



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia



DESENVOLVIMENTO DE *SHAKE* EM PÓ COM MASSA MICELIAL DE
COGUMELOS COMESTÍVEIS

RAIANE ÁILA TEIXEIRA SOUZA

MANAUS
OUTUBRO - 2017

RAIANE ÁILA TEIXEIRA SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE *SHAKE* EM PÓ COM MASSA MICELIAL DE
COGUMELOS COMESTÍVEIS

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS
OUTUBRO - 2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729d Souza, Raiane Aila Teixeira
Desenvolvimento de shake em pó com massa micelial de cogumelos comestíveis / Raiane Aila Teixeira Souza. 2017
85 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. bioprodutos. 2. casca de abacaxi. 3. fibra alimentar. 4. Lentinus. 5. Pleurotus. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RAIANE ÁILA TEIXEIRA SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE *SHAKE* EM PÓ COM MASSA MICELIAL DE
COGUMELOS COMESTÍVEIS

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
Universidade Federal do Amazonas

Prof^ª. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
Universidade Estadual Paulista

Prof^ª. Dra. Rosana Antunes Palheta
Instituto Federal do Amazonas

Prof^ª. Dra. Nélly Mara Vinhote Marinho
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Antônio José Inhamuns da Silva
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Aparecida e Francisco,
À minha inseparável irmã Rayssa,
Ao meu marido Francisco Luiz,
Pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira, pela orientação, dedicação e apoio durante a realização deste projeto.

Aos companheiros de laboratório por toda a ajuda, suporte e risadas que tornaram todos os dias de trabalho únicos e agradáveis, em especial à Larissa Svetlana, Salomão Rocha Martim, Ana Rita Gaia Machado e Lorisa Simas, que estiveram diretamente envolvidos nesta pesquisa.

Ao prof. Dr. Antônio Fábio Lopes de Oliveira, pelo auxílio nas análises centesimais.

À minha mãe, Cida Teixeira e meu padrasto José Adilson, por acreditarem em mim e pelo apoio, compreensão, incentivo.

Ao meu pai, Francisco Souza, que apesar da distância, sempre me incentivou e acreditou no meu potencial.

À melhor irmã, amiga e revisora, Rayssa Halyanne, pela grande ajuda, pelos momentos únicos e pelas risadas sem fim.

Ao meu marido, Francisco Luiz, pela ajuda neste trabalho desde seu início, pela grande paciência e apoio.

Aos melhores amigos que a vida me deu, Larissa Svetlana, Magna Aragão, Marcelly Cristiny, Felipe Souza, Cléber Júnior, que me incentivaram sempre e tornaram essa jornada mais leve.

À Regina Glória Pinheiro Cerdeira, ex-diretora do departamento de Fiscalização da SEMMAS, pela compreensão durante a realização deste estudo.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas, ao Laboratório de Micologia da UFAM e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Meus sinceros agradecimentos.

"Words are, in my not-so-humble opinion, our most inexhaustible source of magic."

J.K. Rowling - *Harry Potter and the Philosopher's Stone*.

RESUMO

A indústria de alimentos produz uma série de resíduos de alto valor econômico que, se submetidos à tecnologias adequadas, podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Para a reciclagem destes resíduos, os cogumelos comestíveis são alternativas para produção de biomassa, sendo que o substrato gerado ao final do bioprocessamento pode ser utilizado na elaboração de produtos alimentícios, pois suas características nutricionais aliadas à riqueza de nutrientes disponíveis favorece o aproveitamento desses subprodutos. Além disso, os impactos ambientais causados pelo descarte irregular de resíduos são minimizados. Esta pesquisa teve como objetivo desenvolver e caracterizar três produtos alimentícios do tipo *shake* formulados com bioprodutos resultantes do processamento da casca de abacaxi como uma alternativa alimentar fonte de fibras. Os bioprodutos foram caracterizados quanto à atividade antioxidante, teor de fenóis totais, digestibilidade *in vitro* das proteínas, bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, atividade hemolítica qualitativa e atividade citotóxica contra fibroblastos humanos MCR5. Os *shakes* foram elaborados utilizando formulações compostas pelos bioprodutos em pó, nas proporções de 0 e 100%, em substituição à farinha de aveia para obtenção de quatro formulações, incluindo a padrão. Os *shakes* produzidos foram submetidos à determinação de composição centesimal, teor de minerais, determinação de pH e acidez titulável total, e determinação da qualidade microbiológica. Os bioprodutos apresentaram atividade antioxidante e reduzido teor de fenóis totais e elevada digestibilidade de proteínas. Todos os ensaios toxicológicos revelaram que se tratam de produtos seguros para o consumo humano. Quando substituída a farinha de aveia pelos bioprodutos houve aumento de minerais, fibras, potássio, cálcio, sódio, cobre e manganês, além da redução das calorias totais.. O pH dos produtos do tipo *shake* apresentaram menor valor que a amostra padrão, maior acidez titulável total e qualidade microbiológica dentro das especificações higiênico-sanitárias em vigor.

Palavras-chave: bioprodutos, casca de abacaxi, fibra alimentar, *Lentinus citrinus*, *Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida*.

ABSTRACT

The food industry produces a series of wastes of high economic value which, if subjected to appropriate technologies, can be converted into commercial products or raw materials for secondary processes. Edible mushrooms are alternatives for the recycling of these residues and the substrate generated at the end of the bioprocess can be used in the elaboration of food products, since its nutritional characteristics, combined with the richness of available nutrients, favors the utilization of these by-products. In addition, the environmental impacts caused by irregular waste disposal are minimized. The objective of this research was to develop and characterize three *shakes*, formulated with bioproducts resulting from the processing of pineapple peel as an alternative food, source of fiber. The bioproducts were characterized for antioxidant activity, total phenol content, *in vitro* protein digestibility, bioassay of toxicity against *Artemia salina*, qualitative hemolytic activity and cytotoxic activity against human MCR5 fibroblasts. *Shakes* were made using formulations composed of powdered bioproducts in the proportions of 0 and 100%, replacing oat flour to obtain four formulations, including the standard one. The *shakes* produced were submitted to determination of centesimal composition, mineral content, determination of pH and total titratable acidity, and determination of the microbiological quality. The bioproducts presented antioxidant activity and reduced content of total phenols and high protein digestibility. All toxicological tests have shown that these products are safe for human consumption. When oatmeal was replaced by bioproducts there was an increase in minerals and fibers content and the reduction of total calories. In addition, there was increase of potassium, calcium, sodium, copper and manganese. The pH of the *shake* products presented lower value than the standard sample, higher total titratable acidity and microbiological quality within the sanitary and hygienic specifications.

Key-words: Bioproducts, fiber, pineapple peel, *Lentinus citrinus*, *Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	22
Figura 2. <i>Pleurotus albidus</i>	22
Figura 3. <i>Lentinus citrinus</i>	233
Capítulo 1	45
Figura 1. Imagens microscópicas em diferentes magnitudes da casca de abacaxi antes da miceliação pelos cogumelos (A) e dos bioprodutos após a miceliação por <i>Pleurotus albidus</i> (B), <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> (C) e <i>Lentinus citrinus</i> (D).	544
Figura 2. Atividade hemolítica qualitativa dos extratos dos bioprodutos a diferentes concentrações, utilizando sangue comercial de carneiro desfibrinado. NC= controle negativo. PC = controle positivo. (A) Bioproduto I - <i>Pleurotus albidus</i> . (B) Bioproduto II - <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> (C) Bioproduto III – <i>Lentinus citrinus</i>	58
Figura 3. Ensaio de toxicidade dos extratos dos bioprodutos em fibroblastos humanos (MRC5) após 72 horas de tratamento. A – Imagens dos fibroblastos MRC5 após 72 horas de tratamento com DMSO, extratos dos bioprodutos e doxorrubicina. B – Porcentagem da viabilidade celular dos extratos dos bioprodutos. DMSO – (controle negativo, 0,01%) e doxorrubicina (controle positivo, 20µM/34µg/mL).	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Teor de nutrientes analisados da casca e da polpa de abacaxi.....	27
Tabela 2. Formulação dos <i>shakes</i> para preparo de 500g do produto.....	32
Capítulo 1.....	45
Tabela 1. Atividade antioxidante e conteúdo de fenóis totais dos extratos aquosos dos bioprodutos.....	56
Tabela 2. Digestibilidade de proteínas <i>in vitro</i> dos bioprodutos.....	56
Tabela 3. Toxicidade dos extratos aquosos frente à <i>Artemia salina</i> após 24 horas.....	57
Capítulo 3.....	68
Tabela 1. Ingredientes utilizados na formulação dos produtos do tipo <i>shakes</i> por 100g de produto.....	72
Tabela 2. Composição físico-química dos <i>shakes</i> produzidos (g/100g).....	74
Tabela 3. Composição de macro e micro minerais dos <i>shakes</i> produzidos.....	76
Tabela 4. Determinação do pH e acidez total titulável dos <i>shakes</i>	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
4.1 Cogumelos comestíveis	20
4.2 Gênero <i>Pleurotus</i>	20
4.3 Gênero <i>Lentinus</i>	22
4.4 Aplicação dos cogumelos comestíveis na indústria de alimentos	23
4.5 Alimentos funcionais.....	24
4.6 Aproveitamento de resíduos agroindustriais	25
4.7 Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	26
5 METODOLOGIA	28
5.1 Matéria Prima.....	28
5.2 Escaneamento por microscopia eletrônica	28
5.3 Determinação da atividade biológica.....	28
5.3.1 Preparação dos extratos	28
5.3.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais	29
5.3.3 Determinação da atividade antioxidante	29
5.4 Determinação da digestibilidade de proteína <i>in vitro</i>	30
5.5 Bioensaio de toxicidade dos extratos brutos frente à <i>Artemia salina</i>	30
5.6 Determinação da atividade hemolítica qualitativa	31
5.7 Avaliação da citotoxicidade utilizando fibroblastos humanos MCR5	31
5.7.1 Linhagem e cultura celular	31

5.7.2 Avaliação da citotoxicidade.....	31
5.8 Formulação dos <i>shakes</i>	
5.9 Determinação da atividade de água dos bioprodutos e dos produtos do tipo <i>shake</i>	
5.10 Determinação da acidez titulável e pH dos <i>shakes</i>	33
5.11 Determinação físico-química dos <i>shakes</i>	33
5.11.1 Determinação da composição físico-química dos <i>shakes</i>	33
5.11.2 Determinação de macro e micro minerais.....	34
5.12 Determinação da qualidade microbiológica dos produtos	34
5.13 Análises estatísticas	34
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
7 RESULTADOS.....	45
CAPÍTULO 1	45
Digestibilidade <i>in vitro</i> , atividade antioxidante e toxicidade de bioprodutos enriquecidos com cogumelos comestíveis.....	45
Introdução	47
Materiais e Métodos	48
Matéria-prima.....	48
Determinação da atividade de água	49
Escaneamento por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
Preparação do extrato aquoso	49
Determinação do teor de fenóis totais.....	49
Determinação da atividade antioxidante	50
Determinação da digestibilidade de proteína <i>in vitro</i>	50
Bioensaio de toxicidade utilizando <i>Artemia salina</i>	51
Atividade hemolítica qualitativa	51
Avaliação da citotoxicidade	52
Análise estatística	53

Resultados e Discussão	53
Determinação da atividade de água	53
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	5
Avaliação da determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante	5
Determinação da digestibilidade de proteína <i>in vitro</i>	56
Bioensaio de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	57
Atividade Hemolítica Qualitativa	57
Avaliação da citotoxicidade	58
Conclusão.....	60
Referências.....	60
CAPÍTULO 2.....	66
Suplementos alimentares do tipo <i>shake</i> formulados a partir de casca de abacaxi e cogumelos comestíveis.....	66
ANEXO	67
CAPÍTULO 3.....	68
Qualidade nutricional de produto do tipo <i>shake</i> elaborado com bioprodutos contendo cogumelos comestíveis.....	68
Introdução	70
Materiais e Métodos	71
Matéria-prima.....	71
Produção dos <i>shakes</i>	71
Determinação da composição físico-química	72
Determinação de macro e micro minerais	72
Determinação da atividade de água	73
Determinação da acidez total titulável e do pH	73
Determinação da qualidade microbiológica dos produtos	73
Análise estatística.....	73
Resultados e Discussão	73

Determinação da composição físico-química	73
Determinação de macro e minerais.....	75
Atividade de água.....	77
Acidez titulável e pH.....	77
Qualidade microbiológica	78
Conclusão.....	79
Referências.....	79
CONCLUSÕES	84
ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

Cogumelos comestíveis são macrofungos intensamente cultivados desde a antiguidade. Estes basidiomicetos são muito apreciados por suas características gastronômicas e nutricionais, por apresentar alto teor de fibras, proteínas, vitaminas e minerais, além de baixo teor de lipídios, sendo excelentes escolhas alimentares para serem incluídas em dietas de baixa caloria (HELENO *et al.*, 2015).

Além das características nutricionais, os cogumelos comestíveis têm potencial terapêutico, uma vez que produzem vários metabólitos com atividade biológica de interesse medicinal, como antitumorais, antioxidantes, imunoestimuladores e antimicrobianos (RAI *et al.*, 2005; FINIMUNDY *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013)

Em adição à importância metabólica, diversas espécies de cogumelos possuem elevado potencial produtivo. A produção de cogumelos em resíduos agroindustriais é uma alternativa extremamente eficiente para reciclagem de matéria orgânica. A biomassa gerada pode ser utilizada como fonte de nutrientes e a utilização dos resíduos reduz os impactos ambientais oriundo do descarte de materiais dispensáveis (SALES-CAMPOS e ANDRADE, 2011; FONSECA *et al.*, 2015).

Os resíduos gerados pelo processamento do abacaxi são exemplos de resíduos agroindustriais que podem ser utilizados no cultivo de cogumelos comestíveis, uma vez que no processamento industrial deste fruto apenas uma pequena porcentagem da inflorescência é aproveitada, já que a parte comestível do abacaxi representa apenas 22,5% do seu volume (SILVA e ZAMBIAZI, 2008). A casca do abacaxi tem valor nutricional superior que sua parte comestível, com um grande conteúdo de fibras e proteínas. Assim, o fruto do abacaxizeiro pode ser considerado um grande fornecedor de resíduos com constituintes nutritivos adequados para serem utilizados na alimentação humana (MARTIN *et al.*, 2012).

Uma característica da casca do abacaxi é o baixo teor lipídico, possibilitando que este resíduo seja utilizado em dietas que visam perda de peso. Além disso, a grande quantidade de fibras presente na casca também age regularizando as funções intestinais e prevenindo uma série de complicações fisiológicas decorrentes da falta de fibras no organismo como, por exemplo, obstipação intestinal, doenças cardiovasculares e câncer de intestino (GONDIM *et al.*, 2005; RODRIGUES e SARAIVA, 2007; MARTIN *et al.*, 2012).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo utilizar o subproduto do processamento da casca de abacaxi enriquecido com a massa micelial de três espécies de cogumelo comestível (*Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida* e *Lentinus citrinus*) para a elaboração de produtos alimentares do tipo *shake*, um alimento saudável e nutritivo.

2 JUSTIFICATIVA

O cultivo de cogumelos comestíveis é um processo biotecnológico que vem contribuindo para a reciclagem de resíduos orgânicos e que atualmente pode ser considerado como um dos poucos processos que combinam a produção de alimentos ricos em proteínas com a redução dos impactos ambientais (SANCHÉZ, 2010).

Nos últimos anos, os cogumelos comestíveis vêm se revelando como excelentes veículos nutricionais para estudo e aplicação na fabricação de produtos alimentícios, devido suas características gastronômicas e propriedades medicinais, aliadas à sua vasta diversidade, contribuindo para melhoria da qualidade de vida do homem. As espécies comestíveis podem ser consumidas *in natura* ou como ingrediente, principalmente na forma de pó, podendo ainda ser associadas à produtos formulados com farinhas (pão, macarrão) e em outros produtos para consumo em lanches (KIM *et al.*, 2011).

Além da utilização direta dos resíduos agroindustriais para o cultivo de cogumelos comestíveis, o biocompósito gerado ao final do processo de cultivo pode ser utilizado como matéria prima para elaboração de produtos alimentícios, uma vez que são fontes de proteínas, minerais, fibras solúveis e insolúveis e compostos fenólicos (GONÇALVES *et al.*, 2010; SALES-CAMPOS, 2011).

Deste modo, a realização desta pesquisa justifica-se pela contribuição em fabricar três produtos alimentares do tipo *shake* com alto valor nutricional, com resíduo agroindustrial enriquecido com cogumelos comestíveis, um produto inovador com alto valor agregado e baixo custo produtivo, que atenda às exigências do mercado consumidor quanto à qualidade tecnológica e sensorial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver três produtos alimentícios tipo *shake* adicionado de bioproduto do processamento da casca de abacaxi enriquecido com massa micelial de cogumelos comestíveis, como alternativa alimentar nutritiva e fonte de fibra.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o bioproduto contendo massa micelial de cogumelos comestíveis quanto à atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos;
- Determinar a atividade de água do bioproduto e dos *shakes* elaborados;
- Investigar a digestibilidade *in vitro* do bioproduto adicionado de massa micelial de cogumelos comestíveis;
- Determinar a toxicidade *in vitro* dos bioprodutos;
- Elaborar três produtos alimentícios do tipo *shake* adicionado de bioproduto;
- Determinar a composição centesimal e mineral dos produtos do tipo *shake*;
- Determinar o pH e a acidez total titulável dos produtos elaborados;
- Analisar a qualidade microbiológica dos produtos do tipo *shakes*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Cogumelos comestíveis

Cogumelos são fungos sapróbios integrantes da classe dos Basidiomycetes que crescem nos mais diversos substratos e desempenham papel essencial na ciclagem de nutrientes, uma vez que colonizam e degradam uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos em um ciclo relativamente curto (CARVALHO *et al.*, 2010, FONSECA *et al.*, 2015). Existem de 14 000 a 22 000 espécies de cogumelos no mundo, cerca de 2000 delas são comestíveis mas apenas 25 são consideradas alimentos e poucas são comercializadas (PATEL *et al.*, 2012; VALVERDE *et al.*, 2015).

Por séculos os cogumelos têm sido utilizados nos países asiáticos por suas características gastronômicas, incluindo aroma e textura. Na França, o consumo de cogumelos remonta desde o século XVII, sendo *Agaricus bisporus* (champignon-de-Paris), a principal espécie cultivada pelos franceses (MOON e LO, 2013).

Cogumelos possuem alto teor de proteínas, baixo teor de lipídios e fornecem um conteúdo energético baixo, fatores que fazem deles excelentes alimentos para dietas de baixa caloria (HELENO *et al.*, 2015). Além disso, apresentam em sua composição minerais e vitaminas, especialmente aquelas do complexo B, ácido ascórbico e ergosterol, que é convertido em vitamina D na presença de luz solar (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013).

Os cogumelos são muito valorizados por seu valor nutricional e aceitabilidade, assim como por suas características farmacológicas. Esses basidiomicetes tem apresentado diversas aplicações medicinais incluindo atividade antitumoral, imunomodulatória, cardiovascular, antiviral, antibacteriana, antiparasitária, hepatoprotetora entre outras (WASSER, 2010). Além disso oferecem uma variedade de compostos metabólicos, como compostos fenólicos e antioxidantes (PALACIOS *et al.*, 2011; MOON e LO, 2013; HELENO *et al.*, 2015).

4.2 Gênero *Pleurotus*

Os basidiomicetes do gênero *Pleurotus* são cosmopolitas, comestíveis, encontrados naturalmente em florestas úmidas tropicais e subtropicais e possuem a habilidade de colonizar os mais diversos substratos (RIVAS *et al.*, 2010, PATEL *et al.*,

2012). As principais características morfológicas desses cogumelos incluem basidiomas com aspecto similar a uma ostra, estipe geralmente lateral, lamelas decurrentes e esporada branca (PUTZKE, 2004; KIRSCH *et al.*, 2016). Esses macrofungos têm distribuição mundial e já foram documentados em áreas da mata atlântica brasileira e mesmo na região da Floresta Amazônica (TEIXEIRA *et al.*, 2009; RIVAS *et al.*, 2010). Pertencem à classe Basidiomycetes, ordem Agaricales, família Polyporaceae (PUTZKE, 2004).

Pleurotus são um dos principais grupos de cogumelos comercializados mundialmente, junto com os dos gêneros *Agaricus* e *Lentinus*. Eles apresentam alto conteúdo de proteínas, vitaminas e minerais, baixo conteúdo de carboidratos, açúcar e lipídios (PATEL *et al.*, 2012). Estes cogumelos são extensamente cultivados devido sua alta eficiência biológica, pois secretam um complexo de enzimas, incluindo peroxidases, lacases, celulasas, hemicelulasas e xilanasas, capazes de promover a degradação de substratos ricos em lignina e celulose (ALEXANDRINO *et al.*, 2007, RAMPINELLI, 2009).

O Brasil possui pelo menos 15 espécies do gênero *Pleurotus* que são consideradas nativas, sendo elas: *Pleurotus albidus* (Berk.) Pegler, *Pleurotus araucariicola* Sing., *Pleurotus calyx* (Speg.) Sing. (= *Lentinus patulus*), *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedj. [sin.: *Pleurotus flabellatus* (Berk. & Br.) Sacc.], *Pleurotus dryinus* (Pers.: Fr.) Kummer, *Pleurotus eugrammus* (Mont.) Dennis – Pegler (como *Nothopanus*), *Pleurotus favoloides* Sing., *Pleurotus hirtus* (Fr.) Sing., *Pleurotus macropus* Bagl. [sin.: *Pleurotus cornucopiae* (Paulet : Pers.) Rolland], *Pleurotus opuntiae* (Dur. & Lév.) Sacc., *Pleurotus ostreatoroseus* Sing., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm., *Pleurotus rickii* Bres., *Pleurotus submembranaceus* (Berk.) e *Pleurotus subtilis* (Berk.) Br. (PUTZKE, 2002).

Entre os *Pleurotus*, *P. albidus* ocorre na Argentina e já foi documentado no Brasil e no México, tem como característica, coloração clara, variando de creme a branco, margem inteira à crenada, fina, geralmente encurvada. Há uma grande variação entre os espécimes, não só em coleções cultivadas em laboratório como também em exemplares coletados da natureza (LECHNER e ALBERTÓ, 2011). *Pleurotus albidus* é uma espécie com grande potencial produtivo, estudos feitos por Lechner e Albertó (2011), mostram que foram obtidos basidiomas de boa qualidade em menor tempo por *P. albidus* quando comparado a outras espécies do mesmo gênero (LECHNER e WRIGHT, 2004).

Pleurotus ostreatus var. *florida* é outra espécie extensamente cultivada no mundo, especialmente na Índia. Estudos mostram que *Pleurotus ostreatus* var. *florida* apresentou 37,19% de proteínas e apenas 3,72% de lipídeos, em base seca (ROUT *et al.*, 2006). Além do potencial nutricional de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, é comumente reportado seu potencial terapêutico, uma vez que já foram isoladas substâncias com atividade antitumoral e imunostimuladoras (ROY *et al.*, 2009).



Figura 1. *Pleurotus albidus*. Acervo fotográfico do Herbário Micológico Jair Putzke/UFAM.



Figura 2. *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. Acervo fotográfico do Herbário Micológico Jair Putzke/UFAM.

4.3 Gênero *Lentinus*

O gênero *Lentinus* Fr. está constituído por cerca de 63 espécies, com distribuição mundial e ocorrendo principalmente em áreas tropicais e temperadas. São cogumelos sapróbios com sabor distinto e alto conteúdo de proteínas, fibras, minerais, vitaminas e teor reduzido de lipídios (KARUNARATHNA *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2015). Pertencem à classe Basidiomycetes, ordem Agaricales, família Polyporaceae (PUTZKE, 2002).

Algumas espécies deste gênero são comestíveis, sendo *Lentinus edodes* a espécie mais consumida mundialmente. Além desta espécie, *Lentinus cladopus* Lév., *Lentinus crinitus*, *Lentinus glabratus* Mont., (L.), *Lentinus subnudus* Fr., *Lentinus velutinus* Fr., *Lentinus cubensis* Berk e *Lentinus strigosus* (Schwein) Fr. são outras espécies comestíveis do gênero (KARUNARATHNA *et al.*, 2011, ZENT *et al.*, 2004).

Lentinus citrinus Walley et Rammeloo é um basidiomicete sapróbio, que ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais. *L. citrinus* é descrito como uma

espécie comestível, embora pouco se conheça em relação ao seu potencial biotecnológico (KIRSCH *et al.*, 2013). Kirsch *et al.*, observaram uma grande produção de protease por este fungo (7,33 a 23,22 U/mL) e Machado *et al.* (2015) constataram que *L. citrinus* apresentou grande quantidade de fibras (11,20g/100g), proteínas (27 g/100g) e presença de aminoácidos essenciais, possuindo propriedades nutricionais para a sua inclusão na dieta humana.



Figura 3. *Lentinus citrinus*. Acervo fotográfico do Herbário Micológico Jair Putzke/UFAM.

4.4 Aplicação dos cogumelos comestíveis na indústria de alimentos

Recentemente, muitos estudos vêm sendo conduzidos com cogumelos de forma estimular a sua inclusão em alimentos processados, seja de forma direta ou indireta (LIN *et al.*, 2008). Estes fungos têm sido adicionados diretamente como ingredientes ou usados indiretamente como uma fonte de fermentação (MOON e LO, 2013).

Diretamente, os cogumelos vêm sendo utilizados para a produção de vários produtos, como por exemplo na indústria de panificação, sendo adicionados nas massas na forma de pó (LIN *et al.*, 2008; OKAFOR *et al.*, 2012). Lin *et al.* (2008) conduziram um experimento com uma formulação de 5% de estipe de *shiitake* em substituição à farinha de trigo e obteve um pão com alto conteúdo de fibra. Machado *et al.*, (2014) elaborou um produto de confeitaria (bolo) à base de crueira adicionado de biomassa de *Lentinus citrinus* cogumelo e observou uma maior concentração de fibras e proteínas nos produtos experimentais.

Outros trabalhos têm mostrado a utilização de cogumelos comestíveis em produtos diversos. Chockchaisawasdee *et al.* (2010) no estudo realizado para desenvolver uma alternativa para melhorar a qualidade nutricional da linguiça de porco tailandesa fermentada, com foco na redução da gordura, utilizou um ingrediente saudável, o cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*). Este estudo revelou o desenvolvimento de um processo de produção alternativo viável, econômico e mais saudável para a linguiça tailandesa. O produto final formulado não só atende as normas de segurança microbiológica, como também o teor de gordura saturada foi reduzido significativamente. Assim, os autores ao final do processo obtiveram uma salsicha mais saudável em comparação ao produto tradicional.

Em outro trabalho realizado por Lemos (2009), o hambúrguer formulado com 12% de *A. brasiliensis* apresentou teor de proteína, carboidratos, fibra alimentar e cinzas superior aos hambúrgueres comerciais avaliados e o teor de lipídeos muito inferior. Com esses dados, o produto elaborado demonstrou ser uma alternativa mais saudável ao produto tradicional, pois além das propriedades nutricionais e gastronômicas, o cogumelo apresenta inúmeras propriedades medicinais.

Indiretamente, os cogumelos vêm sendo utilizados para produzir novos produtos. Lin *et al.* (2010) utilizaram a estipe de *Lentinus edodes* como uma fonte alternativa de nitrogênio em fermentações alcoólicas, uma vez que os estipes possuem alto conteúdo de proteínas e eram geralmente descartadas. Okamura-Matsui *et al.* (2003), demonstraram a habilidade de *Pleurotus ostreatus*, *Tricholoma matsutake* e *Agaricus blazei* de substituir *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cerveja, vinho e saquê.

4.5 Alimentos funcionais

O conceito de alimentos funcionais foi inicialmente introduzido no Japão na década de 80 e se referia aos alimentos utilizados na dieta normal e que, além de suas funções básicas nutricionais, demonstram benefícios fisiológicos ou reduzem o risco de doenças crônicas. Esses alimentos, designados para uso específico na saúde e conhecidos como “*foshu*”, *foods for specified health use*, trazem o selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem Estar japonês (ROSA e COSTA, 2016).

A legislação brasileira, por sua vez, define alimentos funcionais como os alimentos ou ingredientes que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (ANVISA, 1999).

Diversos ingredientes podem ser adicionados em produtos alimentícios com a intenção de conferir características funcionais. A crescente preocupação por uma alimentação saudável coloca alguns alimentos, como proteínas do soro de leite, soja, aveia, gergelim, chia, psyllium, quinoa e linhaça na lista de preferência de um número cada vez maior de consumidores (OLIVEIRA, 2013).

Segundo Barbosa *et al.* (2010) fatores como envelhecimento das populações, as descobertas científicas que vinculam determinadas dietas às doenças, o estilo de vida nas grandes cidades, influenciam a busca por um estilo de vida mais saudável, aumentando a procura por alimentos funcionais e evidenciando cada vez mais essa tendência de consumo. A busca por alimentos funcionais tem formado diferentes nichos de mercado como, por exemplo, os de produtos benéficos ao desempenho físico e mental, para saúde cardiovascular, saúde gastrointestinal, energéticos, para relaxamento e até mesmo com fins estéticos.

O mercado de alimentos e bebidas ligados à saúde e ao bem-estar movimentou cerca de 750 bilhões de dólares no ano de 2013, destes 264 bilhões correspondiam aos produtos funcionais fortificados. A América Latina foi responsável por movimentar 45 bilhões desse montante ou cerca de 17% do mercado de produtos funcionais e o Brasil responsável por movimentar 14,6 bilhões desse total (SCHULKA e COLLA, 2014).

4.6 Aproveitamento de resíduos agroindustriais

Em todo mundo, são geradas milhões de toneladas de resíduos provenientes de atividades agroindustriais que, em pequena escala, são utilizados para produção de ração animal ou dispostos no campo para compostagem. A maior parte destes resíduos ainda é descartada sem tratamento, causando danos ao meio ambiente (MELO *et al.*, 2011). Além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-

primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição (PELIZER *et al.*, 2007).

Os resíduos originados pela indústria apresentam variações, dependendo do tipo de insumo a ser processado e pode ser composto de cascas, sementes, caroços e até mesmo a polpa (NASCIMENTO e FRANCO, 2015). No processamento de frutas para obtenção de sucos e polpas são gerados cerca de 40% de resíduos agroindustriais (INFANTE *et al.*, 2013; NASCIMENTO e FRANCO, 2015). Estes resíduos possuem alto teor de nutrientes como proteínas, carboidratos, lipídios, fibras, flavonoides, antioxidantes e podem ser utilizados para a produção de alimentos. Além disso, são insumos de baixo custo, que podem ser de grande interesse às indústrias de alimentos, pois enriquecem o produto final sem onerar significativamente o custo de produção. (MAURO *et al.*, 2010; MIRANDA *et al.*, 2013).

Estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de aproveitar os resíduos oriundos do processamento de frutas, hortaliças, grãos, entre outras matérias primas. Arimatéia *et al.* (2016) elaboraram um pão de forma enriquecido com resíduos de goiaba e mangaba, observando que algumas das características físico-químicas inerentes aos resíduos agroindustriais das frutas foram incorporadas ao produto. Bender *et al.* (2016) estudaram a utilização de farinha de casca de uva para formulação de um snack, o que resultou em um produto enriquecido nutricionalmente, principalmente com fibras e compostos fenólicos. Miranda *et al.* (2013), investigou o uso da farinha da casca de maracujá como ingrediente da produção de bolos e observou que a farinha do resíduo enriqueceu nutricionalmente o produto, aumentando a quantidade de fibras destes. Coelho e Wosiacki (2010) desenvolveram produtos panificados adicionados de farinha de casca de maçã, resíduo que apresentou 43% de fibra em base seca e caracterizado como alternativa potencial de fibra alimentar.

4.7 Abacaxi (*Ananas comosus*)

Abacaxis, ou ananás, são frutos pertencentes à família Bromeliaceae e ao gênero *Ananas* originários da América do Sul (SILVA *et al.*, 2013). São frutos cilíndricos, com polpa de cor branca, amarela ou laranja-avermelhada, com peso médio de 1 Kg (GRANADA *et al.*, 2004; RODRIGUES e SARAIVA, 2007).

A produção mundial total de abacaxis está entre cerca de 16 e 19 milhões de toneladas, o Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial, atrás apenas da Costa Rica. No ano de 2013, o Brasil produziu 2.483.831 toneladas desse fruto (FAO, 2013). No Estado do Amazonas, o abacaxi é a cultura temporária com maior produção, sendo que no ano de 2015 o Estado produziu 69 milhões de frutos. Desta produção, 79% é oriunda do município de Itacoatiara, região do Novo Remanso (IBGE, 2015).

Os talos, cascas, coroas e cilindros do abacaxi são considerados rejeitos pelas indústrias processadoras apesar de possuírem um elevado teor de açúcares e fibras (MARTIN, 2012). A porção comestível do fruto representa apenas 22, 5% a 35% do seu volume total e cerca de 4,5 % corresponde à casca e 73% à sua parte vegetativa (RODRIGUES e SARAIVA, 2007; SILVA e ZAMBIAZI, 2008).

Dados de Gondim (2005) mostram que a casca do abacaxi apresenta nutrientes maiores do que em suas partes comestíveis, contendo grande quantidade de fibras alimentares, proteínas e até mesmo cálcio. A tabela 1 mostra a comparação entre as duas partes dessa fruta. Santos *et al.* (2010) obtiveram valores de 0,3% lipídios, 1,08% de proteínas e 2,06% de fibras para esse resíduo.

Tabela 1. Teor de nutrientes analisados da casca e da polpa de abacaxi.

Parâmetro	100g de amostra <i>in natura</i> de abacaxi	
	Casca	Parte comestível
Umidade (g)	78,13	86,00
Cinzas (g)	1,03	0,40
Lipídeos (g)	0,55	0,00
Proteínas (g)	1,45	1,00
Fibras (g)	3,89	1,00
Carboidratos (g)	14,95	12,00
Calorias (Kcal)	70,55	48,00
Cálcio (mg)	76,44	22,00
Ferro (mg)	0,71	0,30
Sódio (mg)	62,63	<0,40
Magnésio (mg)	26,79	18,00
Zinco (mg)	0,45	0,30
Cobre (mg)	0,11	0,11
Potássio (mg)	285,87	131,00

Adaptado de GODIM *et al.* (2005).

Os valores nutricionais da casca do abacaxi fazem dele um resíduo com grande potencial para ser utilizado na alimentação humana (MARTIN *et al.*, 2012). A casca de abacaxi possui um baixo teor lipídico, possibilitando que este resíduo seja utilizado em dietas que visam perda de peso. A grande quantidade de fibras presente na casca também age regularizando as funções intestinais e prevenindo uma série de complicações fisiológicas decorrentes da falta de fibras no organismo como, por exemplo, obstipação intestinal, prisão de ventre, doenças cardiovasculares e câncer de intestino (GODIM *et al.*, 2005; RODRIGUES e SARAIVA, 2007).

5 METODOLOGIA

5.1 Matéria Prima

Os bioprodutos gerados pela fermentação semi-sólida da casca de abacaxi pelos cogumelos comestíveis (separadamente) foram produzidos conforme citado por Souza *et al.* (2016). Nesta pesquisa foram utilizados três tipos de bioprodutos como matéria prima: O bioproduto I - constituído por casca de abacaxi miceliada por *Pleurotus albidus*; bioproduto II - casca de abacaxi miceliada por *Pleurotus ostreatus* var. *florida* e; bioproduto III - casca de abacaxi miceliada por *Lentinus citrinus*. Todas as matérias primas foram acondicionadas em frascos de vidro lacrados, previamente esterilizados. Os três bioprodutos foram desidratados e triturados até a obtenção de um pó fino.

5.2 Escaneamento por microscopia eletrônica

A microestrutura da casca de abacaxi e dos bioprodutos foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura com utilização de microscópio eletrônico modelo Quanta 250 (FEI Company), em diferentes magnitudes. Nas análises foi utilizado potencial de aceleração de 15 kV (TSUJIKAWA *et al.*, 2003).

5.3 Determinação da atividade biológica

5.3.1 Preparação dos extratos

Para preparação dos extratos, 2 g dos bioprodutos foram adicionados em 20 mL de água destilada esterilizada, em frascos de Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram mantidos a 30 °C, 180 rpm. Após 30 minutos os extratos brutos foram recuperados por

filtração em tecido de algodão e filtrados em membrana de polietersulfônica com porosidade de 0,22µm para análises posteriores (CHUTMANOP *et al.*, 2008).

5.3.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A concentração de fenóis totais foi quantificada pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). Em placas de 96 poços foi adicionado 10 µL dos extratos numa concentração de 100 mg/ml e 50µL de Folin-Ciocalteu, incubados no escuro por 8 minutos a temperatura ambiente. Logo após esse período foi adicionado 240 µL de solução saturada de carbonato de sódio 0,4% e incubado novamente por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura na absorvância em 715 nm no Multimode Detetor DTX 800 (Beckman Coulter), sendo que o teor fenólico das amostras foi expressa em mgEAG quando comparado com o padrão ácido gálico (SIGMA, G7384-100G).

5.3.3 Determinação da atividade antioxidante

A atividade sequestrante do radical lipossolúvel DPPH (SIGMA) foi realizado segundo metodologia de Molyneux (2004). Para os testes foi preparada uma solução de 2 µg/mL de DPPH (SIGMA®) com código D9132-5G em etanol. Esta solução foi diluída com etanol até à absorvância do controle (DMSO) de 1,000±0,1. Em cada poço da microplaca de 96 poços, foram adicionados 270 µL de DPPH e 30 µL de cada amostra na concentração de 100 mg/mL. Como controle positivo foi utilizado ácido gálico e, para o controle negativo foram utilizados 270 µL de DPPH e 30 µL de etanol. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro e, a leitura da absorvância foi realizada em 492 nm no Multimo de Detetor DTX 800 da Beckman. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de captura do radical DPPH. A capacidade de sequestrar radial livre foi expressa pelo percentual de inibição de oxidação do radical, conforme a equação I.

$$Inibição (\%) = 100 - \frac{Absorbância\ da\ amostra}{Absorbância\ do\ controle} \times 100 \quad \text{Equação (I)}$$

5.4 Determinação da digestibilidade de proteína *in vitro*

A digestibilidade proteica *in vitro* foi determinada de acordo com o método de Akeson e Stahman (1964) e Paiva *et al.* (2015). Uma amostra de 0,775g do bioproduto foi homogeneizada com 1,5 mg de pepsina, em 10 mL de ácido clorídrico 0,1N. Nesta solução foram adicionados 500 µL digluconato de clorexidina 10mg/mL (Merthiolate®, Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S/A), para inibir o crescimento microbiano. A mistura reacional foi incubada por 24 horas, a 37 °C. Ao término da reação, a amostra foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio 0,2 M. Nessa mistura foi adicionada 10 mL de solução de pancreatina em tampão fosfato, pH 8,0 (0,5 mg/10 mL). Após 24 horas, a enzima foi inativada pela adição de 10 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v), para precipitar a proteína não digerida. A amostra foi centrifugada a 8.000 xg, por 15 minutos. A proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC 2002). O resultado foi expresso em porcentagem de nitrogênio digerido, em relação ao nitrogênio total da amostra inicial (Equação II).

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \frac{\text{nitrogênio digerido}}{\text{nitrogênio total da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação (II)}$$

5.5 Bioensaio de toxicidade dos extratos brutos frente à *Artemia salina*

O teste de toxicidade foi avaliado segundo metodologia de Atayde (2011). Os cistos de *Artemia salina* (0,1% p/v) foram incubados em solução de sal marinho não iodado (3% p/v) por 26 horas, sob luminosidade constante, a 30 °C e 140 rpm. Em uma microplaca de 24 poços foram adicionados 200 µL do extrato (100 mg/ml), 1700 µL de solução de sal marinho e 100 µL de suspensão de larvas de *A. salina*. A microplaca foi mantida sob luminosidade constante, a 30 °C, por 24 horas. A mortalidade das larvas foi determinada pela ausência de mobilidade observada sob estereomicroscópio. A toxicidade foi classificada como: não tóxico (0-9%), ligeiramente tóxico (10-49%), tóxico (50-89%), e altamente tóxico (90-100%). Para o cálculo da porcentagem foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{nº de náuplios mortos}}{\text{total de náuplios}} \times 100 \quad \text{Equação (III)}$$

5.6 Determinação da atividade hemolítica qualitativa

A atividade hemolítica dos extratos brutos contra hemácias de carneiro foi realizada pela técnica de hemólise em tubos contendo sangue de carneiro desfibrinado (Ebefarma[®]), de acordo com a metodologia preconizada por Carneiro *et al.* (2011). Uma solução de sangue de carneiro desfibrinado a 2% (v/v) foi preparada em tampão fosfato, pH 7,4. Os extratos foram diluídos em soro fisiológico e testados em concentrações de 1000 a 100 µg/ml. Um volume de 1,0 mL da suspensão de sangue foi adicionado a cada tubo contendo os extratos e estes foram homogeneizados lentamente e deixados em repouso. Após 60 minutos, os tubos foram homogeneizados novamente e mantidos em repouso por mais 24 horas. Como controle negativo foi utilizado soro fisiológico e como controle positivo solução de Triton-X. Os resultados foram descritos como a presença ou ausência de hemólise, baseando-se na coloração do sobrenadante. A presença de um precipitado de células indica um resultado negativo.

5.7 Avaliação da citotoxicidade utilizando fibroblastos humanos MRC5

5.7.1 Linhagem e cultura celular

Neste teste, foram utilizados fibroblastos humanos (MRC5) do Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM. As linhagens foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Ampicilina (p/v). As células foram acondicionadas em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C. O modelo de estudo proporcionou a comparação do efeito citotóxico dos extratos dos bioprodutos, em diferentes concentrações, sobre linhagens de fibroblastos humanos MRC5.

5.7.2 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos extratos dos bioprodutos foi avaliada por meio do teste de Alamar Blue, conforme metodologia descrita por Ahmed *et al.* (1994). Neste teste o Alamar Blue (resazurina) de cor azul e não fluorescente, é reduzido a resofurina, de cor rosa e fluorescente, pelas células viáveis. As células foram transferidas para placas com 96 poços na concentração de 0,5 x 10⁴ células por poço. Esta placa foi mantida a 37 °C com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este período as células foram tratadas na

concentração única de 200 µg/ml de extrato durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizada a doxorrubicina (1720 uM) e como controle negativo DMSO 0,1% (v/v). Três horas antes do final de cada tempo de tratamento foi acrescentado 10 µL do Alamar Blue 0,02% (v/v) . A leitura das placas foi realizada em Leitor de microplaca na região da fluorescência a 465 nm e 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 5.0.

5.8 Formulação dos *shakes*

A formulação dos *shakes* foi baseada no levantamento dos ingredientes dos rótulos das formulações disponíveis no mercado e no trabalho de Araújo *et al.* (2013). Os produtos foram compostos de uma parte fixa e outra parte variável. A parte fixa da formulação foi elaborada com maltodextrina, colágeno hidrolisado, leite desnatado, gelatina sem açúcar sabor morango e goma xantana (Tabela 2).

Na parte variável da formulação foi utilizado farinha de aveia e bioproduto em pó. Para elaboração do *shake* padrão foi utilizada farinha de aveia e nas amostras foram adicionadas o bioproduto, os demais ingredientes permaneceram inalterados. Após a mistura dos constituintes foi obtido o produto final. A reconstituição do produto do tipo *shake* foi feita com água mineral ou leite.

Tabela 2. Formulação dos *shakes* para preparo de 500g do produto.

Ingredientes	<i>shake</i> padrão	<i>shake</i> I*	<i>shake</i> II**	<i>shake</i> III***
Farinha de aveia (g)	115,4	0	0	0
Pó do bioproduto (g)	0	115,4	115,4	115,4
Maltodextrina (g)	115,4	115,4	115,4	115,4
Leite desnatado em pó (g)	153,8	153,8	153,8	153,8
Colágeno hidrolisado (g)	19,2	19,2	19,2	19,2
Goma xantana (g)	19,2	19,2	19,2	19,2
Gelatina sem açúcar sabor morango (g)	76,9	76,9	76,9	76,9

* *shake* preparado com o bioproduto I – casca de abacaxi e *P. albidus*; ** *shake* preparado com o bioproduto II – casca de abacaxi e *Pleurotus ostreatus var. florida*; *** *shake* preparado com o bioproduto III – casca de abacaxi e *L. citrinus*.

5.9 Determinação da atividade de água dos bioprodutos e dos produtos do tipo *shake*

A determinação da atividade de água dos bioprodutos e dos produtos do tipo *shake* foi realizada utilizando um medidor de atividade de água, modelo AQUALab 4TEV a uma temperatura de 25 °C.

5.10 Determinação da acidez titulável e pH dos *shakes*

O pH dos *shakes* foi medido usando medidor de pH digital (PHTEK, PHS-3E) pré-calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0. A acidez titulável dos batidos foi medida por titulação com NaOH 0,1 N e fenolftaleína como indicador, de acordo com metodologia preconizado pelo Instituto Adolpho Lutz (2008).

5.11 Determinação físico-química dos *shakes*

5.11.1 Determinação da composição físico-química dos *shakes*

- **Umidade:** foi determinada por dessecação em estufa com circulação de ar a 105 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante (A.O.A.C., 2002).
- **Proteína:** foi determinada pela concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro *Kjeldahl*, aplicando o fator de conversão 6,26 (A.O.A.C., 2002).
- **Fibras totais:** A fibra bruta foi determinada através de digestão ácido-básica, segundo método de Weende estabelecido pela A.O.A.C (2002).
- **Cinzas (resíduo mineral fixo):** foi determinado por incineração do material em mufla a 550-660 °C até obtenção de peso constante (A.O.A.C., 2002).
- **Lipídios:** foi obtido com misturas de solventes a frio segundo o método *Bligh and Dyer* (BLIGH e DYER, 1959).
- **Carboidratos totais:** foram estimados por diferença (100 – gramas totais de umidade, proteína, lipídios, cinzas e fibra alimentar) (LATINFOODS, 2002; NEPA, 2006).
- **Energia:** a energia total metabolizável, expressa em kilocalorias (kcal), foi calculada pelo fator de conversão de Atwater: (4 g proteína) + (4 g carboidratos totais) + (9 g de lipídeos), preconizados pelo Latinfoods (2002) e NEPA (2006).

5.11.2 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 $\text{HNO}_3 + \text{HCl O}_4$ (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 micronutrientes (Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg^{-1} .

5.12 Determinação da qualidade microbiológica dos produtos

A análise microbiológica foi realizada baseada na determinação do número mais provável de bactérias dos grupos: coliforme totais, coliformes de origem fecal ou *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella*, de acordo com a metodologia preconizada pela a RDC n°12 da ANVISA (SILVA *et al.*, 2007).

5.13 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando análise estatística descritiva (média, desvio padrão, etc.). Os dados referentes à composição centesimal do produto final produzido com diferentes concentrações de casca de abacaxi enriquecido com biomassa de cogumelo comestível foram submetidos à análise de Variância ANOVA e Tukey ao nível de 5% de significância.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Anvisa. Portaria CVS-6/99, de 10.03.99. Disponível em: <[www.http://portal.anvisa.gov.br](http://portal.anvisa.gov.br)>.

AOAC (2002) Official methods of analysis of AOAC Intl. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.

ARAÚJO, T. M. F.; ARCANJO, S. R. S.; OLIVEIRA, A. M. C.; PORTELA, J. V. F.; BESERRA, F. J. Desenvolvimento de *shake* diet em pó à base de farinha de casca de banana. *Higiene Alimentar*, v. 27, p. 98-102, 2013.

ARIMATÉIA, C. C.; PAGANI, A. A. C.; CARVALHO, M. S. Elaboração e composição química de pão de forma enriquecido com resíduos agroindustriais de frutas. *Higiene Alimentar*, v. 30, p. 100-104, 2016.

ATAYDE, H. M.; CARNEIRO, A. L. B.; MARTINS, M. S.; PALHETA, R. A. Bioensaios de toxicidade com espécies de *Artemia*. In: Maria Francisca Simas Teixeira; Taciana de Amorim Silva; Rosana Antunes Palheta; Ana Lúcia Basílio Carneiro; Hérlon Mota Atayde (Org.). *Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)*. 1 ed. Manaus: EDUA, v. 1, p. 190-207, 2011.

BARBOSA, L.; MADI, L.; TOLEDO, M. A.; REGO, R. A. As tendências da alimentação. In: **Brasil Food Trends**, 2020. Pp. 39-47, 2010.

BENDER, A. B. B.; LUVIELMO, M. M.; LOUREIRO, B. B.; SPERONI, C. S.; BOLIGON, A. A.; SILVA, L. P.; PENNA, N. G. Obtention and characterization of grape

skin flour and its use in an extruded snack.. Brazilian Journal of Food Technology, v. 19, 2016.

BLIGH, E. C.; DYER, W. J. A Rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal Biochemistry Physiology, v. 37, n.8, p. 911-917, 1959.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398. Brasília: Ministério da Saúde; 1999.

CARVALHO, C. S. M.; SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N. Mushrooms of the *Pleurotus* genus: a review of cultivation techniques. Interciencia, v. 35, n.3, 2010.

CHOCKCHAISAWASDEE, S.; NAMJAIDEE, S.; POCHANA, S.; STATHOPOULOS, C. E. Development of fermented oyster-mushroom sausage. Asian Journal of Food and Agro-Industry, v. 3, n. 1, p-35-43, 2010.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 83, p. 1012–1018, 2008.

COELHO, L. M.; WOSIACKI, G. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 3, p. 582-588, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2.ed. Brasília-DF, Informação Tecnológica, 2009. 628p.

FERREIRA, V.L.P.; ALMEIDA, T. C. A. de; PETTINELLI, M. L. C. de V.; SILVA, M. A. A. P. da; CHAVES, J. B. P.; BARBOSA, E. M. de M. Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos. Manual: Série Qualidade, SBCTA, 2000. 127p.

FINIMUNDY, T.C.; GAMBATO, G.; FONTANA, R.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; HESS, J.; HENRIQUES, J. A. P.; DILLON, A. J. P.; ROESCH-ELY, M. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising *in vitro* antitumor activity. *Nutrition Research*, v. 33, n. 1., p. 76-84, 2013.

FAO. FAOSTAT statistics database 2013. Agriculture. <http://faostat.fao.org/> Rome, Italy.

FONSECA, T. R. B; SILVA, T. A.; ALECRIM, M. M.; CRUZ-FILHO, R. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, v. 9, n. 30, p. 1814-1822, 2015.

GONÇALVES, C. C. M.; PAIVA, P. C. A.; DIAS, E.S.; SIQUEIRA, F.G.; HENRIQUE, F. Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Fries) Sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para a alimentação animal. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, p. 220-225, 2010.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

GRANADA, G. G.; ZAMBAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. *B. CEPPA*, v. 22, n. 2, p. 405-422, 2004.

HELENO, S. A; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORALES, P.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; GLAMOCLIJA, J.; SOKOVIC, M.; Ferreira, ICFR. Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. *Food Science and Technology*, v. 63, p. 799-806, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Estados, Amazonas. 2015. Disponível em <<https://cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/am/pesquisa/14/1019>>. Acesso em ago. 2017.

INFANTE, J.; SELANI, M. N.; TOLEDO, N. M. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropicais. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food Nutrition*, v. 24, n. 1, p. 87-91, 2013.

KARUNARATHNA, S. C.; YANG, Z. L.; ZHAO, R. L.; VELLINGA, E. C.; BAHKALI, A. H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. Three new species of *Lentinus* from northern Thailand. *Mycological Progress*, v. 4, p. 389–398, 2011.

KIM, J.; LEE, S. M.; BAE, I. Y.; PARK, H.; LEE, H.G.; LEE, S. (1–3)(1–6)- β -Glucan-enriched materials from *Lentinus edodes* mushroom as a high-fibre and low-calorie flour substitute for baked foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, p. 1915–1919, 2011.

KIRSCH, L. de S.; EBINUMA, V. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Mycelial biomass and biochemical properties of proteases produced by *Lentinus citrinus* DPUA 1535 (Higher Basidiomycetes) in submerged cultivation. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 5, p. 505–515, 2013.

KIRSCH, L. S.; MACEDO, A. J. P.; TEIXEIRA, M. F.S. Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 3, 2016.

LATINFOODS. Red Latinoamericana de Composición de Alimentos. 2002. Disponível em: <<http://www.inta.cl/latinfoods/>> Acesso em jul. 2011.

LECHNER, B. E.; ALBERTÓ, E. Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *P. albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 28, n. 4, p. 148-154, 2011.

LECHNER, B. E.; WRIGHT, J. E. The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia*, v. 96, n.4, p. 845–858, 2004.

LEMOS, F. M. R. Elaboração e caracterização de produto análogo a hambúrguer de cogumelo *Agaricus brasiliensis*. 2009. 147p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LIN, L. Y.; TSENG, Y. H.; LI, R. C.; MAU, J. L. Quality of shiitake stipe bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 32, p. 1002–1015. 2008.

LIN, P.; HUANG, S.; MAU, J.; LIOU, B.; FANG, T. J. A novel alcoholic beverage developed from shiitake stipe extract and cane sugar with various *Saccharomyces* strains. *LWT – Food Science and Technology*, v.43, p. 971–976, 2010.

MACHADO, A. R. G.; TEIXEIRA, M. F. S.; KIRSCH, L. S.; CAMPELO, M. C. L., OLIVEIRA, I. M. (in press). Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocelulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2015.

MACHADO, A. R. G. Elaboração de um produto de panificação à base de crueira e cogumelo comestível. Dissertação (Mestrado em Ciências do Alimento). Universidade Federal do Amazonas, p. 66, 2014.

MARTIN, J. G. P.; MATTA JÚNIOR, M. D.; ALMEIDA, M. A.; SANTOS, T.; SPOTO, M. H. F. Avaliação sensorial de bolo com resíduos de casca de abacaxi para suplementação do teor de fibras. *Revista Brasileira de produtos agroindustriais*, v. 14, n.3, p. 281-287, 2012.

MAURO, A. K.; SILVA, V. L. M.; FREITAS, M. C. J. Caracterização física, química e sensorial de cookies confeccionados com farinha de talo de couve (FTC) e farinha de talo de espinafre (FTE) ricas em fibra alimentar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 3, p. 719-728, 2010.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural*, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.

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. *Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food Nutrition*, v. 24, n. 2, p. 225-232, 2013.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, vol. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.

MOON, B.; LO, Y. M. Conventional and novel applications of edible mushrooms in today's food industry. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 38, p. 2146-2153, 2013.

NASCIMENTO, W. B.; FRANCO, C. R.; Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 6, p. 1968-1987, 2015.

NEPA. Tabela de Composição de Alimentos. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. UNICAMP. Campinas, Brasil. 105 pp, 2006.

OKAFOR, J. N. C.; OKAFOR, G. I.; OZUMBA, A.U.; ELEMO, G. N. Quality characteristics of bread made from wheat and Nigerian oyster mushroom (*Pleurotus plumonarius*) powder. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 11, p. 5–10. 2012

OKAMURA-MATSUI, T.; TOMADA, T.; FUKUDA, S.; OHSUGI, M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 23, p. 133–144, 2003.

OLIVEIRA, D. F.; COELHO, A. R.; BURGARDT, V. C. F.; HASHIMOTO, E. H.; LUNKES, A. M.; MARCHI, J. F.; TONIAL, I. B. Alternativas para um produto cárneo mais saudável: uma revisão. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.16, n. 3, p. 163-174, 2013.

PAIVA, F. C.; ALECRIM, M. M.; TEIXEIRA, M. F. S.; KIRSCH, L. S.; JESUS, R. S. Produção de hidrolisado de pirarucu utilizando-se protease de *Aspergillus flavo-furcatis* e pancreatina. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 45, n. 1, p.89-96, 2015.

PALACIOS, I.; LOZANO, M.; MORO, C.; D'ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M.A.; MARTÍNEZ, J.A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, v. 128, p. 674-678, 2011.

PATEL, Y.; NARAIAN, R.; SINGH, V. K. Medicinal properties of *Pleurotus* species (Oyster Mushroom): A Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, v. 3, n.1, p. 01-12, 2012.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*, v. 1, p. 119-127, 2007.

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*, v. 14, n. 1, p. 67-75, 2002.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Os reinos dos fungos. 2 ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2004. 605 p.

RAI, M.; TIDKE, G.; WASSER, S. P. Therapeutic Potential of Mushrooms. *Natural Products Radiance*, v. 4, n. 4, p. 246-257, 2005

RAMPINELLI, J. R. Produção de *Pleurotus djamor* e avaliação do seu potencial nutricional. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

REIS, F. S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 191-197, 2012.

RIVAS, P. M. S.; PEREIRA FILHO, A. A.; SANTOS, F. A.S.; ROSA, I. G. Avaliação de substratos pectocelulósicos para o cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* sp. (Agaricales). *Cadernos de Pesquisa*, v. 17, n. 3, 2010.

RODRIGUES, M. V.; SARAIVA, F. Z. Elaboração de produto alimentício através da farinha da casca e miolo do abacaxi. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel.

ROSA, C. O. B.; COSTA, N. M. B. Alimentos funcionais: histórico, legislação e atributos. In: *Alimentos Funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos*. Costa, N. M. B.; ROSA, C. O. B. 2 ed. Rio de Janeiro: Rúbio, 2016. p. 3-16.

ROUT, D.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ISLAM, S. S. The structure of a polysaccharide from Fraction-II of an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research*, v. 314, p.995-1002, 2006.

ROY, S. K.; DAS, D.; MONDAL, S.; MAITI, D.; BHUNIA, B.; MAITI, T. K.; ISLAM, S.S. Structural studies of an immunoenhancing water-soluble glucan isolated from hot water extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cultivar Assam Florida. *Carbohydrate Research*, v. 344, p. 2596–2601, 2009.

SANCHÉZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p. 1321-1337, 2010.

SALES-CAMPOS, C.; ARAUJO, L. M; MINHONI, M. T. A; ANDRADE, M. C. N. Centesimal composition and physical-chemistry analysis of the edible mushroom

Lentinus strigosus occurring in the Brazilian Amazon. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 85, n. 4, p. 1537-1544, 2013.

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N. Use of wood residues for the cultivation of edible mushroom *Lentinus strigosus* in the Amazon. Acta Amazonica, v. 41, p. 1-8, 2011.

SANTOS, A. R.R.; CIABOTTI, S.; PEREIRA, J. M. A.; GONÇALVES, C. A. A.; CAMPAGNOL, P. C. B. Avaliação da composição centesimal de casca de abacaxi. In: Seminário de Iniciação Científica e Inovação Tecnológica, 3, 2010. Uberaba. Disponível em: http://www.iftm.edu.br/proreitorias/pesquisa/3o_seminario/trabalhos/ali_avaliacao_da_composicao_centesimal.pdf. Acesso em fev. 2016..

SCHULKA, A. C.; COLLA, E. X. Alimentos funcionais e suas perspectivas no mercado brasileiro. Food Ingredientes Brasil, n. 30, p. 84-85, 2014.

SILVA, A. F. R.; ZAMBIAZI, R. C. Aceitabilidade de geléias convencional e *light* de abacaxi obtidas de resíduos da agroindústria. B.CEPPA, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2008.

SILVA, D. I. D.; NOGUEIRA, G. D. R.; DUZZIONI, A. G. Changes of antioxidant constituents in pineapple (*Ananas comosus*) residue during drying process. Industrial Crops and Products, v.50, p. 557-562, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo-SP: Editora Livraria Varela, 552 p., 2007

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with PhosphomolybdicPhosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture, v.16, n.3, p.144-158, 1965.

SOUZA R.A.T.; FONSECA, T.R.B.; KIRSCH, L.S.; SILVA, L.S.C.; ALECRIM, M.M.; CRUZ-FILHO, R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Nutritional composition of bioproducts generated from semi-solid fermentation of pineapple peel by edible mushrooms. African Journal of Biotechnology, v. 15, n. 12, p. 451-457, 2016.

TEIXEIRA, M.F.S.; PUTZKE, J.; PALHETA, R. A.; MATOS, I. T. S. R.; TEIXEIRA, L. S.; SILVA, T. A. Herbário micológico: patrimônio de cogumelos da Amazônia. In: 61ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2009, Manaus. Anais da 61ª Reunião anual da SBPC: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2009.

VALVERDE, M.E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, v. 2015, p. 1-14, 2015.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom Science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 12, n. 1, p.1-16, 2010.

YANG, Z.; XU, J.; FU, Q.; FU, X.; SHU, T.; BI, Y.; SONG, B. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotuseryngii* on mice bearing renal cancer. *Carbohydrate Polymers*, v. 95, n. 2, p. 615-620, 2013.

ZENT, E. L.; ZENT, S.; ITURRIAGA, T. Knowledge and use of fungi by a mycophilic society of the Venezuelan Amazon. *Economic Botany*, v. 2, p.214–226, 2004.

7 RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Digestibilidade *in vitro*, atividade antioxidante e toxicidade de bioprodutos enriquecidos com cogumelos comestíveis.

Pesquisa Agropecuária Brasileira

**Digestibilidade *in vitro*, atividade antioxidante e toxicidade de bioprodutos
enriquecidos com cogumelos comestíveis**

Raiane Áila Teixeira Souza⁽¹⁾, Salomão Rocha Martim⁽²⁾, Leilane Bentes de Souza⁽³⁾,
Marne Carvalho de Vasconcellos⁽⁴⁾ e Maria Francisca Simas Teixeira⁽¹⁾

⁽¹⁾ Coleção de Cultura DPUA. Universidade Federal do Amazonas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.
aila.raiane@gmail.com, mteixeira@ufam.edu.br

⁽²⁾ Faculdade Estácio do Amazonas. Av. Constantino Nery, 3693, Chapada, 69050-001, Manaus, Amazonas, Brasil. salomao.martim@gmail.com.

⁽³⁾ Universidade Federal do Amazonas, mestranda em Ciências Farmacêuticas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.
leilane.bentes@gmail.com.

⁽⁴⁾ Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.
marnevasconcellos@yahoo.com.br

Resumo

Os cogumelos comestíveis são uma boa alternativa para a bioconversão dos resíduos da indústria alimentar. Os três bioprodutos formulados com casca de abacaxi e os cogumelos comestíveis *Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida* e *Lentinus citrinus* tiveram a atividade da água determinada, assim como a capacidade antioxidante,

atividade fenólica total e digestibilidade *in vitro* de proteínas. A toxicidade dos bioprodutos foi investigada utilizando o teste de toxicidade com *Artemia salina*, teste de atividade hemolítica qualitativa e avaliação da citotoxicidade contra fibroblastos humanos MCR5. Os dados mostraram baixa atividade da água, atividade antioxidante variando de 7,21% a 62,17% e atividade fenólica total em torno de 3 mgEAG/g de extrato. Todos os bioprodutos apresentaram altos níveis de digestibilidade. Os três bioprodutos não mostraram toxicidade nas doses testadas.

Palavras-chave: *Pleurotus*, *Lentinus*, resíduos agroindustriais, abacaxi.

Introdução

Cogumelos são considerados uma iguaria com alto valor nutricional e funcional, sendo produtos de extrema relevância comercial devido às suas qualidades organolépticas, propriedades medicinais e significativa importância econômica (Valverde *et al.*, 2015). Estes macrofungos podem crescer em uma grande variedade de resíduos e em diversos ecossistemas são importantes decompositores de matéria orgânica, degradando a celulose, hemicelulose e lignina (Adebayo e Martinez-Carrera, 2015).

O cultivo de cogumelos comestíveis em resíduos agroindustriais tem se apresentado como uma alternativa para o melhor reaproveitamento da matéria orgânica (Fonseca *et al.*, 2015). Estes resíduos são importantes fontes de fibras e ricos em antioxidantes, aumentando, assim, a sua utilização para o preparo de alimentos ou formulações nutracêuticas (Mokochinski *et al.*, 2015). Além disso, a produção de cogumelos pode originar dois produtos de alto valor agregado, os cogumelos para consumo humano e os substratos utilizados para seu cultivo, que podem ser utilizados

como ingredientes para produção de novos produtos alimentícios para alimentação humana e animal (van Kuijk *et al.*, 2015).

A seleção de um substrato de cultivo econômico e eficiente que reduza os custos de produção, é um fator de extrema importância no cultivo de cogumelos (Yang *et al.*, 2015). Neste cenário, os resíduos do processamento de abacaxi podem ser utilizados como um excelente substrato para a produção de tais insumos, pois o processamento do abacaxi gera uma grande quantidade de resíduos com constituintes nutricionais, podendo ser utilizados na alimentação humana (Bresolin *et al.*, 2013).

O objetivo deste estudo foi caracterizar a digestibilidade de proteínas *in vitro*, toxicidade, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais de três bioprodutos formulados com casca de abacaxi e micélio de cogumelos comestíveis, *Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida* e *Lentinus citrinus*, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios.

Materiais e Métodos

Matéria-prima

Os bioprodutos gerados a partir de casca de abacaxi e cogumelos comestíveis foram previamente produzidos conforme citado por Souza *et al.* (2016), no laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas e são resultados da fermentação semi-sólida da casca de abacaxi pelos cogumelos (separadamente). O bioproduto I foi originado da miceliação da casca de abacaxi por *Pleurotus albidus*, enquanto o bioproduto II foi originado pela miceliação de casca de abacaxi por *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. O último bioproduto, bioproduto III, foi composto por casca de abacaxi e o micélio do cogumelo *Lentinus citrinus*. Todos os bioprodutos foram desidratados e triturados até

obtenção de um pó fino, e mantidos em frascos selados e previamente esterilizados até sua posterior utilização.

Determinação da atividade de água

A determinação da atividade de água dos pós dos bioprodutos foram realizadas utilizando um medidor de atividade de água, modelo AQUALab 4TEV, à temperatura de 25 °C .

Escaneamento por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura da casca de abacaxi e dos bioprodutos foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura com utilização de microscópio eletrônico modelo Quanta 250 (FEI Company,), em diferentes magnitudes. Nas análises foi utilizado potencial de aceleração de 15 kV (Tsujikawa *et al.*, 2003).

Preparação do extrato aquoso

O extrato aquoso foi obtido adicionando-se 2 g, separadamente, dos bioprodutos I, II e III em 20 mL de água destilada esterilizada em frascos *Erlenmeyers* de 125 mL. As soluções foram mantidas em agitador por 30 minutos, a 30 °C, 180 rpm e após este tempo os extratos brutos foram recuperados por filtração em tecido de algodão e passados em membrana polietersulfônica 0,22 µm. Os extratos obtidos foram acondicionados para análises posteriores (Chutmanop *et al.*, 2008).

Determinação do teor de fenóis totais

O conteúdo total de fenóis dos extratos foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton e Rossi (1965). Em placas de 96 poços foram adicionados 50 µL de Folin-Ciocalteu a 10 µL de extrato (100 mg/ml). A solução foi incubada por 8 minutos, a temperatura ambiente, então a absorvância foi lida a 715 nm

(DTX 800, Beckman Coulter). Em seguida foi adicionado 240 µL de carbonato de cálcio 0,4% e a reação foi incubada por três minutos. As soluções foram lidas novamente a 715 nm. O teor fenólico das amostras foi expressa em mgEAG quando comparado com o padrão ácido gálico (SIGMA, G7384-100G).

Determinação da atividade antioxidante

A determinação de antioxidantes por DPPH é baseada na redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por Molyneux (2004). Em uma microplaca de 96 poços, 270 µL da solução de DPPH foi adicionada a 30 µL do extrato aquoso, à concentração de 100 mg/mL. A reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente na ausência de luz. Após a incubação, a absorbância foi lida a 492 nm. Ácido gálico foi utilizado como padrão positivo e a solução sem os extratos como controle negativo. A atividade antioxidante foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

Determinação da digestibilidade de proteína *in vitro*

A digestibilidade de proteína foi determinada de acordo com Paiva *et al.* (2015). Uma quantidade de 0,775 g de bioproducto foi incubada com 1,5 mg de pepsina em 10 mL de ácido hidrocloreídrico 0,1N, a 37 °C por três horas. Nesta solução foram adicionados 500 µL digluconato de clorexidina 10mg/mL (Merthiolate®, Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S/A), para inibir o crescimento microbiano. Ao término da reação, a amostra foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio 0,2 M. Nessa mistura foi adicionada 10 mL de solução de pancreatina em tampão fosfato, pH 8,0 (0,5

mg/10 mL). Após 24 horas, a enzima foi inativada pela adição de 10 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v), para precipitar a proteína não digerida. A amostra foi centrifugada a 8.000 xg, por 15 minutos. A proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl e a digestibilidade proteica *in vitro* expressa como a porcentagem do nitrogênio digerido, em relação ao nitrogênio total da amostra inicial, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \frac{\text{nitrogênio digerido}}{\text{nitrogênio total da amostra}} \times 100$$

Bioensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina*

O teste de toxicidade foi avaliado segundo metodologia de Atayde (2011). Os cistos de *Artemia salina* (0,1% p/v) foram incubados em solução de sal marinho não iodado (3% p/v) durante aproximadamente 26 horas, sob luminosidade constante, em agitador orbital a 30 °C e 140 rpm. Em uma microplaca de 24 poços foram adicionados 200 µL do extrato, 1700 µL de solução de sal marinho e 100 µL de suspensão de larvas de *A. salina*. A microplaca foi mantida sob luminosidade constante, a 30 °C, por 24 horas. A mortalidade das larvas foi determinada pela ausência de mobilidade observada sob estereomicroscópio. A toxicidade foi classificada como: não tóxico (0-9%), ligeiramente tóxico (10-49%), tóxico (50-89%), e altamente tóxico (90-100%). Para o cálculo da porcentagem foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de náuplios mortos}}{\text{total de náuplios}} \times 100$$

Atividade hemolítica qualitativa

A atividade hemolítica dos extratos brutos contra hemácias de carneiro foi realizada pela técnica de hemólise em tubos contendo sangue de carneiro desfibrinado

(Ebefarma), de acordo com a metodologia preconizada por Carneiro *et al.* (2011). Uma solução de sangue de carneiro desfibrinado foi preparada em uma suspensão a 2% (v/v) em tampão fosfato, pH 7,4. Os extratos foram diluídos em soro fisiológico e testados em concentrações de 1000 a 100 µg/mL. Um volume de 1,0 mL da suspensão de sangue foi adicionado a cada tubo contendo os extratos e estes foram homogeneizados lentamente e deixados em repouso por 60 minutos. Após este tempo os tubos foram homogeneizados novamente e mantidos em repouso por mais 24 horas. Como controle negativo foi utilizado soro fisiológico e como controle positivo solução de Triton-X. Os resultados foram descritos como a presença ou ausência de hemólise, baseando-se na coloração do sobrenadante. A presença de um precipitado de células indica um resultado negativo.

Avaliação da citotoxicidade

Para determinação da citotoxicidade foram utilizados fibroblastos humanos MRC5 mantidos no meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Ampicilina (p/v). As células foram mantidas em estufa com injeção de 5% de CO₂, a 37 °C. A citotoxicidade foi avaliada por meio do teste de Alamar Blue (Ahmed *et al.*, 1994). As células foram inoculadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço em microplaca com 96 poços e mantida a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas na concentração de 200 µg/mL de extrato dos bioprodutos durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizada a doxorubicina (1720 uM) e como controle negativo foi utilizado DMSO 0,1% (v/v). Após a adição de 10 µL de Alamar Blue a concentração de 0,02%, foi realizada a leitura das placas em leitor de microplaca (DTX800 Beckman and Coulter) nos comprimentos de onda de 465 nm e 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. As

imagens foram capturadas utilizando o programa Zen 2 da Carl Zeiss Microscopy GmbH Company e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 6.0.

Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando estatística descritiva (media e desvio padrão) e também análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software Minitab 17.0.

Resultados e Discussão

Determinação da atividade de água

Todos os bioprodutos analisados mostraram baixa atividade de água (A_w). A A_w do bioproduto I foi de 0,4964, enquanto que a do bioproduto III e do bioproduto II foi 0,5121 de A_w e 0,4393 de A_w , respectivamente. De acordo com Kim *et al.* (2016) esta é uma medida da quantidade de água não ligada disponível em um produto alimentício, que propicia o crescimento de micro-organismos. De modo geral, micro-organismos necessitam, no mínimo, 0,60 de A_w para seu crescimento enquanto que o mínimo de atividade de água requerido para o crescimento da maioria das bactérias é de cerca de 0,87. Bactérias halofílicas requerem 0,75 de A_w e para a produção de micotoxinas por bolores é necessário 0,80 de A_w (Beuchat *et al.*, 2013). Consequentemente, estes resultados indicam um fator de proteção para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deterioração dos produtos.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A imagem obtida por microscopia eletrônica pode ser observada na figura 1. Fungos de podridão branca seletivamente degradam lignina, especialmente durante a fase de colonização do substrato. Mais tarde esses fungos requerem grandes quantidades de hemicelulose e celulose como fontes de carbono para produção da energia necessária para a geração dos corpos de frutificação (van Kuijk *et al.*, 2015). Os resultados obtidos no MEV mostram a casca de abacaxi antes da colonização pelos cogumelos comestíveis (figura 1A) e depois da miceliação (figuras 1B, 1C e 1D). Pode observar-se que a miceliação causa modificações na estrutura da casca de abacaxi, devido à quebra do material lignocelulósico.

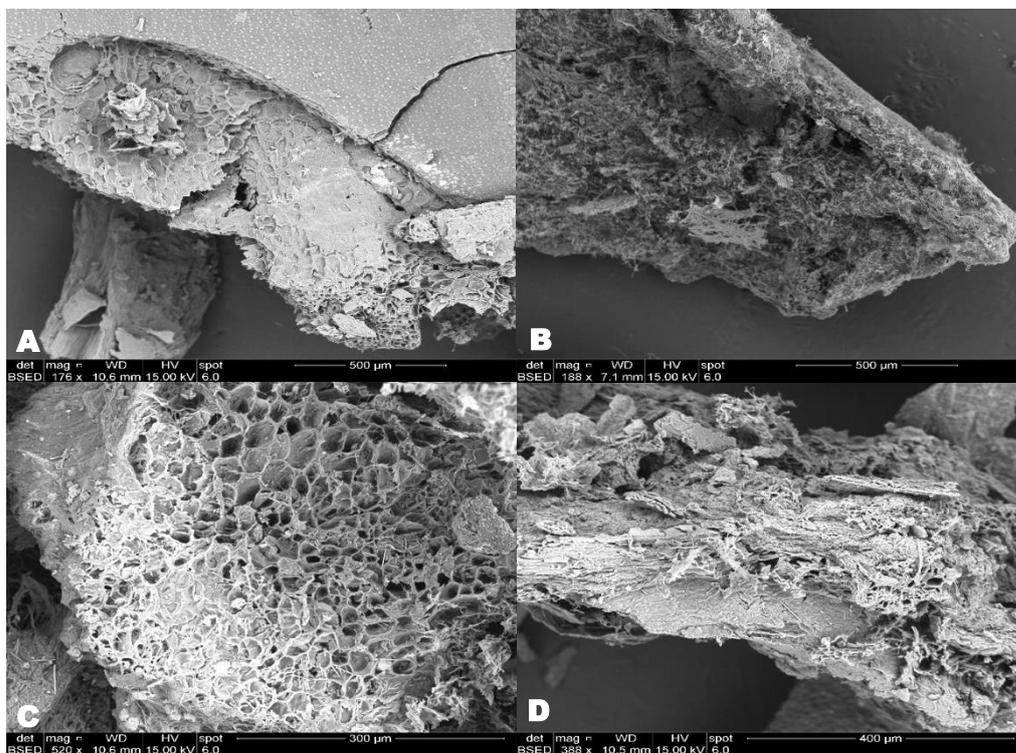


Figura 1. Imagens microscópicas em diferentes magnitudes da casca de abacaxi antes da miceliação pelos cogumelos (A) e dos bioprodutos após a miceliação por *Pleurotus albidus* (B), *Pleurotus florida* (C) e *Lentinus citrinus* (D).

Avaliação da determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante

Os resultados do teor total de fenólicos e da capacidade antioxidante dos extratos dos bioprodutos estão expressos na tabela 1. A quantidade de fenóis nas amostras analisadas variou de 3,71 a 3,87 mgGAE/g, não sendo observada diferença significativa. Os valores obtidos neste estudo foram menores em comparação àqueles encontrados por Wong & Chye (2009), que observaram valores de 23,84 mg GAE/g em extrato metanólico de *Pleurotus florida*. Stefan *et al.* (2015) também encontraram valores superiores quando avaliaram o conteúdo de fenóis em extratos de *Pleurotus ostreatus*, variando de 43,6 a 68 mg GAE/g.

Os valores obtidos na determinação da atividade antioxidante variaram de 7,21% a 62,17%, sendo observada diferença significativa entre os três produtos estudados nesta pesquisa. O extrato do biopoduto II teve o maior valor de atividade antioxidante, enquanto que o extrato do bioproduto I mostrou o menor valor. Stefan *et al.* (2015), observaram uma atividade antioxidante máxima de 47,83% e mínima de 20% em extratos metanólicos de *Pleurotus ostreatus*. Mishra *et al.* (2013) observaram valores próximos ao encontrado neste estudo para extrato do bioproduto II, 67,4 a 69,67%, para extratos de *P. eryngii*, *P. djamor* e *P. flabellatus*, enquanto que para os extratos de *P. sajor-caju* e *Pleurotus florida* os valores obtidos foram de 41,99 a 43,88%. De acordo com Marinova & Batchvarov (2011), a presença de alguns compostos secundários como carboidratos e/ou proteínas pode interferir na acurácia dos resultados expressados através do uso do radical DPPH.

As diferenças entre os valores encontrados neste estudo e em outras pesquisas podem ser devido às variedades dos tipos de substrato, tipos de cogumelos estudados e a atividade destes fungos no meio de crescimento.

Tabela 1. Atividade antioxidante e conteúdo de fenóis totais dos extratos aquosos dos bioprodutos.

Bioprodutos	Atividade antioxidante (%)	Fenóis totais (mgGAE/g extrato)
Bioproduto I	7,21 ± 1,10 ^c	3,73 ± 0,16 ^a
Bioproduto II	62,17 ± 5,28 ^a	3,71 ± 0,09 ^a
Bioproduto III	33,68 ± 1,21 ^b	3,87 ± 0,03 ^a

* em cada coluna, letras diferentes expressam diferenças significativas entre as amostras.

Determinação da digestibilidade de proteína *in vitro*

Os resultados da determinação da digestibilidade de proteínas *in vitro* podem ser observados na tabela 2. Todas as amostras apresentaram altos níveis de digestibilidade, sendo o bioproduto III aquele que apresentou o maior valor (90,89%). Não foi observada diferença significativa entre o valor de digestibilidade encontrado no extrato do bioproduto I (76,33%) e o do bioproduto II (76,62%).

Tabela 2. Digestibilidade de proteínas *in vitro* dos bioprodutos.

Bioprodutos	% Digestibilidade
Bioproduto I	76,33 ± 2,14 ^b
Bioproduto II	76,62 ± 2,36 ^b
Bioproduto III	90,89 ± 0,03 ^a

* em cada coluna, letras diferentes expressam diferenças significativas entre as amostras.

Os resultados obtidos neste estudo foram maiores do que os encontrados por Bento *et al.* (2014), que observaram valores variando de 26,11 a 61,96% de digestibilidade em diversos resíduos agroindustriais lignocelulósicos inoculados com *Pleurotus ostreatus* e *Lentinus edodes*. El-Waziry *et al.* (2016) também obtiveram valores inferiores, 39,29% de digestibilidade em resíduos de palmeira tratados com *Pleurotus florida*. Nasehi *et al.*

(2017) observaram valores de 68,87% de digestibilidade, no tratamento de palha de ervilha por *Pleurotus florida*.

Bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*

O bioensaio utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* é considerado um *screening* preliminar de rápida execução para a determinação da toxicidade de extratos brutos (Syahmi *et al.*, 2010). Os resultados da avaliação de toxicidade dos extratos dos bioprodutos contra *Artemia salina* estão expressos na tabela 3. Nenhum dos extratos, avaliados mostrou toxicidade contra as suspensões de larvas, sendo que a menor taxa de mortalidade foi observada no extrato aquoso do bioproduto II. O extrato do bioproduto I demonstrou uma taxa de mortalidade superior aos demais, mas que ainda é considerado não tóxico.

Tabela 3. Toxicidade dos extratos aquosos frente à *Artemia salina* após 24 horas.

Extratos	% Mortalidade	Resultado
Bioproduto I	9,00 ± 0,01 ^a	Não-tóxico
Bioproduto II	0,00 ± 0,00 ^b	Não-tóxico
Bioproduto III	2,93 ± 0,05 ^{ab}	Não-tóxico

* em cada coluna, letras diferentes expressam diferenças significativas entre as amostras.

Atividade Hemolítica Qualitativa

Os resultados da atividade hemolítica qualitativa podem ser observados na figura 2. É possível observar na imagem a ausência de células vermelhas no sobrenadante dos tubos, que demonstram uma coloração límpida e transparente, similar ao controle negativo. Todos os tubos apresentaram, também, um precipitado de células, demonstrando que os extratos avaliados não promoveram lise das células do sangue. A hemólise refere-se à lise ou ruptura das membranas das células vermelhas do sangue,

permitindo a liberação de hemoglobina para o plasma. Altos valores de hemoglobina livre podem provocar injúrias renais (Paula *et al.*, 2014). Os resultados obtidos neste teste confirmam a não toxicidade dos extratos dos bioprodutos para a membrana eritrocitária.

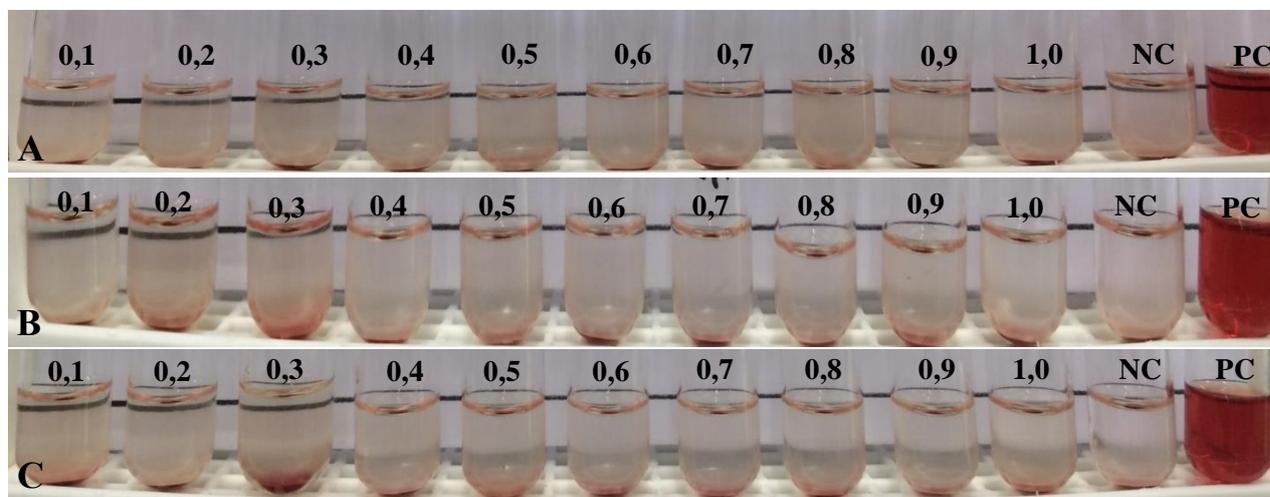


Figura 2. Atividade hemolítica qualitativa dos extratos dos bioprodutos a diferentes concentrações, utilizando sangue comercial de carneiro desfibrinado. NC= controle negativo. PC = controle positivo. (A) Bioproduto I - *Pleurotus albidus*. (B) Bioproduto II - *Pleurotus florida*, (C) Bioproduto III – *Lentinus citrinus*

Avaliação da citotoxicidade

Após 72 horas de tratamento com os extratos dos bioprodutos I, II e III, a viabilidade celular das células MRC5 foi igual ou superior a 100% e as células não apresentaram alterações morfológicas quando comparadas ao controle negativo com DMSO (figura 3). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo para a morte celular e apresentou 23% de viabilidade celular quando testada a 20 μ M ou 34 μ g/mL. Estes dados indicam que os três extratos avaliados não exibiram ação citotóxica contra os fibroblastos humanos MRC5. Al-Temimay (2015), também observou a não toxicidade de pleurotina extraída de *Pleurotus ostreatus* contra células MRC5. O extrato de outro cogumelo, *Fomes fomentarius* também não apresentou atividade citotóxica contra estas

mesmas células (Kolundžić *et al.*, 2016) enquanto que o extrato de *Grifola frondosa* (Klaus *et al.*, 2015) apresentou baixa toxicidade contra os fibroblastos humanos MRC5. Estes resultados corroboram os testes anteriores e indicam que os bioprodutos gerados a partir de casca de abacaxi e cogumelos comestíveis são seguros ao consumo humano.

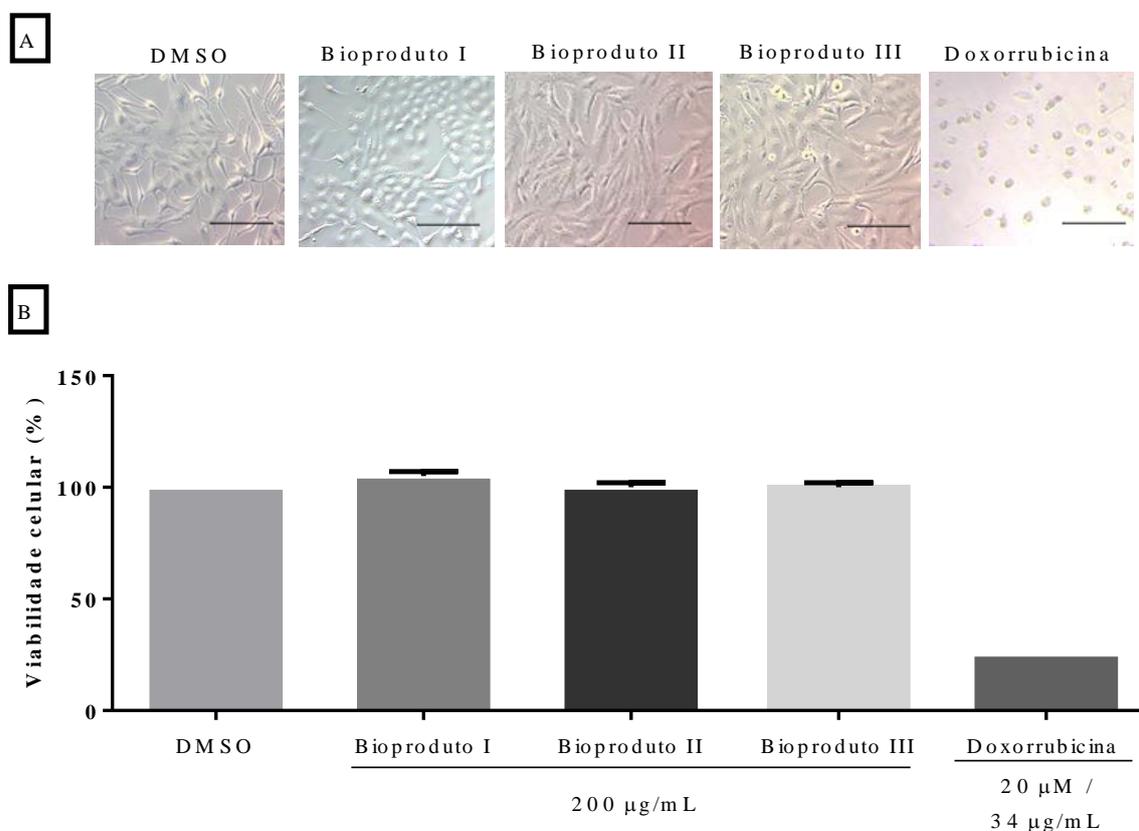


Figura 3. Ensaio de toxicidade dos extratos dos bioprodutos em fibroblastos humanos (MRC5) após 72 horas de tratamento. A – Imagens dos fibroblastos MRC5 após 72 horas de tratamento com DMSO, extratos dos bioprodutos e doxorubicina. B – Porcentagem da viabilidade celular dos extratos dos bioprodutos. DMSO – (controle negativo, 0,01%) e doxorubicina (controle positivo, 20µM/34µg/mL).

Conclusão

1. Os bioprodutos demonstraram baixa atividade de água, reduzindo a probabilidade de contaminação por micro-organismos e podendo ter sua vida útil aumentada devido a esta característica;
2. Os bioprodutos demonstraram atividade antioxidante e um pequeno teor de fenóis totais, podendo ser caracterizados como produtos com propriedades funcionais;
3. Os bioprodutos demonstraram altos valores de digestibilidade de proteína *in vitro*, podendo ser utilizados como ingredientes de novos produtos alimentícios;
4. Os bioprodutos são seguros ao consumo humano, não demonstrando toxicidade em nenhum dos testes realizados;
5. Os bioprodutos podem ser considerados produtos com qualidade biológica;
6. Os bioprodutos de casca de abacaxi miceliados com cogumelos comestíveis apresentam características nutricionais para aplicação na indústria de alimentos.

Referências

- ADEBAYO, E.A.; MARTÍNEZ-CARRERA, D. Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 52-67, 2015.
- AL-TEMIMAY, I.A.; AL-JIBOURI, M.H.; HASSAN, A.A.; MOHAMMAD, F.I. Test the Cytotoxicity of Pleurotin Extracted from an Edible Mushroom *Pleurotus osteratus* Against Three Human Carcinoma Cell Line. **Iraqi Journal of Science**, v. 56, n. 4A, p. 2773-2781, 2015.

AHMED, S.A.; GOGAL, J.R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ATAYDE, H. M.; CARNEIRO, A. L. B.; MARTINS, M. S.; PALHETA, R. A. Bioensaios de toxicidade com espécies de *Artemia*. In: TEIXEIRA, M.F.S.; SILVA, T.A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A.L.B.; ATAYDE, H. M. **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. Manaus: EDUA, v. 1, p. 190-207, 2011.

BENTO, C.B.P.; SILVA, J.S.; RODRIGUES, M.T.; KASUYA, C.M.; MANTOVANI, H.C. Influence of White-rot fungi on chemical composition and *in vitro* digestibility of lignocellulosic agro-industrial residues. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 2724-2732, 2014.

BEUCHAT, L.R.; KOMITOPOULOU, E.; BECKERS, H.; BETTS, R.P.; BOURDICHON, F.; FANNING, S.; JOOSTEN, H.M.; TER KUILE, B.H. Low–Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 1, pp. 150-172, 2013.

BRESOLIN, I.R.A.P.; BRESOLIN, I.T.L.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E.B.; MAZZOLA, P.G. Isolation and purification of bromelain from waste peel of pineapple for therapeutic application. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 971-979, 2013.

CARNEIRO, A.L.B.; OLIVEIRA, V.M.A.; VASQUES, T.G.S.; MAGALHÃES, S.A.; BRANDÃO, P.C.; FREIRE, R.S.; SILVA, R.F. Testes de toxicidade (atividade

hemolítica). In: TEIXEIRA, M.F.S.; SILVA, T.A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A.L.B.; ATAYDE, H. M. **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. Manaus: EDUA, v. 1, p. 208-229, 2011.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1012–1018, 2008.

EL-WAZIRY, A.; ALKOAİK, F.; KHALIL, A.; METWALLY, H.; FULLEROS, R. Nutrient Components and *in vitro* Digestibility of Treated and Untreated Date Palm Wastes with Mushroom (*Pleurotus florida*). **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, p. 195-199, 2016.

FONSECA, T.R.B.; SILVA, T.A.; ALECRIM, M.M.; CRUZ-FILHO, R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 1814-1822, 2015.

KIM, C.; NARTEA, T.J.; PAO, S.; LI, H. JORDAN, K.L.; XU, Y.; STEIN, R. A.; SISMOUR, E.N. Evaluation of Microbial Loads on Dried and Fresh Shiitake Mushrooms (*Lentinula edodes*) as Obtained from Internet and Local Retail Markets, Respectively. **Food Safety**, v. 4, n. 2, p. 45–51, 2016.

KOLUNDŽIĆ, M.; GROZDANIĆ, N.D.; DODEVSKA, M.; MILENKOVIĆ, M.; SISTO, F.; MIANI, A.; FARRONATO, G.; KUNDAKOVIĆ, T. Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom *Fomes fomentarius* (L.) Fr., Polyporaceae. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 110-115, 2016.

KLAUS, A.; KOZARSKI, M.; VUNDUK, J.; TODOROVIC, N.; JAKOVLJEVIC, D.; ZIZAK, Z.; PAVLOVIC, V.; LEVIC, S.; NIKSIC, M.; VAN GRIENSVEN, L. J. D. D. Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom. **Food Research International**, v. 67, p. 272-283, 2015.

MARINOVA, G.; BATCHVAROV, V., 2011. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 17, p. 11-24, 2011.

MISHRA, K.K.; PAL, R.S.; ARUNKUMAR, R.; CHANDRASHEKARA, C.; JAIN, S.K.; BHATT, J.C. Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1557–1563, 2013.

MOKOCHINSKI, J.B.; LÓPEZ, B.G.C.; SOVRANI, V.; SANTA, H.S.D.; GONZÁLEZ-BORRERO, P.P.; SAWAYA, A.C.H.F.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M.N.; TORRES, Y.R. Production of *Agaricus brasiliensis* mycelium from food industry residues as a source of antioxidants and essential fatty acids. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, p. 1-7, 2015.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, vol. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.

NASEHI, M.; TORBATINEJAD, N.M.; ZEREHDARAN, S.; SAFAIE, A.R. Effect of solid-state fermentation by oyster mushroom (*Pleurotus florida*) on nutritive value of some agro by-products. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, p. 221-226, 2017.

PAIVA, F. C.; ALECRIM, M. M.; TEIXEIRA, M. F. S.; KIRSCH, L. S.; JESUS, R. S. Produção de hidrolisado de pirarucu utilizando-se protease de *Aspergillus flavo-furcatis* e pancreatina. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, p.89-96, 2015.

PAULA, C.S.; CANTELI, V.C.D.; VERDAM, M.C.S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B.C.K.; MIGUEL, O.G.M.; MIGUEL, M.D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 189-195, 2014.

SOUZA R.A.T.; FONSECA, T.R.B.; KIRSCH, L.S.; SILVA, L.S.C.; ALECRIM, M.M.; CRUZ-FILHO, R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Nutritional composition of bioproducts generated from semi-solid fermentation of pineapple peel by edible mushrooms. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 451-457, 2016.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p.144-158, 1965.

STEFAN, R.J.; VAMANU, E.; ANGELESCU, G.C. Antioxidant Activity of Crude Methanolic Extracts from *Pleurotus ostreatus*. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 9, n. 1, p. 25-32, 2015

SYAHMI, A.R.M.; VIJAYARATHNA, S.; SASIDHARAN, S.; LATHA,L.Y.; KWAN, Y.P.; LAU, Y.L.; SHIN, L.N.; CHEN, Y. Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of *Elaeis guineensis* Jacq.,(oil palm leaf) Methanol Extract. **Molecules**, v. 15, p. 8111-8121, 2010.

TSUJIKAWA, K.; KANAMORI, T.; IWATA, Y.; OHMAE, Y.; SUGITA, R.; INOUE, H.; KISHI, T. Morphological and chemical analysis of magic mushrooms in Japan. **Forensic Science International**, v. 138, p. 85-90, 2003.

VALVERDE, M.E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

VAN KUIJK, S.J.A.; SONNENBERG, A.S.M.; BAARS, J.J.P.; HENDRIKS, W.H.; CONE, J.W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 191–202, 2015.

WONG, J.Y.; CHYE, F.Y. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 269-277, 2009.

YANG, D.; LIANG, J.; WANG, Y.; SUN, F.; TAO, H.; XU, Q.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; HO, C.; WAN, X. Tea waste: an effective and economic substrate for oyster mushroom cultivation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 680-684, 2015.

CAPÍTULO 2

PEDIDO DE REGISTRO DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Suplementos alimentares do tipo *shake* formulados a partir de casca de abacaxi e cogumelos comestíveis

ANEXO



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

PRÓ-REITORIA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – PROTEC

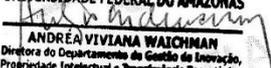


DEPARTAMENTO DE PROPRIEDADE INTELECTUAL E TRANSFERÊNCIA DE
TECNOLOGIA

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS para os devidos fins que **RAIANE ÁILA TEXEIRA SOUZA**, aluna do Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC e sua orientadora professora Dra. **MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA**, da Universidade Federal do Amazonas, deram entrada, nesta pró-reitoria, no formulário da proposta de Declaração de Invenção referente ao produto "**SUPLEMENTOS ALIMENTARES EM PÓ DO TIPO SHAKE FORMULADOS A PARTIR DE CASCA DE ABACAXI E COGUMELOS COMESTÍVEIS**", como resultado do doutorado do referido programa, para ser avaliada para registro de propriedade industrial.

Manaus, 12 de julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

ANDRÉA VIVIANA WAICHMAN
Diretora do Departamento de Gestão de Inovação,
Propriedade Intelectual e Transferência Tecnológica

UFAM

CAPÍTULO 3

Qualidade nutricional de produto do tipo *shake* elaborado com bioprodutos contendo cogumelos comestíveis

Qualidade nutricional de produto do tipo *shake* elaborado com bioprodutos contendo cogumelos comestíveis

Raiane Áila Teixeira Souza⁽¹⁾, Ana Rita Gaia Machado⁽¹⁾, Larissa Svetlana Cavalcante Silva⁽¹⁾, Lorisa Simas Teixeira²; Maria Conceição Loureiro Campelo³, Maria Francisca Simas Teixeira⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Coleção de Cultura DPUA. Universidade Federal do Amazonas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

⁽²⁾ Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. CEP: 52171900 - Recife/PE

⁽³⁾ EMBRAPA Amzônia Ocidental, setor de Gestão de Laboratórios – LASP, Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural, CEP 69010-970, Manaus, Amazonas, Brasil.

Resumo

Shakes são misturas constituídas por vários ingredientes na forma de pó indicados para o preparo de alimentos pela adição de água, leite ou outro produto alimentício, submetidos ou não a posterior cozimento. Este estudo teve como objetivo elaborar três produtos do tipo de *shake* formulados com bioprodutos a base de casca de abacaxi miceliada por *Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida* e *Lentinus citrinus*. Na formulação das misturas foi substituída a farinha de aveia por bioproduto contendo cogumelo. Para obtenção de três produtos, em cada mistura foi adicionado, separadamente, bioproduto a base de *Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida* e *Lentinus citrinus*. Como padrão foi utilizado a mistura a base de aveia. Os produtos foram submetidos à determinação de composição centesimal, teor de minerais, determinação de pH e acidez titulável total e determinação da qualidade microbiológica. Nos três *shakes*, com a substituição da aveia pelo bioproduto, houve aumento de fibras, além dos minerais potássio, cálcio, sódio, cobre e manganês. Nestes produtos o pH foi inferior ao do padrão, exceto aquele contendo bioproduto miceliado por *L. citrinus*, e maior acidez titulável total. Todos os produtos apresentaram qualidade microbiológica de acordo com as especificações higiênico-sanitárias em vigor.

Palavras-chave: Abacaxi, *Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, *Lentinus citrinus*, mistura em pó.

Introdução

Nos últimos anos, devido à aceleração do ritmo urbano, a busca por alimentos industrializados de fácil preparo e de qualidade nutricional vêm aumentando significativamente (Oliveira *et al.*, 2013). A tendência em expansão na indústria alimentícia está associada ao consumo de alimentos semi-prontos, uma vez que aumenta a cada vez mais entre os consumidores a necessidade de reduzir o tempo gasto no preparo de produtos alimentícios (Gouveia, 2006). Esta tendência converge com a necessidade de saúde e bem-estar, resultando em um aumento da demanda por alimentos convenientes, como bebidas, snacks de frutas e vegetais, iogurtes, entre outros (Barbosa *et al.*, 2010).

A preocupação com o bem-estar e com a melhoria da qualidade de vida têm levado os consumidores a buscarem produtos alimentícios mais saudáveis e mais nutritivos, com propriedades funcionais. Os alimentos funcionais são definidos, de modo geral, como alimentos que promovem benefícios à saúde, ao bem-estar físico e que podem, ainda, prevenir doenças (Almeida, 2009, Lopes *et al.*, 2015)

Diversos ingredientes podem ser adicionados a produtos alimentícios com a intenção de conferir características funcionais, as fibras sendo um dos principais elementos utilizados (Lopes *et al.*, 2015). As fibras alimentícias melhoram a atividade intestinal, com o aprimoramento da sua integridade e função absorptiva, manutenção das barreiras intestinais e normalização da microbiota intestinal. O consumo adequado de fibras está relacionado, também, à redução do risco de desenvolvimento de doenças coronarianas, infarto, hipertensão, diabetes e algumas desordens gastrointestinais. O aumento do consumo de fibras melhora, ainda, os níveis de lipídios séricos, ajuda na redução do peso corporal e atua na melhoria do sistema (Bernaud e Rodrigues, 2013; Oliveira *et al.*, 2013; Souza, *et al.*, 2016).

Os resíduos agroindustriais são matérias primas ricas em fibras, vitaminas, minerais, compostos antioxidantes e nutrientes essenciais para o bom funcionamento do organismo humano e são encontrados em abundância, uma vez que a indústria processadora de alimentos gera, aproximadamente, 40% de resíduos agroindustriais. Estes resíduos são constituídos de cascas, sementes, caroços e até mesmo polpas. (Nascimento Filho e Franco, 2015).

Assim sendo, este estudo tem como objetivo desenvolver e caracterizar a composição físico-química de três produtos do tipo *shake* formulados com três diferentes

bioprodutos a base de casca de abacaxi miceliada por *Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida* e *Lentinus citrinus*.

Material e Métodos

Matéria-prima

Os bioprodutos gerados pela fermentação semi-sólida da casca de abacaxi pelos cogumelos comestíveis (separadamente) foram produzidos previamente por Souza *et al.* (2016). Nesta pesquisa foram utilizados três tipos de bioproduto como matéria prima: O bioproduto I - constituído por casca de abacaxi miceliada por *Pleurotus albidus*; bioproduto II - casca de abacaxi miceliada por *Pleurotus ostreatus* var. *florida* e; bioproduto III - casca de abacaxi miceliada por *Lentinus citrinus*. Todas as matérias prima foram acondicionadas em frascos de vidro lacrados, previamente esterilizados. Os três bioprodutos foram desidratados e triturados até a obtenção de um pó fino.

Produção dos shakes

A formulação dos *shakes* foi baseada no levantamento dos ingredientes dos rótulos das formulações disponíveis no mercado e Araújo *et al.* (2013). Os produtos foram compostos de uma parte fixa e outra parte variável. A parte fixa da formulação foi formulada com maltodextrina, colágeno hidrolisado, leite desnatado, gelatina sem açúcar sabor morango e goma xantana.

Na parte variável da formulação foi utilizada farinha de aveia e bioproduto em pó. Para elaboração do *shake* padrão foi utilizada farinha de aveia em substituição ao bioproduto, e os demais ingredientes permaneceram inalterados (Tabela 1). Após a mistura dos constituintes foi obtido o produto final. A reconstituição do produto do tipo *shake* foi feita com água mineral ou leite.

Tabela 1. Ingredientes utilizados na formulação dos produtos do tipo *shakes* por 100g de produto.

Ingredientes (g)	SP	SPA	SPF	SLC
Farinha de aveia	23,1	0,0	0,0	0,0
Pó do bioproduto	0,0	23,1	23,1	23,1
Maltodextrina	23,1	23,1	23,1	23,1
Leite em pó desnatado	30,8	30,8	30,8	30,8
Colágeno Hidrolisado	3,8	3,8	3,8	3,8
Goma xantana	3,8	3,8	3,8	3,8
Gelatina sem açúcar sabor morango	15,4	15,4	15,4	15,4

SP = *shake* padrão; SPA = *shake* + bioproduto miceliado por *P. albidus*; SPF = *shake* + bioproduto miceliado por *P. ostreatus* var. *florida*; SLC = *shake* + bioproduto miceliado por *L. citrinus*

Determinação da composição físico-química

As amostras de *shakes* foram submetidas às análises de umidade, cinza, lipídios, carboidratos e energia total. Todos os testes foram realizados de acordo com os procedimentos descritos pela AOAC (2002). A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105°C até peso constante. A determinação da quantidade de cinzas foi realizada por incineração em mufla a 550-660°C até peso constante e a quantificação de lipídios foi determinada pelo método de *Bligh e Dyer*. A determinação da fração protéica foi realizada pelo método de micro Kjeldahl e a determinação de fibras totais foi realizada por digestão ácido-básica, de acordo com o método de Weende. Os carboidratos totais foram estimados por diferença e o total de energia metabolizável foi calculado pelo fator de conversão de Atwater, ambos recomendados por Latinfoods (2011).

Determinação de macro e micro minerais

A determinação dos minerais foi realizada conforme os métodos proposto pela AOAC (2002). 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.

Determinação da atividade de água

A determinação da atividade de água dos pós dos bioprodutos foram realizadas utilizando um medidor de atividade de água, modelo AQUALab 4TEV, à temperatura de 25 °C .

Determinação da acidez total titulável e do pH

O pH dos produtos foi mensurado utilizando medidor de pH digital (PHTEK, PHS-3E), pré calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0. A acidez total titulável foi aferida por titulação com NaOH 0,1N e fenolftaleína como indicador, e os resultados foram expressos como miliequivalentes por 100g de produto (Adolfo Lutz, 2008).

Determinação da qualidade microbiológica dos produtos

As análises microbiológicas foram realizadas baseadas no número mais provável de coliformes totais, coliformes fecais ou *Escherichia coli* (Kornacki e Johnson, 2001) e presença/ausência de *Salmonella* (ISO 6579:2002, 2002).

Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando estatística descritiva (média e desvio padrão) e também análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software Minitab 17.0.

Resultados e Discussão

Determinação da composição físico-química

Os resultados da composição físico-química dos *shakes* podem ser observados na tabela 2. De acordo com os dados apresentados todas as amostras apresentaram baixo valor de umidade e não houve diferença significativa entre os resultados obtidos. O maior teor de umidade foi observado no *shake* padrão (SP), com valor de 5,43% de umidade. A umidade reduzida dificulta a contaminação por micro-organismos, além de favorecer a concentração dos nutrientes.

O conteúdo de cinzas se refere ao resíduo inorgânico ou mineral. Neste estudo, os valores de cinza observados nas amostras mostraram um aumento significativo após a

substituição da farinha de aveia pelos bioprodutos. Os resultados foram similares aos obtidos por Souza *et al.* (2016), que observaram valores variando de 3,5-6,1 g/100g de cinza em bioprodutos originados pela fermentação semi-sólida de casca de abacaxi por cogumelos comestíveis. Os resultados foram superiores aos valores observados por Reis *et al.* (2012) que avaliaram cinco espécies de cogumelos comestíveis, variando de 0,62 - 1,36 g/100g e aos encontrados por Gondim *et al.* (2005) para a casca de abacaxi, 05g/100g. Estes resultados indicam que os *shakes* produzidos contém um alto conteúdo de minerais.

Tabela 2. Composição físico-química dos *shakes* produzidos (g/100g).

Parâmetros	SP	SPA	SPF	SLC
Umidade (%)	5,43 ± 0,18 ^a	5,05 ± 0,24 ^a	5,24 ± 0,27 ^a	4,94 ± 0,35 ^a
Cinzas (g)	3,60 ± 0,81 ^b	4,98 ± 0,10 ^a	4,98 ± 0,07 ^a	5,03 ± 0,06 ^a
Lipídios (g)	2,83 ± 0,07 ^a	2,74 ± 0,54 ^a	2,09 ± 0,29 ^a	3,84 ± 2,79 ^a
Proteínas (g)	8,39 ± 0,52 ^a	8,64 ± 0,52 ^a	9,85 ± 0,84 ^a	8,41 ± 0,49 ^a
Fibras totais (g)	2,42 ± 0,70 ^c	5,11 ± 0,56 ^{ab}	5,70 ± 0,70 ^a	3,48 ± 0,76 ^{bc}
Carboidratos (g)	77,32 ± 2,03 ^a	73,47 ± 1,07 ^a	72,13 ± 1,36 ^a	73,47 ± 3,61 ^a
Calorias (Kcal)	364,48 ± 0,52 ^a	353,15 ± 3,74 ^{bc}	346,73 ± 3,43 ^c	358,71 ± 6,59 ^{ab}

* em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas entre as amostras.

SP = *shake* padrão; SPA = *shake* + bioproducto miceliado por *P. albidus*; SPF = *shake* + bioproducto miceliado por *P. ostreatus* var. *florida*; SLC = *shake* + bioproducto miceliado por *L. citrinus*

Em relação ao quantitativo de lipídios dos *shakes* não houve alteração significativa após a substituição da farinha de aveia, sendo que todos os *shakes* apresentaram baixo teor de lipídios. De acordo com a RDC nº 54 da Agência de Vigilância Sanitária (2012) produtos alimentares com no máximo 3g de gorduras totais em 100 g de produto podem ser considerados com baixo teor de gordura, de modo que os *shakes* produzidos, com exceção do *shake* SLC, podem ser classificados como produtos com baixo teor de gordura.

Embora não tenha sido observado diferença significativa entre o conteúdo de proteínas dos produtos avaliados, pode-se observar um pequeno aumento no teor proteico dos *shakes* SPA e SPF após a substituição da farinha de aveia pelos bioprodutos. No *shake* SPF houve um aumento de 17% em comparação ao *shake* padrão (SP). Os valores estão em consonância com os valores observados no trabalho de Souza *et al.* (2016), 7,0 -10

g/100g. Os valores obtidos neste estudo são próximos, também, ao encontrado por Torres (2000) na clara de ovo de pata (9,84 g/100g). De acordo com a RDC nº 54 da Agência de Vigilância Sanitária (2012) produtos alimentares com no mínimo de 6 g de proteínas em 100 g de produto podem ser considerados fonte de proteínas.

Os dados apresentados na tabela mostram que houve um aumento significativo na quantidade de fibras dos produtos após a substituição da farinha de aveia pelos bioprodutos. O aumento nos *shakes* SPA e SPF foram superiores a 100% e no *shake* SLC foi de 43%. Os resultados foram superiores aos encontrados por Erkel *et al.* (2015) que formulou cookies com farinha de casca de abacaxi (1,25%). Segundo a ANVISA (2012) produtos alimentícios com um quantitativo maior que 3g/100g podem ser considerados alimentos fontes de fibras. As fibras são nutrientes essenciais para o corpo humano, que possuem ação preventiva na redução do colesterol e estão presentes em dietas saudáveis (Machado *et al.*, 2016).

Determinação de macro e micro minerais

Os resultados de macro e micro minerais dos *shakes* formulados estão dispostos na tabela 3. Os minerais são essenciais para os compostos das funções orgânicas, seja na forma iônica ou como compostos como hormônios, enzimas e proteínas teciduais, totalizando cerca de 4% do peso corporal total (Ramires, 2014). Eles são indispensáveis no metabolismo humano, sendo parte importante em diversas reações, na transmissão de impulsos nervosos, desenvolvimento ósseo e regulação dos sais e equilíbrio hídrico (Okoro e Achuba, 2012).

Os macro minerais cálcio e potássio apresentaram aumento significativo nos *shakes* preparados com os bioprodutos. Os valores de potássio observados neste estudo foram inferiores aos observados por Souza *et al.* (2016), que foram de 15,9, 16,7 e 16,9 g/kg nos bioprodutos formulados com *Lentinus citrinus*, *Pleurotus albidus* e *Pleurotus florida*, respectivamente. Contudo, os valores de cálcio foram superiores aos encontrados por Gondim *et al.* (2005), cerca de (0,76g/kg) em casca de abacaxi.

Potássio é um mineral essencial para a performance das funções celulares, sendo responsável por várias reações orgânicas como transporte de oxigênio, participação na conversão da glicose em glicogênio pelo fígado, auxílio na contração muscular e regulação osmótica (Batista e Silva, 2012). Esse mineral também tem um papel atenuante na hipertensão arterial, resistência à insulina e comorbidades (Jodas *et al.*, 2014).

Tabela 3. Composição de macro e micro minerais dos *shakes* produzidos.

Macrominerais (g.kg ⁻¹)	Amostras			
	SP	SPA	SPF	SLC
P	3,77 ± 0,02 ^a	3,11 ± 0,01 ^d	3,22 ± 0,01 ^b	3,16 ± 0,01 ^c
K	6,95 ± 0,01 ^c	10,35 ± 0,01 ^a	9,28 ± 0,01 ^b	9,25 ± 0,01 ^b
Ca	4,65 ± 0,02 ^d	4,93 ± 0,01 ^c	5,02 ± 0,02 ^b	5,14 ± 0,02 ^a
Mg	0,50 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,01 ^b	0,44 ± 0,01 ^b	0,42 ± 0,02 ^b
S	1,12 ± 0,02 ^b	1,18 ± 0,01 ^a	1,11 ± 0,01 ^b	1,01 ± 0,01 ^c
Microminerais (mg.kg ⁻¹)	SP	SPA	SPF	SLC
Na	6284,66 ± 0,01 ^d	7192,24 ± 0,04 ^a	6748,02 ± 0,02 ^c	7093,51 ± 0,03 ^b
B	3,57 ± 0,02 ^b	5,18 ± 0,01 ^a	2,25 ± 0,01 ^c	1,20 ± 0,01 ^d
Cu	0,98 ± 0,02 ^d	1,40 ± 0,01 ^c	1,60 ± 0,02 ^b	1,75 ± 0,01 ^a
Fe	159,02 ± 0,01 ^a	84,81 ± 0,02 ^c	68,87 ± 0,01 ^d	94,46 ± 0,02 ^b
Mn	11,24 ± 0,02 ^d	13,10 ± 0,01 ^c	15,90 ± 0,02 ^a	13,18 ± 0,01 ^b
Zn	43,41 ± 0,01 ^a	15,38 ± 0,01 ^d	21,86 ± 0,01 ^b	20,30 ± 0,01 ^c

* em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas entre as amostras.

SP = *shake* padrão; SPA = *shake* + bioproducto miceliado por *P. albidus*; SPF = *shake* + bioproducto miceliado por *P. ostreatus* var. *florida*; SLC = *shake* + bioproducto miceliado por *L. citrinus*

O cálcio, por sua vez, é um nutriente essencial para a manutenção da saúde óssea e contribui para a mineralização do esqueleto prevenindo, conseqüentemente, problemas como osteoporose e fraturas na vida adulta e em idades mais avançadas, além disso também participa na formação de fibrina no processo de coagulação sanguínea e na regulação da contração muscular (Assumpção *et al.*, 2016).

Entre os microminerais, aqueles com maior aumento foram sódio, cobre e manganês. Abdolgader *et al.* (2016) também observou alto conteúdo de sódio em seu trabalho, 1797 mg/kg no corpo de frutificação de *Agaricus bisporus* coletado da região de Alosita, na Líbia. Miranda *et al.* (2013) encontrou elevado conteúdo de sódio em bolos formulados com farinha de casca de maracujá, 235,85 mg/60g de produto ou 3930,83 mg/kg⁻¹. Contudo uma colher de sopa (20g) do *shake* possui, em média, 0,14g de sódio, enquanto o limite máximo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é de 2 g/dia (WHO, 2006).

O quantitativo de cobre encontrado no *shake* SLC foi de 1,75 mg.kg⁻¹ e manganês foi de 13,18 mg.kg⁻¹, resultados superiores ao encontrado em basidioma de *Lentinus citrinus* cultivado em exocarpo de cupuaçu e liteira que foi de 0,27 mg.kg⁻¹ e 9,05 mg.kg⁻¹ quando cultivado em casca de arroz e exocarpo de cupuaçu (Machado *et al.*, 2016). O

cobre, juntamente com zinco e ferro, tem papéis proeminentes na formação da hemoglobina, células vermelhas do sangue e mioglobina nas fibras musculares, assim como na produção de energia mitocondrial, na produção de antioxidantes e na formação de radicais livres (Souza *et al.*, 2016).

Os valores de manganês observados nos *shakes* foram superiores aos encontrados por Novaes *et al.* (2015) em biscoitos amanteigados produzidos com farinhas de casca de frutas (0,29 mg/100g ou 2,9 mg/kg). O manganês é um dos minerais necessários às principais funções metabólicas do organismo, atuando como um cofator fundamental (Silva *et al.*, 2014).

Os valores de ferro neste trabalho foram comparados a outros produtos alimentícios e se mostraram superiores aos encontrados por Machado *et al.* (2006) em ovo (13,3 mg/kg), couve (2,5 mg/kg) e cenoura (6,3 mg/kg). Embora tenha ocorrido redução no quantitativo de ferro após a substituição da farinha de aveia pelos bioprodutos, ainda assim, de acordo com a RDC nº 54 da Agência de Vigilância Sanitária (2012), os *shakes* produzidos podem ser classificados como produtos alimentícios fonte de ferro, uma vez que os valores obtidos correspondem no mínimo a 15% da ingestão diária recomendada deste nutriente, que é de 14 mg/dia para um adulto.

Atividade de água

Todas as amostras obtiveram baixos resultados de atividade de água (A_w). A A_w para o *shake* padrão (SP) foi de 0,380, enquanto que para o *shake* SPA foi de 0,3219 e para o *shakes* SPF e SLC esses valores foram de 0,3338 e 0,3569, respectivamente. A atividade de água é importante para a indústria de alimentos uma vez que está relacionada à estabilidade microbiana e deterioração dos alimentos, afetando diretamente a vida de prateleira dos produtos (Khalloufi *et al.*, 2000). De modo geral, os micro-organismos necessitam de, no mínimo, 0,60 A_w para crescer, sendo que maioria das bactérias crescem em ambiente com atividade de água de 0,87 A_w (Beuchat *et al.*, 2013). Esses resultados indicam que os produtos não oferecem condições para o desenvolvimento microbiano.

Acidez titulável e pH

A acidez titulável afere a concentração total de acidez em alimentos e tem influência no sabor, cor, estabilidade microbiana e qualidade geral destes (Tyl *et al.*, 2017). Os resultados da determinação de acidez titulável total e aferição de pH dos *shakes*

estão expostos na tabela 4. Observou-se que a acidez titulável aumentou nos *shakes* formulados com os bioprodutos. Esse resultado provavelmente foi pela presença da casca de abacaxi dos bioprodutos, um resíduo com característica ácida. Costa *et al.* (2007) observaram valores de acidez similares na análise de pós alimentícios produzidos com casca e bagaço de abacaxi, 2,53 e 2,98, respectivamente. Silva *et al.* (2013) obtiveram valores superiores aos deste estudo, cerca de 5 g/100 g, na análise de casca de abacaxi e valores inferiores na análise de demais resíduos deste fruto, 2 g/100 g.

Tabela 4. Determinação do pH e acidez total titulável dos *shakes*.

<i>Shakes</i>	pH	Acidez titulável (ml/100g)
SP	5,16 ± 0,01 ^a	2,33 ± 0,11 ^d
SPA	5,02 ± 0,01 ^b	3,23 ± 0,11 ^a
SPF	5,03 ± 0,01 ^b	2,97 ± 0,05 ^b
SLC	5,07 ± 0,06 ^{ab}	2,60 ± 0,10 ^c

* em cada coluna, letras diferentes expressam diferenças significativas entre as amostras.
 SP = *shake* padrão; SPA = *shake* + bioproduto miceliado por *P. albidus*; SPF = *shake* + bioproduto miceliado por *P. ostreatus* var. *florida*; SLC = *shake* + bioproduto miceliado por *L. citrinus*

Os valores de pH apresentaram redução significativa quando comparados ao *shake* padrão, em conformidade com o aumento da acidez observado, e variou de 5,03 a 5,16. De acordo com os valores de pH e acidez obtidos, os *shakes* podem ser classificados como produtos ácidos, o que pode limitar o crescimento microbiano no produto e aumentar a sua vida útil.

Qualidade microbiológica

Todos os produtos obtiveram resultados negativos para *Salmonella sp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli*, o que indica que as amostras se encontravam dentro das especificações higiênicas sanitárias estabelecidas pela legislação brasileira (RDC nº 12/2001, ANVISA) e podem ser consideradas seguras para consumo.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os *shakes* são produtos alimentícios fonte de proteína, fibras, tem baixo teor de lipídio e o valor de contribuição calórica está de acordo com os requisitos referente ao produto pronto para consumo. Além disso, são produtos constituídos de minerais como ferro, cobre, potássio e manganês, elementos importantes para o desenvolvimento e saúde humana, características que qualificam como uma nova alternativa alimentar de boa qualidade nutricional.

Referências

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC International. 16 ed. Gaithersburg: AOAC, 2002.

ABDOLGADER, R. E.; BELLAIL, A.A.; MOUSA, M. M.; ABRAHEEM, M. F. Proximate and Mineral Contents in Fruiting Bodies of Edible Wild Mushroom from Al-Jabal Alakhdar Province/Libya. *International Journal of Science and Research Methodology*, v. 4, n. 3, p. 123-147, 2016.

ARAÚJO, T. M. F.; ARCANJO, S. R. S.; OLIVEIRA, A. M. C.; PORTELA, J. V. F.; BESERRA, F. J. Desenvolvimento de *shake* diet em pó à base de farinha de casca de banana. *Higiene Alimentar*, v. 27, p. 98-102, 2013.

ASSUMPÇÃO, D.; DIAS, M. R. M.; BARROS, M. B. A.; FISBERG, R. M.; BARROS FILHO, A. A. Calcium intake by adolescents: a population-based health survey. *Jornal de Pediatria*, v. 92, n. 3, p. 251-259, 2016.

ALMEIDA, C. L.; BOAVENTURA, G. T.; GUZMAN – SILVA, M. A. A linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido α -linolênico na formação da bainha de mielina. *Nutrição*, v.22, n.5, p. 747-154, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Anvisa. Resolução nº 54 de 12.11.2012. Disponível em: <[www.http://portal.anvisa.gov.br](http://portal.anvisa.gov.br)>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Anvisa. Resolução nº 12 de 02.01.2001. Disponível em: <[www.http://portal.anvisa.gov.br](http://portal.anvisa.gov.br)>.

BARBOSA, L.; MADI, L.; TOLEDO, M. A.; REGO, R. A. As tendências da alimentação. In: *Brasil Food Trends*, 2020. São Paulo: FIESP, p. 39-47, 2010.

BAPTISTA, F. C. B.; SILVA, L. L. Desenvolvimento de emulsão cremosa para reposição de eletrólitos em humanos. *Cadernos da Escola de Saúde*, v. 1, n. 7, p. 209-217, 2012.

BEUCHAT, L.R.; KOMITOPOULOU, E.; BECKERS, H.; BETTS, R.P.; BOURDICHON, F.; FANNING, S.; JOOSTEN, H.M.; TER KUILE, B.H. Low–Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, v. 76, n. 1, pp. 150-172, 2013.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabologia*, v. 57, n. 6, p. 397-405, 2013.

COSTA, J. M. C.; FELIPE, E. M. F.; MAIA, G. A.; BRASIL, I. M.; HERNANDEZ, F. F. H. Comparação dos parâmetros físico-químicos e químicos de pós alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. *Revista Ciência Agronômica*, v.38, n.2, p.228-232, 2007.

ERKEL, A.; ÁVILA, C. M.; ROMEIRO, M. M.; SANTOS, E. F.; SARMENTO, U. C.; NOVELLO, D. Utilização da farinha de casca de abacaxi em cookies: caracterização físico-química e aceitabilidade sensorial entre crianças. *Revista Uniabeu*, v. 8, n. 19, p. 272-288, 2015.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L.; SANTOS, K. M. Composição Centesimal e de minerais em Cascas de frutas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

GOUVEIA, F. Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. *Ação Uniemp*, v.2 n.5, p. 32-37, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

ISO 6579:2002 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs e Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4th ed. The International Organization for Standardization.

JODAS, E. M. M. G.; VOLTERA, A. F.; GINOZA, M.; KOHLMANN JUNIOR, O.; SANTOS, N. B.; CESARETTI, M. L. R. Efeito do exercício físico e suplementação de potássio sobre a pressão arterial, metabolismo glicídico e albuminúria de ratos hipertensos. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 36, n. 3, p. 271-279, 2014.

KHALOUFFI, S.; GIASON, J.; RATTI, C. Water activity of freeze dried mushrooms and berries. *Canadian Agricultural Engineering*, v. 42, n. 1, p. 51-56, 2000.

KORNACKI J. L.; JOHNSON J. L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Edited by DOWNES F.P.; ITO, K. 4 ed. American Public Health Association (APHA): Washington, USA, pp. 69-82. 2001.

LATINFOODS. Red Latinoamericana de Composición de Alimentos. 2002. Disponível em: <<http://www.inta.cl/latinfoods/>> Acesso em jul. 2011.

LOPES, F. S.; MARTINS, D. S. S.; OLIVEIRA, J. S.; NÓBREGA, A. L.; PINTO-JUNIOR, V. M. Effects of a food produced from the fibrous bran flaxseed in individuals with constipation. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 10, n. 01, 213-217, 2015.

MACHADO, A. R. G.; TEIXEIRA, M. F. S.; KIRSCH, L.S.; CAMPELO, M. C. L.; OLIVEIRA, I. M. A Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 23, p. 621-627, 2016.

MACHADO, F. M. V. F.; CANNIATI-BRAZACA, S. G.; PIEDADE, S. M. S. Avaliação da Disponibilidade de Ferro em Ovo, Cenoura e Couve e em suas Misturas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 610-618, 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. *Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food Nutrition*, v. 4, n. 2, p. 225-232, 2013.

NASCIMENTO FILHO, W. B.; FRANCO, C. R.; Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 6, p. 1968-1987, 2015.

NOVAES, M. D. S.; OLIVEIRA, A. P.; HERNANDES, T.; RODRIGUES, E. C.; SIGARINI, K. S.; PEDRO, F. G. G.; VILLA, R. D. Composição proximal e mineral de biscoitos tipo amanteigado enriquecidos com diferentes farinhas de casca de frutas. *Revista do Instituto Adolpho Lutz*, v. 74, n. 4, p. 390-398, 2015.

OKORO, I. O.; ACHUBA, F. I. Proximate and mineral analysis of some wild edible mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 30, p.7720-7724, 2012.

OLIVEIRA, D. F.; COELHO, A. R.; BURGARDT, V. C. F.; HASHIMOTO, E. H.; LUNKES, A. M.; MARCHI, J. F.; TONIAL, I. B. Alternatives for a healthier meat product: a review. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 16, n. 3, p.163-174, 2013.

RAMIRES, A. D. Influência do cálcio e magnésio sobre o ganho de peso corporal: uma abordagem experimental com ratos wistar em crescimento. 2014. 55f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014

REIS, F. S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 191–197, 2012.

SILVA, D. I. S.; NOGUEIRA, G. D. R.; DUZZIONI, A. G.; BARROZO, M. A. S. Changes of antioxidant constituents in pineapple (*Ananas comosus*) residue during drying process. *Industrial Crops and Products*, v. 50, p. 557– 562, 2013.

SILVA, S. L. C.; MOREIRA, E. G. A.; BAPTISTA, R. A. N.; LIU, S. M.; FERREIRA, A. R.; LIU, P. M. F. Nutrição parenteral em Pediatria: revisão da literatura. *Revista Médica de Minas Gerais*, v. 24, p. 66-74, 2014.

SOUZA, A. L. G.; FERREIRA, M. C. R.; CORRÊA, N. C. F. SANTOS, O. V. The use of residues of extraction from Brazil nut oil (*Bertholletia excelsa*) in food products high in proteins, lipids and fibers. Revista Pan-Amazônica de Saúde v.7 n.4, 2016.

SOUZA R.A.T.; FONSECA, T.R.B.; KIRSCH, L.S.; SILVA, L.S.C.; ALECRIM, M.M.; CRUZ-FILHO, R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Nutritional composition of bioproducts generated from semi-solid fermentation of pineapple peel by edible mushrooms. African Journal of Biotechnology, v. 15, n. 12, p. 451-457, 2016.

SOUZA, R. R.; OLIVEIRA, T. W.; SANTOS, I. H. V. S.; AMARO, E. L.; SILVA. D. Q. Desenvolvimento de bolo de cenoura enriquecido de fibras. Saber Científico, v. 5, n. 2, p. 48 - 56, 2016.

TORRES, E. A. F. S.; CAMPOS, N. C.; DUARTE, M.; GARBELOTTI, M. L.; PHILIPPI, S. T.; RODRIGUES, R. S. M. Composição Centesimal e Valor Calórico De Alimentos de Origem Animal. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v.20 n.2,p. 145-150, 2000.

TYL, C.; SADLER, G. D. pH and Titratable Acidity. In: Food Analysis. NIELSEN, S. Fifth Edition. Springer, pp. 391-402, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Forum on Reducing Salt Intake in Populations. Reducing salt intake in population: report f a WHO fórum and technical meeting, 5-7 October 2006, Paris, 2006.

CONCLUSÕES

Com os resultados deste estudo conclui-se que:

- Os bioprodutos contendo casca de abacaxi miceliada por cogumelos comestíveis tem atividade antioxidante e reduzido teor de fenóis, baixa atividade de água e, portanto, menor risco de contaminação por micro-organismos, alta digestibilidade de proteína *in vitro* e não são tóxicos e podem ser consumidos com segurança;
- A quantidade de fibras nos *shakes* aumentou com substituição da farinha de aveia pelos bioprodutos;
- Os *shakes* são fontes de proteínas, ferro e a contribuição calórica está de acordo com os requisitos de produto pronto para consumo;
- Os *shakes* possuem baixa atividade de água e estão de acordo com as especificações higiênico-sanitárias previstas pela legislação brasileira.

ANEXOS

Pesquisa Agropecuária Brasileira



In vitro digestibility, antioxidant activity and toxicity of bioproducts enriched with edible mushrooms

Journal:	Pesquisa Agropecuária Brasileira
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Area of knowledge:	FOOD TECHNOLOGY/TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, MICROBIOLOGY/MICROBIOLOGIA
Keyword:	<i>Neurospora</i>, <i>Lentinus</i>, agroindustrial wastes, pineapple

SCHOLARGONE[™]
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/pab-scielo>