



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL



DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO ALIMENTÍCIO INOVADOR A BASE DE
COGUMELO E TUBÉRCULOS TROPICAIS

ANA RITA GAIA MACHADO

MANAUS – AM

2017

ANA RITA GAIA MACHADO

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO ALIMENTÍCIO INOVADOR A BASE DE
COGUMELO E TUBÉRCULOS TROPICAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal – BIONORTE para a obtenção do título de
Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia

Orientação: Maria Francisca Simas Teixeira

Área de Concentração: Biotecnologia

Ficha Catalográfica

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

M149d Machado, Ana Rita Gaia
Desenvolvimento de produto alimentício inovador a base de cogumelo e tubérculos tropicais / Ana Rita Gaia Machado. 2017
88 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Maria Francisca Simas Teixeira
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. rizomas tropicais. 2. produtos isentos de glúten. 3. massas alimentícias. 4. sem glúten. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ANA RITA GAIA MACHADO

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO ALIMENTÍCIO INOVADOR A BASE DE
COGUMELO E TUBÉRCULOS TROPICAIS

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia na área de concentração em Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira – UFAM
Orientador – Presidente da Banca

Profa. Dra. Rosana Antunes Palheta – IFAM/CMZL
Membro

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza – INPA
Membro

Profa. Dra. Larissa de Souza Kirsch – UEA
Membro

Profa. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes – Fiocruz
Membro

MANAUS – AM
Novembro/2017

Nobody said it was easy
(The Scientist - Coldplay)

DEDICATÓRIA

A minha mãe Ana e a Prof. Maria Francisca Teixeira, dedico-lhes esta conquista como gratidão por todo carinho e apoio demonstrados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, muito obrigada pelo seu amor, cuidado e fidelidade.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade de desenvolver este trabalho na Micoteca DPUA/UFAM, pelo apoio e suporte oferecidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, por todo suporte concedido durante o curso.

À Fapeam, pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Dra. Maria Francisca Simas Teixeira. Obrigada por acreditar em mim em todos esses anos, por me orientar a ser a profissional que sou hoje e por me ensinar constantemente a ser uma pessoa correta, humilde e responsável como você é só tenho a lhe agradecer.

A minha mãe Ana, obrigada pelo teu suporte de carinho, comida, massagem, roupa e paciência com a minha constante ausência, amo você.

A minha melhor amiga Mircella, obrigada pelo teu apoio, cumplicidade, caronas, traduções, casa, comida, metodologias e tudo mais que você fez por mim por todos esses anos, te amo demais.

Aos meus amigos queridos, Lorisa e Salomão por me ajudar a construir esse trabalho e por serem meus gurus científicos.

A todos os colegas de laboratório, Adrya, Taciana, Larissa, Lari, Dib, Bianca e Fabiano, muito obrigada por todo apoio, material autoclavado, meio de cultura, amizade e pelos momentos divertidos compartilhados.

Ao meu incentivador principal em relação a minha vida profissional acadêmica, Flávio Brito.

A secretária geral do programa Lúcia Pontes pelo apoio mensais com relatórios e frequências.

Ao Prof. Fábio Lopes pela ajuda na realização das análises físico-químicas.

À Maria da Conceição Loureiro Campelo, responsável pelo Laboratório de Análises de Solos e Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental. Obrigada por auxiliar na realização das análises de minerais.

E a todos que de alguma forma me ajudaram nessa jornada, muito obrigada!

RESUMO

Os consumidores cada vez mais acreditam que os alimentos contribuem para a sua saúde. Em resposta a essa tendência, nos últimos anos, a utilização dos cogumelos comestíveis teve crescimento elevado devido o papel significativo na nutrição e na saúde humana. Com isso esta pesquisa teve como objetivo desenvolver massa alimentícia do tipo capeletti formulado com bioproduto à base de tubérculo tropical miceliado por cogumelo comestível, fonte de enzimas proteolíticas e com qualidade nutricional. Os substratos base utilizados para o cultivo dos cogumelos *Pleurotus ostreatoroseus* Singer e *Lentinus citrinus* Walley e Ramello foram a polpa submetida a cocção dos tubérculos tropicais, cará-roxo (*Dioscorea trifida* L), macaxeira (*Manihot esculenta* Crantz) e inhame-roxo (*Dioscorea alata* L). Para obtenção de cultura pura dos cogumelos, discos miceliais de 10 mm de diâmetro foram inoculados na superfície de ágar aveia com extrato de levedura 0,1% (p/v) – OMYA. As culturas foram mantidas a 25°C, por 7 dias, em ausência de luz. Destas culturas foram retirados 10 mm discos miceliais e transferidos para 50 mL de GYP [glicose peptona com extrato de levedura 0,5% (p/v)] mantidas a 25° C, 150 rpm, por 5 dias. A massa micelial recuperada foi utilizada como inóculo na fermentação no estado sólido. Os cultivos foram mantidos a 25 °C em sem luz, umidade ambiental 80% até completa miceliação do substrato. A seleção do bioproduto foi realizada com base na atividade proteolítica e com o significativo foi determinado o efeito e estabilidade do pH e temperatura, efeito de íons metálicos e inibidores. Para elaboração das massas alimentícias foi realizado com bioproduto selecionado a análise das características nutricionais e tecnológicas. As massas alimentícias foram preparadas adicionando o bioproduto em substituição a farinha de arroz com diferentes proporções, 5%, 10% e 15%. Os capeletti foram submetidos as seguintes análises: testes de cozimento, qualidade microbiológica, composição nutricional e características sensoriais. A maior atividade proteolítica foi determinada no extrato bruto de *P. ostreatoroseus* cultivado em *D. alata* sem suplementação (142,22 U/ mL). As proteases apresentaram atividade ótima a 40 °C e pH 7.0, e estabilidade a 50 ° C e pH 8.0 e foram classificadas como proteases de cisteína com base no efeito de inibidores utilizados. O bioproduto formulado com a massa micelial de *P. ostratoroseus* em tubérculos de *D. alata* apresenta viabilidade nutricional e característica tecnológica para o enriquecimento de massas alimentícias do tipo capeletti, fornecendo um produto fonte de proteínas, fibras e minerais, representando uma inovação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Rizomas tropicais, produtos isentos de glúten e massas alimentícias.

ABSTRACT

Consumers increasingly believe that food contributes to their health. In response to this trend, in recent years, the use of edible mushrooms has grown considerably due to the significant role in nutrition and human health. The objective of this research was to develop a capeletti pasta with a bioproduct formulated with a tropical tuber, edible mushroom, source of proteolytic enzymes and nutritional quality. The base substrates used for the cultivation of the *Pleurotus ostreatoroseus* Singer and *Lentinus citrinus* Walley and Rameloo mushrooms were the pulp undergoing the cultivation of tropical tubers (*Dioscorea trifida* L.), manihot esculenta crantz (*Dioscorea trifida* L.) and purple yam (*Dioscorea alata* L). To obtain a pure culture of the mushrooms, mycelial discs of 10mm in diameter were inoculated on the surface of oat agar with 0.1% (w / v) yeast extract - OMYA. Cultures were maintained at 25 ° C for 7 days in the absence of light. From these cultures 10mm mycelial discs were removed and transferred to 50ml GYP [0.5% (w / v) yeast extract peptone maintained at 25 ° C, 150 rpm, for 5 days. The recovered mycelial mass was used as inoculum in the solid state fermentation. Cultures were maintained at 25 oC in the dark, 80% humidity until complete substrate micelliation. The bioproduct selection was carried out based on the proteolytic activity and with the significant was determined the effect and stability of pH and temperature, effect of metallic ions and inhibitors. To prepare the pasta, a bioproduct was selected to analyze the nutritional and technological characteristics. The pasta was prepared by adding the bioproduct in substitution of rice flour with different proportions, 5%, 10% and 15%. The capeletti were submitted to the following analyzes, cooking tests, microbiological quality, nutritional composition and sensorial characteristics. The highest proteolytic activity was determined in the crude extract of *P. ostreatoroseus* grown in *D. alata* without supplementation (142.22 U / mL). The enzymes presented optimum activities at 40 ° C and pH 7.0, and stability at 50 ° C and pH 8.0. Proteases were classified as cysteine proteases based on the effect of inhibitors used. The bioproduct formulated with the mycelial mass of *P. ostratoroseus* in *D. alata* tubers has nutritional viability and technological characteristics for the enrichment of capeletti type pasta, providing a source product of proteins, fibers and minerals, representing an innovation in the foods.

Key words: Tropical rhizomes, gluten-free products and pasta.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
Referências bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 1: Revisão da literatura.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Cogumelos comestíveis.....	18
2.1.1 <i>Lentinus citrinus</i> Walley e Ramello	19
2.1.2 <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> Singer.....	20
2.2 Plantas alimentícias não convencionais	21
2.2.1 Inhame- roxo (<i>Dioscorea alata</i> L).....	22
2.3 Tubérculos tropicais.....	22
2.3.1 Macaxeira (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	23
2.3.2. Cará-roxo (<i>Dioscorea trifida</i> L).....	24
2.4 Produtos Alimentícios enriquecidos com cogumelos	25
Referências bibliográficas.....	27
CAPÍTULO 2: Objetivos e Material e Métodos.....	31
3. OBJETIVO GERAL.....	32
3.1. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Cogumelos comestíveis.....	33
4.2. Preparação do inóculo por fermentação submersa.....	33
4.3. Preparação de Bioprodutos por fermentação no Estado Sólido.....	34
4.3.1. Tratamento dos tubérculos para cultivo dos cogumelos.....	34
4.3.2. Inoculação e crescimento Micelial.....	34
4.4. Desidratação dos bioprodutos.....	35
4.5. Extração de enzimas e determinação da atividade proteolítica.....	35
4.5.1 Determinação da atividade proteolítica.....	35
4.5.2 Determinação do efeito do pH e da temperatur.....	35
4.5.4. Determinação da estabilidade do pH e temperatura.....	35
4.6. Efeito de íons metálicos e inibidores.....	36
4.7. Composição centesimal.....	36
4.8 Determinação de macro e micro minerais	36
4.9 Análises químicas	37
4.10 Análise das propriedades tecnológicas.....	37
4.11 Teste de toxicidade in vitro.....	38
4.12 Avaliação da qualidade microbiológica	39
4.13 Elaboração da massa alimentícia formulada com o bioproduto.....	39

4.14. Teste de cozimento.....	40
4.15 Avaliação do custo das massas alimentícias	41
4.16. Análise Estatística.....	41
Referências bibliográficas.....	42
CAPÍTULO 3: Resultados e Discussão	
Artigo 1: “ <i>Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers</i>	43
CAPÍTULO 4: Resultados e Discussão	
Artigo 2: “Características nutricionais e tecnológicas de bioproduto inovador para inserção na alimentação humana”.....	58
CAPÍTULO 5: Resultados e Discussão	
Artigo 3: “Elaboração de queijo com biomassa de cogumelo comestível utilizando enzimas de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608”.....	74
CONCLUSÕES	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Lentinus citrininus</i> cultivado em exocarpo de cupuaçu e liteira.....	19
Figura 2. <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> cultivado em exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz.....	20
Figura 3. Inhame-roxo (<i>Dioscorea alata</i> L) A. tubérculo com exocarpo; B. tubérculo sem exocarpo; C. polpa.....	22
Figura 4. Macaxeira (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) A. tubérculo com exocarpo; B. tubérculo sem exocarpo; C. polpa.....	23
Figura 5. Cará-roxo (<i>Dioscorea trifida</i> L) A. tubérculo com exocarpo; B. tubérculo sem exocarpo; C. polpa.....	25
Figura 6. Fluxograma de produção dos bioprodutos formulado com cogumelos comestíveis e tubérculos tropicais.....	33
Figura 7. Fluxograma de produção de produção de capelettis formulados com cogumelo comestível e tubérculo tropical.....	40
Capítulo 3. Figura 1. Efeito do pH (A) e temperatura (B) na atividade proteolítica de <i>P. ostreatoroseus</i> cultivado em <i>Dioscorea alata</i>	52
Capítulo 3. Figura 2. Efeito do pH (A) e a temperatura (B) na estabilidade de <i>P. ostreatoroseus</i> cultivado em <i>Dioscorea alata</i>	53
Capítulo 5. Figura 1. Aspectos morfológicos dos capelettis experimentais. Capeletti padrão (A); capeletti com 5% do bioproducto (B); capeletti com 10% do bioproducto (C) e capeletti com 15% do bioproducto (D).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mistura de substratos para cultivos de <i>L. citrinus</i> e <i>P. ostreatoroseus</i>	34
Tabela 2. Formulação das massas alimentícias com tubérculo miceliado	39
Capítulo 3 - Tabela 2. Característica morfológica e média de crescimento micelial radial (cm) de <i>L. citrinus</i> e <i>P. ostreatoroseus</i> em meios ágar Batata Dextrose adicionado de Extrato de Levedura 0,5% (p/v) – BDA e ágar com farelo aveia adicionado de Extrato de Levedura 0,1% (p/v) – OMYA após 6 dias de cultivo	49
Capítulo 3 - Tabela 3. Atividade proteolítica dos cultivos de <i>L. citrinus</i> e <i>P. ostreatoroseus</i> em tubérculos tropicais suplementados com farelo de arroz e crueira	50
Capítulo 3 - Tabela 4. Efeito de ions metálicos e inibidores sobre a atividade de proteases de <i>P. ostreatoroseus</i>	54
Capítulo 4 - Tabela 1. Composição centesimal do bioproduto à base de <i>P. ostratoroseus</i> e <i>D. alata</i>	66
Capítulo 4 - Tabela 2. Minerais presentes no bioproduto à base de <i>P. ostratoroseus</i> e <i>D. alata</i>	66
Capítulo 4 - Tabela 3. Características tecnológicas do bioproduto à base de <i>P. ostratoroseus</i> e <i>D. alata</i>	70
Capítulo 5 - Tabela 2. Teste de qualidade dos capelettis enriquecidos com o bioproduto à base de cogumelo comestível e tubérculo tropical	80
Capítulo 5 - Tabela 3. Composição centesimal dos capelettis enriquecidos com o bioproduto à base de cogumelo comestível e tubérculo tropical	82
Capítulo 5 - Tabela 4. Análise de minerais dos capelettis enriquecidos com o bioproduto à base de cogumelo comestível e tubérculo tropical	83
Capítulo 5 - Tabela 5. Avaliação do custo do capeletti padrão (porção: 700g).....	84
Capítulo 5 - Tabela 6. Avaliação do custo do capeletti com 5% de bioproduto (porção: 700g)	84
Capítulo 5 - Tabela 7. Avaliação do custo do capeletti com 10% de bioproduto (porção: 700g)	84

1. INTRODUÇÃO

A exigência dos consumidores por alimentos saudáveis está estimulando o desenvolvimento de tecnologias inovadoras, condição que está contribuindo para realização de diversas pesquisas com a finalidade de elaborar produtos com qualidade nutricional para promoção de saúde (Abdel-Aziz et al., 2015; Melo et al., 2017).

Nos últimos anos, em resposta a essa tendência, a utilização dos cogumelos comestíveis está em contínuo crescimento como fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e, de compostos bioativos com valor medicinal, características que despertam interesse comercial do consumidor (Bernaud; Rodrigues, 2013; Mattila et al., 2016; Zoho et al., 2016).

Nesse contexto, *Pleurotus ostreatoroseus* e *Lentinus citrinus*, cogumelos comestíveis de comprovada importância biotecnológica, são produtos saudáveis, pobres em calorias e gorduras, ricos em proteínas, vitaminas, fibras dietéticas e aminoácidos essenciais (lisina, triptofano e leucina). Além disso, *L. citrinus* sintetiza proteases com atividades diversas, inclusive tem potencial fibrinolítico enquanto *P. ostreatoroseus* tem alto teor de fibra (Teixeira et al, 2011; Machado et al., 2015; Souza et al., 2016).

Dessa forma, a inserção de espécies de cogumelos na dieta humana associados a produtos consumidos, tradicionalmente, constitui uma alternativa vantajosa e viável para fabricação de novos produtos com qualidades diferenciadas dos alimentos convencionais que podem contribuir para manutenção, promoção da saúde e qualidade de vida (Falguera et al., 2012; Khatua et al, 2013).

Portanto, *Dioscorea trifida* (cará-roxo), *Dioscorea alata* (inhame roxo) e *Manihot esculenta* (macaxeira) são hortaliças que nos rizóforos tem expressivo teor de carbono, baixo teor de nitrogênio e minerais, atributos que proporcionam a sua utilização como substrato para crescimento de cogumelos comestíveis e em consequência geração de novos alimentos (Barlagne et al, 2016; Davidson et al, 2017; Tihamiyu et al, 2017).

Os rizóforos do gênero *Dioscorea* também podem ser utilizados na fabricação de farinha e extração de amido. A farinha pode substituir, com vantagens econômicas, parte da farinha de trigo na produção de pão (Ramos et al., 2013). Na cozinha, tem uso variado, elaboração de doces, bolos e cremes, inclusive como ingrediente de iguarias (Alamu et al, 2014).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, NAHLA A. et al. **Biological treatments as a mean to improve feed utilization in agriculture animals—An overview.** Journal of Integrative Agriculture, v. 14, n. 3, p. 534-543, 2015.
- ALAMU, E. O., MAZIYA-DIXON, B., OKONKWO, C. C., & ROBERTS, A. **Physicochemical and bioactive properties of selected white yam (*Dioscorea rotundata*) varieties adapted to riverine areas of Nigeria.** African Journal of Food Science, 8(7), 402-409, 2014.
- BARLAGNE, C., CORNET, D., BLAZY, J. M., DIMAN, J. L., & OZIER-LAFONTAINE, H. **Consumers' preferences for fresh yam: a focus group study.** Food science & nutrition, 5(1), 54-66, 2017.
- BERNAUD, F. S. R; RODRIGUES, T. C. **Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo.** Arq Bras Endocrinol Metab;57/6, 2013.
- DAVIDSON, G. I., ENE-OBONG, H. N., & CHINMA, C. E. **Variations in Nutrients Composition of Most Commonly Consumed Cassava (*Manihot esculenta*) Mixed Dishes in South-Eastern Nigeria.** Journal of Food Quality, 2017.
- FALGUERA, VÍCTOR; ALIGUER, NÚRIA; FALGUERA, MERCÈ. **An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products?.** Food Control, v. 26, n. 2, p. 274-281, 2012.
- KHATUA, SOMANJANA; PAUL, SNIGDHA; ACHARYA, KRISHNENDU. **Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: a review.** Res J Pharm Technol, v. 6, n. 5, p. 496-505, 2013.
- MACHADO, A. R. G; TEIXEIRA, M. F. S; DE SOUZA KIRSCH, L; CAMPELO, M. D. C. L; DE AGUIAR OLIVEIRA, I. M. **Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region.** Saudi Journal of Biological Sciences, 2015.
- MATTILA, P; SUONPÄÄ, K; PIIRONEN, V. **Functional properties of edible mushrooms.** Nutrition, v. 16, n. 7, p. 694-696, 2016.
- MELO, R. D; et al. **Digestibility of Diets Containing Cara Flour (*Dioscorea trifida* L.) For Laying Hens.** International Journal of Poultry Science, v. 14, n. 3, p. 156, 2015.
- RAMOS, A. D. S., CASTRO, A. P. D., MEDEIRO, C. M., FRAXE, T. D. J. P., MELO, S. R. D. D. **Avaliação da brotação para obtenção de mudas de diferentes partes do tubérculo de cará roxo (*Dioscorea trifida* L).** Revista Brasileira de Agroecologia, 9(1), 170-175, 2014.
- SOUZA, R. A; et al. **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; KIRSCH, L; MACHADO, A. R. G; PINTO, A. C. S; MONTEIRO, J. A. F; PALHETA, R. A; SILVA, L.S.C. **Bioprocesso para produção de extrato proteolítico fibrinolítico, extrato proteolítico fibrinolítico e composição fibrinolítica de cogumelo comestível**, 2011.

TIAMIYU, H. K., BABAJIDE, J. M., & ADEYEYE, S. A. O. **Some quality attributes of heat-moisture treated water yam (*Dioscorea alata*) starch**. Cogent Food & Agriculture, 3(1), 1278192, 2017.

ZOHO BI, F. G. A; AMOIKON, K. E; AHUI-BITTY, M. L; KOUAMÉ, K. G; KATI-COULIBALY, S. **Nutrients value of some edible mushrooms in Côte d'Ivoire**. Agriculture and biology journal of north America, 2016.

CAPÍTULO 1
Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cogumelos comestíveis

Os cogumelos são macrofungos sazonais e ocupam diversos nichos nos ecossistemas florestais. Diversas espécies causam efeitos benéficos à saúde do homem, condição que está estimulando o interesse pelo desenvolvimento de estudos científicos, em particular na indústria de alimentos, para uso consciente como fontes nutritivas e de compostos com atividade biológica funcional (Ma et al., 2013; Ao et al., 2016).

Na literatura estima que existem aproximadamente 140.000 espécies de cogumelos, dos quais apenas 10% são conhecidos. Deste quantitativo, cerca de 50% são comestíveis e 700 têm comprovada propriedade farmacológica, propriedade que está promovendo o reconhecimento mundial da denominação “cogumelo medicinal”, termo que caracteriza a ação medicinal desses fungos (Costa, 2010; Kim, 2017; Wen et al., 2017).

Nos últimos anos, o consumo de cogumelos vem aumentando e ganhando destaque gastronômico, em função do seu sabor refinado e valor nutricional excepcional. Comumente são alimentos que tem conteúdo lipídico baixo e também são fontes de carboidratos, fibras e proteínas, além de aminoácidos e vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K). Além disso, os cogumelos estão se tornando cada vez mais atraentes como alimentos funcionais e produtos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas (Correa et al., 2015; Farzana; Mohajan, 2015).

Apesar do conhecimento do valor alimentício dos cogumelos, o conteúdo de nutrientes varia em função da espécie ou da linhagem cultivada, do processamento após colheita, do estágio de desenvolvimento do basidioma e do tipo de substrato utilizado para cultivo. (Fonseca et al., 2014).

O consumo de cogumelos comestíveis no Brasil está estimado em aproximadamente 160 g/habitante, valor inferior quando comparado ao consumo médio dos franceses, que chega a 4 Kg/habitante, diferença que está associada a falta de tradição e ao valor comercial relativamente elevado no mercado brasileiro (ANPC, 2013). *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus blazei*, *Agaricus brasiliensis* e *Agaricus sylvaticus* são as espécies de maior comercialização e consumo no Brasil, (Costa, 2010).

Nas últimas décadas o uso de cogumelos e/ou de seus extratos está em expansão, devido suas propriedades farmacêuticas que proporcionam a indicação como coadjuvante no tratamento de diversas patologias (Silva; Jorge, 2015). Dessa forma, os cogumelos estão se tornando populares como ingredientes em função do seu conteúdo nutricional para

fortificação de diversas preparações, entre outras, biscoitos, bolos e massas alimentícias que são processados por tecnologia simples e de baixo custo (Farzana; Mohajan, 2015).

2.1.1 *Lentinus citrinus* Walley e Ramello

O gênero *Lentinus* foi identificado por Fries, publicado validamente em 1925, e classificado na ordem Agaricales, família Pleurotaceae, atualmente constitui a família Lentinaceae (Putzke, 2002; Machado et al., 2015).

Nos estudos realizados por Putzke (2002), após uma revisão do material depositado em herbários brasileiros envolvendo os gêneros *Lentinus* e *Pleurotus*, esse cientista elaborou lista e chaves para identificação das espécies desses dois gêneros. A partir desse estudo ficou constatado que *Lentinus* estava representado por aproximadamente 14 espécies nativas. Enquanto *Pleurotus* representado por 15 espécies. Assim, *Lentinus* está classificado no Reino Fungi; Filo Basidiomycota; Ordem Agaricales; Família Lentinaceae e, representado por espécies comestíveis, de importância econômica, como *L. citrinus* (Figura 1).



Figura 1. *Lentinus citrinus* cultivado em exocarpo de cupuaçu e liteira

O gênero *Lentinus* tem píleo pigmentado, quando velho ou seco, camada cortical formada por hifas prostadas, lamelas com borda mais ou menos denticulada, crenulada ou serrilhada e estipe central ou excêntrico (Pereira; Putzke, 1989).

Lentinus spp. sintetiza diversos compostos bioativos, entretanto as peptidases desempenham papel regulador na natureza, com ênfase na morfogênese, fisiologia e metabolismo de cogumelos. Dentre a diversidade de aplicação das peptidases, essas enzimas também são altamente qualificadas para uso no processamento de alimentos, em panificação e confeitaria, clarificação de sucos e produção de queijo (Singhal et al., 2012; Fonseca et al., 2014; Machado, et al 2015).

2.1.2 *Pleurotus ostreatoroseus* Singer

Atualmente Lechner, et al (2005) citam *P. ostreatoroseus* como *P. djamor var. roseus* Corner (Figura 2), uma espécie que tem píleo espatulado a flabeliforme, de coloração rosa quando jovem, esbranquiçada ou amarelada após o envelhecimento, com lamelas decorrentes, estipe excêntrico quase lateral esbranquiçado quando fresco, creme quando seco. Como outras espécies do gênero, ocorre em áreas tropicais, cresce bem em temperaturas superiores a 20°C (Menolli; Paccoala-Meirelles, 2010; Omarini et al., 2010).



Fonte: Fonseca

Figura 2. *Pleurotus ostreatoroseus* cultivado em exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz

Nos diferentes substratos, durante o ciclo de crescimento, os cogumelos sintetizam e excretam vários compostos. Pesquisas realizadas revelam que *P. ostreatoroseus* foi eficiente produtor de proteases nos cultivos em casca de cupuaçu e farelo de arroz, mantidos na ausência de luz. Na citação de Correia, et al (2015) também há registro da ação antitumoral e imunomoduladora de polissacarídeos isolado dos basidiomas desta espécie.

Espécies de *Pleurotus* e *Lentinus* são fungos que tem ampla adaptabilidade a diversas condições ambientais, por isso, comumente estão sendo utilizados na bioconversão de materiais lignocelulósicos pela tecnologia da fermentação em estado sólido. Tal bioprocessos, que proporciona o uso de vários substratos para o crescimento de espécies de cogumelos comestíveis, a exemplo de palhas, gramíneas, serragens, cascas de coco, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar, farelos, entre outros de natureza orgânica (Sala Uddin, 2015).

Em diversos estudos mostraram que casca de cupuaçu, semente de açaí, coroa e casca de abacaxi suplementados com farelo de arroz ou serragem, estimularam o crescimento de *P. ostreatoroseus* quanto de *L.citrinus* (Fonseca et al 2014; Machado et al., 2015; Souza et al, 2016).

2.2 Plantas alimentícias não convencionais

Plantas alimentícias são aquelas que possuem uma ou mais partes que podem ser utilizados na alimentação humana, tais como: raízes tuberosas, tubérculos, bulbos, rizomas, cormos, ramos tenros, folhas, brotos, flores, frutos e sementes ou ainda látex, resina e goma, ou que são usadas para obtenção de óleos e gorduras comestíveis. Inclui-se neste conceito também as especiarias, substâncias condimentares e aromáticas (Kinupp, 2008).

Brasil (2010) classifica como hortaliças não-convencionais produtos de origem vegetal com distribuição limitada, restrita a determinadas localidades ou regiões, exercendo grande influência na alimentação e na cultura de populações tradicionais. Além disso, são espécies que não estão organizadas enquanto cadeia produtiva propriamente dita, diferentemente das hortaliças convencionais (batata, tomate, repolho, alface, etc.), não despertando o interesse comercial por parte de empresas de sementes, fertilizantes ou agroquímicos.

Tais alimentos são nutritivos, produzem sensação saborosa ao serem ingeridos e já foram bastante apreciados, fazendo parte das refeições familiares. Porém, aos poucos, foram sendo esquecidos ou desvalorizados. Entre as principais razões do abandono gradual desses alimentos está o fato de as pessoas terem migrado para cidades grandes, passando a consumir uma quantidade maior de alimentos industrializados (Dias et al, 2009).

Diversas espécies ainda sub-exploradas da flora brasileira, podem constituir uma fonte de renda alternativa e uma opção de diversificação cultural, sobretudo na agricultura familiar. A maioria das plantas não-convencionais é desconhecida, e um reduzido número delas apresenta comprovação científica de suas propriedades. Para maior valorização das plantas tradicionais de uso popular são necessários conhecimentos técnicos acerca do cultivo e uso em grande escala (Kinupp, 2008).

No que se refere às hortaliças nativas, a pesquisa, o cultivo, o uso e a valorização parece ser ainda reduzido. As frutas têm o chamariz da cor, da doçura e da suculência, já as hortaliças em geral são tratadas como "mato", "coisas verdes" aguadas e sem sabores característicos. As nativas, as quais são tratadas aqui como hortaliças regionais ou genericamente como não-convencionais, inegavelmente são "matos" enquanto não cultivadas e utilizadas com regularidade (Brasil, 2010)

As hortaliças não-convencionais são importantes na expressão da cultura de determinadas populações e que em algum momento, tiveram um largo consumo em algumas regiões ou comunidades e que devido às mudanças no comportamento alimentar, passaram a ter expressão econômica e social reduzida, perdendo mercado para outras hortaliças. Como exemplo, o inhame (cará) que até meados da década de 60 apresentava mercado expressivo e

grande consumo pela população, fazendo parte do café-da-manhã. Hoje, consumo deste tubérculo foi reduzido se compararmos com outras hortaliças como tomate e batata (Brasil, 2010).

Dentre as PANC, são importantes, a *Pereskia aculeata mill* (Ora-pro-nóbis), a *Xanthosoma sagittifolium* (Taioba), *Acmella oleracea* (Jambu), *Solanum sessiliflorum* (cubiu), *Eryngium foetidum* (chicória-de-caboclo). E entre as Dioscoreaceae nativas, uma das espécies que pode ser consumida como alimento é a caratinga (*Dioscorea dodecaneura Vell.*), que ocasionalmente vem sendo cultivada em quintais ou jardins como ornamental, devido às belas folhas (Kinupp, 2008).

2.2.1 Inhame- roxo (*Dioscorea alata* L)

Dioscorea alata (Figura 3), da família Dioscoreaceae é uma planta trepadeira tropical que produz tubérculos comestíveis, de forma variada. Os Inhames constituem alimento economicamente básico para milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais, que foi principalmente uma cultura alimentar, mas que agora são utilizados como matéria-prima em uma cadeia de produção de alimentos em benefício dos produtores e dos consumidores (Ellong et al., 2015).

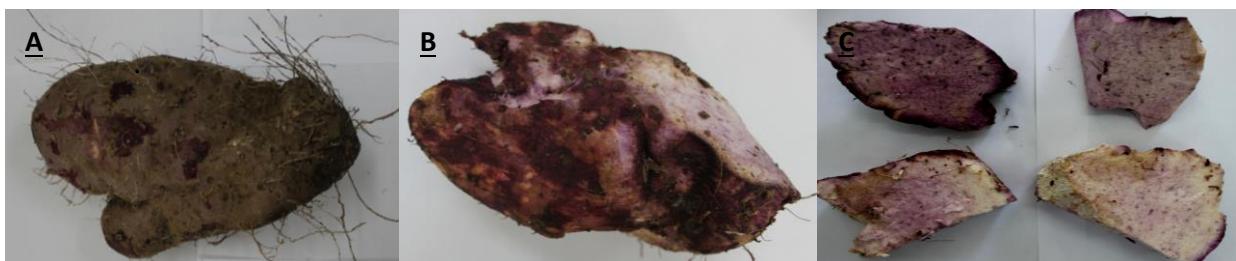


Figura 3. Inhame-roxo (*Dioscorea alata* L) A. tubérculo com exocarpo; B. tubérculo sem exocarpo; C. polpa

Dioscorea alata originária do Extremo Oriente e é considerada a espécie mais representativas, devido a maior disponibilidade e valor econômico. E tem como característica caule quadrado, tubérculos variando na coloração da polpa (branca, amarela cremosa ou roxa) (Ellong et al., 2015; Nadia et al., 2015).

A produção de inhame no Brasil, incluindo *D. alata* e *D. cayenensis* / *D. rotundata*, foi estimada em 232,100 toneladas, em 2010, em uma área de 25.300 ha concentradas nas regiões Nordeste e Sudeste, principalmente produzidos por agricultores de pequena escala e em reduzidas áreas de plantio. O ciclo de vida da *D. alata* varia de cinco a 12 meses, dependendo da espécie e variedade. (Siqueira et al., 2012; Ellong et al., 2015).

Espécies de *Dioscorea* são cultivadas em pequenas quantidades de terra, muitas vezes, menos de um hectare e geralmente plantada em um campo bem drenado, embora rendimentos

aceitáveis também são obtidos a partir de solo argiloso, especialmente aqueles ricos em matéria orgânica (Perlasa et al., 2010).

D. alata, vulgarmente conhecido como inhame chinês ou inhame roxo, é um alimento funcional amplamente consumida no Sudeste da Ásia e da África amplamente utilizado na medicina tradicional como purgativo, diurético, antiespasmódico agente anti-inflamatório e anti-reumático e uma das plantas mais nutritivas entre a família tropical raiz-colheita (Dey; Chaudhur, 2015; De Paula et al., 2012).

Estudos mostram que *D. alata* tem propriedade medicinal, com atividade benéfica para funções gastrointestinais e proporcionar uma proteção oxidativa, possui atividades anti-hiperglicémica, tem papel protetor contra paracetamol induzida hepatotoxicidade e efeitos antioxidantes (Maithili et al., 2011).

O *D. alata* é produtora de túberos de alto valor nutritivo e energético para alimentação humana, é rica em carboidratos, pobre em gordura, possui sais minerais: cálcio, fósforo e ferro, além de vitaminas do complexo B, principalmente B1 (Tiamina) e B5 (Niacina), podendo assim ser indicada na alimentação pelo seu alto valor energético. (Da Silva Ramos et al., 2014).

2.3 Tubérculos tropicais

2.3.1 Macaxeira (*Manihot esculenta* Crantz)

Macaxeira é uma planta dicotiledônea, da família Euphorbiaceae e gênero *Manihot*, originária das Américas, está representada por grande número de espécies, mas, a única cultivada para fins alimentícios é a *Manihot esculenta* Crantz (Figura 4), que pode ser da variedade brava ou mansa, devido ao teor de glicosídeos cianogênicos (que liberam o ácido cianídrico) presente (Bradbury et al., 2013).



Figura 4. Macaxeira (*Manihot esculenta* Crantz A. tubérculo com exocarpo; B. tubérculo sem exocarpo; C. polpa

A qualidade culinária dos tubérculos frescos é um parâmetro importante na seleção de variedades de macaxeira. A identificação dessa qualidade envolve fatores variados e

complexos por constituir-se de um conjunto de características físicas, químicas e sensoriais (Wakil et al., 2015).

A macaxeira vem sendo utilizada nos mais diversos campos da atividade econômica, destacando-se o uso na alimentação humana, principalmente pelas populações dos países em desenvolvimento, que são os seus maiores produtores e consumidores (Quee et al., 2016).

No preparo de produtos derivados da macaxeira, como o tubérculo cozido, frito, em forma de bolo, purê, suflê, entre outros, o cianeto presente na polpa é liberado por volatilização atingindo níveis baixíssimos, tornando-os inócuo. No processo de cocção e fritura proporcionam redução substancial do conteúdo de cianeto da polpa, variando entre 56 e 80% (cocção) e, 70 a 82% (fritura) (Wakil et al., 2015).

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

Os sistemas de produção e de transformação da macaxeira e seus derivados apresentam grande diversidade tecnológica, variando-se desde os pequenos cultivos em quintal à produção tradicional dos pequenos agricultores das zonas semi-áridas do Nordeste e regiões Amazônicas. Contudo as regiões Norte e Nordeste destacam-se como principais consumidoras, sendo a produção essencialmente utilizada na dieta alimentar, na forma de farinha (De Siqueira et al., 2015).

A industrialização da macaxeira visando a produção de bens econômicos como farinhas e féculas desde o descascamento até a torrefação gera resíduos, líquidos e sólidos, que podem ser a água de limpeza dos tubérculos, a casca ou película marrom, a água da prensagem da massa ralada, a água de extração da fécula, as fibras e a crueira (Wakil et al., 2015).

2.3.2 Cará-roxo (*Dioscorea trifida* L)

D. trifida (Figura 5) foi provavelmente a primeira espécie de cará cultivada pelos indígenas e imigrantes da Europa e África, na Amazônia. Embora exista controvérsia acerca da origem e domesticação desse tubérculo, estudos mostram que entre as espécies de

Discoreaceae, de importância econômica *D. trifida* teve origem na América do Sul, áreas de fronteiras entre o Brasil, Suriname, Guiana e Guiana Francesa (Nascimento et al., 2015)

No Brasil, *D. trifida* (Figura 5) ocorre em áreas de floresta tropical, savana do Planalto Central e campos e florestas da Cadeia do Espinhaço. Em outras regiões do Brasil foi introduzida pelos agricultores tradicionais, no Vale do Ribeira (São Paulo), Baixada Cuiabana (Mato Grosso), em Manaus e seus arredores no Rio Negro e em Belém (Nascimento et al., 2015). Esta espécie tem uma haste não-espinhoso e seus tubérculos são geralmente pequenos (menos de 500 g) com polpa branca ou roxa em forma de pêra (Ellong et al., 2015).



Figura 5. Cará-roxo (*Dioscorea trifida* L) A. tubérculo com exocarpo; B. tubérculo sem exocarpo; C. polpa

Na Região Amazônica o cará-roxo pode ser consumido de diversas formas: cozidos, em forma de purê e como ingrediente para sopas e cozidos, assim como sua farinha pode ser acrescentada no desenvolvimento de pães, tortas, bolos e mingaus. Contudo, as pesquisas sobre este tubérculo ainda são escassas e conseqüentemente são desconhecidas as respectivas propriedades nutricionais (Castro et al., 2012).

O cará-roxo se destaca como alimento devido o valor nutricional e adstringente, tem atividade antimicrobiana, propriedade diurética e energizante, permitindo ser utilizado no combate a desnutrição e no tratamento de várias doenças, como diabetes e redução do colesterol (Melo et al., 2015);

Os dados da literatura mostram que cogumelos e tubérculos comestíveis são produtos alimentícios usados na dieta e que tem propriedades bioativas, características que direciona para o uso em associação originando produtos com qualidade nutricional, características adequados para consumo, promoção de saúde e incentivo ao aumento da produção desses tubérculos (Purwandari et al., 2012; Teixeira et al., 2013)

2.4 Massas Alimentícios enriquecidos com cogumelos

Diversas espécies de cogumelos comestíveis estão sendo adicionados em produtos alimentícios para enriquecimento da composição de nutrientes, melhorar a textura, sabor e

acrescentar compostos bioativos para consumo dietético de valor funcional (Adedayo et al., 2010; Khatun et al., 2012; Farzana et al., 2017). Os cogumelos comestíveis são alimentos atraentes para desenvolvimento de produtos funcionais, em especial, por expressarem propriedades antioxidantes, antitumorais, antimicrobiano, embora tenham amplo espectro de atividades biológicas (Khatun et al., 2012).

Nas últimas décadas, os hábitos modernos estão contribuindo para o desenvolvimento crescente e conscientização sobre o consumo de alimentos saudáveis. Com esse objetivo, os cogumelos preenchem lugar de destaque e estão ganhando maior aceitação como alimento ou ingrediente alimentício devido às suas propriedades nutricionais e funcionais especiais.

A adição de biomassa de cogumelos em produtos diversos causa acréscimo principalmente de proteínas, fibras, minerais e peptidases, compostos bioativos que melhoram as propriedades de manipulação, reduzem o tempo de mistura da massa, assim como, aumentam substancialmente o volume, facilitando a abertura da massa (Ahmad et al., 2015).

Dentre os produtos formulados com biomassa de cogumelo tem ênfase os produtos de panificação. Um desses produtos são as massas alimentícias que prioritariamente são produzidas à base de cereais, cuja importância está relacionada com o baixo custo, preparação fácil, propriedades sensoriais agradáveis, vida útil longa de papel importante na nutrição e cultura humana (Correia et al., 2017).

Massas alimentícias são disponíveis nas mais diversas formas, ricas em amido, tem baixo teor de gordura por isso são produtos predisponentes ao enriquecimento com nutrientes essenciais para consumo na dieta (Spanholi; Oliveira, 2009).

No Brasil em 2015, o consumo *per capita* de massas alimentícias, a preferência do consumidor foi por massas secas, seguidas de massas instantâneas e frescas, condição que mostrou consumo de 4,96 kg/ano, 0,97kg/ano e 0,23 kg/ano, respectivamente (Abimapi, 2017).

Embora existam vários estudos mostrando a introdução de cogumelo na forma de pó ou farinha, inexistente formulação de capeletti à base de cogumelos. O capeletti é um tipo de massa fresca que pode ser recheada com carne, com queijo ou com outros ingredientes. O nome *capelete* origina-se do italiano *cappelletto* (no plural, *cappelletti*), que significa “chapeuzinho”(Guarienti; Miranda, 2007). Dessa forma, utilizar o bioproduto formulado com *P. ostreatoroseus* e *D. alata* para enriquecer massa de capeletti seria uma alternativa para disponibilizar um alimento inovador e com potencial nutricional.

REFERÊNCIAS

- ABIMAPI - Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados. **Massas alimentícias**. Disponível em: <<http://www.abimapi.com.br/macarrao>>. Acesso em: 19 set. 2017.
- ADEDAYO, M. R., OLASEHINDE, G. I., AJAYI, A. A. **Nutritional value of some edible mushrooms from Egbe farmland, West Yagba Local Government Area, Kogi State, Nigeria**. *African Journal of Food Science*, 4(4), 1-3, 2010.
- AHMED, OSMAN et al. **Radiologically guided placement of mushroom-retained gastrostomy catheters: long-term outcomes of use in 300 patients at a single center**. *Radiology*, v. 276, n. 2, p. 588-596, 2015.
- ANPC: Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos. **O setor de cogumelos no Brasil**, 2013. Disponível em: <http://www.anpc.org.br/index.php/informacoes/setor-de-cogumelos>. Acesso em: 20 de julho de 2017.
- AO, T., SEB, J., AJUNGLA, T., DEB, C. R. **Diversity of Wild Mushrooms in Nagaland, India**. *Open Journal of Forestry*, 6(05), 404, 2016.
- BRADBURY, E. JANE et al. **Geographic differences in patterns of genetic differentiation among bitter and sweet manioc (*Manihot esculenta* subsp. *esculenta*; Euphorbiaceae)**. *American journal of botany*, v. 100, n. 5, p. 857-866, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de hortaliças não-convencionais**. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília : Mapa/ACS, 2010.
- CASTRO, A. P; FRAXE, T. J. P; PEREIRA, H. S; KINUPP, V. F. **Etnobotânica das variedades locais do cará (*Dioscorea* spp.) cultivados em comunidades no município de Caapiranga, estado do Amazonas**. *Acta bot. bras.* 26(3): 658-667, 2012.
- CORREIA, P. M., ESTEVES, S. A., GUINÉ, R. P. F. **Effect of mushroom powder in fresh pasta development**. In *Baltic Conference on Food Science and Technology: conference proceedings*. LLU, 2017.
- COSTA, N. M. B; ROSA, B. R. **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e efeitos fisiológicos**. Editora Rubio, 2010
- DA SILVA RAMOS, A; et al. **Avaliação da brotação para obtenção de mudas de diferentes partes do tubérculo de cará roxo (*Dioscorea trifida* L)**. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 9, n. 1, 2014.
- DE PAULA, C. D; et al. **Características físico-químicas e morfológicas de rizóforos de inhame (*Dioscorea alata*)**. *Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 10, n. 2, p. 61-70, 2012.

DE SIQUEIRA, N. P. N. C., DA SILVA CAZUMBA, Í. R., DE ANDRADE, A. C. B., CONCEIÇÃO, C. G., DOS SANTOS ANDRADE, J., CARDOSO, R. D. C. V., DRUZIAN, J. I. **A farinha de mandioca (*Manihot esculenta crantz*) de copioba e a vida no campo, em Nazaré-BA: contribuições da pesquisa qualitativa à indicação geográfica.** Cadernos de Prospecção, 8(2), 383, 2015

DEY, P; CHAUDHURI, T. K. **Phytochemical Characterization of *Dioscorea Alata* Leaf and Stem By Silylation Followed by GC-MS Analysis.** Journal of Food Biochemistry, 2015.

DIAS, A. C. P; et al. **Avaliação do consumo de hortaliças não convencionais pelos usuários das unidades do Programa Saúde da Família (PSF) de Diamantina-MG.** Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 16, n. 3, p. 279-284, 2009.

ELLONG, E. N. et al. **Physicochemical, nutritional and sensorial qualities of Boutou yam (*Dioscorea alata*) varieties.** Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, v. 3, n. 2, p. 138-150, 2015.

FARZANA, T ;MOHAJAN, S. **Effect of incorporation of soy flour to wheat flour on nutritional and sensory quality of biscuits fortified with mushroom.** Food science & nutrition, 3(5), 363-369, 2015

FONSECA, T. R B; et al. **Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da Floresta Amazônica.** Revista Brasileira de Tecnologia, v. 8, n. 01, p. 1227-1236, 2014.

GUARIENTI, E, M; MIRANDA, M. Z. **Massa Fresca Tipo Capelete Congelada.** Embrapa Informação Tecnológica, 1 ed, p 40, 2007.

KHATUN, S., ISLAM, A., CAKILCIOGLU, U; CHATTERJE, N. C. **Research on mushroom as a potential source of nutraceuticals: A review on Indian perspective.** American Journal of Experimental Agriculture, 2(1), 47, 2012.

KIM, K. H. **Discovery of new bioactive metabolites from Korean wild mushrooms.** *균학회/소식*, 29(1), 21-22, 2017.

KINUPP, V. F; BARROS, I. B I. **Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas.** Ciencia e Tecnologia de Alimentos. Campinas, Sp. Vol. 28, n. 4 (out./dez. 2008), p. 846-857, 2008.

KIRSCH, L. S; et al. **Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the peg/phosphate aqueous two-phase system.** Química Nova, v. 35, n. 10, p. 1912-1915, 2012.

LECHNER, B. E., WRIGHT, J. E., & ALBERTÓ, E. **The genus *Pleurotus* in Argentina: mating tests.** Sydowia-horn-, 57(2), 233, 2005.

MA, L., CHEN, H., DONG, P., LU, X. **Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*.** Food Chemistry, 139(1), 503-508, 2013.

- MACHADO, A. R. G; TEIXEIRA, M. F. S; DE SOUZA KIRSCH, L; CAMPELO, M. D. C. L; DE AGUIAR OLIVEIRA, I. M. **Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region.** Saudi Journal of Biological Sciences, 2015.
- MAITHILI, V., DHANABAL, S. P., MAHENDRAN, S., & VADIVELAN, R.. **Antidiabetic activity of ethanolic extract of tubers of *Dioscorea alata* in alloxan induced diabetic rats.** Indian journal of pharmacology, 43(4), 455, 2011.
- MELO, R. D; et al. **Digestibility of Diets Containing Cara Flour (*Dioscorea trifida* L.) For Laying Hens.** International Journal of Poultry Science, v. 14, n. 3, p. 156, 2015.
- MENOLLI JUNIOR, N; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. **Obtention of *Lentinula edodes* strains resistant to high temperatures and selection of strains resistant to *Trichoderma* sp.** Ciência e Agrotecnologia, v. 34, n. SPE, p. 1640-1646, 2010.
- MUMTAZ, M. S., KHAN, N. A., REHMAN, A., JABBAR, A. **Production of oyster mushroom (*Pleurotus pulmonarius*) on different agriculture wastes combination with lemon grass (*Cymbopogon citratus*).** Pakistan Journal of Phytopathology, 28(1), 71-74, 2016.
- NADIA, L; et al. **Chemical characterization of flour fractions from five yam (*Dioscorea alata*) cultivars in Indonesia.** Journal of Engineering and Technological Sciences, v. 47, n. 1, p. 92-103, 2015.
- NASCIMENTO, W. F; et al. **Distribution, management and diversity of the endangered Amerindian yam (*Dioscorea trifida* L.).** Brazilian Journal of Biology, v. 75, n. 1, p. 104-113, 2015.
- OMARINI, A; et al. **Sensory analysis and fruiting bodies characterisation of the edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Polyporus tenuiculus* obtained on leaf waste from the essential oil production industry.** International journal of food science & technology, v. 45, n. 3, p. 466-474, 2010.
- PEREIRA, A. B., PUTZKE, J. **Lista preliminar de vegetação da Península Keller-Ihla do Rei Jorge-Antártica.** In Resumos, Congresso Nacional de Botânica (Brazil). vol. 40, p. 26, 1989
- PERLASA, F. B.; RUIZA, R. B.; PANTEA, R.E. **Field evaluation of selected yam (*Dioscorea alata*) accessions in acid soils and saline-prone areas.** In: 19th World Congress of Soil Science, 2010.
- PURWANDARI, U. **Annealed purple yam (*Dioscorea alata* var. *purpurea*) flour improved gelatinisation profile, but increased glycemic index of substituted bread.** International Food Research Journal 20(2): 865-871, 2012.
- PUTZKE, J. **Os gêneros *Pleurotus* e *Lentinus* (Agaricales, basidiomycota, fungos) no Brasil - i: lista de espécies e chaves de identificação.** Caderno de Pesquisa série Biologia. Vol 14 Num 1, 2002.

QUEE, D. D, et al. **Economic Evaluation of Weed Control and Herbicide Residues on Cassava (*Manihot esculenta Crantz*) in Ghana.** Journal of Agricultural Science, v. 8, n. 7, p. 47, 2016.

SALA UDDIN, G. M. **Evaluation of antimicrobial, antioxidante and cytotoxic property of *Pleurotus ostreatus* mushroom.** Int. Res. J. Bio. Sci. 4 (1) , 29-33, 2015.

DA SILVA, A. C., JORGE, N. **Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes.** Journal of Health Sciences, 375-84, 2015.

SINGHAL, P.; NIGAM, V. K.; VIDYARTHI, A. S. **Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases.** International Journal of Advanced Biotechnology and Research, v. 3, n. 3, p. 653-669, 2012.

SIQUEIRA, M.V.B.M; et al. **DNA fingerprinting of water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in Brazil based on microsatellite markers.** Horticultura Brasileira, v. 30, n. 4, p. 653-659, 2012.

SOUZA, R. A; et al. **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.

SPANHOLI, L ;DE OLIVEIRA, V. R.). **Using of passion fruit albedo flour in *Passiflora edulis flavicarpa* Degener a homemade pasta.** (Brazilian Journal of Food and Nutrition), 20(4), 599-604, 2009.

TEIXEIRA, A. P. et al. **The use of purple yam (*Dioscorea trifida*) as a health-promoting ingredient in bread making.** Journal of Research in Biology, v. 3, n. 1, p. 747-758, 2013.

WAKIL, S. M. et al. **Starter developed pupuru, a traditional Africa fermented food from cassava (*Manihot esculenta*).** International Food Research Journal, v. 22, n. 6, p. 2565-2570, 2015.

WEN, T. C., XIAO, Y. P., HAN, Y. F., HUANG, S. K., ZHA, L. S., HYDE, K. D., & KANG, J. C. **Multigene phylogeny and morphology reveal that the Chinese medicinal mushroom '*Cordyceps gunnii*' is *Metacordyceps neogunnii* sp. nov.** Phytotaxa, 302(1), 27-39, 2017.

CAPÍTULO 2

Objetivos e Material e Métodos

3. Objetivo Geral

Esta pesquisa teve como objetivo desenvolver produto alimentício adicionado de bioproduto contendo tubérculo miceliado por cogumelo comestível como forma de promover benefícios nutricionais à dieta humana.

3.1 Objetivos Específicos

- Elaborar bioprodutos utilizando polpa de cará-roxo (*Dioscorea trifida* L), macaxeira (*Manihot esculenta* Crantz) e inhame-roxo (*Dioscorea alata* L) como substrato para cultivo de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720;
- Determinar a atividade de proteases para selecionar um bioproduto para a elaboração da massa alimentícia;
- Caracterizar as proteases de maior atividade quanto ao pH, temperatura e estabilidade;
- Determinar a composição centesimal e tecnológica do bioproduto selecionado;
- Elaborar massa alimentícia fresca do tipo capeletti com o bioproduto selecionado;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do bioproduto na massa alimentícia do tipo capeletti;
- Determinar a composição centesimal e características de cozimento das massas alimentícias do tipo capeletti.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cogumelos comestíveis

As espécies de cogumelos comestíveis selecionadas para este estudo foram *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, cedidas pela Micoteca DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Os cogumelos foram cultivados em ágar farelo de aveia, adicionado de Extrato de Levedura 0,1% (p/v) – OMYA para obtenção de cultura viável e preparação do inóculo para cultivo nos tubérculos. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por oito dias.

4.2 Preparação do inóculo por fermentação submersa

Dos cultivos em OMYA foram retirados dez discos miceliais, medindo 10 mm de diâmetro e transferidos para 50 mL de extrato GYP [glicose- peptona com extrato de levedura 0,5% (p/v)]. A fermentação foi conduzida a 25° C, 150 rpm. Após cinco dias, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração utilizando peneira de alumínio com 10 mesh. A biomassa recuperada foi utilizada como inóculo para o cultivo em tubérculos esterilizados.

4.3 Preparação de Bioprodutos por fermentação no Estado Sólido

4.3.1 Tratamento dos tubérculos para cultivo dos cogumelos

Os tubérculos, cará-roxo (*Dioscorea trifida*), macaxeira (*Manihot esculenta*) e inhame-roxo (*Dioscorea alata*) foram adquiridos no comércio e transportados para o laboratório, em seguida, foram lavados em água potável e sanitizados com solução desinfetante para hortifrutícolas Pury Vita®, conforme a recomendação do fabricante. A seguir foram descascados e cortados com uma faca de aço inox, em cubos de 10mm. Cada amostras de 200g foi embalada em saco de polietileno e esterilizados a 121°C por 10 minutos (Fonseca et al., 2014).

4.3.2 Inoculação e crescimento Micelial

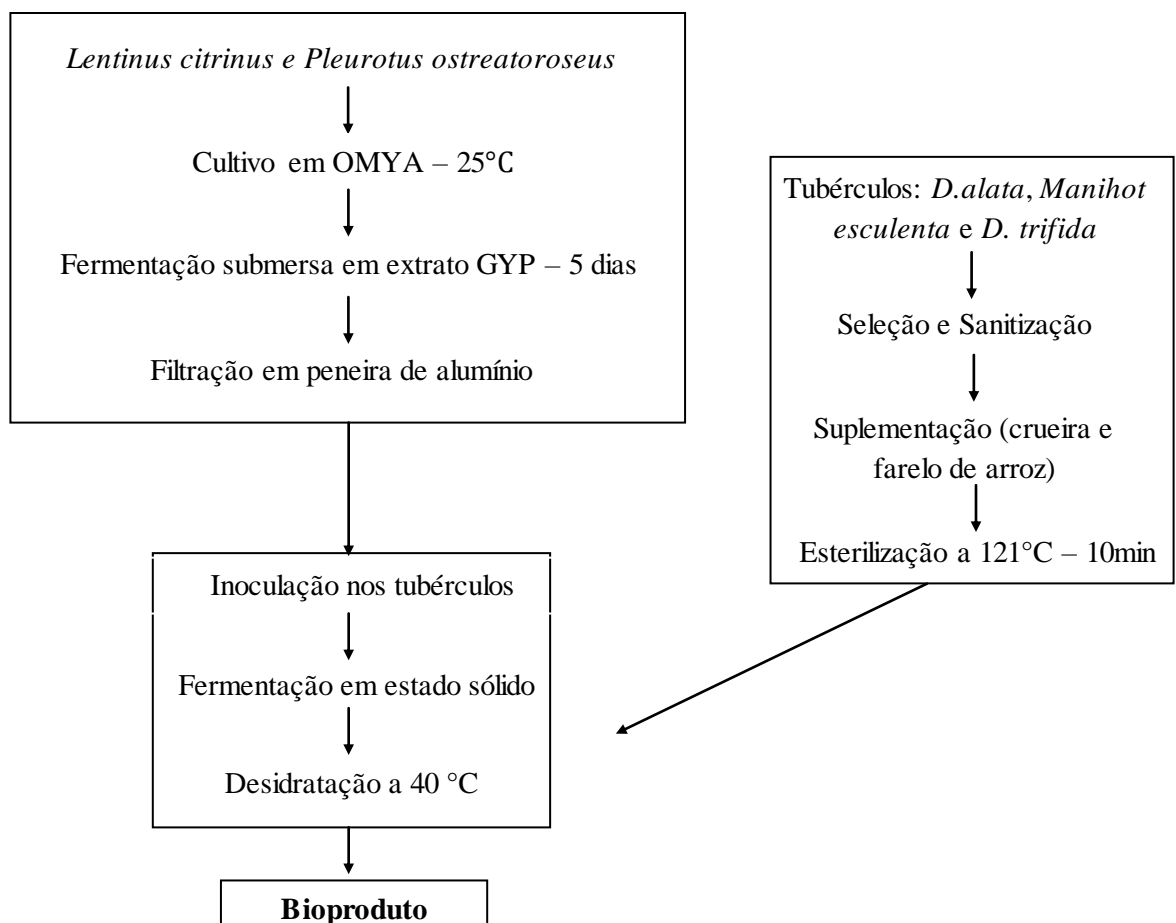
A biomassa recuperada da fermentação em meio líquido foi inoculada na parte superior dos tubérculos, suplementados com farinha de arroz e crueira em diferentes proporções, conforme a tabela 1. Como padrão foi utilizado o tubérculo sem suplementação. A fermentação no estado sólido foi conduzida a 25 °C, na ausência de luz, umidade ambiental de 80%, até completa miceliação do tubérculo.

Tabela 1. Mistura de substratos para cultivos de *L. citrinus* e *P. ostreatoroseus*

Mistura de substrato	Proporção (tubérculo: suplemento)
Macaxeira	100:0
Macaxeira + Farelo de arroz	90:10
Macaxeira + Farelo de arroz	80:20
Macaxeira + Crureira	90:10
Macaxeira + Crureira	80:20
Cará roxo	100:0
Cará roxo + Farelo de arroz	90:10
Cará roxo + Farelo de arroz	80:20
Cará roxo + Crureira	90:10
Cará roxo + Crureira	80:20
Inhame roxo	100:0
Inhame roxo + Farelo de arroz	90:10
Inhame roxo + Farelo de arroz	80:20
Inhame roxo + Crureira	90:10
Inhame roxo + Crureira	80:20

4.4 Desidratação dos bioprodutos

Os bioprodutos foram desidratados a 40°C por 24 horas, em desidratadora marca Parda® com controle de temperatura e circulação de ar forçado. As amostras foram trituradas em mini processador, Black & Decker®. Para padronização da granulometria do bioproduto foi utilizada peneira de alumínio com 10 mesh.

**Figura 6.** Fluxograma de produção dos bioprodutos formulado com cogumelos comestíveis e tubérculos tropicais

4.5 Extração de enzimas proteolíticas

As enzimas foram extraídas em água destilada esterilizada na proporção de 1:5 (tubérculo miceliado:água destilada, m/v) em frascos de Erlenmeyer de 125mL. Os frascos foram mantidos a 25°C, 150 rpm. Após 1 hora os extratos foram recuperados por filtração a vácuo utilizando de papel de filtro Whatman nº 1 para determinação de atividade proteolítica.

4.5.1 Determinação da atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica 0,15mL do extrato bruto foi adicionado em 0,25mL de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. As amostras e os brancos foram preparados em triplicada e incubados a 25°C por uma hora em câmara escura. A reação foi interrompida com 1,2 mL de TCA [ácido tricloroacético 10% (p/v)] seguido de centrifugação por 10 min a 4°C. Posteriormente, do sobrenadante foi retirado 0,8 mL e adicionado a 1,4mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância a 440 nm de 0,1 em 1 hora (Leighton et al., 1973).

4.5.2 Determinação do efeito do pH e da temperatura

O efeito do pH foi determinado com a amostra com maior atividade de proteases na faixa de 5,0 a 10,0 utilizando-se o sistema de reação formulado com azocaseína 1% em tampão: citrato, fosfato e carbonato-bicarbonato a 0,1 M. As amostras foram incubadas durante uma hora na ausência de luz e, em seguida foi determinada a atividade proteolítica. O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado na faixa de 25 °C a 60 °C por 1 hora. Ao término do período de incubação, a atividade enzimática foi determinada conforme descrito anteriormente.

4.5.4 Determinação da estabilidade do pH e temperatura

Para avaliação da estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:5) nas seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10) e mantidos a 25 °C por 24 horas. Após este período foi determinada a atividade proteolítica, nas condições ótimas de pH e temperatura. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80 °C, por 1 hora. Em seguida, foi determinada a atividade proteolítica, nas condições ótimas de análise. Os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos.

4.6 Efeito de íons metálicos e inibidores

O efeito de íons metálicos [Cloreto de cálcio (CaCl₂), Cloreto de potássio (KCl), Cloreto de sódio (NaCl), Sulfato de cobre (CuSO₄), Sulfato ferroso (FeSO₄), Sulfato de magnésio (MgSO₄) e Sulfato de zinco (ZnSO₄)] e de compostos inibidores de protease: EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), pepstatina e ácido iodoacético, na concentração final de 10 mM foi determinado por pré-incubação com o extrato bruto durante 1 hora, a 50 °C. A atividade enzimática residual foi determinada e comparada com o controle que corresponde a 100% de atividade. Todas as amostras foram preparadas em triplicata (Alecrim et al., 2015).

4.7 Composição centesimal

A determinação da composição centesimal foi realizada conforme citado a seguir:

- Umidade: determinada por dessecação em estufa com circulação de ar a 60 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante (A.O.A.C, 2006).
- Proteína total: determinada pela concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro *Kjeldahl* e aplicando o fator de conversão 6,25.
- Cinzas (resíduo mineral fixo): determinado por incineração do material em mufla a 550 °C-660 °C até obtenção de peso constante (A.O.A.C, 2006).
- Lipídios: determinado de acordo com o método descrito por Bligh and Dyer (1959).
- Carboidratos totais: estimados por diferença entre o somatório das porcentagens de umidade, proteína, lipídios, cinzas (Nepa, 2006).
- Energia: a energia total metabolizável = (4kcal/g de proteína) + (4kcal/g carboidratos totais) + (9kcal/g de lipídeos), preconizados por Nepa 2006.

4.8 Determinação de macro e micro minerais

A determinação dos minerais foi realizada conforme os métodos propostos pela Embrapa (2009). As amostras foram desidratadas em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C, em seguida desidratadas e submetidas a digestão úmida HNO₃ + HCl O₄ (3:1). O teor de fósforo foi determinado por Espectrofotometria com azul de molibdênio; cálcio, magnésio, potássio, sódio 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 (Na, Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg⁻¹.

4.9 Análises químicas

O pH do bioproduto foi aferido usando medidor de pH digital (PHTEK, PHS-3E) pré-calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0. A acidez titulável foi medida por titulação com NaOH 0,1 N e os resultados foram expressos em percentagem de ácido cítrico (Lagnika et al., 2017).

4.10 Análise das propriedades tecnológicas

4.10.1 Determinação da capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água foi determinada pelo método citado por Beuchat et al (1975). Nesta avaliação, em cada tubo do tipo Falcon de 25 ml foi pesado um grama de amostra e adicionado 10 mL de água. As suspensões foram mantidas por 60 minutos, a 25 °C para posterior centrifugação por 30min. Após decantação do sobrenadante a amostra foi novamente pesada. A alteração do peso da amostra foi expressa em absorção de água (%) com base no peso da amostra original. A análise foi realizada em triplicata.

4.10.2 Determinação da capacidade de absorção de gordura

A determinação da capacidade de absorção de gordura foi realizada conforme o método de Sosulski (1962). Nesta análise, em cada tubo do tipo Falcon de 25 ml foi pesado um grama de amostra e adicionado 10 mL de óleo de soja com densidade de $0,98 \text{ gm}^{-1}$. As amostras foram homogenizadas com espátula de aço inoxidável, seguido de centrifugação por 15min. Após sedimentação do sobrenadante, a amostra foi novamente pesada. A capacidade de absorção de gordura da amostra foi expressa como ganho de massa de óleo ligado em porcentagem. A análise foi realizada em triplicata.

4.10.3 Determinação da densidade aparente

A densidade foi determinada em triplicata pelo método de Narayana e Narasinga-Rao (1984). Em cada proveta foi pesado 50g de amostra e pressionadas continuamente até que não houvesse mais nenhuma alteração no volume. A diferença de peso e volume final da amostra foi determinada na proveta. A densidade aparente foi calculada em g/mL da amostra.

4.10.4 Determinação da capacidade de inchamento

A capacidade de inchamento foi determinado com o método descrito por Leach et al. (1959) com modificação para pequenas amostras. Em cada tubo do tipo Falcon foi misturado um grama da amostra com 10 ml de água destilada. As amostras foram mantidas a 80 °C em banho de água com agitação por 30 min. Os tubos fechados foram retirados do banho e secos,

depois das amostras resfriadas foram invertidos para homogeneização e centrifugados por 15 minutos. O sobrenadante decantado foi removido cuidadosamente e o poder de inchamento determinado como o peso do sedimento dividido pelo peso da amostra seca.

4.10.5 Determinação da capacidade e estabilidade da espuma

A capacidade de espuma (FC) e a estabilidade da espuma (FS) foram determinadas de acordo com Narayana e Narasinga Rao (1984). Em cada proveta de 100 ml foram adicionados dois gramas de amostra a 50 ml de água destilada a 30 °C. A suspensão foi misturada e devidamente agitada para formação da espuma durante 30 segundos. O FC foi expresso em porcentagem considerando o aumento do volume da espuma na proveta. O volume de espuma foi registrado após 1 hora da agitação para determinar o FS como porcentagem do volume inicial de espuma.

4.11 Teste de toxicidade *in vitro*

O teste de toxicidade foi realizado no laboratório de atividade biológica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas.

4.11.1 Linhagem e condições de cultivo

Nesta análise, fibroblastos humano (MRC5) foram mantidos em garrafas de cultura contendo meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), com Soro Fetal Bovino 10% (p/v) (SFB) e Ampicilina-Estreptomicina 1% (p/v). As células foram mantidas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. O modelo de estudo proporcionou a comparação do efeito citotóxico do extrato do bioproduto, em diferentes concentrações sobre linhagens de fibroblastos humanos (MRC5).

4.11.2 Citotoxicidade em fibroblastos humanos

A citotoxicidade dos extratos do bioproduto foi avaliada pelo teste do Alamar Blue (resazurina) (Ahmed et al., 1994). O Alamar Blue (resazurina) de cor azul e não fluorescente é reduzido pelas células viáveis a resofurina (cor rosa e fluorescente).

As células foram transferidas para microplacas (96 poços) na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço e mantida a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h. As células foram tratadas por 72 h com extrato do bioproduto com concentração única (200 µg/mL diluída em DMSO). Como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina (1720 µM). O controle negativo diluído foi DMSO 0,1% (v/v). Três horas antes do final de cada tempo de

tratamento foi acrescentado 10 µL do Alamar Blue 0,02% (p/v). A leitura foi feita em Leitor de microplaca na região da fluorescência a 465 nm e 540 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0.

4.12 Avaliação da qualidade microbiológica

Para avaliar a qualidade microbiológica do bioproduto desidratado e triturado foi realizada a determinação de Coliformes Totais, *Bacillus cereus* e *Salmonella* sp. de acordo com Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos preconizados pela RDC nº12, da ANVISA, 2001, citado por Silva, 2007.

4.13 Elaboração da massa alimentícia formulada com o bioproduto

As massas alimentícias foram formuladas utilizando os ingredientes citados na tabela 1. Separadamente, nas quatro formulações contendo o bioproduto 5%, 10% e 15% (p/v), exceto o padrão, os ingredientes foram misturados na seguinte ordem, farinha de arroz, goma xantana, bioproduto, ovos, azeite e água, em batedeira industrial Black & Decker®, até a obtenção de uma massa homogênea. Em seguida, a massa foi moldada em máquina de cilindro manual para abertura de massa fresca. As massas cortadas em formato triangular foram utilizadas na elaboração dos capeletti e recheadas com frango desfiado e outros temperos (Figura 2).

Tabela 2. Formulação do capeletti com bioproduto à base de cogumelo comestível e tubérculo Amazônico

Ingredientes	Formulações ¹			
	CP	C5	C10	C15
Água	20ml	20ml	20ml	20ml
Azeite	200ml	200ml	200ml	200ml
Bioproduto	-	25g	50g	75g
Farinha de arroz	500 g	475g	450g	425g
Goma xantana	100g	100g	100g	100g
Ovos	230g	230g	230g	230g
Peito de frango*	100g	100g	100g	100g

¹ Formulação equivalente o capeletti padrão (CP); capeletti com 5% do bioproduto (C5); capeletti com 10% do bioproduto (C10) e capeletti com 15% do bioproduto (C15).

*Foram utilizados como tempero: Sal, Alho, Cebola, Tomilho e Coentro.

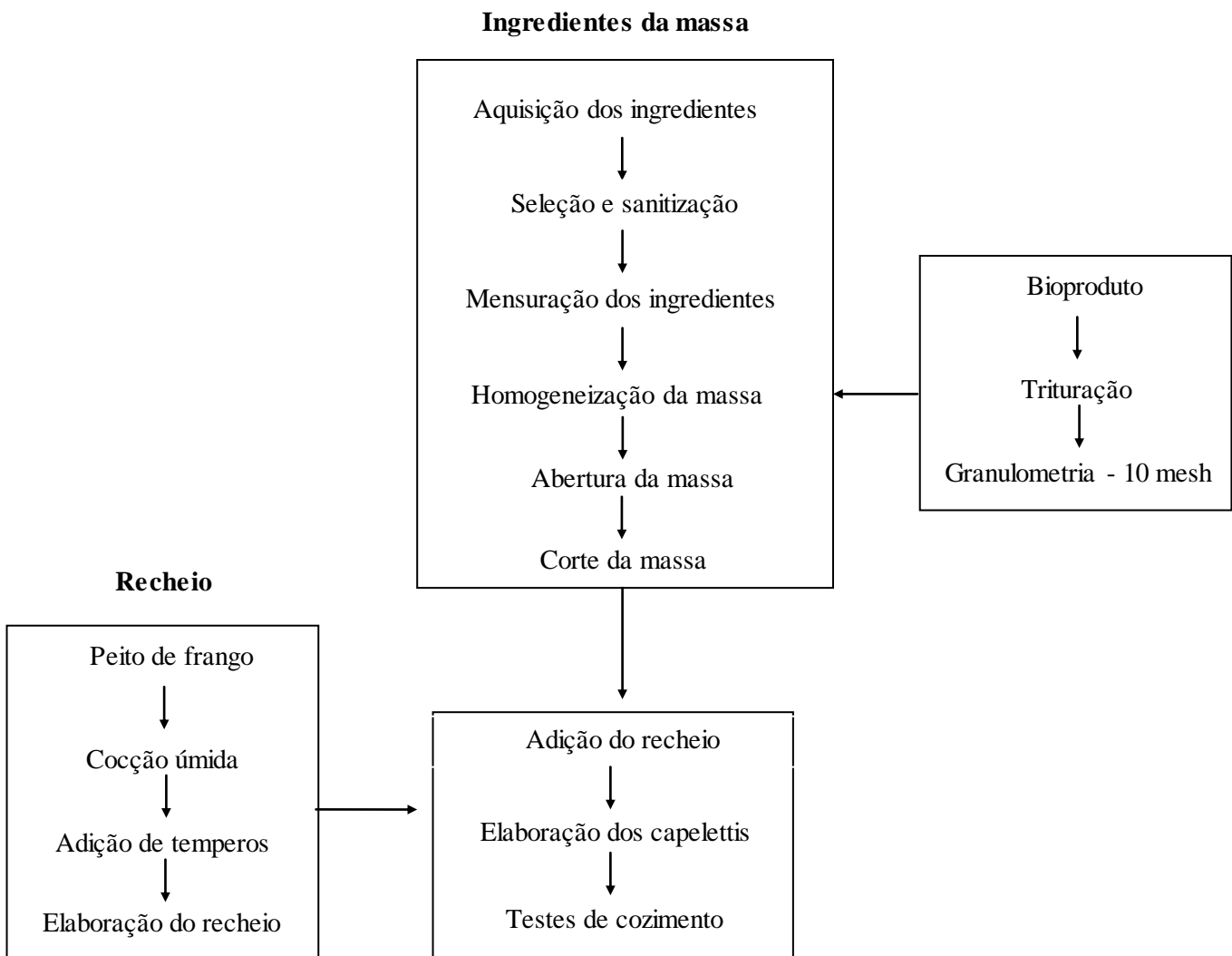


Figura 2. Fluxograma de produção de capelletis formulados com cogumelo comestível e tubérculo tropical

4.14 Testes de cozimento das massas alimentícias

O teste de cozimento foi realizado segundo o método 16-50 da AACC (1997). Os parâmetros avaliados foram:

4.14.1 Tempo de cozimento

O tempo de cozimento foi determinado pela cocção de 10 g de amostra em 350 mL de água destilada em ebulição, até atingir a qualidade visual adequada em consequência da gelatinização do amido em toda a seção da massa. Este ponto foi determinado pela compressão de amostras de produto cozido, a cada 30 segundos, entre duas lâminas de vidro até o desaparecimento do eixo central.

4.14.2 Aumento de massa do produto cozido

O aumento de massa foi determinado pela pesagem de uma amostra antes e após a cocção, utilizando-se o tempo de cozimento ideal de cada amostra. O valor do aumento de massa é a razão entre a massa da pasta cozida e a massa da pasta crua (10 g), expresso em porcentagem (%).

4.14.3 Perda de sólidos na água de cozimento

A quantidade de sólidos perdidos na água de cozimento foi determinada pela evaporação de 25 mL de água de cozimento, obtida com o cozimento da massa. Aumento de massa do produto cozido acima, em estufa a 105 °C, até peso constante.

4.15 Avaliação do custo das massas alimentícias

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

4.16 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva (Tabelas e gráficos). Para analisar os resultados os dados foram submetidos à análise de variância - ANOVA e, as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Minitab versão 18.0.

Referências Bibliográficas

A.O.A.C - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15.ed. Washington: AOAC, 2006.

AHMED, S. ANSAR; GOGAL, ROBERT M.; WALSH, JANE 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.

ALECRIM, M. M., PALHETA, R. A., TEIXEIRA, M. F. S., & OLIVEIRA, I. M. D. A. **Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste**. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(1), 151-157, 2015.

BEUCHAT, L.R., CHERRY, Y.P. and Quinn, M.R., **Physicochemical. Latinamericanos de Nutricion**, Caracas. 140–149, 1975.

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

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2.ed. Brasília-DF, Informação Tecnológica, 628p, 2009.

LAGNIKA, C., ADJOVI, Y. C., LAGNIKA, L., GOGOHOUNGA, F. O., DO-SACRAMENTO, O., KOULONY, R. K., & SANNI, A. **Effect of Combining Ultrasound and Mild Heat Treatment on Physicochemical, Nutritional Quality and Microbiological Properties of Pineapple Juice**. *Food and Nutrition Sciences*, 8(02), 227, 2017.

LEACH, H.W.; MCCOWEN, L.D.; SCHOCH, T.J. **Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches**. *Cer. Chem.*, v. 36, n. 6, p. 534-544, 1959.

LEIGHTON, T. J. et al. **The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis***. *Journal of Molecular Biology*, v. 76, n. 1, p. 103-122, 1973.

NARAYANA, K. AND NARASINGA-RAO, M.S. **Effect of partial proteolysis on the functional properties of winged pea (*Psophocarpus tetragonolobus*) flour**. *Journal of Food Science*, Vol. 49 No. 3, pp. 944-947. 1984.

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

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

SOSULSKI, F.N. **The centrifuge method for determining flour absorption in hard red spring wheats**. *Cereal Chemistry*. v. 39, n. 4, p. 344-350, 1962.

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão

Artigo 1: “Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers”

Artigo publicado na revista científica *African Journal of Biotechnology*

Produção e caracterização de peptidases de cogumelos comestíveis cultivados em tubérculos da Amazônia

Ana Rita Gaia Machado^{1*}, Salomão da Rocha Martim¹, Mircella Marialva Allecrim² Maria Francisca Simas Teixeira³

¹ Universidade Federal do Amazonas, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal –Bionorte; Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus - AM, 69067-005; ritamachado.nutri@hotmail.com

² Departamento de Engenharia Agrícola e de Solos –UFAM. Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep: 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil

³ Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Coleção de Culturas DPUA –UFAM. Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep: 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil

Resumo

As proteases são enzimas comerciais importantes, e entre suas numerosas fontes estão as Basidiomycetes. O uso de proteases em muitas áreas industriais promove a busca de enzimas com novas propriedades. O objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar as peptidases de um bioproduto de biomassa micelial cultivada em tubérculos amazônicos. *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 foram cultivados em *Dioscorea trifida*, *Manihot esculenta* e *Dioscorea alata* suplementado com farelo de arroz ou resíduo de farinha de mandioca em diferentes proporções. A atividade proteolítica significativa foi determinada no extrato bruto de *P. ostreatoroseus* cultivado em *D. alata* (DA) sem suplementação (142,22 U / mL). As enzimas apresentaram atividades ótimas a 40 ° C e pH 7,0; e Estabilidade a 50 ° C e pH 8,0. As proteases foram classificadas como proteases de cisteína com base no efeito de inibidores utilizados.

Palavras-chave: *Pleurotus*, *Lentinus*, *Dioscorea*, protease.

Abstract:

Proteases are important commercial enzymes, and among their numerous sources are the Basidiomycetes. The use of proteases in many industrial areas promotes the search for enzymes with new properties. The aim of this study is to produce and characterize the peptidases of a biocomposite from mycelial biomass grown in Amazonian tubers. *Lentinus citrinus* DPUA 1535 and *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 were cultivated on *Dioscorea trifida*, *Manihot esculenta* and *Dioscorea alata* supplemented with rice bran or manioc flour residue in different proportions. The higher proteolytic activity was determined in the crude extract from *P. ostreatoroseus* grown in *D. alata* (DA) without supplementation (142.22 U / mL). The enzymes showed optimum activities at 40 ° C and pH 7.0; and stability at 50 ° C and pH 8.0. The proteases were classified as cysteine proteases based on the effect of inhibitors used.

Key words: *Pleurotus*, *Lentinus*, *Dioscorea*, protease

Introdução

As proteases são enzimas com importante uso biotecnológico. Eles têm aplicações em reações químicas e bioquímicas, alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos e cosméticos. As proteases representam os maiores grupos de enzimas industriais mundiais com perspectivas crescendo em torno de 7% até 2020 (Singh et al, 2016; Geng et al, 2016; Chandrasekaran et al., 2015).

Peptidases podem ser obtidas por microorganismos como bactérias e fungos, plantas ou animais. No entanto, as fontes microbianas dessas enzimas têm preferência para serem utilizadas devido às suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, são adequadas à manipulação genética e podem ser cultivadas em curto prazo por processo de fermentação (Sharma et al, 2017; Souza et al., 2015)

Nos últimos anos, os cogumelos comestíveis *Lentinus crinitus*, *L. citrinus*, *Pleurotus ostreatoroseus*, *P. florida* e *P. albidus* são relatados como fontes de enzimas, incluindo proteases (Fonseca et al, 2014; Kirsch et al., 2011; Machado et al. , 2015; Martim et al, 2017; Souza et al., 2016). Os cogumelos comestíveis são consumidos por muitas civilizações durante séculos devido às suas propriedades nutricionais e dietéticas. Eles apresentam altas quantidades de proteínas, fibras e baixos níveis de gorduras e produzem enzimas, vitaminas, compostos antimicrobianos, antioxidantes e imunossilúcidos (Reid et al, 2016).

Em termos de variedade, qualidade nutricional e a síntese de compostos bioativos, os cogumelos proporcionam excelente escolha do consumidor em benefício da saúde. Inclusive, o conteúdo proteico dos cogumelos tem similaridade entre os de origem animal e vegetal, contudo superior à maioria dos outros alimentos, contém todos os aminoácidos essenciais exigidos pelo homem (Nwoko et al., 2017).

Portanto, o cultivo de cogumelos para fabricação de biocompositos, combinação de micélio com substrato de diferentes composições possibilita a obtenção de diversos compostos com atividade biológica (Haneef et al., 2017). Assim sendo, polpa de tubérculo, como *Dioscorea trifida* (cará-roxo), *Dioscorea alata* (inhame roxo) e *Manihot esculenta* (macaxeira) são substratos com propriedades nutricionais que podem ser utilizados para cultivo de cogumelos comestíveis e síntese de biocatalisadores, por exemplo peptidases. Considerando a disponibilidade de tubérculos comestíveis na Amazônia esta pesquisa foi

realizada com o objetivo de produzir e caracterizar peptidases de bioproduto obtido contendo biomassa micelial e polpa de tubérculos amazônicos.

Material e Métodos

Cogumelos Comestíveis

As espécies de cogumelos comestíveis selecionadas para este estudo foram *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, cedidas pela Micoteca DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Os cogumelos foram cultivados em BDA+YE [ágar Batata com Extrato de Levedura 0,5% (p/v)] para obtenção de cultura viável e preparação do inóculo.

Seleção do meio de cultivo para preparação do inóculo

A seleção do meio de cultura sólido para preparação do inóculo, os cogumelos foram cultivados em BDA adicionado de Extrato de Levedura 0,5% (p/v) e Ágar com farelo de aveia adicionado de Extrato de Levedura 0,1% (p/v) – OMYA. As culturas foram incubadas a 25°C, por 8 dias, na ausência de luz. O meio de cultivo selecionado foi o que proporcionou a taxa de crescimento radial significativa. A taxa de crescimento radial foi avaliada medindo-se o diâmetro da colônia com o auxílio de uma régua, a cada 24 horas, a partir do segundo dia de cultivo até a completa colonização da superfície do meio de cultura em placa (Fonseca et al, 2014).

O vigor micelial foi classificado pelo método subjetivo de notas, nota 1 - fracamente adensado, nota 2 - mediantemente adensado e nota 3 - fortemente adensado (Marino et al., 2008).

Preparação do inóculo por fermentação submersa

Dos cultivos mantidos no meio de cultura que proporcionar taxa significativa de crescimento radial foram retirados dez discos miceliais ($\varnothing = 10$ mm) para serem inoculados em 50 mL de GYP [glicose- peptona com extrato de levedura 0,5% (p/v)]. A fermentação foi conduzida a 25° C, 150 rpm. Após cinco dias, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração, em crivo de alumínio ($\varnothing = 75$ mm) e inoculada nos tubérculos esterilizados.

Cultivo dos cogumelos comestíveis nos tubérculos

Os tubérculos, cará-roxo (*Dioscorea trifida*), macaxeira (*Manihot esculenta*) e inhame-roxo (*Dioscorea alata*) utilizados como substrato para cultivo dos cogumelos foram

adquiridos no comércio da cidade de Manaus-Amazonas. No laboratório, os tubérculos foram lavados em água potável e sanitizados em hipoclorito de sódio 50 ppm de cloro por 10 minutos. Posteriormente foram descascados manualmente com uma faca de aço inox e as imperfeições eliminadas. Em seguida foram cortados em cubos de 1cm, acondicionados em sacos de polietileno e esterilizados a 121°C por 10 minutos.

A biomassa recuperada da fermentação em meio líquido foi inoculada nos tubérculos suplementados com farinha de arroz e crueira em diferentes proporções, conforme a tabela 1. Como padrão foi utilizado o tubérculo sem suplementação. A fermentação no estado sólido foi realizada a 25°C, na ausência de luz, umidade ambiente de 60% até completa miceliação dos substratos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1. Mistura de substratos para cultivos de *L. citrinus* e *P. ostreatoroseus*

Mistura de substrato	Proporção (tubérculo: suplemento)
Macaxeira	100:0
Macaxeira + Farelo de arroz	90:10
Macaxeira + Farelo de arroz	80:20
Macaxeira + Crueira	90:10
Macaxeira + Crueira	80:20
Cará roxo	100:0
Cará roxo + Farelo de arroz	90:10
Cará roxo + Farelo de arroz	80:20
Cará roxo + Crueira	90:10
Cará roxo + Crueira	80:20
Inhame roxo	100:0
Inhame roxo + Farelo de arroz	90:10
Inhame roxo + Farelo de arroz	80:20
Inhame roxo + Crueira	90:10
Inhame roxo + Crueira	80:20

Após a completa miceliação dos tubérculos pelos cogumelos, as polpas foram desidratadas a 40°C por 24 horas, em desidratadora marca Pardal® com controle de temperatura e circulação de ar forçado. Em seguida os tubérculos miceliados foram triturados em processador para determinação da atividade proteolítica. Para padronização da granulometria do tubérculo miceliado e triturado foi utilizada peneira com 10 mesh de diâmetro.

Extração de enzimas e determinação da atividade proteolítica

As enzimas foram extraídas em água destilada esterilizada na proporção de 1:5 (tubérculo miceliado:água destilada, m/v) em frascos de Erlenmeyer de 125mL, mantidos a

25°C, 150 rpm durante 1 hora. Os extratos foram recuperados por filtração a vácuo utilizando de papel de filtro Whatman nº 1 para determinação de atividade proteolítica.

Determinação da atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica 0,15mL do extrato bruto foi adicionado em 0,25mL de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. As amostras e os brancos foram preparados em triplicada e incubados a 25°C por uma hora em câmara escura. A reação será interrompida com 1,2 mL de TCA [ácido tricloroacético 10% (p/v)] seguido de centrifugação por 10 min a 4°C. Posteriormente, do sobrenadante será retirado 0,8 mL e adicionado a 1,4mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M. Uma unidade de atividade proteolítica será definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância a 440 nm de 0,1 em 1 hora (Leighton et al, 1973).

Determinação do efeito do pH e da temperatura

O efeito do pH será determinado na faixa de 5,0 a 10,0 utilizando-se o sistema de reação formulado com azocaseína 1% em tampão: citrato, fosfato e carbonato-bicarbonato a 0,1 M. As amostras serão incubadas durante uma hora na ausência de luz e, em seguida será determinada a atividade proteolítica. O efeito da temperatura na atividade proteolítica será avaliado na faixa de 25 °C a 60 °C por 1 hora. Ao término do período de incubação, a atividade enzimática será determinada conforme descrito anteriormente.

Determinação da estabilidade do pH e temperatura

Para a estabilidade ao pH, o extrato bruto será adicionado (1: 1) nas seguintes soluções de tampão 0,2 M: citrato-fosfato (5,0 e 6,0), Tris-HCl (7,0 e 8,0) e glicina-NaOH (9,0 e 10,0) e mantido à temperatura ótima nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min. No teste de estabilidade térmica, os extratos serão incubados a diferentes temperaturas que variam de 25 °C e 70 °C durante 0, 30, 60, 90 e 120 min. Todas as amostras serão preparadas em triplicata.

Efeito de íons metálicos e inibidores

O efeito de íons metálicos [Cloreto de cálcio (CaCl₂), Cloreto de potássio (KCl), Cloreto de sódio (NaCl), Sulfato de cobre (CuSO₄), Sulfato ferroso (FeSO₄), Sulfato de magnésio (MgSO₄) e Sulfato de zinco (ZnSO₄)] e de compostos inibidores de protease [EDTA (ácido etilendiaminotetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), pepstatina e ácido iodoacético], na concentração final de 10 mM foi determinado por pré-incubação com o

extrato bruto durante 1 hora, a 50 °C. A atividade enzimática residual foi determinada e comparada com o controle que corresponde a 100% de atividade. Todas as amostras foram preparadas em triplicata (Alecrim et al., 2015).

Resultados e Discussão

Seleção do meio de cultivo para preparação do inóculo

A tabela 2 demonstra os resultados do crescimento radial, em seis dias, de *L. citrinus* e *P. ostreatoroseus*, em meio de cultura sólido. Entre os meios avaliados, os valores significativos (67,0 e 65,5 mm) do crescimento e a maior densidade micelial foi observada em OMYA + YE, para *P. ostreatoroseus* e *L. citrinus*. Em todos os meios de cultura *L. citrinus* produziu micélio branco, mas com micélio mediamente adensado em OMYA, inferior quando comparado a *P. ostreatoroseus*, no mesmo meio.

No cultivo de *P. ostreatoroseus*, a densidade do foi do tipo mediamente adensado e coloração branca, em BDA+YE. Em OMYA+ YE, a massa micelial apresentou coloração rósea e fortemente adensada, colonizando totalmente a superfície do meio. Com esses dados a pesquisa mostrou que OMYA+YE pode ser o meio adequado para o crescimento das duas espécies nas condições analisadas.

Os resultados são semelhantes aos de outros estudos que observaram o crescimento e a morfologia de cogumelos em cultura pura, usando outros meios de cultivo, comprovando que essa condição influencia no crescimento de fungos (SASTRE-AHUATZI et al., 2007; WIRIYA et al 2014; MASOUMI et al., 2015). O cultivo *in vitro* busca elucidar as condições ótimas de crescimento de espécies de fungos, em relação aos nutrientes dos meios de cultura, temperatura e tempo de incubação, sendo este conhecimento um pré-requisito para o cultivo em larga escala (DE ANDRADE et al, 2010).

Tabela 2. Característica morfológica e média de crescimento micelial radial (cm) de *L. citrinus* e *P. ostreatoroseus* em meios ágar Batata Dextrose adicionado de Extrato de Levedura 0,5% (p/v) – BDA e ágar com farelo aveia adicionado de Extrato de Levedura 0,1% (p/v) – OMYA após 6 dias de cultivo.

Cogumelo	Meios de cultivo	Cor do micélio	Vigor micelial	Media do crescimento micelial (mm)
<i>L. citrinus</i> DPUA 1535	BDA + YE 0,5%	Branca	2	48,8±0,2 ^b
	OMYA + YE 0,1%	Branca	2	65,5±0,3 ^a
<i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720	BDA + YE 0,5%	Branca	2	64,0±0,1 ^b
	OMYA + YE 0,1%	Rósea	3	67,0±0,2 ^a

Medias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Seleção da espécie de cogumelo de maior atividade proteolítica

A tabela 3 mostra a atividade de proteases por *L. citrinus* e *P. ostreatoroseus* quando cultivado em tubérculos tropicais ou misturados com farelo de arroz e crueira. As enzimas foram sintetizadas e excretadas em todas as condições analisadas sendo que o valor da atividade proteolítica variou de acordo com o tipo de suplementação e macrofungo investigado.

O valor significativo de atividade proteolítica (142,22 U/mL) foi determinado em *P. ostreatoroseus* cultivado em inhame roxo (*Dioscoreae alata* L), sem suplementação. Quando *P. ostreatoroseus* foi cultivado em cará-roxo (*Dioscoreae trifida*) suplementado com farelo de arroz 20% (m/m), em base úmida, houve redução de 61,45 % do valor significativo de atividade proteolítica.

Entre os demais substratos os valores inferiores de atividade proteasica, respectivamente, foram 10,73 U/mL e 18 U/mL, observados em *L. citrinus* cultivado em Inhame roxo + FA (90:10) e *P. ostreatoroseus* em Macaxeira + CRU (90:10).

Tabela 3. Atividade proteolítica dos cultivos de *L. citrinus* e *P. ostreatoroseus* em tubérculos tropicais suplementados com farelo de arroz e crueira ⁽¹⁾

Experimento	<i>L. citrinus</i> (U/mL)	<i>P. ostreatoroseus</i> (U/mL)
Macaxeira 100%	23,11±1,9 ^l	31,26±0,6 ^{ij}
Macaxeira + FA 80:20	51,11±0,7 ^{cd}	43,11±3,1 ^{fg}
Macaxeira + FA 90:10	41,33±2,3 ^g	22,46±0,4 ^l
Macaxeira + CRU 80:20	43,55±1,5 ^{fg}	37,33±2,6 ^h
Macaxeira + CRU 90:10	32,66±0,6 ⁱ	18,00±0,6 ^m
Inhame roxo 100%	29,97±0,21 ^{ij}	142,22±0,8 ^a
Inhame roxo + FA 80:20	28,37±0,7 ^{jk}	48,89±2,3 ^{cd}
Inhame roxo + FA 90:10	10,73±0,2 ⁿ	24,88±0,3 ^{kl}
Inhame roxo + CRU 80:20	30,11±0,3 ^{ij}	45,15±0,5 ^{ef}
Inhame roxo + CRU 90:10	30,40±0,1 ^{ij}	44,31±0,1 ^{efg}
Cará-roxo 100%	42,47±0,1 ^{fg}	51,04±0,2 ^{cd}
Cará-roxo + FA 80:20	52,40±0,11 ^{bc}	54,82±0,7 ^b
Cará-roxo + FA 90:10	23,97±0,23 ^l	49,04±0,1 ^{cd}
Cará-roxo + CRU 80:20	47,80±0,1 ^{de}	32,26±0,3 ⁱ
Cará-roxo + CRU 90:10	44,37±0,2 ^{efg}	44,66±0,5 ^{efg}

FA = Farelo de arroz; CRU = crueira

⁽¹⁾As médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p <0,05).

Os resultados obtidos neste estudo para *P. ostreatoroseus* foram superiores aos citados por Fonseca et al (2014), que observou atividade proteolítica significativa (7,89 U/mL) ao utilizar exocarpo de cupuaçu suplementado com 20% farelo de arroz para a mesma espécie de macrofungo.

Os valores obtidos para *L. citrinus* também foram superiores ao encontrado por Kirsch et al (2013) cultivado em meio líquido utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Contudo os resultados foram similares aos trabalhos de Machado et al. (2015) e Souza et al. (2016) que produziram *L. citrinus* em exocarpo de cupuaçu + liteira e casca de abacaxi, sem suplementação, respectivamente.

Muitas enzimas produzidas por cogumelos são usadas no processamento de alimentos para a melhoria da qualidade nutricional de produtos alimentares. Ahmed et al. (2015) estudaram a influência de quatro diferentes tipos de enzimas comerciais sobre reologia da massa e qualidade final de um *cookie*. Esses autores demonstraram que as proteases afetam o grau de amolecimento, quebrando a rede de glúten, responsável pela retenção, migração e evaporação de água durante o cozimento e desnaturação de proteínas.

Os resultados desta investigação revelaram a produção de proteases por *P. ostreatoroseus* e *L. citrinus* e o potencial dos tubérculos tropicais, principalmente o inhame roxo (*Dioscoreae alata* L) como substrato para produção de proteases.

Caracterização parcial das enzimas proteolíticas

pH ótimo e temperatura ótima na atividade de protease

Os resultados da caracterização enzimática de *P. ostreatoroseus* cultivado em inhame roxo (*Dioscoreae alata* L) estão descritos na figura (1 e 2). Os dados mostram que em relação ao pH (figura 1A) foi observado que as enzimas foram ativas na faixa de pH 5,0 a 10,0, mas apresentaram atividade ótima em pH 7,0 permanecendo ativas em pH neutro 6,0 e 7,0 com atividade relativa de 88% e 100%. Esses dados estão em concordância com os encontrados na literatura uma vez que espécies do gênero *Pleurotus* apresentam enzimas proteolíticas com atividade na faixa de pH de 6,0-7,0 quando cultivado em substratos amazônicos (serragem, semente de açaí, exocarpo de cupuaçu, exocarpo e coroa de abacaxi (Fonseca et al, 2014).

A produção de proteases extracelulares com atividade ótima em 7,0 por *P. ostreatoroseus* cultivado em inhame roxo (*Dioscoreae alata* L) provavelmente esteja associada a necessidade do cogumelo em hidrolisar os diferentes substratos disponíveis como fonte de nutrientes protéicos. Nirmal et al. (2011), citam que os fungos produzem proteases ácidas, neutras e alcalinas, inclusive uma espécie pode produzir mais de um tipo dessas enzimas que podem ser ativas a uma ampla faixa de pH (4,0 a 11,0).

Quanto ao efeito da temperatura na atividade das proteases de *P. ostreatoroseus* (Figura 1B), os dados mostram que entre 25°C a 80°C as enzimas permaneceram ativas por 60

minutos. Nestas condições, as enzimas de *P. ostreatoroseus* demonstraram atividade ótima a 40° C, seguido de decréscimo, até a completa inativação a 80°C. Em temperaturas elevadas, as enzimas sofrem desnaturação protéica, pois as ligações intramoleculares são afetadas (AHMED et al., 2011, ALI et al., 2014).

Estes resultados estão semelhantes com Fonseca et al. (2014), Guan et al. (2011) e Machado et al. (2015) em que a temperatura ótima das proteases de *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pholiota nameko* e *Lentinus citrinus*, foi determinada a 40 °C - 50°C.

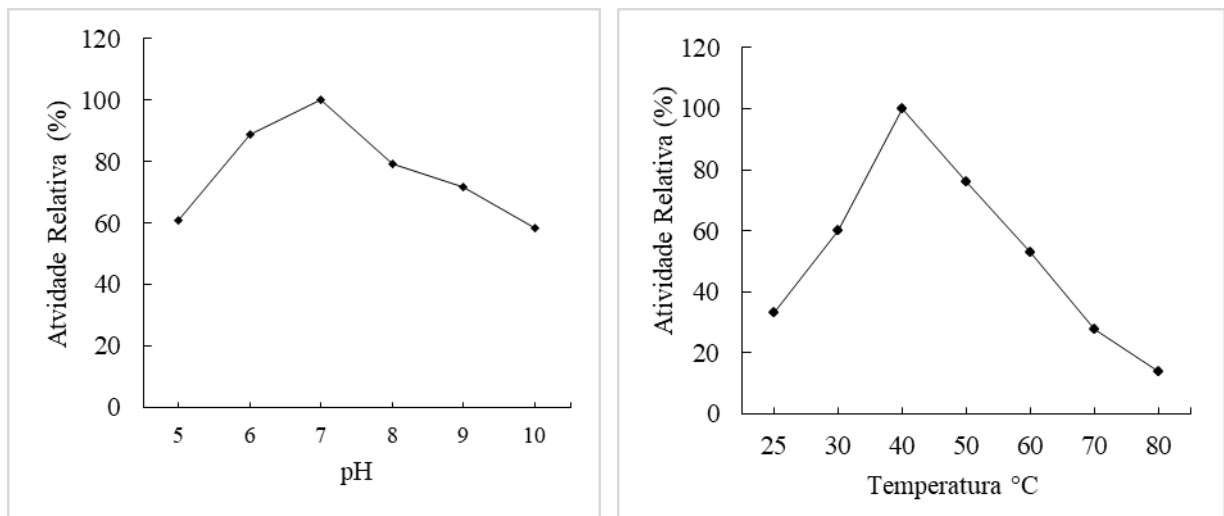


Fig. 1-Efeito do pH (A) e temperatura (B) na atividade proteolítica de *P. ostreatoroseus* cultivado em *Dioscorea alata*.

Estabilidade ao pH e temperatura

A estabilidade ao pH e temperatura é um parâmetro importante na utilização de enzimas em indústrias pois determina a viabilidade econômica do processo (MORETTI et al., 2012). A estabilidade ao pH foi mantida entre pH 7,0 e 8,0 de 95%-100% de atividade por 1 hora, com redução de atividade em pH 9,0 (Figura 2A). Em intervalo de tempo similar, a estabilidade térmica destas enzimas foi mantida entre 40 a 50 °C, exibindo 94 a 100% de atividade relativa, respectivamente. Em 70 °C foi verificada a inativação das enzimas (Figura 2B). Proteases produzidas por *Lentinus citrinus* cultivado em exocarpo de cupuaçu e liteira mostrou que as enzimas foram ativas a todas as temperaturas com maior atividade a 30 C durante 60 min (Machado et al, 2015). De acordo com Cheng et al. (2012) a termoestabilidade de proteínas de cogumelos comestíveis pode variar.

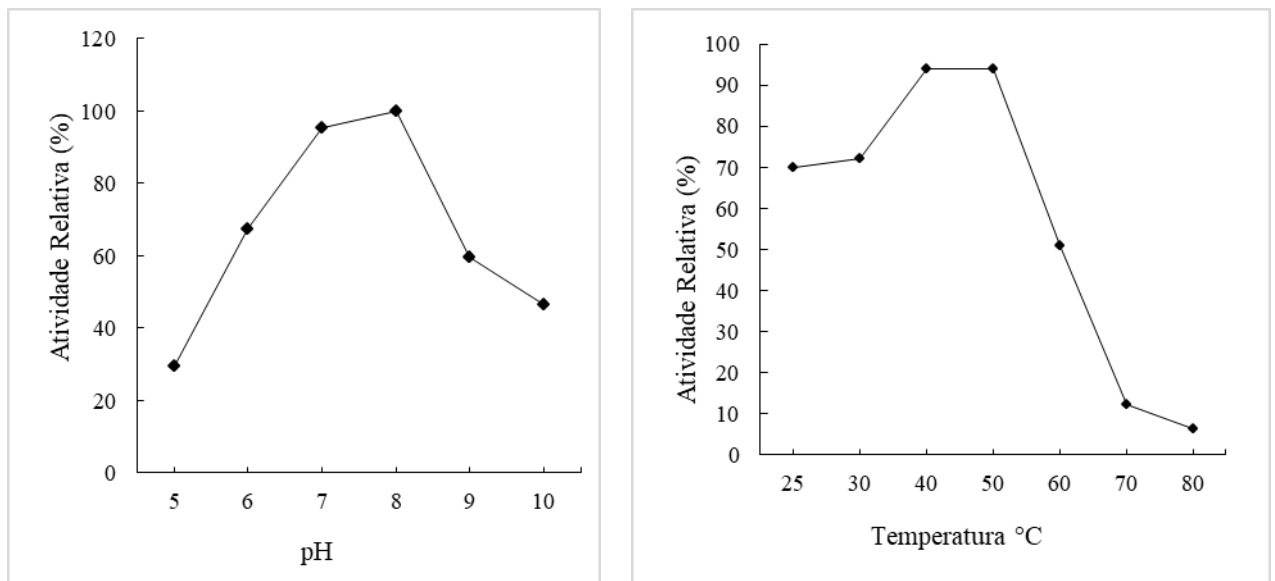


Fig. 2-Efeito do pH (A) e a temperatura (B) na estabilidade de *P. ostreatoroseus* cultivado em *Dioscorea alata*.

Efeitos de íons metálicos e inibidores

Os resultados do efeito de inibidores sobre atividade das proteases apresentados na tabela 4 demonstram que as enzimas foram inibidas em 95%, 94% e 87% por ácido iodoacético, PMSF e EDTA, sugerindo a presença de cisteína proteases, metalo-proteases e serino-proteases no extrato de *P. ostreatoroseus* cultivado em *Dioscorea alata* L, respectivamente. Estudos têm citado a presença de diferentes classes de proteases em cogumelos. Sabotič et al. (2007) cita a presença de cisteino-proteases e metalo-proteases em *P. ostreatus*. Lebedeva et al. (2009) e Zhang et al. (2010) verificaram a inibição da atividade proteolítica de *P. ostreatus* (Fr.) Kumm e *Hypsizygus marmoreus* ao utilizar PMSF, sugerindo a presença de serino-proteases.

Os íons Cu^{2+} e Zn^{2+} causaram uma redução de 95% respectivamente. Em condições similares, K^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} exerceram pouca influência na atividade enzimática. Martin et al, (2017) mostraram que o íon Zn^{2+} aumentou a atividade de coagulação em 78% no estudo com *Pleurotus albidus*. Ahmed e Helmy (2012) também observaram o aumento da atividade na presença de íons Zn^{2+} (67,7%) no estudo com *Bacillus licheniformis* 5A5. Segundo Couto et al, (2005) a interação de metais com enzimas ligninolíticas extracelulares de fungos de podridão-branca é particularmente importante para a compreensão da regulação de processos biotecnológicos de degradação fúngica. Os íons podem ligar-se a resíduos de aminoácidos e

modificar a estrutura de proteína que pode ter influência positiva ou negativa na atividade proteolítica (Merheb-Dini, 2009).

Tabela 4. Efeito de íons metálicos e inibidores sobre a atividade de proteases de *P. ostreatoroseus*

Íons metálicos e inibidores	Inibição (%)
Control	100 ±0,1
Cu ²⁺	95±0,7
Zn ²⁺	95±0,3
Fe ²⁺	34±0,6
Mg ²⁺	11±0,7
Mn ²⁺	52±0,3
Ca ²⁺	17±0,1
K ²⁺	11±0,7
Na ²⁺	21±0,6
Acido Iodoacetico	95±0,2
EDTA	87±0,1
PMSF	94±0,8
Pepstatina A	36±0,1

Conclusão

Os valores significativos de atividade de proteases foram determinados no bioproduto originário da miceliação de *P.ostreatoroseus* em tubérculo de *D.alata*. Nas condições experimentais os dados sugeriram a presença predominante de cisteína proteases e serina protease. As proteases expressaram atividade ótima a 40 °C, pH 7,0 com maior estabilidade a 50 °C, pH 8,0.

Referencias Bibliográficas

- Ahmed I, Zia MA, Iftikhar T, Iqbal HM (2011). **Characterization and detergent compatibility of purified protease produced from *Aspergillus niger* by utilizing agro wastes.** BioResources 6(4):4505-4522.
- Ahmed SA, Helmy WA (2012). **Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes.** Braz. J. Chem. Eng. 29(1):69-76.
- Alecrim MM, Palheta RA, Teixeira MFS, Oliveira IMDA (2015). **Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste.** Int. J. Food Sci. Technol. 50(1):151-157.

- Andrade MCN, Chavari JL, Minihoni MTA, Zied DC (2010). **Crescimento micelial in vitro de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura.** Acta Sci. Agron. 32(1):69-72.
- Chandrasekaran S, Kumaresan SSP, Manavalan M (2015). **Production and Optimization of Protease by Filamentous Fungus Isolated from Paddy Soil in Thiruvavur District Tamilnadu.** J. Appl. Biol. Biotechnol. 3(6):66-69.
- Cheng S, Xu J, Liu C, Zhu Y, Nelson DR, Zhou S, Luo H (2012). **Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*.** Nat. Commun. 3(913):1-12.
- Couto SR, Sanromán MA (2006). **Application of solid-state fermentation to food industry—a review.** J. Food Eng. 76(3):291-302.
- Escobar VV, Pérez AM, Arredondo C (2007). Evaluación de la producción del hongo *Lentinula edodes* Pegler en bloques sintéticos a base de residuos agroindustriales. Ingeniería y Ciencia 3(6):23-39.
- Fonseca TRB, Barroncas JF, Teixeira MFS (2014). **Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da Floresta Amazônica.** Rev. Bras. Tecnol. Agroind. 8(1):1227-1236.
- Geng C , Nie X, Tang Z, Zhang Y, Lin J, Sun M, Peng D (2016). **A Novel Serine Protease, Sep1, From *Bacillus Firmus* DS-1 Has Nematicidal Activity and Degrades Multiple Intestinal-Associated Nematode Proteins.** Sci. Rep. 6:25012.
- Guan GP, Zhang GQ, Wu YY, Wang HX, Ng TB (2011). **Purification and characterization of a novel serine protease from the mushroom *Pholiota nameko*.** J. Bio. Bioeng. 111(6):641-645.
- Haneef M, Ceseracciu L, Canale C, Bayer IS, Heredia-Guerrero JA, Athanassiou A (2017). **Advanced Materials From Fungal Mycelium: Fabrication and Tuning of Physical Properties.** Sci. Rep. 7(41292):1- 11.
- Kirsch LS, Pinto ACP, Porto TS, Porto ALF, Teixeira MFS (2011). **The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walleyn et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae).** Int. J. Med. Mushrooms 13(2):185-192.

- Lebedeva GV, Proskuryakov MT (2009). **Purification and characterization of milk-clotting enzymes from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm).** Appl. Biochem. Microbiol. 45(6):623.
- Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973). **The relationship of serine protease activity to RNA poly-merase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*.** J. Mol. Biol. 76:103-122.
- Machado ARG, Teixeira MFS, Kirsch LS, Campelo MDCL, Oliveira IMA (2016). **Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region.** Saudi J. Biol Sci. 23(5):621-627.
- Martim SR, Silva LSC, Souza LB, Carmo EJ, Alecrim MM, Vasconcellos MC, Teixeira MFS (2017). ***Pleurotus albidus*: A new source of milkclotting proteases.** Afr. J. Microbiol Res. 11(17):660-667.
- Masoumi F, Pourianfar HR, Masoumi A, MostafaviMendi E (2015). **A study of mycelium characterization of several wild genotypes of the button mushroom from Iran.** Int. J. Adv. Res. 3:236-246.
- Merheb-Dini C, Gomes E, Boscolo M, da Silva R (2010). **Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31:(Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31).** Food Chem. 120(1):87-93.
- Moretti M, Bocchini-Martins DA, Silva RD, Rodrigues A, Sette LD, Gomes E(2012). **Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation.** Braz. J. Microbiol. 43(3):1062-1071.
- Nirma NP, Shankar S, Laxman RS (2011). **Fungal proteases: Na overview.** Int. J. Biotechnol. Biosci. 1(1):1-40.
- Nwoko MC, Onyeizu UR, Okwulehie IC, Ukoima HN (2017). **Nutritional and Bioactive Compounds: Evaluation of *Pleurotus pulmonarius* (Fries) Quel. Fruit Bodies Grown on Different Wood Logs in Abia State, Nigeria.** J. Bioremediat. Biodegrad. 8:393.

- Okwulehie IK, Okwujiako IA (2008). **The Effects of Some Physical and Nutritional Factors on the Vegetative Growth of *Pleurotus ostreatus* var. Florida Eger. Under Tropical Conditions.** Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol. 2(1):41-44.
- Rasane P, Jha A, Sabikhi L, Kumar A, Unnikrishnan VS (2015). **Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods-a review.** J. Food Sci. Technol. 52(2):662-675.
- Reid T, Munyanyi M, Mduluzi T (2017). **Effect of cooking and preservation on nutritional and phytochemical composition of the mushroom *Amanita zambiana*.** Food Sci. Nutr. 5(3):538-544.
- Sastre-Ahuatzi M, Téllez-Téllez M, Díaz-Godínez G, Montiel-González AM, Díaz R, Sánchez C (2007). **Mycelial growth of strains of *Pleurotus ostreatus* developed on agar and its correlation with the productivity in pilot production farm.** Braz. J. Microbiol. 38(3):568-572.
- Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A (2017). **Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties.** J. Genet. Eng. Biotechnol. 15:115-126.
- Singh R , Kumar M, Mitta A, Mehta PK (2016). **Microbial enzymes: industrial progress in 21st century.** 3 Biotech 6(2):174.
- Souza RAT, Fonseca TRB, Kirsch LS, Silva LSC, Alecrim MM, Filho, RFC, Teixeira MFS (2016). **Nutritional composition of bioproducts generated from semi-solid fermentation of pineapple peel by edible mushrooms.** Afr. J. Biotechnol. 15(12):451-457.
- Wiriyaj J, Kavinlertvatana P, Lumyong S (2014). **Effects of diferente culture media, carbon and nitrogen sources and solid substrates on growth of *Termitomyces mushrooms*.** Chiang Mai J. Sci. 41(3):542-556.
- Zhang X, Liu Q, Zhang G, Wang H, Ng T (2010). **Purification and molecular cloning of a serine protease from the mushroom *Hypsizygus marmoreus*.** Proc. Biochem. 45(5):724-730.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

Artigo 2: “Características nutricionais e tecnológicas de bioproduto inovador para inserção na alimentação humana”

Características nutricionais e tecnológicas de bioproduto inovador para inserção na alimentação humana

Ana Rita Gaia Machado¹, Salomão Rocha Martim¹, Maria da Conceição Loureiro Campelo², Marne Carvalho de Vasconcellos³, Leilane Bentes de Souza³, Maria Francisca Simas Teixeira⁴

¹Universidade Federal do Amazonas, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal –Bionorte; Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus - AM, 69067-005; ritamachado.nutri@hotmail.com

² Embrapa Amazônia Ocidental, Setor de Gestão de Laboratórios – LASP. Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural - CEP: 69010-970 Caixa Postal 319 - Manaus, Amazonas, Brazil

³ Universidade Federal do Amazonas, Ciências Farmacêuticas. Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep: 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil

⁴ Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Coleção de Culturas DPUA –UFAM. Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep: 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil

Resumo

Nos últimos anos, o consumo de cogumelos vem aumentando e ganhando destaque gastronômico devido o seu sabor refinado, por se tratar de um alimento saudável. O objetivo deste estudo foi desenvolver um bioproduto formulado com massa micelial de *Pleurotus ostreatoroseus* utilizando como substrato tubérculos de *Dioscorea alata* para ser utilizado como ingrediente em preparações alimentares. A composição centesimal, o conteúdo de macro e micro minerais, os testes funcionais e toxicológicos foram avaliados no bioproduto a base de *Dioscorea alata* com o micélio de *Pleurotus ostreatoroseus*. O bioproduto foi obtido por processo de fermentação semi-sólida e desidratação. As análises foram realizadas seguindo metodologias padrão. Os dados mostraram que a porcentagem de proteínas, fibras e minerais do bioproduto foi superior por conta da miceliação pelo cogumelo. Os testes funcionais mostraram que bioproduto possui características comerciais para produção e desenvolvimento de outros produtos alimentícios. Estes dados mostram que o bioproduto possui alto valor nutricional e pode ser utilizados como ingrediente para elaboração de produtos de panificação e massas alimentícias.

Palavras-chave: Cogumelo comestível, Tubérculo, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Dioscoreae alata*, PANC.

Abstract

In recent years, the consumption of mushrooms has been increasing and gaining gastronomic prominence due to its refined taste, because it is a healthy food. The objective of this study was to develop a bioproduct formulated with *Pleurotus ostreatoroseus* mycelial mass using as substratum *Dioscorea alata* tubers to be used as an ingredient in food preparations. Centesimal composition, macro and micro mineral contents, functional and toxicological tests were evaluated in the *Dioscorea alata* based bioproduct with *Pleurotus ostreatoroseus* mycelium. The bioproduct was obtained by semi-solid fermentation and dehydration. The analyzes were performed following standard methodologies. The data showed that the percentage of proteins, fibers and minerals of the bioproduct was superior due to the micelliation by the mushroom. Functional tests have shown that bioproducts have commercial characteristics for the production and development of other food products. These data show that the bioproduct has high nutritional value and can be used as an ingredient for the preparation of bakery products and pasta.

Key words: Edible Mushroom, Tuber, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Dioscoreae alata*, PANC.

Introdução

Atualmente a maioria dos alimentos não só fornecem nutrientes, mas também compostos com atividade biológica que promovem a prevenção de doenças e contribui para a melhoria da saúde e bem estar geral humano. Esta condição que está estimulando a demanda por alimentos com essas características pelos consumidores (Cardoso et al., 2017; Pereira et al., 2017).

Entre os alimentos com propriedade funcional e com ação biológica, se destacam os cogumelos comestíveis, produtos alimentícios que tem uso tradicional em função de suas características nutricionais, organolépticas e gastronômicas. Diversas espécies produzem compostos bioativos que proporcionam benefícios a saúde humana, condição que está estimulando a produção e o crescimento da inclusão desses macrofungos na dieta (Reis; Rocha, 2017; Souza et al, 2016).

Pleurotus ostreatoroseus que tem basidiomas carnosos de coloração rosada, assim como outros representantes do gênero, cresce naturalmente em florestas tropicais e subtropicais. É uma espécie fonte de proteínas, fibras dietéticas, carboidratos, minerais, aminoácidos essenciais e teor baixo de lipídios. Além disso, produz compostos com ação redutora de triglicérides, antioxidantes, antimicrobianos, enzimas, entre outros (Cardoso et al., 2017; Fonseca et al., 2015).

Espécies de *Pleurotus* crescem em diversos substratos orgânicos, condição que proporciona o aproveitamento de diferentes substratos para obtenção de biomassa com qualidade nutricional (Fonseca et al., 2015). Nesse contexto, o aproveitamento de tubérculos, provenientes da produção no Estado Amazonas, para crescimento de cogumelos comestíveis consiste em uma opção biotecnológica relativamente simples e de baixo custo para geração de produtos alimentícios com qualidade nutricional e tecnológicas viáveis para aplicação industrial.

Entre as plantas alimentícias não convencionais disponíveis na Amazônia, *Dioscorea alata*, da família Dioscoreaceae, apresenta tubérculos comestíveis são fontes ricas de carboidratos e baixo teor de nitrogênio, característica que favorece o cultivo de cogumelos para formação de produtos para fins alimentícios (Awoyale et al., 2016; Ellong et al, 2015; Nadia et al, 2015). O objetivo deste estudo foi desenvolver um bioproduto formulado com massa micelial de *Pleurotus ostreatoroseus* utilizando como substrato tubérculos de *Dioscorea alata* para ser utilizado como ingrediente em preparações alimentares.

Material e Métodos

Matéria-Prima

Para elaboração do bioproduto, neste estudo foram utilizados como matéria-prima *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, do acervo da Micoteca DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM e *Dioscorea alata* como substrato para o cultivo do cogumelo.

Cultivo de *P. ostreatoroseus* em meio sólido

P. ostreatoroseus foi cultivado em ágar farelo de aveia, adicionado de Extrato de Levedura 0,1% (p/v) – OMYA, esterilizado a 121 °C, por 15 minutos. De cada cultura foi transferido um disco micelial de 10mm de diâmetro para a superfície de OMYA. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por seis dias.

Preparação do Inóculo por Fermentação Submersa

Dos cultivos de *P. ostreatoroseus* em OMYA foram retirados dez discos miceliais, medindo 10 mm de diâmetro e transferidos para 50 mL de extrato GYP [glicose- peptona com extrato de levedura 0,5% (p/v)]. A fermentação foi conduzida a 25° C, 150 rpm. Após cinco dias, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração utilizando peneira de alumínio com 10 mesh. A biomassa recuperada foi utilizada como inóculo na elaboração do bioproduto.

Preparação do Bioproduto por Fermentação no Estado Sólido

Para elaboração do bioproduto foi utilizado como substrato *D. alata* para cultivo in vitro de *P. ostreatoroseus*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tubérculos de *D. alata* foram adquiridos de unidade domiciliar e transportados para o laboratório, em seguida, foram lavados em água potável e sanitizados com solução desinfetante para hortifrutícolas Pury Vita®, conforme recomendação do fabricante. A seguir foram descascados e cortados com uma faca de aço inox, em cubos de 10mm. Cada amostra de 200g foi embalada em saco de polietileno e esterilizados a 121°C por 10 minutos (Fonseca et al., 2015).

Inoculação e Crescimento Micelial

A biomassa recuperada da fermentação em meio líquido foi inoculada na parte superior da amostra de tubérculo, umidade 60%, em embalagem de polipropileno de alta

densidade. A fermentação no estado sólido foi conduzida a 25 °C, na ausência de luz, umidade ambiental de 80%, até completa miceliação do tubérculo.

Desidratação do bioproduto

O bioproduto foi desidratado a 40°C por 24 horas, em desidratadora marca Parda® com controle de temperatura e circulação de ar forçado. As amostras foram trituradas em mini processador, Black & Decker®. Para padronização da granulometria do bioproduto foi utilizada peneira de alumínio com 10 mesh.

Composição centesimal

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

Determinação de macro e micro minerais

A determinação dos minerais foi realizada conforme os métodos propostos pela Embrapa (2009). As amostras foram desidratadas em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C, em seguida desidratadas e submetidas a digestão úmida HNO₃ + HCl O₄ (3:1). O teor de fósforo foi determinado por Espectrofotometria com azul de molibdênio; cálcio, magnésio, potássio, sódio 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 expressos em g.kg⁻¹ e os dos micros (Na, Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg⁻¹.

Análises químicas

O pH do bioproduto foi aferido usando medidor de pH digital (PHTEK, PHS-3E) pré-calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0. A acidez titulável foi medida por titulação com

NaOH 0,1 N e os resultados foram expressos em percentagem de ácido cítrico (Lagnika et al., 2017).

Análise das propriedades tecnológicas

Determinação da capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água foi determinada pelo método citado por Beuchat et al (1975). Nesta avaliação, em cada tubo do tipo Falcon de 25 ml foi pesado um grama de amostra e adicionado 10 mL de água. As suspensões foram mantidas por 60 minutos, a 25 °C para posterior centrifugação por 30min. Após decantação do sobrenadante a amostra foi novamente pesada. A alteração do peso da amostra foi expressa em absorção de água (%) com base no peso da amostra original. A análise foi realizada em triplicata.

Determinação da capacidade de absorção de gordura

A determinação da capacidade de absorção de gordura foi realizada conforme o método de Sosulski (1962). Nesta análise, em cada tubo do tipo Falcon de 25 ml foi pesado um grama de amostra e adicionado 10 mL de óleo de soja com densidade de $0,98 \text{ gm}^{-1}$. As amostras foram homogenizadas com espátula de aço inoxidável, seguido de centrifugação por 15min. Após sedimentação do sobrenadante, a amostra foi novamente pesada. A capacidade de absorção de gordura da amostra foi expressa como ganho de massa de óleo ligado em porcentagem. A análise foi realizada em triplicata.

Determinação da densidade aparente

A densidade foi determinada em triplicata pelo método de Narayana e Narasinga-Rao (1984). Em cada proveta foi pesado 50g de amostra e pressionadas continuamente até que não houvesse mais nenhuma alteração no volume. A diferença de peso e volume final da amostra foi determinada na proveta. A densidade aparente foi calculada em g/mL da amostra.

Determinação da capacidade de inchamento

A capacidade de inchamento foi determinado com o método descrito por Leach et al. (1959) com modificação para pequenas amostras. Em cada tubo do tipo Falcon foi misturado um grama da amostra com 10 ml de água destilada. As amostras foram mantidas a 80 °C em banho de água com agitação por 30 min. Os tubos fechados foram retirados do banho e secos, depois das amostras resfriadas foram invertidos para homogeneização e centrifugados por 15

minutos. O sobrenadante decantado foi removido cuidadosamente e o poder de inchamento determinado como o peso do sedimento dividido pelo peso da amostra seca.

Determinação da capacidade e estabilidade da espuma

A capacidade de espuma (FC) e a estabilidade da espuma (FS) foram determinadas de acordo com Narayana e Narasinga Rao (1982). Em cada proveta de 100 ml foram adicionados dois gramas de amostra a 50 ml de água destilada a 30 °C. A suspensão foi misturada e devidamente agitada para formação da espuma durante 30 segundos. O FC foi expresso em porcentagem considerando o aumento do volume da espuma na proveta. O volume de espuma foi registrado após 1 hora da agitação para determinar o FS como porcentagem do volume inicial de espuma.

Teste de toxicidade *in vitro*

O teste de toxicidade foi realizado no laboratório de atividade biológica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas.

Linhagem e condições de cultivo

Nesta análise, fibroblastos humano (MRC5) foram mantidos em garrafas de cultura contendo meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), com Soro Fetal Bovino 10% (p/v) (SFB) e Ampicilina-Estreptomicina 1% (p/v). As células foram mantidas a 37 °C em estufa com 5% de CO². O modelo de estudo proporcionou a comparação do efeito citotóxico do extrato do bioproduto, em diferentes concentrações sobre linhagens de fibroblastos humanos (MRC5).

Citotoxicidade em fibroblastos humanos

A citotoxicidade dos extratos do bioproduto foi avaliada pelo teste do Alamar Blue (resazurina) (Ahmed et al., 1994). O Alamar Blue (resazurina) de cor azul e não fluorescente é reduzido pelas células viáveis a resofurina (cor rosa e fluorescente).

As células foram transferidas para microplacas (96 poços) na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço e mantida a 37 °C com atmosfera de 5% de CO² por 24 h. As células foram tratadas por 72 h com extrato do bioproduto com concentração única (200 µg/mL diluída em DMSO). Como controle positivo foi utilizado a doxorubicina (1720 µM). O controle negativo diluído foi DMSO 0,1% (v/v). Três horas antes do final de cada tempo de tratamento foi acrescentado 10 µL do Alamar Blue 0,02% (p/v). A leitura foi feita em Leitor

de microplaca na região da fluorescência a 465 nm e 540 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0.

Avaliação da qualidade microbiológica

Para avaliar a qualidade microbiológica do bioproduto desidratado e triturado foi realizada a determinação de Coliformes Totais, *Bacillus cereus* e *Salmonella* sp. de acordo com Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos preconizados pela RDC nº12, da ANVISA, 2001, citado por Silva, 2007.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva (Tabelas, gráficos e distribuição de frequência em classes). Para analisar os resultados da composição nutricional e característica tecnológica os dados foram submetidos à análise de variância - ANOVA e, as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), utilizando o software Minitab 18.0.

Resultados e Discussão

Na tabela 1 estão apresentados os valores médios da composição centesimal do bioproduto e do tubérculo de *D.alata*. A umidade do bioproduto e do tubérculo foi de 8,60% e 23,88%, respectivamente. O valor médio de umidade para o tubérculo *D. alata* foi 67% inferior ao encontrado por Teixeira et al. (2016). Enquanto a umidade do bioproduto em média foi 58% superior ao relatado por Souza et al (2016) no bioproduto formulado com casca de abacaxi miceliada com *Pleurotus albidus*.

O quantitativo de cinzas do bioproduto foi de 1,72%, valor que representou aumento de 68% comparado ao teor de cinzas do tubérculo *D. alata*. Estudos revelaram teores de cinzas de 0,55 a 0,87% para batatas orgânicas (Virmond et al., 2014) e 2,37% para farinha de *Dioscorea alata* cultivada na Nigéria (Awoyale et al., 2016). Essa diferença de conteúdo de mineral pode estar relacionada com as características intrínsecas dos tubérculos, solo de cultivo e com o processo de fabricação (Alvares et al, 2015).

O teor de lipídios do bioproduto foi de 1% e o da *D. alata* 0,11%, resultado que corrobora com outros dados referidos para tubérculos, incluindo *D. alata* cultivada na Nigéria (Vengaiyah et al, 2013 ; Awoyale et al., 2016).

O conteúdo de proteínas do bioproduto foi de 6,60%, representando aumento de 30% comparado a *D.alata*. Valor inferior foi determinado *Dioscorea cayenensis* (2,62%), por Adepoju et al, (2017), farinha de cará-roxo (*Dioscorea trifida*) citado por Costa et al (2016) (2,65%) e Teixeira et al, (2016) com a farinha de Aria (*Calathea allouia*) (4,16%). De acordo com a Dietary Reference Intakes (DRI, 2005) produtos alimentares com no mínimo de 6g de proteínas em 100g de produto pode ser considerado fonte proteica. O acréscimo do teor de proteína no bioproduto está indicando que o cogumelo de contribuiu com aporte de proteínas (Souza et al, 2016).

Em relação ao valor de fibras o valor do bioproduto 60% superior comparado ao *D. alata*. Em outros estudos realizados com tubérculos, os resultados mostraram valores inferiores em *Dioscorea cayenensis* (0,4%), *D. remotiflora* (1,22%) e *Dioscorea trifida* (2,21%) (Adepoju et al, 2016; Soto et al, 2014; Teixeira et al, 2016). Baseado na Dietary Reference Intakes (DRI, 2005) produtos alimentícios com um quantitativo maior que 3g/100g podem ser considerados alimentos fontes de fibras. O aumento de fibra provavelmente está associado à ação de diferentes enzimas durante os estágios vegetativos e reprodutivos dos cogumelos (Souza et al, 2016).

Os dados também mostraram que bioproduto tem conteúdo de carboidrato (77,40%) similar quando comparado a farinha de outros tubérculos amazônicos, Cará-roxo e Ária [*Dioscorea trifida* e *Calathea allouia* (83 e 81%)], respectivamente. Os valores elevados de carboidratos são sugestivos para a inclusão do bioproduto na elaboração de pães e/ou massas alimentícias (Teixeira et al, 2016). Nas condições experimentais, a incorporação da massa micelial de *P.ostratoroseus* no tubérculo *D.alata*, aumentou significativamente os valores nutricionais do produto final produzido por fermentação no estado sólido.

Tabela 1. Composição centesimal do bioproduto à base de *P. ostratoroseus* e *D. alata*

Variáveis	<i>Dioscorea alata</i>	Bioproduto
Umidade (%)	23,88±0,01 ^a	8,60±0,04 ^b
Cinzas (%)	0,55±0,07 ^b	1,72±0,03 ^a
Lipídeos (%)	0,11±0,04 ^b	1,00±0,11 ^a
Proteína (%)	4,60±0,05 ^b	6,60±0,39 ^a
Fibras (%)	2,00±0,12 ^b	5,0±0,05 ^a
Carboidratos	68,84±0,28 ^b	77±0,81 ^a
Energia (kcal 100g ⁻¹)	294±0,22 ^b	343±0,05 ^a

Os resultados referentes ao teor de minerais do bioproduto estão citados na tabela 4. Os cogumelos podem acumular em seus corpos de frutificação grandes quantidades de macro e micro elementos que são essenciais para os fungos e seus consumidores, sendo o potássio (K) e o fósforo (P) dois elementos predominantes e geralmente são seguidos por Ca, Mg, Na e Fe (Wang et al, 2014).

Dos microminerais, a maior taxa no bioproduto foi ferro (2.54mg/100g). Resultados semelhantes (2.4 – 2.7mg/100g) foram demonstrados por Souza et al (2016) no bioproduto contendo exocarpo de abacaxi miceliado por *Pleurotus albidus* ou *P. florida*. De acordo com a DRI (2005) a ingestão diária de ferro deve ser acima de 8 e 18mg/dia para homens e mulheres em fase adulta, respectivamente, sendo que para um alimento ser considerado de fonte de ferro é necessário que atenda no mínimo 15% da recomendação diária (2,0mg/100g).

Zinco (1,65 mg/100g) foi outro micromineral que teve destaque no bioproduto. Resultados superiores aos encontrados em *Ganoderma lucidum* e *Trametes versicolor* com 5,0mg.kg⁻¹ e 14,0 mg.kg⁻¹ (Cohen et al, 2014). Outras espécies de cogumelos, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinus edodes* apresentaram um quantitativo maior de zinco 8,8 mg/100g e 7,7 mg/100g respectivamente (Falandysz; Borovička, 2013). Este resultado revela que o bioproduto pode ser considerado alimento fonte de zinco (DRI, 2005).

Entre os macrominerais, potássio (1,15 g/100g) foi determinado em maior quantitativo no bioproduto. Este valor de potássio foi similar ao de *Lentinus citrinus* cultivado em exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz e, superior a mesma espécie cultivada em liteira, 20g.kg e 1g.kg, respectivamente (Machado et al, 2015). Com base nesses resultados e a determinação da DRI (2005) o bioproduto investigado pode ser classificado como alimento fonte de potássio. O quantitativo de minerais nos cogumelos podem variar de acordo com a linhagem e o substrato utilizado no cultivo (Lou et al, 2017).

Tabela 2. Minerais presentes no bioproduto à base de *P. ostratoroseus* e *D. alata*

Nutrientes	Valores
P (g kg ⁻¹)	1,86±1,25
K (g kg ⁻¹)	11,50±0,00
Ca (g kg ⁻¹)	0,48±5,00
Mg (g kg ⁻¹)	0,46±0,36
Fe (mg kg ⁻¹)	25,45±0,02

Na (mg kg ⁻¹)	1,00±0,81
Cu (mg kg ⁻¹)	6,09±0,81
Mn (mg kg ⁻¹)	1,43±0,81
Zn (mg kg ⁻¹)	16,50±0,07

O valor de pH do bioproduto formulado com polpa de *Dioscorea alata* miceliado com *P. ostreatoroseus* foi 5,5, atributo benéfico, pois contribui para maior vida de prateleira e em consequência a conservação das características nutricionais (Borges et al, 2009; Reis et al, 2017) Os resultados apresentados estão na faixa daqueles citados para farinha de batata doce, farinha de casca de batata e farinha de banana verde, o pH foi registrado na faixa de 5,70, 4,96 e 5,30 , respectivamente (Borba et al, 2005; Fernandes et al, 2010 e Borges et al, 2009).

A acidez titulável do bioproduto foi de 1,3 g.100 g⁻¹, resultado superior ao apresentado por Fernandes et al, (2006) e Trindade et al, (2010) para espécies de batata e de inhame (*Dioscorea* sp), 0,20 g.100 g⁻¹ e 0,5 g.100 g⁻¹ respectivamente. No estudo realizado por Kirsch (2013), barra de cereais elaborada com massa micelial de *Pleurotus albidus* a acidez titulável foi de 2,01 g.100 g⁻¹, valor superior ao determinado nesta pesquisa. A acidez de um produto alimentício pode ser derivada dos próprios compostos naturais do alimento, pelo tipo de processamento ao qual o alimento foi submetido e deterioração microbiana (Santos et al, 2012; Vengaiah et al, 2013).

A tabela 3 apresenta as características tecnológicas do bioproduto determinadas pelas seguintes análises, absorção de água, absorção de gordura, densidade aparente, capacidade de inchamento, capacidade de espuma e estabilidade de espuma.

A capacidade de absorção de água para o bioproduto foi 2,2 g.g⁻¹ (Tabela 3), valor aproximado ao determinado para farinha de tubérculo *palmyrah* (Vengaiah et al, 2013), 2,5 g.g⁻¹ . Também foram relatados para fécula de mandioca e farinha de bagaço de mandioca, valores de 1,6 a 6,73 g.g⁻¹ (Fiorda et al, 2013). Valores altos de absorção de água são importantes para ajudar a manutenção da umidade de produtos e a capacidade de associação com a água (Wang et al, 2006). Neste sentido, a adição do bioproduto elaborado nesta pesquisa pode contribuir para o melhoramento do manuseio e impedir o ressecamento do produto final durante o armazenamento, como exemplo, produtos de panificação, confeitaria e massas alimentícias.

Tabela 3. Características tecnológicas do bioproduto à base de *P. ostratoroseus* e *D. alata*

Parâmetros	Valores
Capacidade de absorção de água (g g ⁻¹)	2,2±0,25
Capacidade de absorção de gordura (g g ⁻¹)	1,0±0,07
Densidade aparente (g cm ³)	0,2±0,02
Capacidade de inchamento (g g ⁻¹)	3,00±0,22
Capacidade de espuma (%)	30±0,02
Estabilidade de espuma (%)	15±0,81

Na avaliação da capacidade de absorção de gordura equivaleu a 1,0 g.g⁻¹, dado que indica a baixa solubilidade em óleo no bioproduto (Tabela 3). No trabalho realizado por Santana et al, 2017 e Fiorda et al (2013) foram relatados valores de 1,7 a 2,75 ml de g⁻¹ para farinhas vegetais e 0,59 g.g⁻¹ para farinha do bagaço da mandioca. A diferença dos valores de absorção de gordura pode estar relacionada com maior quantidade de grupos hidrofóbicos expostos nas proteínas presente nos alimentos, assim sendo, quanto maior teor de proteínas no alimento maior é a absorção de gorduras (Santana et al, 2017). Além disso, a absorção de gordura é uma característica importante nas formulações alimentares, ou seja, gorduras realçam o sabor e são desejáveis para melhorar a sensação do produto na boca (Porte et al, 2011).

Vengaiyah et al (2013) citam que, a densidade aparente de produto alimentício depende do tamanho das respectivas partículas, característica que determina os requisitos de embalagem, manuseio de materiais e a aplicação em processamento industrial. Nesta pesquisa foi constatado valor igual a 0,2 g.cm³ referente a densidade aparente do bioproduto (Tabela 2). Estudos mostraram valores de densidade aparente para farinha de tapioca e farinha de pupunha, respectivamente, 0,1 g.cm⁻³ e 0,7 g cm⁻³ (Silva et al,2014; Carvalho et al, 2010).

O poder de inchamento do bioproduto foi de 3,0 g.g⁻¹, uma característica que mede a capacidade de hidratação e de peso de grânulos inchados da amostra e a água ocluída na análise. Nunes et al (2009) encontraram teor igual a 7,0 g.g⁻¹ em féculas de mandioca, produto que contém maior quantidade de amido. Segundo Limberger et al (2008) a magnitude do inchamento ocorre em função do amido e da temperatura utilizada experimentalmente, quando a temperatura do meio aumenta as moléculas de amido são ativadas

termodinamicamente, aumentando a mobilidade granular e por consequência a penetração da água, condição que facilita a capacidade de inchamento.

A formação de espuma do bioproduto foi cerca de 30%, valor superior ao encontrado por Suriya et al (2016) que relataram valores entre 9 a 20% em diferentes tratamentos com a farinha do tubérculo (*Amorphophallus paeoniifolius*). No experimento realizado com *D. alata* a formação foi de 25% (Nwakaudu et al, 2017). Quanto a estabilidade da espuma, 15% foi o valor determinado no bioproduto valor inferior ao citado por Vengaiyah et al (2013), 20%. A formação e a estabilidade de espuma são importantes em produtos de panificação e confeitaria por auxiliarem na incorporação de ar mantendo a boa textura da massa (Wang et al, 2006).

O extrato aquoso do bioproduto não demonstrou toxicidade contra os fibroblastos humanos (MRC5), nas condições experimentais, resultado evidenciado pela manutenção das características morfológicas dos fibroblastos nas condições avaliadas. Os extratos aquosos dos cogumelos *Hericium erinaceus* e *P. albidus* não apresentaram toxicidade contra fibroblastos humanos (MRC5), resultados observados por Lai et al. (2013) e Martim et al. (2017), respectivamente. Yuan et al.(2014) também não verificaram toxicidade dos extratos aquosos de *Inonotus obliquus*, *Cordyceps militaris* e *Uncaria tomentosa* contra fibroblastos humanos.

Os resultados da avaliação da qualidade microbiológica do bioproduto demonstraram ausência de Coliformes Totais, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp e *Staphylococcus* coagulase positiva, resultados que comprovam que o processo de elaboração do bioproduto foi realizado em adequadas condições higiênico-sanitária (Silva et al, 2007).

Conclusão

O bioproduto formulado com a massa micelial de *P. ostromorseus* em tubérculos de *D. alata* tem viabilidade nutricional e boa característica tecnológica para fortificação de produtos de panificação e massas alimentícias, representando uma inovação na indústria de alimentos.

Referências Bibliográficas

ADEPOJU, O. T., BOYEJO, O., & ADENIJI, P. O. **Nutrient and antinutrient composition of yellow yam (*Dioscorea cayenensis*) products**. Data in Brief, 11, 428-431, 2017.

AHMED, S. ANSAR; GOGAL, ROBERT M.; WALSH, JANE 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.

ÁLVARES, V. D. S., DA SILVA, R. S., DA CUNHA, C. R., FELISBERTO, F. Á. V., & CAMPOS FILHO, M. D. **Efeito de diferentes concentrações de corante natural de açafrão-da-terra na composição da farinha de mandioca artesanal.** Revista Caatinga, 28(1), 256-262, 2015

AWOYALE, W. MAZIYA-DIXON, B., SANNI, L. O; SHITTU, T. A. **Effect of water yam (*Dioscorea alata*) flour fortified with distiller's spent grain on nutritional, chemical, and functional properties.** Food science & nutrition, 4(1), 24-33, 2016.

BEUCHAT, L.R., CHERRY, Y.P. and Quinn, M.R., **Physicochemical. Latinamericanos de Nutricion,** Caracas. 140–149, 1975.

BORGES, A. D. M., PEREIRA, J; PEREIRA DE LUCENA, E. M. **Caracterização da farinha de banana verde.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, 29(2), 2009.

CARDOSO, R. V., FERNANDES, Â., OLIVEIRA, M. B. P., CALHELHA, R. C., BARROS, L., MARTINS, A., FERREIRA, I. C. **Development of nutraceutical formulations based on the mycelium of *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*.** Food & Function, 2017.

CARVALHO, A. V., DE VASCONCELOS, M. A. M., SILVA, P. A., ASSIS, G. T; ASCHERI, J. L. R. **Caracterização tecnológica de extrusados de terceira geração à base de farinhas de mandioca e pupunha.** Ciência e agrotecnologia, Lavras, v. 34, n. 4, p. 995-1003, jul, 2010.

COSTA FEIJÓ, J., CRUZ, F. G. G., MELO, R. D., RUFINO, J. P. F., DAMASCENO, J. L., COSTA, A. P. G. C; NEGREIROS, T. D. J. N. **Farinha de cará (*Dioscorea trifida*) sobre o desempenho, qualidade do ovo e bioquímica sérica de poedeiras comerciais leves.** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 17(3), 413-423, 2016

ELLONG, E. N. et al. **Physicochemical, nutritional and sensorial qualities of Boutou yam (*Dioscorea alata*) varieties.** Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, v. 3, n. 2, p. 138-150, 2015.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** 2.ed. Brasília-DF, Informação Tecnológica, 628p, 2009.

FALANDYSZ, J; BOROVIČKA, J. **Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks.** Applied Microbiology and Biotechnology, 97(2), 477-501, 2013.

FERNANDES, A. F. **Utilização da farinha de casca de batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) na elaboração de pão integral.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006

FIORDA, F. A., SOARES SOARES JÚNIOR, M., ALVES DA SILVA, F., REIS FONTINELLE SOUTO, L., & EIRAS GROSSMANN, M. V. **Farinha de bagaço de**

mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. Pesquisa Agropecuária Tropical, 43(4), 2013.

FONSECA, T. R. B., DE AMORIM SILVA, T., ALECRIM, M. M., DA CRUZ FILHO, R. F., TEIXEIRA, M. F. S. **Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil.** African Journal of Microbiology Research, 9(30), 1814-1822, 2015.

LAI, P. L., NAIDU, M., SABARATNAM, V., WONG, K. H., DAVID, R. P., KUPPUSAMY, U. R.; MALEK, S. N. A. **Neurotrophic properties of the Lion's mane medicinal mushroom, *Hericium erinaceus* (*Higher Basidiomycetes*) from Malaysia.** International journal of medicinal mushrooms, 15(6), 2013.

LAGNIKA, C., ADJOVI, Y. C., LAGNIKA, L., GOGOHOUNGA, F. O., DO-SACRAMENTO, O., KOULONY, R. K., & SANNI, A. **Effect of Combining Ultrasound and Mild Heat Treatment on Physicochemical, Nutritional Quality and Microbiological Properties of Pineapple Juice.** Food and Nutrition Sciences, 8(02), 227, 2017.

LOU, Z., SUN, Y., ZHOU, X., BAIG, S. A., HU, B; XU, X. **Composition variability of spent mushroom substrates during continuous cultivation, composting process and their effects on mineral nitrogen transformation in soil.** Geoderma, 307, 30-37, 2017.

MACHADO, A.R.G; TEIXEIRA, M.F.S; KIRSCH, L.S; CAMPELO, M.D.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 J. Biol Sci. 23(5):621-627, 2016

MARTIM, S.R; SILVA, L.S.C; SOUZA, L.B; CARMO, E.J; ALECRIM, M.M; VASCONCELLOS, M.C; TEIXEIRA, M.F.S. ***Pleurotus albidus*: A new source of milkclotting proteases.** Afr. J. Microbiol Res. 11 (17):660-667, 2017.

NADIA, L., WIRAKARTAKUSUMAH, M. A., ANDARWULAN, N., PURNOMO, E. H., NODA, T., ISHIGURO, K. **Chemical characterization of flour fractions from five yam (*Dioscorea alata*) cultivars in Indonesia.** Journal of Engineering and Technological Sciences, 47(1), 92-103, 2015

NARAYANA, K. AND NARASINGA-RAO, M.S. **Effect of partial proteolysis on the functional properties of winged pea (*Psophocarpus tetragonolobus*) flour.** Journal of Food Science, Vol. 49 No. 3, pp. 944-947. 1984.

NUNES, L. B., SANTOS, W. D. J., CRUZ, R. S. **Rendimento de extração e caracterização química e funcional de féculas de mandioca da região do semi-árido baiano.** Alimentos e Nutrição Araraquara, 20(1), 129-134, 2009.

NWAKAUDU, A. A., NWAKAUDU, M. S., OWUAMANAM, C. I., ALAGBAOSO, S. O., NJOKU, N. E., AGUNWAH, I. M, OFOEGBU, J. O. **Effect of carboxymethylcellulose incorporation on the functional, pasting and sensory properties of water yam (*D. alata*) flour.** European Journal of Food Science and Technology, 5(1), 1-12, 2017

PEREIRA, G. S., CIPRIANI, M., WISBECK, E., SOUZA, O., STRAPAZZON, J. O., & GERN, R. M. **Onion juice waste for production of *Pleurotus sajor-caju* and pectinases.** Food and Bioproducts Processing, 106, 11-18, 2017.

PORTE, A., SILVA, E. F. D., ALMEIDA, V. D. D. S. D., SILVA, T. X. D., PORTE, L. H. M. **Propriedades funcionais tecnológicas das farinhas de sementes de mamão (*Carica papaya*) e de abóboras (*Cucurbita sp.*)**. Rev Bras Prod Agro, 13(1), 91-6, 2011.

REIS, M. F., ROCHA, C. L. M. **Efeito de extratos aquosos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre o desenvolvimento vegetativo de *Aspergillus nidulans***. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, 11(2), 42-52, 2017.

REIS, D. S., FIGUEIREDO NETO, A., FERRAZ, A. D. V., DE FREITAS, S. T. **Produção e estabilidade de conservação de farinha de acerola desidratada em diferentes temperaturas**. Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado, 2017.

SANTANA, G. S., DE OLIVEIRA FILHO, J. G., EGEA, M. B. **Características tecnológicas de farinhas vegetais comerciais**. Revista de agricultura neotropical, 4(2), 88-95, 2017.

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

SILVA, P.A; et al,2014; Caracterização de farinhas de tapioca produzidas no estado do Pará. Ciência Rural, Santa Maria, v.43, n.1, p.185-191, jan, 2014

SOSULSKI, F.N. **The centrifuge method for determining flour absorption in hard red spring wheats**. Cereal Chemistry. v. 39, n. 4, p. 344-350, 1962.

SOTO, J. L. M., GONZÁLEZ, J. V., NICANOR, A. B., CRUZ, L. G., FERNÁNDEZ, J. Y. **Chemical Characterization and Nutritional Evaluation of Mountain's yam (*Dioscorea remotiflora* Kunth) Tubers**, 2014.

SOUZA, R.A.T, FONSECA, T.R.B, KIRSCH, L.S, SILVA, L.S.C, ALECRIM, M.M, FILHO, R.F.C, TEIXEIRA, M.F.S. **Nutritional composition of bioproducts generated from semi-solid fermentation of pineapple peel by edible mushrooms**. Afr. J. Biotechnol. 15(12):451-457. 2016.

SURIYA, M., BARANWAL, G., BASHIR, M., REDDY, C. K., HARIPRIYA, S. **Influence of blanching and drying methods on molecular structure and functional properties of elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*) flour**. LWT-Food Science and Technology, 68, 235-243, 2016.

TRINDADE, T., SOARES, L. S., FURTADO, M. C., CASTRO, A. A., CARNELOSSI, M. A. **Composição centesimal de inhame (*Dioscorea sp.*) in natura e minimamente processado**. Scientia Plena, 7(6), 2011.

TEIXEIRA, L. S., MARTIM, S. R., SILVA, L. S. C., KINUPP, V. F., TEIXEIRA, M. F. S., PORTO, A. L. F. **Efficiency of Amazonian tubers flours in modulating gut microbiota of male rats**. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 38, 1-6. 2016

VENGAIAH, P. C., MURTHY, G. N., PRASAD, K. R., KUMARI, K. U., & ARULRAJ, S. **Physico-chemical and functional characteristics of palmyrah (*Borassus flabellifer* L) tuber flour**. Journal of Plantation Crops (India). 41(3): 437-440, 2013.

VIRMOND, E. P., KAWAKAMI, J., VONCIK, K. S., CÓRDOVA, K. R. V., SLOMPO, P. J. H. **Características físico-químicas de cultivares de batata sob cultivo orgânico** **Physico-chemical characteristics of potato cultivars on organic system**. *Ambiência*, 10(1), 31-42, 2014.

WANG, S. H., ROCHA, G. O., NASCIMENTO, T. P., ASCHERI, J. L. **Absorção de água e propriedades espumantes de farinhas extrusadas de trigo e soja**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 2006.

WANG, X. M., ZHANG, J., WU, L. H., ZHAO, Y. L., LI, T., LI, J. Q. LIU, H. G. **A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China**. *Food Chemistry*, 151, 279-285, 2014.

YUAN, X., SUN, H., LIU, Y., SHIROSHITA, T., KAWANO, S., TAKESHI, S., ZHANG, Z.. **Anti-cancer activity comparisons of aqueous extracts from *Inonotus obliquus*, *Cordyceps militaris* and *Uncaria tomentosa* in vitro and in vivo**. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(6), 2014

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão

Artigo 3: “Massa alimentícia elaborada com bioproduto composto por tubérculo miceliado com cogumelo comestível”

Massa alimentícia elaborada com bioproduto composto por tubérculo miceliado com cogumelo comestível

Ana Rita Gaia Machado¹, Maria da Conceição Loureiro Campelo², Maria Francisca Simas Teixeira³

¹Universidade Federal do Amazonas, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal –Bionorte; Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus - AM, 69067-005; ritamachado.nutri@hotmail.com

⁵ Embrapa Amazônia Ocidental, Setor de Gestão de Laboratórios – LASP. Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural - CEP: 69010-970 Caixa Postal 319 - Manaus, Amazonas, Brazil

⁶ Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Coleção de Culturas DPUA –UFAM. Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep: 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil

Resumo

Alimentos comumente consumidos pela população constituem matéria-prima essencial para fortificação de produtos de baixo conteúdo de nutrientes. A utilização de alimentos alternativos para a manutenção da saúde vem demonstrando aumento de interesse pelo consumidor. Diante disso o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição e as características tecnológicas de massa alimentícia fresca do tipo capeletti formulada com diferentes proporções de bioproduto contendo tubérculo miceliado com *Pleurotus ostreatoroseus*. Os capelettis foram caracterizados quanto sua composição nutricional com diferentes concentrações (5; 10 e 15%) e apresentaram elevadp teor de proteínas, fibras e cinzas mineirais. Dentre as formulações testadas a com melhor conteúdo nutricional foi o capeletti com 15% do bioproduto em sua formulação, se destacou por apresentar maior conteúdo de fibras e minerais quando comparado com a massa padrão. Os resultados do presente estudo indicam a viabilidade da utilização do bioproduto constituído por tubérculo de *Dioscorea alata* miceliado com *Pleurotus ostreatoroseus*, como ingrediente na elaboração de massa alimentícia do tipo capeletti fonte de proteínas, fibras e minerais, constituintes que proporcionam benefícios a saúde humana.

Palavras-chave: *Pleurotus ostreatoroseus*, *Dioscoreae alata*, produto isento de glúten.

Abstract

The use of alternative food for health maintenance has been showing an increase of interest by the consumer. Foods commonly consumed by the population are essential raw materials for fortifying products with low nutrient content. Therefore, the objective of this work was to evaluate the composition and technological characteristics of fresh pasta of the capeletti type formulated with different proportions of bioproduct containing mycotic tuber with *Pleurotus ostreatoroseus*. The capelettis were characterized as their nutritional composition with different concentrations (5, 10 and 15%) and showed considerable protein, fiber and mineral ash contents. Among the formulations tested with the highest nutritional content was capeletti with 15% of the bioproduct in its formulation, it was distinguished by its higher content of fibers and minerals when compared to the standard mass. The results of the present study indicate the feasibility of using the bio - product constituted by *Dioscorea alata* mycelia tuber with *Pleurotus ostreatoroseus*, as an ingredient in the elaboration of capeletti type pasta source of proteins, fibers and minerals, constituents that provide benefits to human health.

Key words: *Pleurotus ostreatoroseus*, *Dioscoreae alata*, gluten-free product.

Introdução

As massas alimentícias são alimentos consumidos mundialmente, popular entre os consumidores pela facilidade de transporte, manipulação e suas propriedades de armazenamento (Khan et al, 2014; Silva et al, 2016). No mercado brasileiro, as massas estão sendo o segundo alimento mais consumido, contudo tem baixo valor nutricional, predominando os carboidratos, com deficiência vitaminas fibras, minerais e baixa qualidade proteica (Kahlon; Chiu, 2015).

Alimentos comumente consumidos pela população constituem matéria-prima essencial para fortificação de produtos de baixo conteúdo de nutrientes. Nesse sentido, a exigência do consumidor pela disponibilização de produtos saudáveis está incentivando o desenvolvimento de produtos com qualidade nutricional de forma a contribuir com a promoção da saúde e bem-estar da humanidade.

A utilização de tecnologias que explorem as propriedades de componentes da matéria-prima para desenvolver produtos com propriedade de formar estrutura semelhante à do glúten estão proporcionando a melhoria da qualidade de nutrientes das massas alimentícias, as quais são as denominadas de não convencionais (Ormenese; Chang, 2002).

O enriquecimento das propriedades nutricionais e a inovação tecnológica de massas alimentícias consiste na incorporação de novos ingredientes. Entre as diversas matérias-primas utilizadas no enriquecimento de massas estão inulina, aveia, amaranto, trigo sarraceno, farinha de sorgo, farelo de trigo, quinoa e cogumelos comestíveis (*Boletus edulis* e *Lentinula edodes*) (Bustos et al, 2013; Kahan et al, 2014; Sobota et al, 2015; Kahlon; Chiu, 2015; Lu et al, 2016).

A incorporação do bioproduto contendo tubérculo miceliado por *Pleurotus ostreatoroseus* constitui uma forma de incorporar nutrientes, especialmente fibras e minerais, características benéficas para as funções metabólicas humanas, assim como, geração de benefícios econômicos em coração a massa tradicional.

Fonseca et al (2015) demonstrou que *Pleurotus ostreatoroseus*, um isolado amazônico, contém teor de proteína 23,53% , 3,08% de lipídios, 6,49% de cinzas, 12,79% de fibras e 46% de carboidratos quando cultivado em exocarpo de cupuaçu misturado com farelo de arroz 20% (p/p). Sendo assim a incorporação de bioproduto teve como objetivo avaliar a composição e as características tecnológicas de massa alimentícia fresca do tipo capeletti formulada com diferentes proporções de bioproduto contendo tubérculo miceliado com *Pleurotus ostreatoroseus*.

Material e Métodos

Matéria-prima

O bioproduto utilizado neste estudo foi obtido por fermentação no estado sólido, originário da miceliação dos rizomas de *Dioscorea alata* por *Pleurotus ostreatus* e rizoma (Machado et al, 2017), cedido pelo Laboratório de Micologia Industrial e Médica da Universidade Federal do Amazonas. O bioproduto foi desidratado e triturado até a obtenção de um pó fino. Para a utilização na elaboração de quatro massas do tipo capeletti o bioproduto foi armazenado em frascos de vidro esterilizados com tampa rosqueável.

Elaboração do capeletti enriquecido com o bioproduto

As massas alimentícias foram formuladas utilizando os ingredientes citados na tabela 1. Separadamente, nas quatro formulações contendo o bioproduto a 5%, 10% e 15% (p/v), exceto o padrão, os ingredientes foram misturados na seguinte ordem, farinha de arroz, goma xantana, bioproduto, ovos, azeite e água, em batedeira industrial Black & Decker®, até a obtenção de uma massa homogênea. Em seguida, a massa foi moldada em máquina de cilindro manual para abertura de massa fresca. As massas cortadas em formato triangular foram utilizadas na elaboração dos capelettis e recheadas com frango desfiado.

Tabela 1. Formulação do capeletti com bioproduto à base de cogumelo comestível e tubérculo tropical

Ingredientes	Formulações ¹			
	CP	C5	C10	C15
Água	20ml	20ml	20ml	20ml
Azeite	200ml	200ml	200ml	200ml
Bioproduto	-	25g	50g	75g
Farinha de arroz	500 g	475g	450g	425g
Goma xantana	100g	100g	100g	100g
Ovos	230g	230g	230g	230g
Peito de frango*	100g	100g	100g	100g

¹ Formulação equivalente o capeletti padrão (CP); capeletti com 5% do bioproduto (C5); capeletti com 10% do bioproduto (C10) e capeletti com 15% do bioproduto (C15).

*Foram utilizados como tempero: Sal, Alho, Cebola, Tomilho e Coentro.

Teste de cozimento dos capelettis

O teste de cozimento foi realizado segundo o método 16-50 da AACC (1995). Os parâmetros avaliados foram:

Tempo de cozimento

O tempo de cozimento foi determinado pela cocção de 10 g de amostra em 350 mL de água destilada em ebulição, até atingir a qualidade visual adequada em consequência da gelatinização do amido em toda a seção da massa. Este ponto foi determinado pela compressão de amostras de produto cozido, a cada 30 segundos, entre duas lâminas de vidro até o desaparecimento do eixo central.

Aumento de massa do produto cozido

O aumento de massa foi determinado pela pesagem de uma amostra antes e após a cocção, utilizando-se o tempo de cozimento ideal de cada amostra. O valor do aumento de massa é a razão entre a massa da pasta cozida e a massa da pasta crua (10 g), expresso em porcentagem (%).

Perda de sólidos na água de cozimento

A quantidade de sólidos perdidos na água de cozimento foi determinada pela evaporação de 25 mL de água de cozimento, obtida segundo procedimento descrito no item Aumento de massa do produto cozido acima, em estufa a 105 °C, até peso constante.

Avaliação da qualidade microbiológica

Para avaliar a qualidade microbiológica das massas alimentícias foram verificadas a presença de Coliformes Totais, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus*, de acordo com Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos preconizados pela RDC nº12, da ANVISA, 2001, citado por Silva, 2007.

Composição centesimal

A composição centesimal foi realizada através da determinação de umidade, lipídeos, proteína, cinzas e carboidratos. A umidade foi determinada por dessecação 105 °C até obtenção de peso constante. A determinação da fração protéica foi realizada pelo método micro Kjeldahl, aplicando o fator de conversão 6,25 (Silva et al, 2007). A quantificação de lipídios foi realizada segundo o método Bligh and Dyer. As cinzas, fibra bruta foram determinadas por incineração do material em mufla a 550-660 °C e digestão ácido-básica, segundo método de Weende, respectivamente (A.O.A.C, 2006). Os carboidratos totais foram estimados por diferença. O valor calórico das massas foi calculado utilizando-se os

coeficientes de ATWATER que considera 4kcal/g de proteínas e carboidratos e 9kcal/g para os lipídios.

Determinação de macro e micro minerais

A determinação dos minerais foi realizada conforme os métodos propostos 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 $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (3:1). O teor de fósforo foi determinado por Espectrofotometria com azul de molibdênio; cálcio, magnésio, potássio, sódio, 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 (Na, Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg^{-1} .

Avaliação do custo das preparações

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

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva (Tabelas, gráficos e distribuição de frequência em classes). Para analisar os resultados da composição nutricional e o teste de cozimento os dados foram submetidos à análise de variância - ANOVA e, as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Minitab versão 16.0.

Resultados e Discussão

A figura 1 mostra as massas do tipo capeletti formuladas com diferentes concentrações do bioproduto (5%, 10% e 15%, p/p) e recheadas com frango desfiado. Na abertura das massas foram observadas as seguintes características, aspecto firme, não quebradiça, coloração levemente marrom/arroxeadas e aderência adequada do bioproduto à massa, sem desprendimento durante a cocção. Estas características mostraram que as massas do tipo capeletti contendo bioproduto foram similares ao capeletti padrão. Qualidades fundamentais que podem auxiliar no desenvolvimento de tecnologia de processamento comercial para a utilização efetiva do bioproduto, sobretudo na fabricação de massas alimentícias do tipo capeletti (Lu et al, 2016; Farzana; Mohajan; 2015).



Figura 1. Aspectos morfológicos dos capeletti experimentais. Capeletti padrão (A); capeletti com 5% do bioproduto (B); capeletti com 10% do bioproduto (C) e capeletti com 15% do bioproduto (D).

O teste de cozimento dá informações de como o produto se comporta durante a cocção, informando o tempo de cozimento das massas, seu aumento de massa e perda de resíduos sólidos na água (Tabela 2). O comportamento das massas alimentícias durante e após o cozimento é um dos parâmetros de qualidade de maior importância para os consumidores desse produto (Del Bem et al, 2012).

O tempo de cocção variou em função da composição das massas, sendo acrescido em alguns segundos com a adição do bioproduto, cerca de 12% de diferença entre o capeletti padrão (CP) do capeletti com 15% (C15), esse resultado pode ter sido em função do quantitativo de fibras presente no bioproduto que requer maior tempo de cocção. Resultados similares foram encontrados por Feitoza et al (2015) que desenvolveram massas alimentícias com farinha de arroz integral orgânico e o seu tempo de cozimento variou de 7-8min. Contudo, Khan et al, 2014 elaboraram macarrão com farinha de sorgo em diferentes proporções e seu tempo de cocção variou entre 14-15 minutos. O consumidor atual tende a procurar por alimentos práticos, com qualidade nutricional, de fácil e rápido preparo, sendo assim o tempo de cocção influencia diretamente na compra do produto.

No presente estudo o aumento de massa (%) acompanhou o aumento do teor de bioproduto. Segundo Hummel (1966), o aumento adequado de massa situa-se entre a faixa de 200 e 300% para massas à base de trigo. De modo geral, as massas elaboradas no presente trabalho apresentaram valores inferiores a esses padrões (entre 130 e 160%), o que pode ser explicado pelo baixo tempo de cozimento e por ser uma massa alimentícia sem glúten e com recheio.

Os valores encontrados na determinação das perdas de sólidos solúveis mostraram que os capelletis elaborados com o bioproduto perderam entre 3,3 a 7,8%, e o capeletti padrão 4,4% de perda de sólidos. Segundo Sobota et al. (2015) uma massa alimentícia com maior quantitativo de fibra dietética em sua composição pode apresentar um aumento nas perdas de matéria seca durante o cozimento. Perdas de sólidos de até 6% são características de massas de qualidade muito boa, até 8% de massas de média qualidade e valores iguais ou superiores a 10% são características de massas de qualidade ruim (Hummel, 1966). O alto teor de perda de sólidos é uma característica indesejável e representa alta solubilidade do amido, resultando em turbidez na água e baixa tolerância ao cozimento (Khan et al, 2014).

Com relação às características intrínsecas das matérias-primas, acredita-se que a redução na quantidade de farinha de arroz pela adição do bioproduto possa ter influenciado os resultados obtidos, em que contribuiu para o aumento de massa, no teor de sólidos solúveis em água quente e favoreceu o aumento do tempo de cozimento. Contudo a massa de capeletti com maior qualidade nos parâmetros avaliados foi o capeletti elaborado com 10% de bioproduto em sua formulação, apresentando tempo ótimo de cozimento, volume de massa e perda de sólidos que caracterizam a massa de qualidade boa.

Tabela 2. Teste de qualidade dos capelettis enriquecidos com o bioproduto à base de cogumelo comestível e tubérculo tropical

Variáveis	Capelettis experimentais*			
	CP	C5	C10	C15
Tempo de cozimento (m)	6,50±0,10 ^c	6,48±0,26 ^c	7±0,21 ^b	7,40±0,41 ^a
Aumento de massa (%)	132±0,15 ^c	134±0,07 ^c	143±0,54 ^b	158±0,04 ^a
Perda de sólidos (%)	4,4±0,07 ^c	3±0,04 ^d	5±0,03 ^b	7,8±0,08 ^a

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

*Testes realizados em triplicata - capeletti padrão (CP); capeletti com 5% do bioproduto (C5); capeletti com 10% do bioproduto (C10) e capeletti com 15% do bioproduto (C15).

Os resultados da análise microbiológica das massas alimentícias demonstraram a ausência Coliformes Totais, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus*. Estes resultados mostraram que os produtos foram elaborados em condições higiênico-sanitárias adequadas e que a qualidade desses produtos está em conformidade com as exigências da legislação brasileira, RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 e as citações de Silva, et al (2007).

Na tabela 3 estão apresentados os valores médios da composição centesimal dos capeletti elaborados com o bioproducto formulados com *Pleurotus ostreatoroseus* e *Dioscorea alata*. A umidade significativa dos capeletti foi na massa com 5% de bioproducto em sua massa (C5) com 9,21% , cerca de 2,50% superior quando comparado aos capeletti com 15% e 10% de bioproducto, respectivamente. Valores similares foram encontrados por Rocha, et al (2009) em macarrão elaborado com ora-pro-nóbis e por Sobota et al (2015) em massa integral formulada com farelo de trigo. Os teores de umidade dos capeletti estão em conformidade com a legislação que estabelece um teor de umidade máximo para as massas secas de 13,0%.

O quantitativo de cinzas significativa foi no capeletti contendo 15% de bioproducto com 1,64% valor 18% superior quando comparado ao produto padrão. Resultados inferiores foram encontrados em massas de semolina e mistas de semolina com farinhas de leguminosas com 1,8% (Del Bem et al, 2012) e em macarrão isento de glúten com farinha de arroz com 0,8% de cinzas. Segundo Borges et al (2003) o fato de se usar farinhas fontes de fibras implica em valores altos no teor de cinzas, que no produto final poderá variar segundo a percentagem de farinha utilizada no seu preparo e que o teor de cinzas está diretamente relacionado à coloração que a massa alimentícia apresenta no estado cru.

O teor de lipídios significativo foi no capeletti padrão (CP) com 17,90%, valor que representou aumento de 10% ao capeletti com 15% de bioproducto. O quantitativo de lipídio diminui conforme a adição do bioproducto na massa.

O teor de proteína do capeletti diminuiu significativamente ($P < 0,05$) em massas contendo 15%, 10% e 5% em comparação com a massa de controle. O conteúdo de proteínas do capeletti padrão foi de 19,55% valor 23% superior ao capeletti com 15% de bioproducto. Valores inferiores foram determinado em macarrão formulado com farinha de sorgo (12,59%), por Khan et al (2014), macarrão com farelo de trigo (13,40%) citado por Sobota et al (2015) e Martinez et al (2017) com macarrão sem glúten elaborado com farinha de amêndoa (12%). A recomendação diária de proteínas estimada pela OMS é de 19,0g para crianças de 4 a 8 anos e de 56,0g para adultos acima de 18 anos. Sendo assim, o consumo de 100,0g de capeletti com 5% de bioproducto atende 91% da necessidade diária de proteína para crianças e em média 13% das necessidades diárias para adultos.

Em relação ao valor de fibras o valor do capeletti formulado com 15% de bioproducto foi significativo quando comparado ao capeletti padrão, cerca de 62% superior. Em outros

estudos realizados com massas alimentícias sem glúten, os resultados mostraram valores inferiores em macarrão de arroz (0,8%), macarrão com ora-pro-nóbis (0,46%), macarrão com *Salvia hispanica* (2%) (Tomicki et al, 2015; Rocha et al, 2008; Menga et al, 2016). De acordo com Sobota et al (2014) o conteúdo de fibras alimentares em massas alimentícias depende do tipo de matérias-primas utilizadas na produção e varia de 2,80% para 9,40%. Baseado na Dietary Reference Intakes (DRI, 2005) produtos alimentícios com um quantitativo maior que 3g/100g podem ser considerados alimentos fontes de fibras.

A adição do bioproduto formulado a base de *P. ostreatoroseus* e *D. alata* constituiu, portanto, boa alternativa para aumentar o teor de fibras dietéticas no capeletti contendo 15% e com isso favoreceu o valor nutricional desse alimento.

Os dados da tabela 3 também mostram que em relação ao conteúdo de carboidratos o seu quantitativo foi diminuído conforme a adição do bioproduto na massa. O capeletti padrão foi 12% superior ao capeletti com 15% de bioproduto em sua formulação. Valores superiores foram encontrados em outras massas alimentícias sem glúten, Tomicki et al (2015) e Borges et al (2003) com 60% e 80%, respectivamente.

Tabela 3. Composição centesimal dos capelettis enriquecidos com o bioproduto à base de cogumelo comestível e tubérculo tropical

Variáveis (g/100g ms)	Capelettis experimentais			
	CP	C5	C10	C15
Umidade	9,15±0,04 ^b	9,21±0,01 ^a	9,00±0,20 ^c	8,98±0,04 ^d
Cinzas	1,35±0,03 ^b	1,06±0,05 ^d	1,10±0,06 ^c	1,64±0,07 ^a
Lipídeos	17,90±0,08 ^a	17,50±0,02 ^b	16,50±0,02 ^c	16,21±0,77 ^d
Proteína	19,55±0,06 ^a	17,42±0,07 ^b	16,00±0,02 ^c	14,90±0,39 ^d
Fibras	1,20±0,06 ^d	2,00±0,08 ^c	2,70±0,20 ^b	3,20±0,10 ^a
Carboidratos	50,90±0,05 ^a	47,20±0,20 ^b	45,30±0,06 ^c	44,90±0,03 ^d
Energia (kcal)	442±0,02 ^a	415±0,05 ^b	393±0,04 ^c	250±0,08 ^d

As médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). capeletti padrão (CP); capeletti com 5% do bioproduto (C5); capeletti com 10% do bioproduto (C10) e capeletti com 15% do bioproduto (C15).

A tabela 4 demonstra os resultados referentes ao teor de minerais dos capelettis enriquecidos com o bioproduto à base de cogumelo comestível e tubérculo amazônico. Nos produtos experimentais, à medida que aumentou a concentração de cogumelo houve redução de 23, 9 e 23% do teor de sódio, cobre e manganês quando comparado ao produto controle, respectivamente. Provavelmente este resultado pode ter ocorrido em função da retirada da farinha de arroz.

Em relação a ferro, potássio, fosforo, cálcio, enxofre e zinco o efeito foi inverso, o conteúdo desses dois minerais aumentou de acordo com a adição do bioproduto, enquanto o quantitativo de manganês foi semelhante em todos os produtos.

Dos microminerais, o que expressou maior taxa nos capelettis experimentais foi o ferro, variando de 2,63mg a 3,10mg/100g, sendo que o capeletti com 15% de bioproduto foi 21% superior quando comparado com o capeletti padrão. Valores inferiores foram encontrados em macarrão elaborado com arroz e feijão (1,98%) e macarrão de arroz com farinha de milho (1,44%) (Minguita et al, 2015; Silva et al, 2016). De acordo com a Dietary Reference Intakes (DRI, 2005) a ingestão diária de ferro deve ser acima de 8 e 18mg/dia para homens e mulheres em fase adulta, respectivamente, sendo que para um alimento ser considerado de fonte de ferro é necessário que atenda no mínimo 15% da recomendação diária (2,0mg/100g).

O zinco foi outro micromineral que teve maior quantitativo nos capelettis, variando de 12,31mg.kg a 14,04 mg.kg. Resultados superiores aos encontrados em macarrão de arroz com farinha de milho com 7,0mg.kg (Silva et al, 2016), macarrão de trigo sarraceno com 3,5 mg.kg (Rybicka et al, 2016). Este resultado revela que o bioproduto pode ser considerado alimento fonte de zinco (DRI, 2005).

Entre os macrominerais, potássio foi determinado em maior quantitativo nos capelettis variando de 2,45g.kg a 3,25 g.kg, sendo que o capeletti com 15% de bioproduto em sua formulação foi 24% superior ao capeletti padrão. Este valor de potássio foi similar ao macarrão sem glúten com semente de amaranto e macarrão com farinha de arroz e milho, 3,25g.kg e 2,50 g.kg (Cárdenas-Hernández et al, 2016; Tomicki et al, 2015). Com base nesses resultados e a determinação da DRI (2005) os capeletti formulados com o bioproduto podem ser classificados como alimento fonte de potássio.

Tabela 4. Análise de minerais dos capelettis enriquecidos com o bioproduto à base de cogumelo comestível e tubérculo tropical

Nutrientes	Capelettis experimentais			
	CP	C5	C10	C15
P (g kg ⁻¹)	1,63±0,08 ^a	1,32±0,03 ^c	1,38±0,10 ^b	1,63±0,04 ^a
K (g kg ⁻¹)	2,45±0,53 ^d	2,50±0,10 ^c	2,75±0,23 ^b	3,25±0,45 ^a
Ca (g kg ⁻¹)	2,12±0,74 ^d	2,23±0,23 ^c	2,35±0,74 ^b	2,40±0,35 ^a
Mg (g kg ⁻¹)	0,26±0,17 ^a	0,23±0,07 ^c	0,22±0,23 ^d	0,24±0,13 ^b
S (g kg ⁻¹)	1,12±0,17 ^c	1,08±0,07 ^d	1,23±0,23 ^b	1,31±0,13 ^a
Fe (mg kg ⁻¹)	24,51±1,52 ^d	26,33±0,24 ^c	29,60±0,23 ^b	31,03±1,04 ^a
Na (mg kg ⁻¹)	5,22±0,05 ^a	4,00±0,30 ^d	4,50±0,07 ^c	5,00±0,19 ^b

Cu (mg kg ⁻¹)	3,21 ± 0,0 ^b	3,35 ± 0,18 ^a	2,98±2,24 ^c	2,91 ± 0,28 ^d
Mn (mg kg ⁻¹)	5,53±0,0 ^a	4,84±0,0 ^b	4,58±0,14 ^c	4,27±0,0 ^d
Zn (mg kg ⁻¹)	14,04±0,0 ^a	12,31±0,0 ^d	12,73±0,35 ^c	13,95±0,0 ^b

Avaliação do Preço de Custo

O custo total do capeletti sem a adição do bioproducto (Tabela 5.) foi estimado em R\$ 9,00 e rendeu uma porção de 700g. Nos capelettis contendo 5%, 10 e 15% (Tabela 6, 7 e 8) o rendimento foi semelhante ao controle e a estimativa de preço foi de R\$ 10,15, R\$ 11,26 e R\$12,36, respectivamente.

Tabela 5. Avaliação do custo do capeletti padrão (porção: 700g)

Ingrediente	Und	Preço (R\$)	Qtd	Preço total (R\$)
Azeite	L	18,00	0,200	3,60
Farinha de arroz	kg	6,00	0,500	3,00
Ovos	und	0,43	2	0,86
Goma Xantana	kg	4,00	0,100	0,4
Peito de Frango	kg	12,00	0,200	1,2
Bioproducto	kg	50,0	0,000	-
Total				9,00

Tabela 6. Avaliação do custo do capeletti com 5% de bioproducto (porção: 700g)

Ingrediente	Und	Preço (R\$)	Qtd	Preço total (R\$)
Azeite	L	18,00	0,200	3,60
Farinha de arroz	kg	6,00	0,475	2,85
Ovos	und	0,43	2	0,86
Goma Xantana	kg	4,00	0,100	0,4
Peito de Frango	kg	12,00	0,200	1,2
Bioproducto	kg	50,0	0,025	1,25
Total				10,15

Tabela 7. Avaliação do custo do capeletti com 10% de bioproducto (porção: 700g)

Ingrediente	Und	Preço (R\$)	Qtd	Preço total (R\$)
Azeite	L	18,00	0,200	3,60
Farinha de arroz	kg	6,00	0,450	2,70
Ovos	und	0,43	2	0,86
Goma Xantana	kg	4,00	0,100	0,4
Peito de Frango	kg	12,00	0,200	1,2
Bioproducto	kg	50,0	0,050	2,50
Total				11,26

Tabela 8. Avaliação do custo do capeletti com 15% de bioproduto (porção: 700g)

Ingrediente	Und	Preço (R\$)	Qtd	Preço total (R\$)
Azeite	L	18,00	0,200	3,60
Farinha de arroz	kg	6,00	0,425	2,55
Ovos	und	0,43	2	0,86
Goma Xantana	kg	4,00	0,100	0,4
Peito de Frango	kg	12,00	0,200	1,2
Bioproduto	kg	50,0	0,075	3,75
Total				12,36

Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam a viabilidade da utilização do bioproduto constituído por tubérculo de *Dioscorea alata* miceliado com *Pleurotus ostreatoroseus*, como ingrediente na elaboração de massa alimentícia do tipo capeletti fonte de proteínas, fibras e minerais, constituintes que proporcionam benefícios a saúde humana.

REFERENCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS - AACC. **Approved methods of the AACC**. 8. ed. Saint Paul, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 15.ed. Washington: AOAC, 2006.

BUSTOS, M. C., PEREZ, G. T., LEÓN, A. E. **Combination of resistant starches types II and IV with minimal amounts of oat bran yields good quality, low glycaemic index pasta**. International Journal of Food Science & Technology, 48(2), 309-315, 2013.

CÁRDENAS-HERNÁNDEZ, A., BETA, T., LOARCA-PIÑA, G., CASTAÑO-TOSTADO, E., NIETO-BARRERA, J. O., MENDOZA, S. **Improved functional properties of pasta: Enrichment with amaranth seed flour and dried amaranth leaves**. Journal of Cereal Science, 72, 84-90, 2016.

DEL BEM, M. S., POLES, L. F., SARMENTO, S. B. S., & ANJOS, C. **Physicochemical and sensory properties of pasta prepared with legume flours hydrothermally treated**. Alimentos e Nutrição Araraquara, 23(1), 101-110, 2012.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2.ed. Brasília-DF, Informação Tecnológica, 628p, 2009.

FARZANA, T., MOHAJAN, S. **Effect of incorporation of soy flour to wheat flour on nutritional and sensory quality of biscuits fortified with mushroom**. Food science & nutrition, 3(5), 363-369, 2015.

FEITOZA, J. V. F., DA SILVA NOGUEIRA, L. P., LIMA, A. L. P., SILVA, G. A. S., CAVALCANTI, M. T. **Elaboração de massa alimentícia fresca enriquecida com farinha de arroz castanho integral orgânico.** Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, 4(1), 2015.

FONSECA, T. R. B., DE AMORIM SILVA, T., ALECRIM, M. M., DA CRUZ FILHO, R. F., TEIXEIRA, M. F. S. **Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil.** African Journal of Microbiology Research, 9(30), 1814-1822, 2015.

HUMMEL, C. **Macaroni products: manufacture, processing and packing.** London: Food Trade, 1966. 287p.

KHAN, I., YOUSIF, A. M., JOHNSON, S. K., GAMLATH, S. **Effect of sorghum flour addition on in vitro starch digestibility, cooking quality, and consumer acceptability of durum wheat pasta.** Journal of food science, 79(8), 2014

KAHLON, T. S., CHIU, M. C. M. **Teff, buckwheat, quinoa and amaranth: Ancient whole grain gluten-free egg-free pasta.** Food and Nutrition Sciences, 6(15), 1460, 2015.

LU, X., BRENNAN, M. A., SERVENTI, L., MASON, S., BRENNAN, C. S. **How the inclusion of mushroom powder can affect the physicochemical characteristics of pasta.** International Journal of Food Science & Technology, 51(11), 2433-2439, 2016.

MARTÍNEZ, M. L., MARÍN, M. A., GILL, R. D., PENCI, M. C., RIBOTTA, P. D. **Effect of defatted almond flour on cooking, chemical and sensorial properties of gluten-free fresh pasta.** International Journal of Food Science & Technology, 52(10), 2148-2155, 2017.

MENGA, V., AMATO, M., PHILLIPS, T. D., ANGELINO, D., MORREALE, F., FARES, C. **Gluten-free pasta incorporating chia (*Salvia hispanica* L.) as thickening agent: An approach to naturally improve the nutritional profile and the in vitro carbohydrate digestibility.** Food chemistry, 221, 1954-1961, 2017.

MINGUITA, A. P. D. S., CARVALHO, J. L. V. D., OLIVEIRA, E. M. M., GALDEANO, M. C. **Production and characterization of pasta from biofortified foods: wheat flour, polished rice flour and whole bean flour.** Ciência Rural, 45(10), 1895-1901, 2015.

ORMENESE, R. D. C. S., CHANG, Y. K. **Massas alimentícias de arroz: uma revisão.** Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, 20(2), 2002.

ROCHA, D. D. C., Pereira Júnior, G. A., VIEIRA, G., PANTOJA, L., SANTOS, A. D. PINTO, N. A. V. D. **Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado.** Alimentos e Nutrição Araraquara, 19(4), 459-465, 2009.

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

SILVA, E. M. M., ASCHERI, J. L. R., ASCHERI, D. P. R. **Quality assessment of gluten-free pasta prepared with a brown rice and corn meal blend via thermoplastic extrusion.** LWT-Food Science and Technology, 68, 698-706, 2016.

SOBOTA, A., RZEDZICKI, Z., ZARZYCKI, P., KUZAWIŃSKA, E. **Application of common wheat bran for the industrial production of high-fibre pasta.** International Journal of Food Science & Technology, 50(1), 111-119, 2015.

TOMICKI, L., RIGO, A. A., DURIGON, A., GUTKOSKI, L. C., ZENI, J., VALDUGA, E., ... & TONIAZZO, G. **Elaboração e avaliação da qualidade de macarrão isento de glúten.** Ciência Rural, 45(7), 1311-1318, 2015.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos conclui-se que:

- Entre os bioprodutos elaborados, o selecionado foi o tubérculo de *Dioscorea alata* miceliado por *Pleurotus ostreatoroseus* em função do conteúdo significativo de proteases que expressaram atividade ótima a 40 °C, pH 7,0 com maior estabilidade a 50 °C, pH 8,0;
- As proteases extraídas do tubérculo de *Dioscorea alata* miceliado por *Pleurotus ostreatoroseus*, nas condições experimentais, os dados sugeriram a presença predominante de cisteína proteases e serina protease;
- A inclusão de *P. ostreatoroseus* no tubérculo de *D.alata* originou um bioproducto não tóxico, com características tecnológicas e acrescido de conteúdo nutricional, com valores significativos de proteínas e fibras, características que viabiliza o uso para fortificação de massas alimentícias;
- Como ingrediente de massa alimentícias do tipo capeletti, o bioproducto em diferentes concentrações, proporcionou a fortificação do produto final com proteínas, fibras e minerais, representando uma inovação na indústria de alimentos;
- Tanto o bioproducto como as massas alimentícias do tipo capeletti tem qualidade microbiológica e nutricional para consumo humano.