8 ^a
Weight (g)	98± 38 ^a	116 ± 54 ^a
Total yield		
Biological efficiency (%)	84,2±2,2 ^a	93,5±3,1 ^a
Productivity (%)	20,52±1,9 ^a	24,17±2,1 ^a
Production rate (%)	20,32±8 ^b	34,15±14 ^a
Mushrooms dimentions		
Pileus thickness (cm)	3,7±0,8 ^a	2,4±0,8 ^b
Pileus width (cm)	3,8±0,4 ^a	2,5±0,6 ^b
Stipe length (cm)	3,50±0,3 ^a	2,8 ±0,4 ^b

2

Means followed by the same letters did not differ from one another by the Tukey test ($p < 0.05$).

3

4

5

Table 2. Centesimal composition of *L. citrinus* (g/100g of substrate in dry basis).

Variables	Substrates	
	CE+RB	CE+Li
Humidity	11,88±0,4 ^a	10,94±0,1 ^b
Ash	4,90±0,7 ^a	4,95±0,4 ^a
Fat	3,33±0,3 ^b	4,50±0,1 ^a
Nitrogen	4,67±0,1 ^b	6,30±0,2 ^a
Protein (Nx 4,38)	20,00±0,2 ^b	27,00±0,3 ^a
Total Fiber	6,30±0,4 ^b	11,20±0,2 ^a
Total Carbohidrates	53,59±0,1 ^a	41,41±0,1 ^b
Energy (Kcal)	324,33±0,1 ^a	314,14±0,1 ^b

6

Means followed by the same letters did not differ from one another by the Tukey test ($p < 0.05$).

7

8

9

10

11

12

13

14

1

Table 3. Biomass minerals of *L. citrinus* cultivated in different substrates.

Nutrients	Substrates	
	CE+RB	CE+Li
P (g kg ⁻¹)	10,94±0,01 ^a	0,01±0,01 ^b
K (g kg ⁻¹)	22,25±0,02 ^a	0,96±0,03 ^b
Ca (g kg ⁻¹)	0,09±0,01 ^b	40,00±0,02 ^a
Mg (g kg ⁻¹)	1,26±0,04 ^a	0,58±0,01 ^b
Fe (mg kg ⁻¹)	53,34±0,02 ^a	0,57±0,03 ^b
Na (mg kg ⁻¹)	174,42±0,02 ^b	446,0±0,52 ^a
Cu (mg kg ⁻¹)	34,84±0,01 ^a	0,27±0,02 ^b
Mn (mg kg ⁻¹)	9,05±0,02 ^a	ND
Zn (mg kg ⁻¹)	66,21±0,02 ^a	0,10±0,01 ^b

2

Means followed by the same letters did not differ from one

3

another by the Tukey test (p < 0.05). ND: No determined

4

5 **Table 4.** Amino acids presented in the biomass of *Lentinus citrinus* cultivated in different substrates (mg/ 100
6 g protein).

<i>Lentinus citrinus</i>		
Amino acids	CE+RB	CE+Li
Aspartic acid	2,49	2,57
Glutamic acid	4,00	4,41
Serine	1,83	1,52
Glycine	1,24	1,45
Histidine	0,49	0,70
Arginine	1,47	2,28
Threonine	0,96	1,30
Alanine	1,11	1,78
Proline	0,49	1,24
Tyrosine	0,46	1,10
Valine	1,25	1,55
Methionine	0,18	0,48
Cysteine	0,04	0,15
Isoleucine	0,65	1,27
Leucine	0,93	2,07
Phenylalanine	0,77	1,28
Lysine	1,33	1,85
Tryptophan	0,41	0,37
Total	20,10	27,00

7

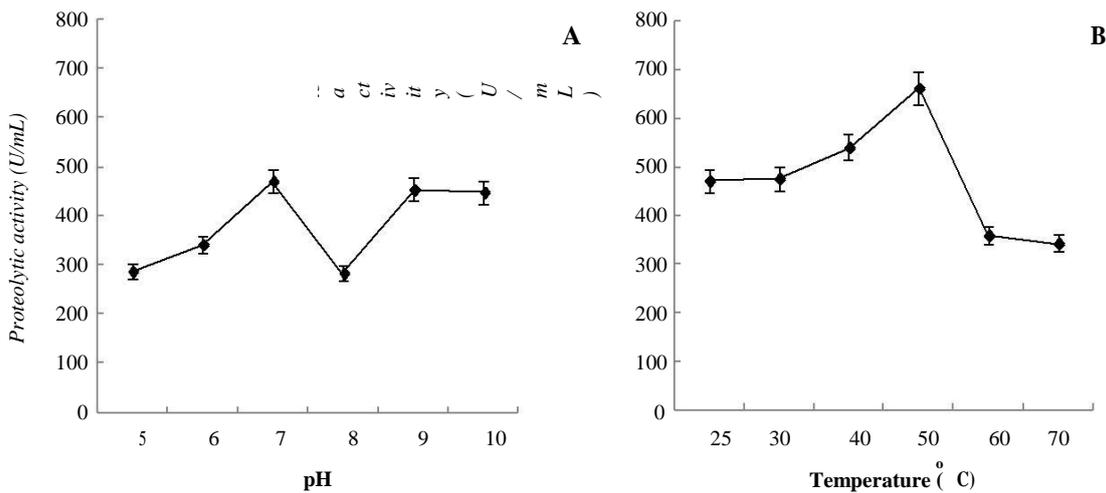


Figure 1-Effect of pH (A) and temperature (B) on proteolytic activity of *Lentinus citrinus* proteases.

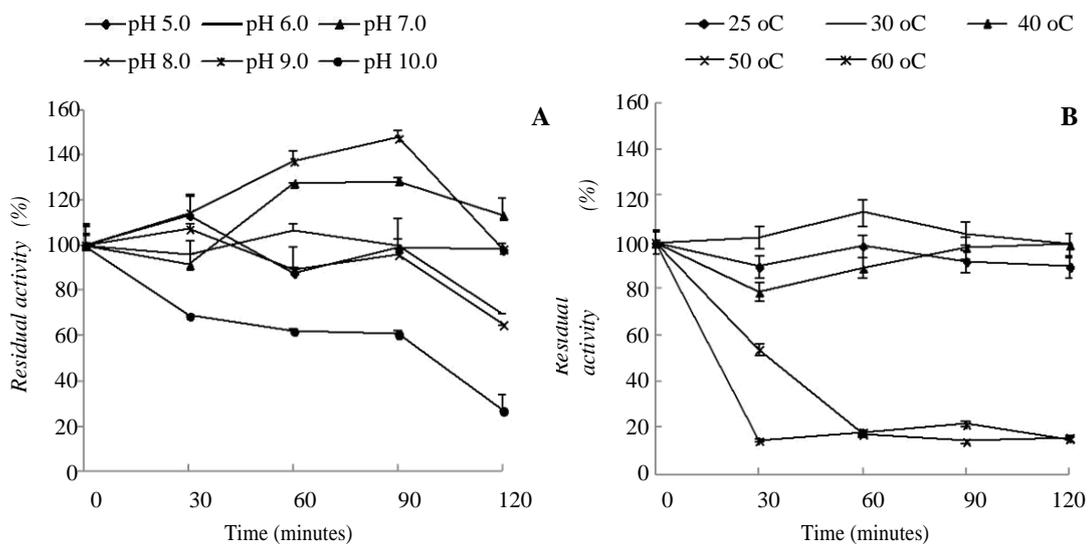


Figure 2-Effect of pH (A) and temperature (B) on stability of *Lentinus citrinus* proteases.

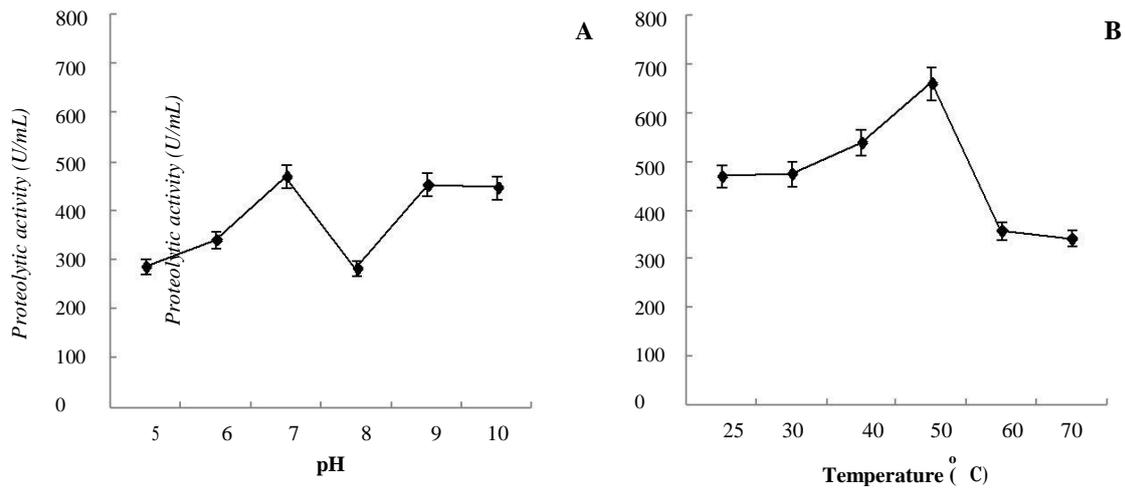


Figure 1-Effect of pH (A) and temperature (B) on proteolytic activity of *Lentinus citrinus* proteases.

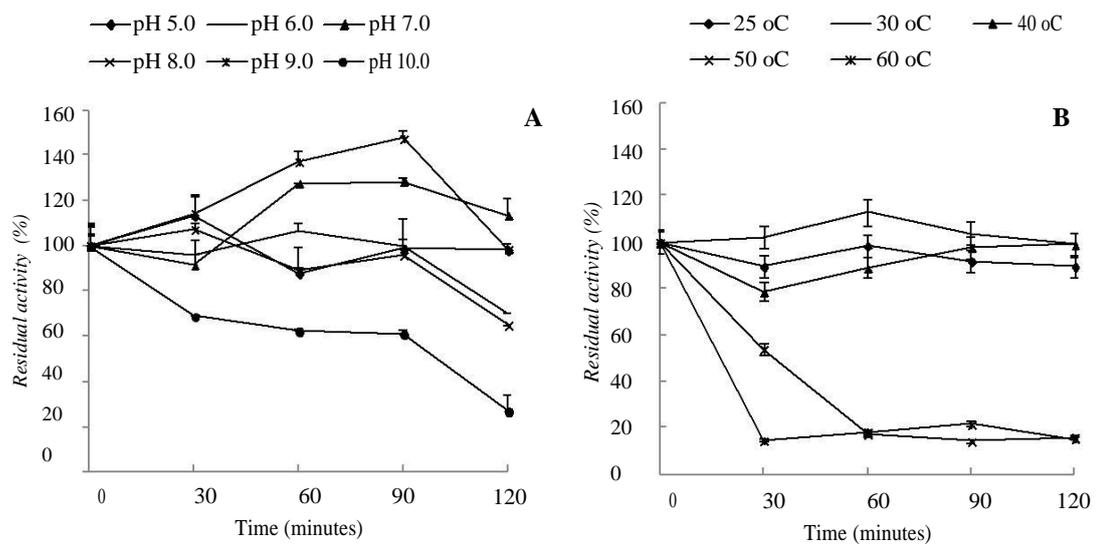


Figure 2-Effect of pH (A) and temperature (B) on stability of *Lentinus citrinus* proteases.

Table 1. Characteristics and total yield of *Lentinus citrinus*.

Variables	Substrates	
	CE+RB	CE+Li
Number of mushrooms	95± 2,5 ^a	120± 2,8 ^a
Weight (g)	98± 38 ^a	116 ± 54 ^a
Total yield		
Biological efficiency (%)	84,2±2,2 ^a	93,5±3,1 ^a
Productivity (%)	20,52±1,9 ^a	24,17±2,1 ^a
Production rate (%)	20,32±8 ^b	34,15±14 ^a
Mushrooms dimentions		
Pileus thickness (cm)	3,7±0,8 ^a	2,4±0,8 ^b
Pileus width (cm)	3,8±0,4 ^a	2,5±0,6 ^b
Stipe length (cm)	3,50±0,3 ^a	2,8 ±0,4 ^b

Means followed by the same letters did not differ from one another by the Tukey test ($p < 0.05$).

Table 2. Centesimal composition of *L. citrinus* (g/100g of substrate in dry basis).

Variables	Substrates	
	CE+RB	CE+Li
Humidity	11,88±0,4 ^a	10,94±0,1 ^b
Ash	4,90±0,7 ^a	4,95±0,4 ^a
Fat	3,33±0,3 ^b	4,50±0,1 ^a
Nitrogen	4,67±0,1 ^b	6,30±0,2 ^a
Protein (Nx 4,38)	20,00±0,2 ^b	27,00±0,3 ^a
Total Fiber	6,30±0,4 ^b	11,20±0,2 ^a
Total Carbohidrates	53,59±0,1 ^a	41,41±0,1 ^b
Energy (Kcal)	324,33±0,1 ^a	314,14±0,1 ^b

Means followed by the same letters did not differ from one another by the Tukey test ($p < 0.05$).

Table 3. Biomass minerals of *L. citrinus* cultivated in different substrates.

Nutrients	Substrates	
	CE+RB	CE+Li
P (g kg ⁻¹)	10,94±0,01 ^a	0,01±0,01 ^b
K (g kg ⁻¹)	22,25±0,02 ^a	0,96±0,03 ^b
Ca (g kg ⁻¹)	0,09±0,01 ^b	40,00±0,02 ^a
Mg (g kg ⁻¹)	1,26±0,04 ^a	0,58±0,01 ^b
Fe (mg kg ⁻¹)	53,34±0,02 ^a	0,57±0,03 ^b
Na (mg kg ⁻¹)	174,42±0,02 ^b	446,0±0,52 ^a
Cu (mg kg ⁻¹)	34,84±0,01 ^a	0,27±0,02 ^b
Mn (mg kg ⁻¹)	9,05±0,02 ^a	ND
Zn (mg kg ⁻¹)	66,21±0,02 ^a	0,10±0,01 ^b

Means followed by the same letters did not differ from one another by the Tukey test ($p < 0.05$). ND: No determined

Table 4. Amino acids presented in the biomass of *Lentinus citrinus* cultivated in different substrates (mg/ 100 g protein).

<i>Lentinus citrinus</i>		
Amino acids	CE+RB	CE+Li
Aspartic acid	2,49	2,57
Glutamic acid	4,00	4,41
Serine	1,83	1,52
Glycine	1,24	1,45
Histidine	0,49	0,70
Arginine	1,47	2,28
Threonine	0,96	1,30
Alanine	1,11	1,78
Proline	0,49	1,24
Tyrosine	0,46	1,10
Valine	1,25	1,55
Methionine	0,18	0,48
Cysteine	0,04	0,15
Isoleucine	0,65	1,27
Leucine	0,93	2,07
Phenylalanine	0,77	1,28
Lysine	1,33	1,85
Tryptophan	0,41	0,37
Total	20,10	27,00

CAPÍTULO 2

**Elaboração de produto de confeitaria sem glúten formulado com
farinha de crueira e cogumelo comestível**

Elaboração de produto de confeitaria sem glúten formulado com farinha de crueira e cogumelo comestível

Ana Rita Gaia Machado¹, Maria Francisca Simas Teixeira², Lorisa Simas Teixeira³, Maria da Conceição Loureiro Campelo⁴, Ila Maria de Aguiar Oliveira¹

¹Universidade Federal do Amazonas-UFAM – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

²Universidade Federal do Amazonas-UFAM – Instituto de Ciências Biológicas

³Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE - Biotecnologia/RENORBIO

⁴Embrapa Amazônia Ocidental, Setor de Gestão de laboratórios – LASP

RESUMO

OBJETIVO: desenvolver um produto de confeitaria à base de crueira e enriquecido com basidiomas de *Lentinus citrinus* como forma de disponibilizar um produto fonte de fibras e com qualidade proteica desejável para alimentação humana.

MÉTODOS: Para o preparo dos três produtos de confeitaria foi utilizado crueira e, substituindo esse resíduo da mandioca por *L. citrinus* 15% e 25% (p/p) nas respectivas formulações. Os ingredientes foram pesados e homogeneizados até formar uma massa homogênea. A massa preparada foi transferida para formas de papel individualizadas e submetidas à cocção em forno pré-aquecido a 180 °C por 45-60 minutos. Após a cocção, os produtos foram resfriados a 25 °C para posterior avaliação da característica morfológica, composição centesimal, análise microbiológica, determinação de minerais e do custo das preparações.

RESULTADOS: Os três produtos de confeitaria apresentaram características viáveis para consumo, entre estes, o produto contendo crueira e *L. citrinus* 25% (p/p) apresentou característica morfológica adequada e qualidade nutricional significativa, com destaque para o conteúdo fibra, proteína de macro e microminerais.

CONCLUSÃO: O resíduo da mandioca, a crueira e *L. citrinus*, cogumelo comestível de ocorrência em clima tropical são ingredientes viáveis para utilização na fabricação de produtos de confeitaria, como opção para obtenção de produtos sem glúten e de baixo custo.

Termos de Indexação: Bolo, resíduo de mandioca, *L. citrinus*, fonte de fibra

ABSTRACT

OBJECTIVE: developing a cake based on crueira and *Lentinus citrinus* mushroom powder to make available a product rich fiber and protein.

METHODS: Three cakes were made using crueira, *L. citrinus* powder 15% and 25% (w/w) was incorporated in the formulations. The ingredients were weighed and mixed to form a mass. The prepared mass was transferred to an individual cake pan and submitted to cooking in 180 °C oven for 45-60 minutes. After cooking, the products were cooled to 25 °C for later assessment of morphology, chemical composition, microbiological analysis, and determination of minerals and the cost of preparations.

RESULTS: The different formulations were viables for consumption. The product with *L. citrinus* powder 25% (w/w) resulted in significant adequate morphology and nutritional quality, especially the fiber content, protein macro and trace minerals.

Index: cake, crueira, *L. citrinus*, fiber

INTRODUÇÃO

Para suprir as necessidades dos portadores de doença celíaca e daqueles que necessitem de dieta específica, a demanda por produtos que não contenham glúten estão despertando interesse da indústria de alimentos (GORGONIO et al, 2011; HAMADA et al, 2013)

Em função dessa proposição, o consumidor está buscando novos alimentos que promovam bem estar e longevidade, uma tendência que impulsiona o desenvolvimento de produtos não convencionais formulados com novos ingredientes para atender às exigências do mercado, a exemplo de farinhas ricas em fibra e outros nutrientes para elaboração de produtos confeitaria e massas alimentícias (GUIMARAES et al, 2010; LEMOS, 2009; KIRINUS et al., 2010; ZAVAREZE, 2010) .

Dentre os produtos regionais amazônicos ricos em fibras e amido, a crueira é um subproduto constituído por pedaços de raízes e entrecasca, separados por peneiras antes do processamento da farinha de mandioca. Como subproduto de descarte, a cureira geralmente vem sendo comercializada como ração animal, adubo orgânico e utilizada na formulação de mingaus e biscoitos para consumo por parte da população (NEVES et al, 2008).

Outro produto alimentício que está se tornando uma alternativa para promoção da melhoria da qualidade de vida do homem são os cogumelos comestíveis, macrofungos da ordem *Agaricales*, ricos em compostos bioativos e que tem características nutricionais semelhantes a diversos produtos vegetais e animais, ou seja, como fonte de proteínas (19 a 35 %), têm baixo valor calórico (30 cal/100 g de matéria seca), alto valor de aminoácidos essenciais (lisina, triptófano e leucina), vitaminas (B₁ e C), polissacarídeos, minerais, fibra (4 a 20%) e carboidratos (51 a 88 %) (SMITH; SULLIVAN, 2004; FURLANI; GODOY, 2005).

Produtos contendo subproduto da mandioca são capazes de serem produzidos em diversas regiões brasileiras, como uma alternativa viável que pode contribuir para a redução do custo do produto, assim como, em substituição a farinhas convencionais utilizadas em panificação (VIEIRA et al., 2010)

Dada a importância de produtos sem glúten, dos cogumelos comestíveis e a falta de tradição em consumir os subprodutos da mandioca, esta pesquisa teve como objetivo elaborar um produto de confeitaria à base de crueira, enriquecido com basidiomas de *Lentinus citrinus* como forma de disponibilizar produto regional rico em fibras e com qualidade proteica desejável para alimentação humana, em uma perspectiva e melhoria da condição de saúde da população.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria Prima

Crueira

Como matéria prima base foi utilizada crueira desidratada em estufa de ar circulante a 40°C adquirida em casa de farinha de mandioca do município de Manacapuru-Amazonas. A crueira triturada e peneirada apresentava a seguinte composição centesimal: umidade 11,54 %; proteínas 3,93%; lipídios 0,58%; cinzas 0,47%; fibra 0,70%; carboidratos totais. 82,78% e Valor energético 352,06 Kcal.

Cogumelo Comestível

A biomassa desidratada e triturada de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 foi produzido em resíduo agroflorestal amazônico em escala laboratorial na Universidade Federal do Amazonas-UFAM. A composição centesimal do cogumelo foi determinada: umidade 10,94%; proteína 27,0%, lipídios 4,50%; cinzas 4,95%; fibras 11,20%; carboidratos totais 41,41% e Valor energético 314,14 Kcal.

Preparação dos produtos de confeitaria

Para preparação do produto foram utilizadas três formulações, contendo 15% e 25% de cogumelo desidratado em substituição a crueira e o controle, sem *L.citrinus*. Na tabela 1 estão as formulações dos produtos mensurados individualmente sem glúten e lactose.

Tabela 1. Formulação dos bolos à base de crueira e cogumelo comestível

Ingredientes	Formulações ¹		
	B1	B15	B25
Ovos	2 unidades	2 unidades	2 unidades
Açúcar refinado	200 g	200g	200g
Óleo vegetal	120 ml	120 ml	120 ml
Claras	4 unidades	4 unidades	4 unidades
Fermento químico	½ colher	½ colher	½ colher
Baunilha	½ colher	½ colher	½ colher
Crueira triturada	120 g	102g	90g
Basidiomas desidratado	-	18g	30g

¹ Formulação equivalente ao bolo controle (B1); 15% (B15); 25% (B25) da quantidade de cogumelo

Técnica de preparo dos produtos

Para o preparo da massa, todos os ingredientes foram pesados, adicionados individualmente e misturados com auxílio de uma batedeira doméstica Walitta® até formar uma massa homogênea. Em seguida foi acrescentado à massa, a crueira triturada e peneirada e o cogumelo desidratado. A massa preparada foi transferida em formas de papel individualizadas e assada em forno pré-aquecido a 180 °C por 45-60 minutos. Após cocção, os produtos foram resfriados em temperatura ambiente e acondicionados em potes hermeticamente fechados.

Caracterização macroscópica dos produtos

As características morfológicas de cada produto foram determinadas de acordo com a metodologia citada por Gorgonio et al (2011). A imagem digital de cada bolo foi obtida utilizando uma câmera Canon 18.0 Mega Pixel para posterior avaliação dos aspectos morfológicos.

Após o término da cocção, os bolos foram avaliados para determinação do diâmetro (D) e Espessura (E) com auxílio de uma régua de 30 centímetros e o peso determinado em analítica. O índice de expansão obtido pela relação D/E dos produtos formulados foram determinados de acordo com a AACC (1995).

Avaliação da qualidade microbiológica

Os produtos de confeitaria foram processados pela técnica de diluição sucessiva, em triplicata. De cada réplica foi retirada uma amostra de biomassa equivalente a 10% da biomassa obtida para obtenção de amostra composta. De cada amostra composta foi retirada um grama para análise microbiológica, incluindo leveduras, fungos filamentosos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SILVA et al, 2007) O crescimento dos microrganismos foi observado a cada 24 horas quando determinou-se as UFC's.

Composição centesimal

Os produtos elaborados com basidiomas de *L. citrinus* foram submetidas à determinação de umidade, lipídeos, proteína, cinzas e carboidratos. A umidade foi determinada por dessecação 105 °C até obtenção de peso constante. A determinação da fração protéica foi realizada pelo método micro Kjeldahl, aplicando o fator de conversão 6,25 (SILVA et al, 2007). A quantificação de lipídios foi realizada segundo o método Bligh and Dyer. As cinzas, fibra bruta foram determinadas por incineração do material em mufla a 550-660 °C e digestão ácido-básica, segundo método de Weende, respectivamente (A.O.A.C, 2006). Os carboidratos totais foram estimados por diferença. O valor calórico dos bolos foi calculado utilizando-se os coeficientes de ATWATER que considera 4kcal/g de proteínas e carboidratos e 9kcal/g para os lipídios (MOSCATTO et al, 2004).

Determinação de macro e micro minerais

A determinação dos minerais foi realizada conforme os métodos proposto pela Embrapa (2009). As amostras foram desidratadas em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C, em seguida desidratadas e submetidas a digestão úmida HNO₃ + HCl O₄ (3:1). O teor de fósforo foi determinado por Espectrofotometria com azul de molibdênio; cálcio, magnésio, potássio, cobre, ferro, manganês e zinco por espectrofotometria de absorção atômica (EAA). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os valores de macronutrientes (Ca, P, Mg, K) foram calculados em g.kg⁻¹ e os dos micros (Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg⁻¹.

Avaliação do custo das preparações

Na determinação do cálculo do custo de cada produto no final da fabricação foi considerado o preço dos ingredientes utilizados nas formulações controle e experimentais adquiridos no comercio local no município de Manaus-Amazonas-Brasil.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), utilizando o programa Minitab versão 16.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físicas dos três produtos de confeitaria elaborados com cureira e enriquecidos com *L. citrinus* está apresentado na Tabela 2. Os produtos no final da fabricação apresentaram aparência integral, contudo à medida que se aumentou a concentração de cogumelo em substituição da crueira, os valores dos parâmetros, tamanho e peso foi crescente (Figura 1). A diferença significativa dos parâmetros avaliados só foi observada nos produtos experimentais contendo 25% de cogumelo, com destaque para o peso e a espessura, parâmetros cujo valor foi superior 10%, em relação ao produto controle. Todavia, o índice de expansão após cocção reduziu, à medida que foi aumentado o teor de cogumelo, conseqüentemente o conteúdo de fibra, em substituição a crueira. Este aumento de peso e a redução do índice de expansão podem está associado às propriedades hidrofílicas das fibras constituintes do cogumelo, especialmente polissacarídeos, polímeros que tem a propriedade de retenção da água nos produtos (ORSINE et al, 2012; GUIMARÃES et al., 2010). Os dados aqui apresentados são similares aos citados por Guimarães et al. (2010) para bolos simples elaborados com farinha da entrecasca de melancia 7% e 30% em substituição a farinha de trigo refinada.



Figura 1. Aspectos morfológicos dos produtos experimentais. Produto sem adição de cogumelo (A); Produto com 15% cogumelo (B); Produto com 25% cogumelo (C).

Outro resultado evidenciado foi o aumento crescente da espessura após a adição do cogumelo nas formulações experimentais (Tabela 2), com diferença significativa no produto contendo *L. citrinus* 25% (p/p), efeito determinado pelas proteases dessa espécie. Além disso, essas enzimas também podem ter impedido a deformação do produto no forno (KOBBLITZ, 2013). O potencial de *L. citrinus* como fonte de proteases foi identificado nos estudos realizados por Kirsch et al (2011) e UFAM (2011).

Tabela 2. Característica morfológicas dos produtos à base de crueira e cogumelo comestível

Produto de Confeitaria				
Amostra	Tempo de cocção (min)	Peso (g)	Diâmetro x Espessura (cm)	Índice de Expansão
Controle	40	50±1,00 ^c	6,5±0,05 ^a x 4,5±0,05 ^c	1,60 ^a ±0,02
Cogumelo 15%	50	53±0,50 ^b	6,5±0,05 ^a x 4,7±0,05 ^b	1,45 ^b ±0,01
Cogumelo 25%	55	55±1,00 ^a	6,5±0,05 ^a x 5,0±1,00 ^a	1,30 ^c ±0,05

As médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p <0,05).

Qualidade microbiológica dos produtos

Os resultados da análise microbiológica dos basidiomas desidratados de *L. citrinus*, assim como, dos bolos com e sem adição de cogumelo demonstraram a ausência de coliformes fecais, *Salmonella* sp. e de fungos. Estes resultados mostraram que a qualidade desses produtos está em conformidade com as exigências da legislação brasileira, RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 e as citações de Silva et al (2001) que exige a ausência de *Salmonella*, teor igual a 10^4 para Coliformes Totais e *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, (5×10^3) e bactérias psicrófilas (500 UFC's).

A presença de fungos em excesso, contagem acima de 10^6 UFC/g, indica manipulação inadequada, podendo ser decorrente de falhas na limpeza da matéria-prima, ou no manuseio realizado em condições insatisfatórias (LEMOS, 2009). Com relação às bactérias mesófilas, quando a contagem também for superior a 10^6 UFC/g, podem levar a alteração sensorial e redução do tempo de prateleira, indicando insalubridade do produto.

Composição centesimal

Na tabela 3, os resultados referentes a média da composição centesimal dos produtos de confeitaria utilizando crueira como ingrediente base mostra que as variáveis lipídios e carboidratos foram significativos no bolo controle. Quando a crueira foi substituída por 15% de cogumelo a significância só foi observada nos teores de umidade e cinzas. No produto experimental em que a crueira foi substituída em 25% de cogumelos, os teores da maioria dos parâmetros avaliados (cinzas, lipídios, proteínas, fibras e carboidratos) foram significativos, exceto a umidade que o valor foi semelhante ao do controle.

Em comparação ao controle, o teor de proteína e fibra foi crescente nos produtos experimentais, a medida que aumentou a concentração de cogumelo. Efeito inverso foi verificado no quantitativo de carboidratos e no conteúdo calórico, ou seja, houve redução dessas variáveis nos dois produtos (Tabela 3), resultados que demonstram à qualidade nutricional dos produtos a base de crueira e a eficácia do cogumelo *L. citrinus* nas formulações experimentais, considerando que os demais ingredientes foram mantidos nas mesmas quantidades.

O produto desenvolvido nesta pesquisa com maior percentual de fibras (Tabela 3) apresenta teor considerável quando comparado aos produtos elaborados com matéria prima similares, a exemplo do bolo de macaxeira (0,7%g/100g) e, biscoito formulado com polvilho azedo que apresentou 0,3%g/100g de fibra alimentar (TACO, 2011; APLEVICZ et al, 2006). Além disso, outros produtos descritos na literatura, bolo enriquecido com entrecasca de melancia (fibra=2,51%g/100g), bolo de chocolate com soja (fibra=0,3%g/100g); bolo com farinha de casca de maracujá (fibra=1,86%g/100g), apresentaram quantitativo de fibras inferior (GUIMARÃES et al, 2010; JUSTINO et al, 2010; MIRANDA et al, 2013).

A Portaria nº 27 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 1998, classifica alimentos sólidos como fonte de fibra, aqueles contendo no mínimo 3 g/100 g⁻¹. Os produtos contendo 6 g/100g⁻¹ são referidos como fonte de alto teor de fibra (BRASIL, 1998). Com base nesse documento, o produto elaborado com farinha de crueira contendo 25% de *L. citrinus* caracteriza-se como alimento fonte de fibra.

Segundo Miranda et al (2013) o enriquecimento com fibras pode melhorar a qualidade nutricional de dietas, reduzindo inclusive suas calorias com o uso de farinhas que tem grande potencial para servirem como ingredientes

alimentícios. Em se tratando do cogumelo comestível estudado, um ingrediente pouco explorado, porém tem constituição adequada para ser usado como ingrediente alimentício de alta qualidade. IOM (2005) cita que conforme a Dietary Reference Intake (DRI), para homens e mulheres entre 19 e 70 anos a ingestão diária de fibras alimentares deve ser equivalente a 21- 38g. Dessa forma, as preparações enriquecidas com *Lentinus citrinus* podem ser consideradas alimentos fontes de fibras visto que oferecem, por porção, até 1g de fibras a mais que a formulação controle (BRASIL, 1998).

O teor lipídico encontrado nas três formulações dos produtos à base de crueira que apresentou aproximadamente 31% foi devido a adição de óleo vegetal, inclusive, em substituição ao volume de leite, respectivamente com a finalidade de formar uma emulsão para aprimorar a textura do alimento e elaborar um alimento sem leite na sua composição de forma a favorecer o consumidor que apresenta alergias e intolerâncias aos constituintes do leite.

O óleo vegetal usado nas formulações tem na composição basicamente, 7% de ácido graxo saturado, 11% de ácido graxo linolênico e 21% de ácido graxo linoléico, ambos poliinsaturados e, 61% de ácidos graxos monoinsaturado. Segundo Lottenberg (2009) o consumo de ácidos graxos insaturados está associado diminuição de LDL sérico e assim prevenir o surgimento de doenças coronarianas. Por esse critério, o risco pode ser reduzido de forma mais eficaz quando os ácidos graxos trans e ácidos graxos saturados são substituídos por ácidos graxos insaturados (MARTIN et al, 2006).

Tabela 3. Composição centesimal dos produtos elaborado à base de crueira e cogumelo comestível

Variáveis (g/100g ms)	Produto de confeitaria		
	B1	B15	B25
Umidade	10,11±1,25 ^b	12,92±1,26 ^a	10,07±0,41 ^b
Cinzas	0,72±0,00 ^c	0,93±0,07 ^b	1,06±0,04 ^a
Lipídeos	30,37±5,00 ^a	30,42±1,64 ^a	30,65±0,77 ^a
Nitrogênio	0,52±0,02 ^c	0,8±0,05 ^b	1,13±0,04 ^a
Proteína (Nx 6,25)	3,25±0,36 ^c	5,0±0,07 ^b	7,1±0,81 ^a
Fibras	0,83±0,02 ^c	1,98±0,01 ^b	3,29±0,01 ^a
Carboidratos	54,72±0,81 ^a	48,72±0,05 ^b	48,53±0,36 ^b
Energia (kcal)	502,2±0,07 ^a	488,66±0,04 ^b	498,37±0,08 ^a

As médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p <0,05).

Macro e micro minerais dos produtos à base de crueira

A tabela 4 demonstra os resultados referentes ao teor de minerais dos produtos elaborado a base de crueira adicionado de *L. citrinus*. Neste estudo a concentração de potássio e fósforo aumentaram 15,5% e 46,0% nos produtos suplementados de cogumelo [15% e 25% (p/v)], respectivamente. Nos produtos experimentais, à medida que aumentou a concentração de cogumelo houve redução de 8,9% e 16,7% do teor de cálcio quando comparado ao produto controle. Provavelmente este resultado pode ter ocorrido em função da retirada da crueira, alimento derivado do processamento da mandioca que na forma crua e cozida contém 15 e 19mg de cálcio /100g, respectivamente (TACO, 2011). Em relação a magnésio e ferro o efeito foi inverso, o conteúdo desses dois minerais aumentou de

acordo com a concentração do cogumelo, enquanto o quantitativo de sódio foi semelhante em todos os produtos, porém manganês não foi determinado no produto controle. Já nos demais produtos, o teor de manganês foi similar. O quantitativo de cobre e zinco aumentou nos produtos adicionados de cogumelo, com variação de 53,12% a 16,40%, respectivamente.

Os minerais em sua maioria são considerados essenciais devido as diversas funções que exercem no organismo dos seres humanos, tais como, participação em diferentes formas no processo de crescimento; constituintes estruturais dos tecidos corporais; reguladores de atividades enzimáticas; facilitam a transferência pela membrana de nutrientes e outras moléculas (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

Entre os macrominerais, o sódio presente em quantitativo significativo nos produtos, controle e experimentais, Estes alimentos ainda podem ser classificados como apropriados para consumo em relação ao teor de sódio. De acordo com as recomendações de ingestão diária preconizada pelas DRI's (2005), a taxa máxima do nível de ingestão (UL) de sódio para indivíduos de 19-70 anos, 2,3 g/dia.

Dos microminerais, o que expressou maior taxa nos produtos experimentais foi o ferro, variando de 9,83mg a 16.65mg/100g . De acordo com a DRI (2005) a ingestão diária de ferro deve ser acima de 8-18mg/dia para homens e mulheres em fase adulta, respectivamente. Os produtos elaborados com crueira e cogumelo comestível demonstram conteúdo de ferro superior quando comparado a outros produtos fontes de ferro, tais como sardinha (3,9mg/100g); carne bovina (3,6mg/100g); miúdos de frango (6,5mg/100g); fígado (9,5mg/100g; feijão carioca (8,0mg/100g); soja (13,1 mg/100g) (TACO, 2011). De acordo com Hoffmann; Kruger (2011) o consumo de alimentos ricos em ferro reconhecido auxiliam na composição de células vermelhas do sangue.

Tabela 4. Análise de minerais dos produtos elaborado à base de crueira e cogumelo comestível

Nutrientes	Produtos de confeitaria		
	B1	B15	B25
P (g kg-1)	0,90±0,08 ^c	1,41±0,03 ^b	1,67±0,04 ^a
K (g kg-1)	21,96±1,53 ^c	35,97±4,10 ^b	45,08±1,14 ^a
Ca (g kg-1)	10,14±0,74 ^a	9,23±0,23 ^{ab}	8,44±0,35 ^b
Mg (g kg-1)	2,29±0,17 ^c	3,52±0,07 ^b	3,90±0,13 ^a
Fe (mg kg-1)	9,83±1,52 ^b	14,53±2,24 ^a	15,67±1,04 ^a
Na (mg kg-1)	1235±22,9 ^a	1235±22,9 ^a	1235±22,9 ^a
Cu (mg kg-1)	0,50 ^b ± 0,0	2,17 ^a ± 0,28	2,67 ^a ± 0,28
Mn (mg kg-1)	ND±0,0 ^c	0,50±0,0 ^b	0,50±0,0 ^a
Zn (mg kg-1)	3,83±0,0 ^c	6,83±0,0 ^b	8,17±0,0 ^a

Avaliação do Preço de Custo

O custo total do produto sem a adição de cogumelo (Tabela 5.) foi estimado em R\$ 4,80 e rendeu 10 porções, com custo de R\$ 0,48/porção. Nos produtos contendo 15% e 25% (Tabela 6 e 7) o rendimento foi semelhante ao controle e a estimativa de preço foi de R\$ 5,76, e R\$ 6,40, respectivamente, custando cada porção R\$ 0,58 e R\$ 0,64 respectivamente.

Tabela 5. Avaliação do custo do produto controle sem cogumelo (porção: 10)

Ingrediente	Und	Preço (R\$)	Qtd	Preço total (R\$)
Açúcar refinado	kg	2,50	0,200	0,50
Óleo vegetal	L	4,00	0,120	0,53
Ovos	und	0,35	6	2,10
Baunilha	L	5,50	0,005	0,91
Fermento Químico	kg	3,00	0,001	0,30
Crueira	kg	4,50	0,120	0,54
Cogumelo triturado	kg	58,0	0,000	-
Total				4,80

Tabela 6. Avaliação do custo do produto com 15% cogumelo (porção: 10)

Ingrediente	Und	Preço (R\$)	Qtd	Preço total (R\$)
Açúcar refinado	kg	2,50	0,200	0,50
Óleo vegetal	L	4,00	0,120	0,53
Ovos	und	0,35	6	2,10
Baunilha	L	6,50	0,005	0,91
Fermento Químico	kg	3,00	0,001	0,30
Crueira	kg	4,50	0,102	0,46
Cogumelo triturado	kg	58,0	0,018	1,04
Total				5,76

Tabela 7. Avaliação do custo do produto com 25% cogumelo (porção: 10)

Ingrediente	Und	Preço (R\$)	Qtd	Preço total (R\$)
Açúcar refinado	kg	2,50	0,200	0,50
Óleo vegetal	L	4,00	0,120	0,53
Ovos	und	0,35	6	2,10
Baunilha	L	6,50	0,005	0,91
Fermento Químico	kg	3,00	0,001	0,30
Crueira	kg	4,50	0,090	0,40
Cogumelo triturado	kg	58,0	0,030	1,74
Total				6,40

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam a viabilidade da utilização da crueira e de *L. citrinus* como suplemento na formulação de produtos sem glúten como uma alternativa para o desenvolvimento de novas tecnologias alimentares na indústria de confeitaria para elaboração de produtos de baixo custo, ricos em macro e micronutrientes que proporcionam benefícios a saúde humana.

REFERENCIAS

- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS - AACC. **Approved methods of the AACC**. 8. ed. Saint Paul, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 15.ed. Washington: AOAC, 2006.
- APLEVICZ, K. S. **Caracterização de produtos panificados à base de féculas de mandioca nativas e modificadas**. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 27, de 13 de janeiro de 1998. **Aprova o regulamento técnico referente a informação nutricional complementar**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 jan. 1998.
- FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS. **Bioprocesso para produção de extrato proteolítico fibrinolítico, e composição fibrinolítica de cogumelo comestível**. PI 1107365-9 de 07/11/2011.
- FURLANI R.P., GODOY H.T. **Valor Nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão**. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, 149- 154 pp, 2005.
- GORGÔNIO, C. M. S; PUMARI, M; MOTHÉ, C. G. **Macroscopic and physiochemical characterization of a sugarless and gluten-free cake enriched with fibers made from pumpkin seed (*Cucurbita maxima*, L.) flour and cornstarch**. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 31(1): 109-118, jan.-mar. 2011.
- GUIMARAES, R. R ; FREITAS, M. C. J.; SILVA, V. L. M. **Simple cakes elaborated with flour of watermelon inner skin (*Citrullus vulgaris*, Sobral): chemical, physical, and sensory evaluation**. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, vol. 30, n. 2, June 2010.
- HAMADA, S; SUZUKI, K; AOKI, N; SUZUKI, Y. **Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae***. **Journal of Cereal Science**. 57, 91- 97, 2013.
- HOFFMANN, S. A.; KRUGER, R. L. **Preparation, sensory and physical-chemical cookie iron-rich meal to bovine lung**. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 577-583, out./dez. 2011.
- INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids** . Washington, DC: National Academy, 2005. 1331p
- JUSTINO, P. F. **Avaliação sensorial de bolo de chocolate acrescido de soja por crianças em idade escolar**. **Revista Salus-Guarapuava (PR)**. Jul./Dez; 3(2): 13-20, 2009.
- KIRINUS, P; COPETTI, C; OLIVEIRA, V. R. **Utilização de farinha de soja (*Glycine max*) e de quinoa (*Chenopodium quinoa*) no preparo de macarrão caseiro sem glúten**. **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 21, n. 4, p. 555-561, out./dez, 2010.

- KIRSCH, L. S; PINTO, A. C. S; PORTO, T. S; PORTO, A. L. F; TEIXEIRA, M. F. S. **The Influence of Different Submerged Cultivation Conditions on Mycelial Biomass and Protease Production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae)**. International Journal of Medicinal Mushrooms, 13(2): 185–192, 2011.
- KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Reimpr, 2013.
- LEMOS, F. M. R. **Elaboração e caracterização de produto análogo a hambúrguer de cogumelo *Agaricus brasiliensis***. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.
- LOTTEBERG, A. M. P. **Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular**. Arq Bras Endocrinol Metab. 53/5, 2009.
- MAHAN, L.K; ESCOOT-STUMP, S. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. São Paulo: Roca, 11ªed., 2005.
- MARTIN, C. A, et al . **Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos**. Rev. Nutr., Campinas , v. 19, n. 6, dez. 2006.
- MIRANDA, A.A; CAIXETA, A.C.A; FLÁVIO, E.F; PINHO, L. **Desenvolvimento e análise de bolos enriquecidos com farinha da casca do maracujá (*Passiflora edulis*) como fonte de fibras**. Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr., Araraquara v. 24, n. 2, p. 225-232, abr./jun. 2013.
- MOSCATTO, J. A.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; HAULY, M. C. O. **Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate**. Ciência e Tecnologia de Alimentos 24 (4): 634-640, out.-dez, 2004.
- NEVES, V. J. M; BROETTO, F; MARCHESE, J. A. **Aproveitamento do resíduo da produção de farinha de mandioca na produção de Álcool fino**. Revista Raízes e Amidos Tropicais, volume 4, p.14-21, 2008.
- ORSINE, J. V. C; BRITO, L. M; NOVAES, M. R. C. G. **Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e farmacológicas**. Rev. HCPA & Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gd. do Sul;32(4):452-460, 2012.
- SILVA, N. **Manual de Métodos de Análise. Microbiológica de Alimentos**. São Paulo - Livraria Varela Editora, 2007.
- SMITH J.E., SULLIVAN R. **The Western approach to medicinal mushrooms**. Journal Science. 1-11 pp. 2004.
- TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP**.- 4. ed. rev. e ampl.-- Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011.
- VIEIRA, J. C, et al . **Qualidade física e sensorial de biscoitos doces com fécula de mandioca**. Cienc. Rural, Santa Maria , v. 40, n. 12, Dec. 2010.
- ZAVAREZE, E. R; MORAES, K. S; SALAS-MELLADO, M. L. M. **Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite**. Ciênc. Technol. Aliment. Campinas, vol. 30, n. : 100-105, 2010.

5. CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa mostraram a viabilidade da produção de cogumelo comestível, uma forma de aproveitamento de resíduo agroindustrial proveniente da Região Amazônica.

A partir dos cultivos nos resíduos agroindustriais foram obtidos basidiomas com qualidade nutricional com teores de proteínas, fibras, minerais e aminoácidos essenciais aceitáveis para ser agregada a dieta de indivíduos que buscam uma alimentação saudável e também como ingrediente para o desenvolvimento de outros produtos.

Os produtos de confeitaria desenvolvidos a base de crueira quando adicionados de basidiomas de *L. citrinus* apresentaram características morfológicas, sobressaindo a textura e a qualidade nutricional adequada para consumo humano.

6. REFERÊNCIAS

A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 15.ed. Washington: AOAC, 2006.

AISHAH, M. S.; WAN ROSLI, W. I. **The effect of addition of oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) on nutrient composition and sensory acceptance of selected wheat- and rice-based products**. International Food Research Journal 20(1): 183-188, 2013.

AKINLONU E.O **Nutritional and sensory qualities of novel dishes from cassava**. A Dissertation submitted to the Department of Nutrition and Dietetics, College of Food Science and Human Ecology, University of Agriculture, Abeokuta, (2011).

APLEVICZ, K. S. **Caracterização de produtos panificados à base de féculas de mandioca nativas e modificadas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2006.

BADARÓ, A. C. L. **Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana - parte 2**. NUTRIR GERAIS, Ipatinga, v. 3, n. 4, p. 396-416, fev./jul. 2009.

BLIGH, E.G; DYER, W.J. **A rapid method for total lipid extraction and purification**. Can. J .Biochem .Physiol. 37:911-917, 1959.

BORGES, M.F; FUKUDA, W. M. G; ROSSETTI, A. G. **Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 37, n. 11, p. 1559-1565, nov. 2002.

DIAS, A R. G. **Efeito de oxidantes, de ácidos orgânicos e da fração solúvel em água na propriedade de expansão do amido de mandioca fermentado**. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FORTES R.C., NOVAES M.R.C.G. **Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 52, 2006.

FURLANI R.P., GODOY H.T. **Valor Nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão.** Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 64, n. 2, 149- 154 pp, 2005.

GODOY, H.T. **Valor Nutricional de cogumelos comestíveis.** IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL. III SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 266, Caxias no Sul, RS. Anais – Proceedings. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.22, 2008.

GOMES, A; MENDES DA SILVA, C; RICARDO, N. **Effects of annealing on the physicochemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo).** Carbohydr. Polym. 60:1-6, 2005.

GRACIOLLI, L.A; CAETANO, C. S. P. S; LEONEL, M; AGUIAR, E.B. **Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus florida* em ramas de mandioca.** Revista Raízes e Amidos Tropicais, Volume 6, p.26-39, 2010.

GUIMARAES, R. R ; FREITAS, M. C. J.; SILVA, V. L. M. **Simple cakes elaborated with flour of watermelon inner skin (*Citrullus vulgaris*, Sobral): chemical, physical, and sensory evaluation.** Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, vol. 30, n. 2, June 2010.

IBGE. CEPAGRO. **Levantamento sistemático da produção agrícola de mandioca,** 2011. Acesso dia: 10.02.2013.

KIRINUS, P; COPETTI, C; OLIVEIRA, V. R. **Utilização de farinha de soja (*Glycine max*) e de quinoa (*Chenopodium quinoa*) no preparo de macarrão caseiro sem glúten.** Alim. Nutr., Araraquara v. 21, n. 4, p. 555-561, out./dez, 2010.

LATINFOODS, **Tabla de Composicion de Alimentos de América Latina .** www.fao.org/LAmerica/grupo.htm, 2002.

LEMOS, F. M. R. **Elaboração e caracterização de produto análogo a hambúrguer de cogumelo *Agaricus brasiliensis***. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

MARQUES, J. A.; RADO, I. N.; ZEOULA, L. M.; ALCALDE, C. R.; NASCIMENTO, W. G. **Avaliação da Mandioca e seus resíduos Industriais em substituição ao milho no desempenho de novilhas confinadas**. Rev. bras. zootec., 29(5):1528-1536, 2000.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. **Alimentos Funcionais e Nutraceuticos: Definições, Legislação e Benefícios a Saúde**. Revista Eletrônica de Farmácia Vol 3(2), 109-122, 2006.

MORENO, G. **Revision Del genero *Lentinus*fr. en España**. Anal. Inst. Bot. Cavanilles, vol. 32, n.2, 1975.

NEPA, **Tabela de Composição de Alimentos**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em alimentação. UNICAMP. Campinas, Brasil. 105 p, 2006

NEVE, V. J. M.; BROETTO, F; MARCHESE, J. A. **Aproveitamento do resíduo da produção de farinha de mandioca na produção de Álcool fino**. Revista Raízes e Amidos Tropicais, volume 4, p.14-21, 2008.

PUTZKE, J. **Os gêneros *Pleurotus* e *Lentinus* (*Agaricales*, *Basidiomycota*, fungos) no Brasil - I: Lista de espécies e chaves de identificação**. Caderno de Pesquisa série Biologia, vol. 14, n.1, 2002.

SILVA, A. C; JORGE, N. **Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes**. UNOPAR Cien Ciênc Biol Saúde. 13(Esp):375-84, 2011.

SILVA, N. **Manual de Métodos de Análise. Microbiológica de Alimentos**. São Paulo - Livraria Varela Editora, 2007.

SHEIKH, M. A. M; KUMAR, A; ISLAM, M. M; MAHOMUD, M. S. **The effects of mushroom powder on the quality of cake**. Progress. Agric. 21(1 & 2): 205 – 214, 2010.

SMITH J.E., SULLIVAN R. **The Western approach to medicinal mushrooms.** Journal Science. 1-11 pp. 2004.

SOARES JÚNIOR, M. S; OLIVEIRA, W. M; CALIARI, M; VERA, R. **Otimização da formulação de pães de forma preparados com diferentes proporções de farinha de trigo, fécula de mandioca e Okara.** B.CEPPA, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 221-248, jan./jun, 2006.

SOUZA, M. L; MENEZES, H, C. **Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 24(1): 120-128, jan.-mar, 2004.

ULZIJARGAL, E; et al. **Quality of bread supplemented with mushroom mycelia.** Food Chemistry 138 70–76, 2013.

UKWURU, M.U; EGBONU, S.E. **Recent development in cassava-based products research.** **Academia.** Journal of Food Research 1(2): 001-013, February, 2013.

VIEIRA, J. C, et al . **Qualidade física e sensorial de biscoitos doces com fécula de mandioca.** Cienc. Rural, Santa Maria , v. 40, n. 12, Dec. 2010.

WOSIACKI, G; CEREDA, M. P. **Valorização de resíduos do processamento de mandioca.** Ciencias Exatas e da Terra, C. Agrárias e Engenharias, 8 (1): 27-43, 2002.

ZAVAREZE, E. R; MORAES, K. S; SALAS-MELLADO, M. L. M. **Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite.** Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, vol. 30, n. : 100-105, 2010.

ZOLDAN, G; et al. **Manual de referencias para casas de farinha.** SEBRAE/ AL- Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas do Estado de Alagoas, 2006.