



CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO
ALIMENTÍCIO ADICIONADO DE *Pleurotus albidus*

ADRYA DA SILVA FIGUEIREDO

MANAUS
JULHO-2017

ADRYA DA SILVA FIGUEIREDO

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO
ALIMENTICÍO ADICIONADO DE *Pleurotus albidus*

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

Orientadora: Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS
JULHO-2017

Ficha Catalográfica

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

F475c Figueiredo, Adrya da Silva
Caracterização Nutricional e Desenvolvimento de Produto
Alimentício Adicionado de *Pleurotus albidus* / Adrya da Silva
Figueiredo. 2017
115 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Cogumelos. 2. Fermentação. 3. Alimentos. 4. Biotecnologia. 5.
Enzima. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Ao meu filho amado Grigórios e aos meus queridos pais Manoel e Telma, dedico-lhes esta conquista como gratidão por todo carinho, apoio e compreensão demonstrados.

AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora Dra. Maria Francisca Simas Teixeira, por ser um exemplo de dedicação a ciência e por compartilhar seus ensinamentos profissionais e pessoais que fizeram de mim uma pessoa melhor.

A todos os colegas de laboratório, Salomão, Ritinha, Mircella, Taciana, Lorisa e Larissa. Muito obrigada por toda ajuda, amizade e pelos momentos divertidos compartilhados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Federal do Amazonas (UFAM). Obrigada por abrir as portas para a realização da análise antioxidante e citotoxicidade em célula.

Ao professor José Rego, por auxiliar na realização das análise de textura, no laboratório de Instrumentação para produtos agroindustriais da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Ao Dr. 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.

Aos docentes e discentes do Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, e a todos que de alguma forma contribuíram nessa jornada.

Muito obrigada!

RESUMO

O gênero *Pleurotus* pertence à ordem Agaricales, família Pleurotaceae e constitui um grupo de cogumelos cosmopolitas, encontrados em regiões de clima temperado. Os *Pleurotus* possuem um grande número de espécies comestíveis que crescem em diferentes condições de substratos, considerados de fácil produção e com pouco investimento, utilizando matérias-primas baratas e facilmente disponíveis como, palha, capim e bagaço. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e as propriedades nutricionais de *P. albidus* para fortificar produto de panificação do tipo massa alimentícia e avaliar o efeito de diferentes combinações da biomassa desidratada do cogumelo sobre a qualidade nutricional das massas elaboradas. Os resultados mostraram que *P. albidus* cresceu e excretou proteases em todos os substratos testados, exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum) e semente de açaí (*Euterpe oleracea*), suplementados com farelo de arroz (*Oryza sativa*) e crueira (resíduo grosseiro da *Manihot esculenta*), apresentando valores significativos para as misturas suplementadas com farelo de arroz. O padrão proteolítico das enzimas em extrato bruto usando inibidores indica ser cisteína e metaloprotease, pH 6,0 e temperatura ótima 40 e 50 °C. As enzimas mantiveram estáveis entre 60 a 90 minutos nas temperaturas de 30 a 50 °C. A biomassa não apresentou toxicidade nos testes de hemólise em sangue comercial de carneiro e na avaliação citotóxica em célula de fibroblasto humano. Mostrou capacidade antioxidante em DPPH (68,47 µg/ml), radical ABTS (93,99 µg/mL), fenóis totais (79,9 mgEq/g) e flavonoides (14,8 mgEq/g). Na qualidade nutricional, a biomassa apresentou teor de carboidratos totais de 60,3%, 36,3% de proteínas, 2,7% de fibra bruta, 0,8% de cinzas, 0,4% de lipídios e 376,3 Kcal. O potássio foi o macromineral mais abundante, seguido de fósforo, enxofre, magnésio, e cálcio com 21,08 g.Kg⁻¹, 10,31 g.Kg⁻¹, 2,08 g.Kg⁻¹, 1,33 g.Kg⁻¹ e 0,26 g.Kg⁻¹, respectivamente. Já entre os microminerais o ferro (131,85 mg.Kg⁻¹) e zinco (95,78 mg.Kg⁻¹) estão em maior quantidade, seguido do boro, sódio, manganês e cobre, 39,48 mg.Kg⁻¹, 33,04 mg.Kg⁻¹, 7,27 mg.Kg⁻¹, e 2,0 mg.Kg⁻¹, respectivamente. Na avaliação da qualidade microbiológica os macarrões elaborados com a biomassa de *P. albidus* foram consideradas seguras para consumo humano. A adição da biomassa elevou o teor de minerais e apresentou um aumento de 53% e 64% de proteínas e fibras, respectivamente, as massas demonstraram qualidade no teste de cozimento e textura, mostrando que a adição de *P. albidus* tem potencial para o desenvolvimento de produto alimentício com qualidades nutricionais.

Palavras-chave: *Pleurotus albidus*, enzima, composição nutricional, macarrão.

ABSTRACT

The genus *Pleurotus* (Fr.) Quél belongs to the order Agaricales, family Pleurotaceae and constitutes a group of cosmopolitan mushrooms, found in regions of temperate climate. *Pleurotus* has a large number of edible species that grow in different substrates. They are considered to be easy to grow fast and with low costs using inexpensive and available raw materials such as straw, grass and bagasse. The aim of this study was to evaluate the production and nutritional properties of *P. albidus* to supplement a pasta and evaluating the nutritional quality of different combinations of its dehydrated biomass on the final product. The results showed that *P. albidus* grew and excreted proteases in all tested substrates: cupuaçu exocarp (*Theobroma grandiflorum*, Schum) and açai seed (*Euterpe oleracea*), supplemented with rice bran (*Oryza sativa*) and crueira (residue of *Manihot esculenta*). The substrates supplemented with rice bran showed significant values of proteolytic activity than the ones supplemented with crueira. The enzymes showed optimum activity at pH 6.0, 40 °C and 50 °C and they were characterized as being cysteine and metalloprotease. The crude extract was not toxic in the hemolysis and human fibroblast cells test. It showed antioxidant capacity in DPPH (68.47 µg / ml), ABTS radical (93.99 µg / mL), total phenols (79.9 mgEq / g) and flavonoids (14.8 mgEq / g). In the nutritional quality, the biomass presented total carbohydrate content of 60.3%, 36.3% of protein, 2.7% of crude fiber, 0.8% of ash, 0.4% of lipids and 376.3 Kcal. Potassium was the most abundant macromineral, followed by phosphorus, sulfur, magnesium, and calcium with 21.08 g.Kg⁻¹, 10.31 g.Kg⁻¹, 2.08 g.Kg⁻¹, 1.33 g .Kg⁻¹ and 0.26 g.Kg⁻¹, respectively. Among the microminerals, iron (131.85 mg.Kg⁻¹) and zinc (95.78 mg.Kg⁻¹) were higher, followed by boron, sodium, manganese and copper with 39.48 mg.Kg⁻¹, 33.04 mg.Kg⁻¹, 7.27 mg.Kg⁻¹, and 2.0 mg.Kg⁻¹, respectively. In the evaluation of the microbiological quality the noodle produced and supplemented with *P. albidus* biomass were considered safe for human consumption. The addition of mushroom biomass increased proteins, fibers and mineral content. The noodle also showed quality in the cooking test and texture. According to the results, the addition of *P. albidus* has potential for development of food products with nutritional qualities.

Keyword: *Pleurotus albidus*, enzyme, nutritional composition, pasta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA	17
Figura 1. Características morfológicas de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado em exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz.....	18
Figura 2. <i>Pleurotus albidus</i> DPUA 1692: (A) Basidiomas (haste e píleo) cultivados em exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz (2:1, p/p); (B) Aspecto morfológico das lamelas	19
 CAPÍTULO III: METODOLOGIA.....	 41
Figura 1. Fluxograma da fermentação semi-sólida e determinação da atividade proteolítica.....	45
Figura 2. Fluxograma da produção dos basidiomas de <i>Pleurotus albidus</i>	50
Figura 3. Fluxograma da formulação das massas alimentícias fortificadas com <i>Pleurotus albidus</i>	54
 CAPÍTULO IV: ARTIGO I.....	 61
Figura 1. Média da atividade de protease produzida por <i>Pleurotus albidus</i> em substratos agroindustriais durante 15 dias por fermentação semi-sólida. Meios: SA (semente de açaí); CC (exocarpo de cupuaçu); SA+CC [semente de açaí+exocarpo cupuaçu (2:1 p/p)]; CC+SA [exocarpo cupuaçu+semente de açaí (2:1 p/p)], suplementados com farelo de arroz (FA) e crueira (CRU).....	68
Figura 2. pH (A) e temperatura °C (B) ótima de protease de <i>P. albidus</i> produzidas por FSS em SA+CC+FA (semente de açaí+exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz).....	70
Figura 3. Estabilidade do pH (A) e temperatura °C (B) de protease produzida por <i>Pleurotus albidus</i> em SA+CC+FA (semente de açaí+exocarpo de cupuaçu+farelo de arroz).....	71
 CAPÍTULO V: ARTIGO II.....	 78
Figura 1. A. Macarrão padrão; B. Macarrão fortificado com 15% de biomassa de cogumelo; C. Macarrão fortificado com 25% de biomassa de cogumelo.....	95
Figura 2. Gráfico ternário da relação entre as propriedades mecânicas do macarrão padrão (MP) com os macarrões acrescidos de biomassa de cogumelo a 15% (M15) e 25% (M25).....	102
Figura 3. Efeito do <i>Pleurotus albidus</i> após 72h de tratamento em cultura de MRC5 pelo método de Alamar Blue™.....	104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III: METODOLOGIA	41
Tabela 1. Substratos utilizados para fermentação de <i>Pleurotus albidus</i> : Substrato base (SA = semente de açaí, CC = exocarpo de cupuaçu) e Substrato suplementar (FA = farelo de arroz, CRU= crueira).....	43
Tabela 2. Ingredientes e proporções usadas nas formulações de macarrão contendo biomassa de <i>Pleurotus albidus</i>	51
 CAPÍTULO IV: ARTIGO I.....	 61
Tabela 1. Substratos utilizados para fermentação de <i>Pleurotus albidus</i> : Substrato base (SA = semente de açaí, CC = exocarpo de cupuaçu) e Substrato suplementar (FA = farelo de arroz, CRU= crueira).....	65
Tabela 2. Efeito dos inibidores e íons na atividade enzimática de <i>Pleurotus albidus</i>	73
 CAPÍTULO V: ARTIGO II.....	 78
Tabela 1. Média da composição centesimal dos basidiomas de <i>Pleurotus albidus</i> DPUA 1692...	89
Tabela 2. Minerais dos basidiomas de <i>P. albidus</i> DPUA 1692, cultivado em resíduos da agroindústria amazônica.....	90
Tabela 3. Conteúdo de fenóis totais e flavonóides de extratos de <i>Pleurotus albidus</i>	92
Tabela 4. Conteúdo de fenóis totais e flavonóides de extratos de <i>Pleurotus albidus</i>	93
Tabela 5. Composição centesimal do macarrão contendo biomassa de cogumelo 15 e 25% (p/p) e o macarrão padrão.....	96
Tabela 6. Determinação de macro e microminerais das amostras de macarrão padrão e teste.....	98
Tabela 7. Análise do pH e atividade de água de macarrão padrão e teste.....	99
Tabela 8. Características relacionadas com a cocção dos macarrões padrão e adicionadas de biomassa de cogumelo.....	101
Tabela 9. Atividade hemolítica do extrato bruto da biomassa de <i>Pleurotus albidus</i> em sangue de carneiro comercial.....	103

LISTA QUADRO

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA.....	17
Quadro 1. Características morfológicas de <i>Pleurotus albidus</i>	20
Quadro 2. Conteúdo nutricional de espécies do gênero <i>Pleurotus</i>	21
Quadro 3. Propiedades antioxidantes de <i>Pleurotus</i> spp.....	22
Quadro 4. Produtos alimentícios suplementados com biomassa de cogumelos comestíveis.....	24
Quadro 5. Massas alimentícias fortificadas com matérias-primas alternativas.....	26

LISTA DE ABREVIACÕES

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

AACC - *American Association of Cereal Chemists*

Abs – Absorvância

ABTS - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância em Saúde

a_w – Atividade de água

B - Boro

BDA - Ágar Batata Dextrose

C/N – Relação carbono e nitrogênio

Ca - Cálcio

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CC – Exocarpo de cupuaçu

CI₅₀ - Concentração inibitória de 50%

cm – Centímetros

CO₂ - Dióxido de carbono

CRU - Crueira

Cu - Cobre

CuSO₄ - Sulfato de cobre

DMSO – Dimetilsulfoxido

DPPH - 1,1-diphenyl -2-picrylhydrazyl

DPUA – Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EAA - Absorção atômica

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

Eq - Quercetina

FA – Farelo de arroz

Fe - Ferro

FeSO₄ - Sulfato ferroso

FSS – Fermentação semi-sólida

g - Gramas

h - Hora

HM – Absorvância da hemólise

HNO₃ - Ácido nítrico

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HT - Absorvância

K – Potássio

Kcal – Valor energético

KCl - Cloreto de potássio

Kg – Quilograma

La₂O₃ - Óxido de lantânio

M – mol

M15 – Macarrão com 15% de biomassa de cogumelo

M25 - Macarrão com 25% de biomassa de cogumelo

mg - Miligrama

Mg – Magnésio

Min - Minutos

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

Mn – Manganês

MP – Macarrão padrão

MRC5 - Linhagens de células de fibroblastos humanos

Na - Sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

nm – Nanômetros

P – Potássio

p/p – peso/peso

p/v – peso/volume

PA - peso da amostra

pH – potencial hidrogeniônico

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil

PR - peso do resíduo evaporado

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

rpm – rotações por minuto

S - Enxofre

S.S - Sólidos solúveis perdidos (%)

SA – Semente de açaí

SFB - Soro Fetal Bovino

TCA - ácido tricloroacético

Tris-HCl - trisaminometano de ácido clorídrico

U/mL – Unidade por mililitro

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

US\$ - Moeda Dolar

Va - Volume da alíquota

Vc - Volume da água de cozimento

YE – Extrato de levedura

Zn - Zinco

ZnSO₄ - Sulfato de zinco

°C – Graus Celsius

µg - Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
<u>Capítulo I: Revisão de Literatura</u>	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Gênero <i>Pleurotus</i>	18
2.2 Importância nutricional e ação biológica dos cogumelos.....	20
2.3 Produtos incorporados de cogumelos.....	23
Conclusão.....	26
Referencias.....	27
<u>Capítulo II: Objetivos</u>	39
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
<u>Capítulo III: Metodologia</u>	41
4. METODOLOGIA.....	42
4.1 Cultivo e manutenção do cogumelo.....	42
4.2 Fermentação semi-sólido.....	42
4.3 Extração das enzimas.....	43
4.3.1 Atividade proteolítica.....	43
4.3.2 Determinação do efeito do pH e da temperatura e estabilidade da enzima.....	44
4.3.3 Efeito de inibidores de protease e iões metálicos sobre a atividade enzimática.....	44
4.4 Produção de basidiomas em resíduo agroindustrial.....	46
4.4.1. Preparação do spawn.....	46
4.4.2 Produção de basidiomas.....	46
4.5 Determinação da capacidade antioxidante.....	47
4.5.1 Preparo das amostras.....	47
4.5.2 Teor de fenólicos totais.....	47

4.5.3 Teor de flavonoides totais.....	48
4.5.4 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	48
4.5.5 Atividade sequestrante do radical ABTS.....	49
4.6 Formulação das massas alimentícias tipo macarrão.....	51
4.6.1 Matérias-primas e elaboração do macarrão.....	51
4.6.2 Determinação da propriedade de cozimento do macarrão.....	52
4.6.3 Textura do produto cozido.....	53
4.7 Análise da composição da biomassa de <i>P. albidus</i> e massas alimentícias.....	55
4.8 Composição mineral dos basidiomas de <i>P. albidus</i> e massas alimentícias.....	56
4.9 Análise microbiológica das massas alimentícias.....	57
4.10 Teste de Toxicidade.....	57
4.10.1 Ação citotóxica do extrato proteolítico em sangue comercial de carneiro.....	57
4.10.2 Citotoxicidade em célula.....	57
4.11 Análises estatísticas.....	58
Referencias.....	59
 <u>Capítulo IV:Artigo I</u>	61
Artigo I: PROTEASES COM PROPRIEDADES INDUSTRIAIS DE UMA ESPÉCIE DE... COGUMELO SELVAGEM DA AMAZÔNIA.....	62
 <u>Capítulo V: Artigo II</u>	78
Artigo 2: QUALIDADE NUTRICIONAL DO MACARRÃO FORTIFICADO COM BIOMASSA DE COGUMELO COMESTIVEL.....	79
 <u>Capítulo VI: Propriedade Intelectual</u>	113
Patente: MACARRÃO ELABORADO COM BIOMASSA DE COGUMELO COMESTIVEL, PRODUTO DE PANIFICAÇÃO SEM GLÚTEN.....	114
 CONCLUSÃO	115

1. INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis são produtos de fácil cultivo e comercialização, característica que contribui para o sucesso da produção em muitas regiões, além das condições climáticas, tempo de crescimento e investimento reduzido. Aproximadamente 300 espécies de cogumelos são comestíveis, todavia 30 foram domesticados e 10 são mundialmente cultivados e comercializados. (ROSMIZA et al., 2016).

Entre os cogumelos produzidos em grande escala, espécies de *Pleurotus* já estão classificadas como o segundo cogumelo mais popular, anualmente a produção atinge valores superiores a 900 mil toneladas (14,2% da produção mundial total de cogumelos) (BELLETTINI et al., 2016; THONGKLANG e LUANGHARN, 2016).

Em termos de propriedade nutricional, os cogumelos são alimentos comprovadamente fontes de proteína, carboidrato, fibra, vitaminas, minerais e compostos bioativos. Diferente de outros alimentos ricos em proteínas, os cogumelos comestíveis são cultivados em vários substratos lignocelulósicos por sintetizarem amplos complexos enzimáticos que são capazes de degradar compostos orgânicos complexos em resíduos biológicos (ROSLI et al., 2011; YANG et al., 2016)

Espécies de cogumelos são comumente utilizadas não só para degradação de resíduos orgânicos, mas também como matéria prima ou como fonte de ácidos graxos insaturados, compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides, bioativos que promovem a saúde e o bem estar do homem (PAUCAR-MENACHO et al 2008; REIS et al., 2012). *Pleurotus albidus* é uma espécie promissora para produção de biomassa, de importância nutricional e medicinal, tem distribuição nas regiões subtropicais e temperadas (Brasil, Argentina e México), cresce praticamente em todas as estações do ano (GARCIA et al., 2014).

Na indústria de produtos alimentícios, cogumelos comestíveis que tem sabor agradável e propriedades farmacológicas são continuamente usados para fins gastronômicos na elaboração produtos, como pães, biscoitos, sorvete, iogurte, entre outros (AHMAD e SINGH, 2016; AMARAL et al., 2014; SANTA et al. 2014 e CHAUHAN et al., 2017). Estratégia que contribui para utilização gradual dos cogumelos no desenvolvimento de produtos inovadores com melhores qualidades nutricionais e atributos funcionais (NAGY et al., 2017).

As massas alimentícias são de grande aceitação no mercado, mas têm elevado valor energético, reduzido teor de fibras, vitaminas, minerais e proteínas, qualidade que favorece a incorporação de biomassa de cogumelo, em substituição ao amido, para o enriquecimento proteico, fibra, além de contribuir para a melhoria da textura e sabor (TOMICKI et al., 2015).

Esta pesquisa teve como objetivo a produção de *Pleurotus albidus* para fortificar produto de panificação do tipo massas alimentícia e avaliar o efeito de diferentes combinações da massa micelial desidratada do cogumelo sobre a qualidade nutricional das massas elaboradas.

Capítulo I

Revisão de Literatura

Pleurotus: fontes renováveis de nutrientes e compostos bioativos com potencial gastronômico

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* (Fr.) Quél constitui um grupo de cogumelos cosmopolitas que crescem em resíduos agrícolas e/ou troncos de árvores em decomposição, são sapróbios, comumente encontrado em regiões de clima tropical e temperado (LECHNER e ALTERTÓ, 2011; WISBECK et al., 2016).

O crescimento de *Pleurotus* em substratos lignocelulósico ocorre devido à síntese do complexo enzimático que favorece a realização do ciclo biológico das diversas espécies do gênero. Estes macrofungos são denominados fungos de podridão branca porque degradam lignina, celulose e hemicelulose (ADEBAYO e CARRERA, 2015; ASGHER et al., 2016; DÍAZ-GODÍNEZ et al., 2016 e RASHID et al., 2016).

As principais características morfológicas desses cogumelos incluem basidiomas que se desenvolvem com aspecto semelhante a uma ostra (Figura 1), estipe geralmente lateral, lamelas decorrente e esporada branca (PUTZKE e PUTZKE, 2004).



Figura 1. Características morfológicas de *Pleurotus ostreatus* cultivado em exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz. Fonte: Herbário Micológico Jair Putzke (Universidade Federal do Amazonas-UFAM).

O gênero *Pleurotus* está classificado no Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Basidiomycetes, Ordem Agaricales, Família Pleurotaceae (CHANG e MILES, 2004). Ao lado de outras espécies, como *P. eryngii*, *P. pulmonarius*, *P. djamor*, *P. sajor-caju*, *P. cystidiosus*, *P. citrinopileatus* e *P. cornucópias* são representantes de fácil cultivo numa variedade de substratos lignocelulósicos, inclusive em escala comercial. Além disso, constituem um grupo de cogumelos comestíveis de valor econômico considerável, com propriedades gastronômicas, nutricionais e medicinais (BELLETTINI et al., 2016).

Nas últimas décadas, os cogumelos são cada vez mais reconhecidos como alimentos por seu importante papel na saúde humana, nutrição e como coadjuvante no tratamento de doenças por sintetizarem compostos com propriedades medicinais, a exemplo de antioxidantes, antimicrobianos, entre outros compostos com atividade biológica (RATHEE et al., 2012; RATHORE e SHARMA, 2017).

Sendo assim, várias pesquisas estão apontando a espécie *P. albidus* (Figura 2), originária da América do Sul, isolada na Argentina, no México e no Brasil, como um novo cogumelo com potencial alimentício e biotecnológico (LECHNER e ALTERTÓ, 2004; MORENO-FUENTES e BAUTISTA-NAVA, 2006; TEIXEIRA et al., 2009). *P. albidus* tem sabor agradável, o basidioma mede de 5,0 a 6,0 cm de altura e possui características morfológicas distintas, citadas no quadro 1 (LECHNER e ALTERTÓ, 2004; KUMARI e SAPAN, 2012).

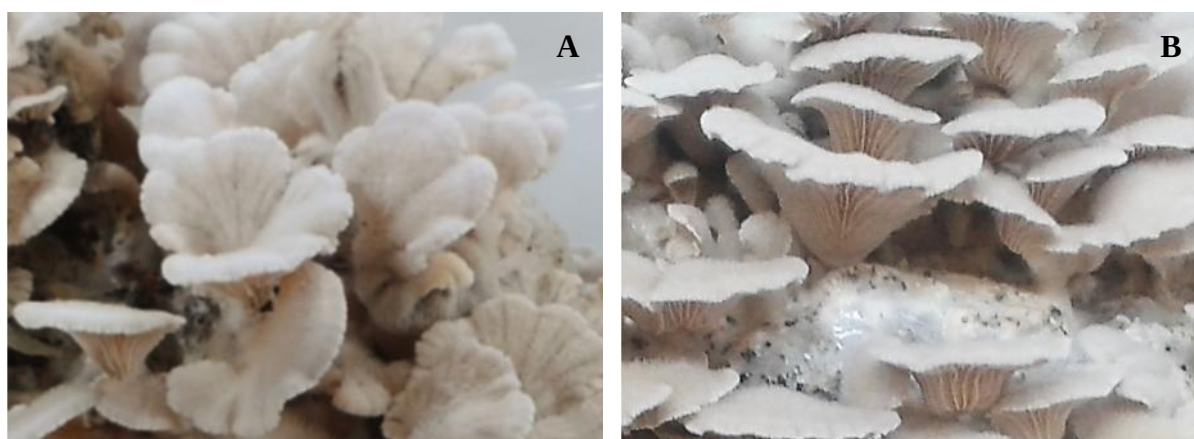


Figura 2. *Pleurotus albidus* DPUA 1692: (A) Basidiomas (haste e píleo) cultivados em exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz (2:1, p/p); (B) Aspecto morfológico das lamelas.

Em relação às características de *P. albidus*, dados da literatura mostram que isolados de diferentes regiões expressam características macro e microscópicas semelhantes, exceto a presença de microestruturas, como queilocistídios que foi observado por KUMARI e SAPAN (2012) e não citado por LECHNER e ALBERTÓ (2004) (Quadro 1).

Quadro 1. Características morfológicas de *Pleurotus albidus*.

Macro e microestruturas	Características
Píleo	5,0 a 8,0 cm de diâmetro, forma infundibuliforme e na maturidade se torna ciatiforme, coloração branca a branco acinzentado
Lamela	Decorrentes, bordas suaves
Esporada	Branca
Esporos	Cilíndricos, hialino, inamilóide, cinofílico, liso
Estipe	Excêntrico, reticulado, anel ausente
Basidio	Clavato-cilíndrico, tetrasporico
Queilocistídio	Subcapitado, cilíndrico, tubular longo derrubado, septado, muitas vezes com conexões de grampo
Hifas	Hifas tramais, estipe hifas de superfície paralelas em toda a medição. Conexões de grampo presentes ao longo

Fonte: Lechner e Alvertó, 2004; Kumari e Sapan, 2012.

Na avaliação da produtividade em resíduos lignocelulósicos utilizando *Pleurotus albidus*, *P. cistidiosus*, *P. dijamour*, *P. ostreatus*, *P. pulmonaris*, o elevado rendimento (82%) só foi determinado nos cultivos de *P. albidus*. A partir desses resultados, este cogumelo foi recomendado como uma nova espécie cultivável em nível comercial (LECHNER e ALBERTÓ, 2011). O crescimento dos cogumelos em substratos agrícolas depende de fatores genéticos, ambientais e nutricionais (FIGUEIRÊDO e DIAS, 2014). Dessa forma, o cultivo de *P. albidus* em resíduos lignocelulósicos viabiliza a produção de alimentos proteicos a redução de contaminantes ambientais, o custo de produção e desenvolvimentos de novos bioprodutos (SOUZA et al., 2015; SUBBIAH e BALAN, 2015).

2.2 Importância nutricional e ação biológica dos cogumelos

O aroma, sabor, valor nutricional e a textura dos cogumelos possuem características organolépticas singulares, fazendo com que, muitas vezes, sejam consumidos como parte

integrante de uma dieta equilibrada (LU et al., 2016; GAMBATO et al., 2016; AZEVEDO et al., 2017).

Considerado um alimento saudável para todas as faixas etárias, os cogumelos se destacam pelo quantitativo de proteína, reduzido teor de calorias e gordura. Comumente contém fibras dietéticas, ácido fólico e vitamina B-12 (AHMAD e SINGH, 2016) (Quadro 2).

Quadro 2. Conteúdo nutricional de espécies do gênero *Pleurotus*.

Espécie	Foto	Proteína	Fibra	Lipídio	Cinza	Carboidrato
<i>P. ostreatus</i>		27,23	24,53	2,37	6,76	36,74
<i>P. ostreatoroseus</i>		23,53	12,79	3,08	6,49	46,98
<i>P. djamor</i>		20,50	22,43	1,12	7,40	32,69
<i>P. eryngii</i>		1,21	-	0,16	0,68	8,95
<i>P. pulmonarius</i>		27,98	7,89	8,77	7,68	88,38
<i>P. sajor-caju</i>		25,24	26,28	2,47	9,08	37,22

Fonte: RAMPINELLI et al., 2010; REIS et al., 2012; ASHRAF et al., 2013; FONSECA et al., 2015; ADENIPEKUN e OMOLASO, 2015.

Atualmente cogumelos não só despertam interesse por seu valor nutricional, mas também por suas propriedades funcionais e enzimáticas. Muitas espécies são fontes de metabólitos bioativos, compostos que estão sendo usados na elaboração de fármacos e nutracêuticos. Entre os compostos de interesse industrial e medicinal estão os antimicrobianos, vitaminas, enzimas, polissacarídeos e compostos fenólicos (OBODAI et al., 2014).

Os antioxidantes presentes nos alimentos que ingerimos podem assumir um papel relevante como possíveis agentes protetores contra os radicais livres, reduzindo os danos causados pelo estresse oxidativo. Sendo os cogumelos um exemplo de uma boa fonte de compostos antioxidantes, pois, vários estudos tem demonstrado que estes possuem na sua constituição química compostos fenólicos, carotenóides, glicosídeos, ergotionina e ácido ascórbico (FERREIRA e ABREU, 2007; KHATUA et al., 2013; KOZARSKI et al., 2014 e SANCHEZ 2017). Um clássico exemplo de cogumelo fonte de antioxidantes são espécies do gênero *Pleurotus* (Quadro 3).

Quadro 3. Propriedades antioxidantes de *Pleurotus* spp.

Espécie de Cogumelo	Compostos antioxidantes	Referência
<i>P. albidus</i>	Fenóis Totais	GAMBATO et al. 2016
<i>P. cornucopiae</i>	Fenóis Totais	KOLAYLI et al., 2012
<i>P. cornucopiae</i>	Fenóis Totais	KOLAYLI et al., 2012
<i>P. cystidiosu</i>	Fenóis Totais Tocoferóis	YANG et al., 2002; SANCHEZ, 2017
<i>P. djamor</i> var. <i>djamor</i>	Fenóis Totais Flavonóides	ARBAAYAH et al., 2013
<i>P. djamor</i> var. <i>roseus</i>	Fenóis Totais Flavonóides	ARBAAYAH et al., 2013
<i>P. ostreatus</i>	Fenóis Totais, Flavonóides Tocoferóis	YANG et al., 2002; KELEŞ et al., 2011; KOLAYLI et al., 2012; ARBAAYAH et al., 2013; VAMANU, 2014; REZAEIAN et al., 2015 SANCHEZ, 2017
<i>P. pulmonarius</i>	Fenóis Totais Flavonóides	ARBAAYAH et al., 2013
<i>P. sajor-caju</i>	Fenóis Totais	PUTTARAJU et al., 2016
<i>Pleurotus</i> cf. <i>eryngii-Kerman</i>	Fenóis Totais Flavonóides	REZAEIAN et al., 2015
<i>Polyporus squamosus</i>	Tocoferóis	ELMASTAS et al., 2007

Entre as enzimas produzidas, as peptidases ou proteases ocupam o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas de origem microbianas e são utilizadas em diversos processos industriais (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003; ORLANDELLI et al., 2012). *Agaricus bisporus*, *Armillariella mellea*, *Flammulina velutipes*, *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, são citados como produtores de peptidases (INÁCIO et al., 2015; VISHVAKARMA e MISHRA, 2017; e YOSHIMI et al., 2017).

Proteases desempenham papel importante na indústria de alimentos, nos diversos processos, atuam como agentes modificadores do produto final, melhorando o sabor, a textura e aparência. Comumente são utilizadas na fabricação de queijo, na clarificação de bebidas, no amolecimento de carne e em produtos de panificação (INÁCIO et al., 2015). Apesar do reconhecimento dos cogumelos como ferramentas peculiares em processos biotecnológicos, muitas características desses fungos ainda são pouco exploradas.

2.3 Produtos incorporados de cogumelos

Cogumelos comestíveis são produtos renováveis utilizados como suplemento alimentar devido aos seus constituintes nutricionais (proteínas, minerais e vitaminas) e compostos com atividades biológicas sintetizados por diversas espécies (FARZANA e MOHAJAN, 2015). Com base nessas características, produtos alimentícios saudáveis estão sendo desenvolvidos, como pães, biscoitos, bolos, massas, entre outros (CEITA et al., 2009; DESAYI, 2012; IBRAHIUM e HEGAZY, 2014) (Quadro 4).

Quadro 4. Produtos alimentícios suplementados com biomassa de cogumelos comestíveis.

Espécie Cogumelo	Produto Fortificado	Referencia
<i>Agaricus bisporus</i>	Massa; Salsicha; Pão; Nuggets	LU et al., 2016; NAGY et al., 2017; AHMAD e SINGH, 2016; SHARMA et al., 2015
<i>Agaricus blazei</i>	Linguiça suína; Chocolate branco; Óleo vegetal; Café do tipo cappuccino	STEFANELLO et al., 2015; SANDRI et al., 2012; SILVA et al., 2009; RIELLA et al., 2011 (PATENTE)
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Iogurte; Molho de tomate; Sorvete	AMARAL et al., 2014; MONTEIRO et al., 2011; SANTA et al., 2014 (PATENTE)
<i>Boletus edulis</i>	Massa	LU et al., 2016
<i>Hypsizygus tessellatus</i>	Biscoito Biscoito Salgado	CHAUHAN et al., 2017
<i>Lentinus spp.</i>	Produto de confeitaria	TEIXEIRA et al., 2016 (PATENTE)
<i>Lentinus citrinus</i>	Bioprodutos com exocarpo de abacaxi	SOUZA et al., 2016
<i>Lentinus edodes</i>	Hambúrguer sem glúten; Iorgute; Massa	FRANKE et al., 2016; HASSAN et al., 2014; LU et al., 2016
<i>Pleurotus spp.</i>	Farinha do bagaço de uva e maça	PAZ 2008
<i>Pleurotus albidus</i>	Ração de peixe; Bioprodutos com exocarpo de abacaxi	SARTORI et al., 2015; SOUZA et al., 2016
<i>Pleurotus flabellatus</i>	Ração de peixe	SARTORI et al., 2015
<i>Pleurotus florida</i>	Bioprodutos com exocarpo de abacaxi	SOUZA et al., 2016
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Farinha enriquecida com ferro; Biscoito; Cereal; Ração de peixe	CONDÉ et al., 2017; FARZANA e MOHAJAN, 2015; REGULA et al., 2016; SARTORI et al., 2015
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Patty de galinha; Tempero Herbal; Ração de peixe	ROSLI et al., 2011; SAIFUL e ROSLI 2016; SARTORI et al., 2015
<i>Terfezia claveryi</i>	Biscoito	GADALLAH e ASHOUSH, 2016

Produtos de panificação são incorporados com diferentes ingredientes ricos nutricionalmente para sua diversificação. O enriquecimento com proteína pode ser obtido adicionando cogumelo que tem expressivo teor proteico (24-35%) e fibras dietéticas. Portanto, o desenvolvimento e o consumo de produtos de panificação incorporados de cogumelos comestíveis contribuem para melhoria do estado nutricional da população (POLIZER et al. 2015). Massas alimentícias também podem ser incorporadas com cogumelos na forma de farinha, porém os dados acerca do enriquecimento desses produtos são escassos.

A RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005 da ANVISA define como massas alimentícias, produtos desenvolvidos com farinha de trigo (*Triticum aestivum* L.), com outras espécies do gênero *Triticum*, ou derivados de trigo durum (*Triticum durum* L.) ou derivados de outros cereais, leguminosas, além de raízes ou tubérculos, resultantes do processo de empasto e amassamento mecânico, sem fermentação. Aquelas elaboradas a partir da substituição parcial dos derivados de trigo por outros materiais amiláceos são denominadas massas mistas (BRASIL, 2005).

Massas são alimentos produzidos com tecnologia simples, de baixo custo, com vida de prateleira relativamente longa. Além disso, tem fácil preparo e estão disponíveis nos mais variados formatos, tamanhos e cores. Do ponto de vista nutricional são ricas em amido e baixo teor de gordura, podendo ser enriquecidas com vitaminas e minerais (SPANHOLI e OLIVEIRA, 2009)

O consumo *per capita* anual de massas alimentícias no Brasil em 2016 foi de 6,2 Kg/ano. A preferência do consumidor são as massas secas com consumo de 4,96 Kg no ano de 2015, seguidos de massas instantâneas e frescas com consumo de 0,97 Kg e 0,23 Kg, respectivamente. O Brasil é o sexto país com o maior índice de venda de massas alimentícias, com registro 2.139,90 U\$ milhões de venda em 2016 (ABIMAPI, 2017).

Na quadro 5 está descrito massas alimentícias fortificadas com matérias primas alternativas das mais variadas fontes. A busca por novos produtos com um maior aporte nutricional é uma realidade do mercado mundial, assim como as massas alimentícias, outros produtos também estão sendo elaborados com uso de ingredientes alternativos, como por exemplo, o uso de cogumelos comestíveis em produtos de confeitarias, chocolate e iogurte, entre outros (Sandri et al., 2012; Amaral et al., 2014 e Teixeira et al., 2016).

Quadro 5. Massas alimentícias fortificadas com matérias-primas alternativas.

Ano	Autor	Pesquisas
2000	SILVEIRA et al.	Massa alimentícia seca, em que o plasma bovino foi utilizado como substituto dos ovos.
2003	ORMENESE e CHANG	Macarrão de Arroz
2006	MENEGASSI e LEONEL	Massa mista de mandioquinha-salsa
2008	PAUCAR-MENACHO et al.	Massa alimentícia fresca funcional à base de farinha de trigo pela incorporação de Isolado Proteico de Soja e de Polidextrose, utilizando páprica como corante.
2010	MALUF et al.	Massa de macarrão adicionada de carne de pescado
2013	SCHMIELE et al.	Massa alimentícia sem glúten com farinha de arroz, farinha de arroz pré-gelatinizada, isolado proteico de soja e albumina de ovo modificada e desidratada.
2014	FOGAGNOLI e SERAVALL	Massa alimentícia fresca com farinha de exocarpo de maracujá
2014	SILVA e BASTO	Massa alimentícia de macarrão isenta de glúten enriquecida com farinha da semente de abacate e farinha de arroz
2015	MINGUITA et al.	Massas alimentícias a base de matérias-primas biofortificadas.
2016	MEDEIROS et al.	Macarrão Instantâneo com farinha de maçã e adição de cafeína e taurina
2016	PEREIRA et al.	Massa fresca alimentícia rica em ômega 3

Conclusão

As publicações consultadas revelaram que os cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*, incluindo *Pleurotus albidus*, tem expressivo teor de proteína, fibra e minerais. Diversos representantes desse gênero sintetizam compostos que são potenciais antioxidantes e excretores de enzimas industriais. Tais propriedades estão estimulando o interesse para inserção dos cogumelos na alimentação e os compostos bioativos como aditivo numa diversidade de produtos gastronômicos, a exemplo das massas alimentícias. Por fim, os *Pleurotus* representam uma alternativa viável para enriquecimento nutricional na elaboração de novos produtos com propriedades funcionais benéficas a saúde do homem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMAPI - Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados. Disponível em: < <https://www.abimapi.com.br/estatistica-massas.php>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

ADEBAYO, E.A.; MARTINEZ-CARRERA, D. Oyster mushroom (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. **African Journal of Biotechnonology**, v.14, n.1, p. 52-67, 2015.

ADENIPEKUN, C. O.; OMOLASO, P. O. Comparative Study on Cultivation, Yield Performance and Proximate Composition of *Pleurotus pulmonarius* Fries.(Quelet) on Rice Straw and Banana Leaves. **World J. Agric. Sci**, v. 11, n. 3, p. 151-158, 2015.

AHMAD, K.; SINGH, N. Evaluation of nutritional quality of developed functional bread fortified with mushroom and dates. **The Clarion**, 5(1):23-28, 2016.

AMARAL, A. C. C., DA SILVA PIRES, C. L., KEIBER, M., BATISTA, M. G., DALLA SANTA, H. S., NOVELLO, D. Características físico-químicas e sensoriais de iogurte adicionado de micélio de cogumelo *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo submerso em bagaço de uva. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.12, n.2, p. 1050-1062, 2014.

ARBAAYAH, H. H., UMI, K.Y. Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. **Mycosphere**, v.4, p. 661–673, 2013. Doi 10.5943/mycosphere/4/4/2

ASGHER, M., WAHAB, A., BILAL, M., IQBAL, H. M. N. Lignocellulose degradation and production of lignin modifying enzymes by *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 195-201, 2016.

ASHRAF, J., ALI, M. A., AHMAD, W., AYYUB, C. M., SHAFI, J. Effect of different substrate supplements on Oyster Mushroom (*Pleurotus* spp.) Production. **Food Science and Technology**, v. 1, n.3, p. 44-51, 2013.

AZEVEDO, S., CUNHA, L. M., OLIVEIRA, J. C., Mahajan, P. V., e FONSECA, S. C. Modelling the influence of time, temperature and relative humidity conditions on the mass loss rate of fresh oyster mushrooms. **Journal of Food Engineering**. 2017

BELLETTINI, M. B., FIORDA, F. A., MAIEVES, H. A., TEIXEIRA, G. L., ÁVILA, S., HORNUNG, P. S., MACARI-JUNIOR, A., RIBANI, R. H. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>

BRASIL, 2005. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - **RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.

CEITA, G. O., UETANABARO, A. P. T., KAMIDA, H. M. Emprego de substratos convencionais e alternativos para produção de cogumelos comestíveis: uma breve revisão. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.9, n. 1, p. 52-6, 2009.

CHANG, S. T., MILES, P. G. **Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact**. 2 ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2004, p. 451.

CHAUHAN, G.; PRASAD, S.; RATHORE, H., SHARMA, S. Nutritional profile and value addition of products from *Hypsizygus tessellatus*. **Food Biology**, v. 6, p. 1-6, 2017.

CONDÉ, V. F., OLIVEIRA, J. E. Z., OLIVEIRA, D. M. F. Farinha de cogumelo *Pleurotus ostreatus* (hiratake) enriquecido em ferro. **Ciência e Natura**, v.39, n.1, p. 1, 2017.

DESAYI, D. Development and sensory evaluation of mushroom fortified noodles. **Int J Food Agri Vet Sci**, v.2, p. 187-189, 2012.

DÍAZ-GODÍNEZ, G.; TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; SÁNCHEZ, C. e DÍAZ, R. Characterization of the solid-state and liquid fermentation for the production of laccases of *Pleurotus ostreatus*. **World's largest Science, Technology & Medicine**, 2016. Doi <http://dx.doi.org/10.5772/64239>

ELMASTAS, M., ISILDAK, O., TURKEKUL, I., TEMUR, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.3, p. 337-345, 2007.

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**, v.3, n.5, p. 363–369, 2015.

FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; ABREU, R. M. V. Antioxidants in wild mushrooms. **Curr. Med. Chem**, v.16, p. 1543–1560, 2009.

FIGUEIRÊDO, V. R. D., DIAS, E. S. Buton mushroom cultivation in function of temperature. **Ciência Rural**, v. 44, n. 2, p. 241-246, 2014.

FOGAGNOLI, G., SERAVALLI, E. A. G. Aplicação de farinha de casca de maracujá em massa alimentícia fresca. **Campinas**, v. 17, n. 3, p. 204-212, 2014.

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

FRANKE, M., KRUMMEL, A., ROSA, V., GONÇALVES, W., AZEVEDO, M.L., MORAES, C.C. Avaliação físico-química de hambúrguer a base de cogumelo com derivados de arroz e sem glúten. **Capa**, v. 8, n. 2, 2016.

GADALLAH, M. G., ASHOUSH, I. S. Value Addition on Nutritional and Sensory Properties of Biscuit Using Desert Truffle (*Terfezia clavervyi*) Powder. **Food and Nutrition**, v.7, p. 1171-1181, 2016.

GAMBATO, G., TODESCATO, K., PAVÃO, E. M., SCORTEGAGNA, A., FONTANA, R. C., SALVADOR, M., CAMASSOLA, M. Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource technology**, v.207, p. 46-51, 2016.

GARCÍA, S. C., HERNÁNDEZ, R. G., BLANCO, J. C., GIL, J. E. R. Caracterización del crecimiento micelial *in vitro* de *Pleurotus albidus* pegler 1983 Y *Pleurotus djamor* boedijin 1959, en tabasco, México. **Kuxulkab'**, v. 19, n. 37, 2014.

HASSAN, O. A.; ABUGHAZALEH, A. A.; IBRAHIM, S. A.; ISIKHUEMHEN, O. S.; AWAISHEH, S. S., REZA, T. Viability and α and β -galactosidase activity of *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus reuteri* in yoghurt products supplemented with shiitake mushroom extract during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 4, p. 570-576, 2014.

IBRAHIUM, M., HEGAZY, A. Effect of replacement of wheat flour with mushroom powder and sweet potato flour on nutritional composition and sensory characteristics of biscuits. **Curr Sci Int**, v. 3, n. 1, p. 26-33, 2014.

INÁCIO, F.D.; FERREIRA, R.O.; ARAUJO, C.A.V. de; BRUGNARI, T.; CASTOLDI, R.; PERALTA, R.M., SOUZA, C.G.M. Review Article: Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**, p. 10, 2015.

KELES, A.; KOCA, I., GENÇ CELEP, H. Antioxidant properties of wild edible mushrooms. **J Food Process Technol**, v. 2, n. 3, p. 6, 2011.

KHATUA, S.; PAUL, S.; ACHARYA, K. Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: A review. **Res. J. Pharm. Technol**, v. 6, p. 496–505, 2013.

KOLAYLI, S.; SAHIN, H.; ALIYAZICIOGLU, R., SESLI, E. Phenolic components and antioxidant activity of three edible wild mushrooms from Trabzon, Turkey. **Chem Nat Comp**, v. 48, n. 1, p. 123, 2012

KOZARSKI, M. S.; KLAUS, A. S.; NIKSIC, M. P.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.VRVIC, M. M.; JAKOVLJEVIC, D.M. Polysaccharides of higher fungi: Biological role, structure and antioxidative activity. **Chem. Ind**, 68, 305–320. 2014

KUMARI, B., UPADAHYAY, R. C., SAPAN, S. Mycological observation on Genus *Pleurotus* from India. **Global Journal of Environmental Research**, v. 6, n. 3, p. 80-83, 2012.

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

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

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**, v. 51, n. 11, p. 2433-2439, 2016.

MALUF, M. L. F., WEIRICH, C. E., DALLAGNOL, J. M., SIMÕES, M. R., FEIDEN, A., BOSCOLO, W. R. Elaboração de massa fresca de macarrão enriquecida com pescado defumado. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p.84-90, 2010.

Desenvolvimento de Macarrão Instantâneo com Farinha de Maçã e Adição de Cafeína e Taurina Natália F. de Medeiros, Vitor C. Meleiro & Samer Pereira **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v. 10, n. 20, p. 235-240, 2016.

MENEGASSI, B., LEONEL, M. Análises de qualidade de uma massa alimentícia mista de mandioquinha-salsa. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**. Botucatu, v. 2, p. 27-36, 2006.

MINGUITA, A. P. S., CARVALHO, J. L. V., OLIVEIRA, E. M. M., GALDEANO, M. C. Produção e caracterização de massas alimentícias a base de alimentos biofortificados: trigo, arroz polido e feijão carioca com casca. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.10, p.1895-1901, 2015.

MONTEIRO, C. S., HARACEMIV, S. M. C., MIGUEL, O. G., BALBI, M. E., PENTEADO, P. T. Avaliação sensorial de formulação de molho de tomate adicionado do cogumelo *Agaricus brasiliensis*. **Hig. aliment**, v. 25, n. 194/195, p. 172-177, 2011.

MORENO-FUENTES, Á., BAUTISTA-NAVA, E. El" hongo blanco patón", *Pleurotus albidus*, en Hidalgo. Su primer registro en México. **Revista Mexicana de Micología**, n. 22, p. 41-47, 2006.

NAGY, M., SEMENIUC, C. A., SOCACI, S. A., POP, C. R., ROTAR, A. M., SĂLĂGEAN, C. D., TOFANĂ, M. Utilization of brewer's spent grain and mushrooms in fortification of smoked sausages. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 315-320, 2017.

OBODAI, M., FERREIRA, I. C., FERNANDES, Â., BARROS, L., MENSAH, D. L. N., DZOMEKU, M., URBEN, A.F.; PREMPEH, J., TAKLI, R. K. Evaluation of the chemical and antioxidant properties of wild and cultivated mushrooms of Ghana. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19532-19548, 2014.

ORLANDELLI, R.C., SPECIAN, V., FELBER, A.C., PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Bios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

ORMENESE, R. de C. S. C., CHANG, Y. K. Macarrão de Arroz: Características de Cozimento e Textura em Comparação com o Macarrão Convencional e Aceitação pelo Consumidor. **Braz. J. Food Technol**, v. 6, n. 1, p. 91-97, 2003.

PAUCAR-MENACHO, L. M., SILVA, L. H., BARRETTO, P. A. A., MAZAL, G., FAKHOURI, F. M., STEEL, C. J., COLLARES-QUEIROZ, F. P. Desenvolvimento de massa alimentícia fresca funcional com a adição de isolado proteico de soja e polidextrose utilizando páprica como corante. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 767-778, 2008.

PAZ, M. F. (inventor), Fundação Universidade Federal da Grande Dourados (BR/MS), (depositante). Cultivo de espécies de cogumelo do gênero *Pleurotus* em bagaços de uva (vitis

sp.) e maçã (*malus* sp.) e elaboração da farinha do bagaço miceliado. BR patente PI 0603003-3 A2, 2008.

PEREIRA, S., MELEIRO, V. C., TEIXEIRA, B. J. C., MEDEIROS, N. F. Desenvolvimento de Massa Fresca Alimentícia Rica em Ômega 3. **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v. 10, n. 20, 2016.

POLIZER, Y. J., POMPEU, D., HIRANO, M. H., FREIRE, M. T. D. A., Trindade, M. A. Development and evaluation of chicken nuggets with partial replacement of meat and fat by pea fibre. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 62-69, 2015.

PUTTARAJU, N. G., VENKATESHAIAH, S. U., DHARMESH, S. M., URS, S. M. N., SOMASUNDARAM, R. Antioxidant activity of indigenous mushrooms. **J Agric Food Chem**, v. 54, p.9764-72, 2006.

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

RAMPINELLI, J. R., SILVEIRA, M. L. L., GERN, R. M. M., FURLAN, S. A., NINOW, J. L., WISBECK, E. Nutritional value of *Pleurotus djamor* cultivated in banana straw. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 197-202, 2010.

RASHID, M. H., BHATTACHARJYA, D. K., PAUL, R. K., RAHAMAN, M. S. RAHAMAN, M. S., MIAH, M. N., AHMED, K. U. Effect of different saw dust substrates on the growth and yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus florida*). **Biores Comm.**, v. 2, n. 1, p. 193-199, 2016.

RATHEE, S., RATHEE, D., RATHEE, D., KUMAR, V. E., RATHEE, P. Mushrooms as therapeutic agentes. **Rev. Bras. Farmacogn**, 2012.

RATHORE, H., PRASAD, S., SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **PharmaNutrition**, 2017.

REGULA, J., KREJPCIO, Z., STANIEK, H. Iron bioavailability from cereal products enriched with *Pleurotus ostreatus* mushrooms in rats with induced anaemia. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 23, n. 2, 2016.

REIS, F. S., MARTINS, A., BARROS, L., FERREIRA, I. C. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1201-1207, 2012.

REZAEIAN, S., SAADATM, S., SATTARI, T. N., MIRSHAMSI, A. Antioxidant potency of Iranian newly cultivated wild mushrooms of *Agaricus* and *Pleurotus* species. **Biomedical Research**, v. 26, n. 3, 2015.

RIELLA, H. G., BARROS, L. A., CARVALHO, E. U. C. (inventores), Expansão Científica LTDA EPP (BR/SP) (depositante). Café do tipo cappuccino enriquecido com cogumelo *Agaricus Blazei Murril*. BR patente PI 0903613-0 A2, 2011.

ROSLI, W. I., SOLIHAN, M. A., AISHAH, M., NIK FAKURUDIN, N. A., MOHSIN, S. S. J. Colour, textural properties, cooking characteristics and fibre content of chicken patty added with oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*). **International Food Research Journal**, v.18, p. 612-618, 2011.

ROSMIZA, M. Z., DAVIES, W. P., JABIL, M. J., MAZDI, M. Prospects for increasing commercial mushroom production in Malaysia: challenges and opportunities. **Mediterranean Journal of Social Sciences**, 7(1 S1), 406, 2016.

SAIFUL, B. S., WAN ROSLI, W. I. Effect of oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) addition on the nutritional composition and sensory evaluation of herbal seasoning. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 1, p. 262-268, 2016.

SANCHEZ, C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 2, p.13-22, 2017.

SANDRI, I. G., PIEMOLINI-BARRETO, S. B. L. T. Chocolate branco adicionado de cogumelo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 14, n.3, p.203-209, 2012.

SANTA, H.S.D., SANTA, O.R.D., KEIBER, M., SOVRANI, V., ROSA, J., ALMEIDA, D.J. (inventores), Universidade Estadual Do Centro Oeste - UNICENTRO (BR/PR) (depositante). Processo para a produção de uma formulação de gelado comestível tipo sorvete adicionada de micélio do cogumelo *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo submerso em bagaço de maçã. BR patente BR 10 2012 029528 8 A2, 2014.

SARTORI, S. B., FERREIRA, L. F. R., MESSIAS, T. G., SOUZA, G., POMPEU, G. B., MONTEIRO, R. T. R. *Pleurotus* biomass production on vinasse and its potential use for aquaculture feed. **Mycology**, v. 6, n. 1, p. 28-34, 2015.

SCHMIELEI, M., JAEKEL, L. Z., I SHIDAI, P. M. G., CHANG, Y. K., STELL, C. J. S. Massa alimentícia sem glúten com elevado teor proteico obtida por processo convencional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 5, p. 908-914, 2013.

SHARMA, A., VAIDYA, D. ABROL, G. S., RANA, N., NILAKSHI, C. Functional and textural properties of Indian nuggets assorted with mushroom for lysine enrichment. **J Food Sci Technol**, v. 52, n. 6, p. 3837–3842, 2015.

SILVA, I. R. A., BASTO, M. B. (inventores), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano -If Sertão-PE (BR/PE) (depositante). Processo de obtenção de massa alimentícia de macarrão isenta de glúten enriquecida com farinha da semente de abacate e farinha de arroz. BR patente PI 102014027810-9 A2, 2014.

SILVA, A. C., OLIVEIRA, M. C., DEL-RE, P.V., JORGE, N. Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. **Ciênc. Agrotec**, v. 33, n. 4, p. 1103-1108, 2009.

SILVEIRA, A. E. V. G., SOUZA-SOARES, L. A., BADIALE-FURLONG, E. Avaliação nutricional de uma massa alimentícia seca à base de plasma bovino. **Alim. Nutr.**, São Paulo, v. 11, p. 51-65, 2000.

SOUZA, P. M. D., BITTENCOURT, M. L. D. A., CAPRARA, C. C., FREITAS, M. D., ALMEIDA, R. P. C. D., SILVEIRA, D., FONSECA, Y. M, FERREIRA-FILHO, E.X., PESSOA-JUNIOR, A., MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

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

SPANHOLI, L., OLIVEIRA, V. R. Utilização de farinha de albedo de maracujá (*Passiflora edulisflavicarpadegener*) no preparo de massa alimentícia. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n.4, p. 599-603, 2009.

STEFANELLO, F. S., CAVALHEIRO, C. P., LUDTKE, F. L., DA SILVA, M. D. S., FRIES, L. L. M., KUBOTA, E. H. Efeito da adição de extrato de cogumelo do sol em linguiça suína e avaliação da estabilidade oxidativa e microbiológica do produto. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 171-186, 2015.

SUBBIAH, K. A., BALAN, V. A. Comprehensive Review of Tropical Milky White Mushroom (*Calocybe indica* P&C). **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 184-194, 2015.

TEIXEIRA, M.F.S. *et al.* Herbário micológico: patrimônio de cogumelos da Amazônia. In: 61ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2009, Manaus. **Anais da 61ª Reunião anual da SBPC: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, 2009.

TEIXEIRA, M. F. S. T., MACHADO, A. R. G., TEIXEIRA, L. S., SILVA, L. S. (inventores), Fundação Universidade do Amazonas (BR/AM) (depositante). Processo de produção de produto alimentício compreendendo cogumelo comestível, produto alimentício e uso de

cogumelo comestível desidratado em produtos de confeitaria. BR patente PI 1107320-9 A2, 2016.

THONGKLANG, N., LUANGHARN, T. Testing agricultural wastes for the production of *Pleurotus ostreatus*. **Mycosphere**, 7(6), 766-772, 2016.

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

VAMANU, E. Antioxidant properties of mushroom mycelia obtained by batch cultivation and tocopherol content affected by extraction procedures. **BioMed research international**, 2014.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., FAVELATORRES, E., AGUILAR, C. N., RÓMEROGOMES, S. J., DÍAZ-GODÍNEZ, G., AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.13, n. 2, p.157-167, 2003.

VISHVAKARMA, R., MISHRA, A. Production of a protease inhibitor from edible mushroom *Agaricus bisporus* and its statistical optimization by response surface methodology. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-8, 2017.

WISBECK, E., ALVES, E. P., LIMA, S. G. D., GERN, R. M. M., SILVEIRA, M. L. L., FURLAN, S. A. Maintenance culture medium and inoculum based on peach palm leaves for *Pleurotus* spp. production. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, 2016.

YANG, D., LIANG, J., WANG, Y., SUN, F., TAO, H., XU, Q., ZHANG, L., ZHANG, Z., HO, C., WAN, X. Tea waste: an effective and economic substrate for oyster mushroom cultivation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 96(2), 680-684, 2016.

YOSHIMI, Y., SUGAWARA, Y., HORI, C., IGARASHI, K., KANEKO, S., TSUMURAYA, Y., KOTAKE, T. A protease/peptidase from culture medium of *Flammulina velutipes* that acts on arabinogalactan-protein. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 3, p. 475-481, 2017.

Capítulo II

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção e a composição nutricional de *Pleurotus albidus* em resíduos da agroindústria da Amazônia no desenvolvimento de um produto alimentício com qualidade nutricional para consumo humano.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento micelial vertical de *P. albidus* em resíduos da agroindústria e selecionar uma mistura de substrato para cultivo;
- Produzir basidiomas de *P. albidus* no resíduo selecionado em escala semi-industrial por fermentação semi-sólida;
- Avaliar o potencial nutricional da biomassa de *P. albidus* produzida por fermentação semi-sólida;
- Determinar a atividade de antioxidante dos basidiomas de *P. albidus*;
- Caracterizar a atividade proteolítica dos extratos do crescimento vertical micelial e basidioma de *P. albidus*;
- Avaliar a toxicidade do extrato dos basidiomas de *P. albidus*;
- Avaliar a qualidade microbiológica dos basidiomas desidratados.
- Elaborar massa alimentícia tipo macarrão adicionado da biomassa dos basidiomas de *P. albidus*;
- Caracterizar a qualidade e potencial nutricional da massa alimentícia.

Capítulo III

Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo e manutenção do cogumelo

Pleurotus albidus DPUA1692 (Berk.), do acervo da Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, preservado sob óleo mineral foi cultivado em BDA [Ágar Batata Dextrose + Extrato de Levedura 0,5% (p/v)], em placas de Petri (90 mm x 15 mm), a 25 °C, por sete dias, na ausência de luz.

4.2 Fermentação semi-sólida

Aquisição e preparo do substrato: na tabela 1 estão relacionados os substratos base, os respectivos suplementos e a proporção desses resíduos utilizados no bioprocesso. Os substratos utilizados foram, SA - semente de açaí (*Euterpe oleracea*), CC – exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum), CRU – crueira (resíduo grosseiro da *Manihot esculenta*) e FA – farelo de arroz (*Oryza sativa*). Inicialmente, os resíduos lignocelulosico foram lavados em água corrente e imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (p/v) durante 15 minutos, seco a 60 °C em forno de ar forçado durante 12 h, em seguida triturados em processador marca METIVISA®.

Os resíduos com 60% de umidade foram armazenados em tubos de ensaio (200 mm x 25 mm), até a formação de coluna de 150 mm, contendo algodão umedecido com água destilada esterilizada. Os tubos foram esterilizados a 121 °C, 60 minutos por dois dias consecutivos. Na superfície do substrato esterilizado e resfriado foi inoculado três discos miceliais de 8 mm de diâmetro de *P. albidus*. A fermentação foi conduzida a 25 °C por 15 dias (Figura 1 pg. 45).

Tabela 1. Substratos utilizados para fermentação de *Pleurotus albidus*: Substrato base (SA = semente de açaí, CC = exocarpo de cupuaçu) e Substrato suplementar (FA = farelo de arroz, CRU= crueira).

Experimento	Substrato Base	Substrato Suplementar	Proporção
1	SA	FA	2:1
2	CC	FA	2:1
3	SA+CC	FA	2:1:1
4	CC+SA	FA	2:1:1
5	SA	CRU	2:1
6	CC	CRU	2:1
7	SA+CC	CRU	2:1:1
8	CC+SA	CRU	2:1:1

Para este experimento foram utilizados os substratos base e suplementos para selecionar a mistura de substrato adequada para o desenvolvimento micelial de *P. albidus*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3 Extração das enzimas

A extração dos resíduos miceliados e do basidioma foi realizada em água destilada esterilizada na proporção 1:10 em frascos de Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram mantidos a 30 °C, 180 rpm. Após 30 minutos os extratos brutos foram recuperados por filtração em tecido de algodão e filtrados em membrana de polietersulfônica (0,22 µm) para determinação da atividade proteolítica descrita por ALECRIM et al. (2015).

4.3.1 Atividade proteolítica

Para determinação da atividade de protease, em cada tubo de ensaio foi adicionado 0,15 mL do extrato bruto adicionado e 0,25 mL de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. As amostras e os brancos foram preparados em triplicata e incubados a 25 °C por 1

hora, em câmara escura. A reação foi interrompida com 1,2 mL de TCA [ácido tricloroacético 10% (p/v)] seguido de centrifugação por 10 minutos, a 4 °C. Posteriormente, do sobrenadante foi retirado 0,8 mL e adicionado a 1,4 mL 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.

4.3.2 Determinação do efeito do pH e da temperatura e estabilidade da enzima

O efeito do pH foi determinado na faixa de 3,0 a 10,0 utilizando o sistema de reação formulado com azocaseína 1% em tampão: citrato, fosfato e carbonato-bicarbonato a 0,1 M. Os sistemas foram incubados durante uma hora na ausência de luz e, em seguida foi determinada a atividade proteolítica. O branco e os sistemas de reação foram preparados em triplicata. O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado na faixa de 30 °C a 80 °C por 1 hora. Ao término do período de incubação, a atividade enzimática foi determinada conforme descrito anteriormente. Para a estabilidade do pH, o extrato bruto foi disperso (1:1) nas seguintes soluções de tampão 0,1 M: citrato (4,0, 5,0 e 6,0), fosfato (7,0 e 8,0) e carbonato bicarbonato (9,0 e 10,0) e mantido a 25 °C durante 24 h. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado a diferentes temperaturas na gama de 25 a 80 °C durante 1 h.

4.3.3 Efeito de inibidores de protease e íons metálicos sobre a atividade enzimática

O efeito de inibidores e íons metálicos sobre a atividade enzimática foi investigado a 40 °C utilizando íons metálicos 100 mM [Cloreto de cálcio (CaCl_2), Cloreto de potássio (KCl), Cloreto de sódio (NaCl), Sulfato de cobre (CuSO_4), Sulfato ferroso (FeSO_4), Sulfato de zinco (ZnSO_4)] e de compostos inibidores de protease [EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), ácido iodoacético] e, pepstatina (10 mM). O efeito inibidor foi determinado por pré-incubação com o extrato bruto durante 1 hora e a atividade enzimática residual foi determinada e comparada com o controle que corresponde a 100% de atividade. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

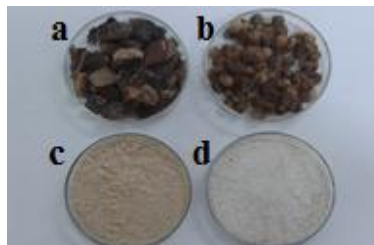
FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

E
T
A
P
A
I

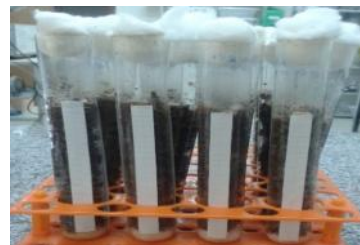
Reativação de *P. albidus* e preparo dos resíduos



7º dia de cultivo de *P. albidus* em meio BDA.



a. Exocarpo de cupuaçu; b. Semente de açaí; c. Farelo de arroz; d. Cruzeira



Resíduos esterilizados em tubos de ensaio em coluna de 150 mm

E
T
A
P
A
II

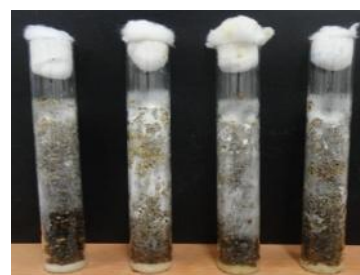
Crescimento micelial vertical



Discos de micélio de 8 mm de *P. albidus* em resíduos lignocelulósicos



14º dia: Resíduos suplementados com farelo de arroz



14º dia: Resíduos suplementados com crueira

E
T
A
P
A
III

Atividade proteolítica



Extração: proporção 1:10 (resíduo miceliado/água destilada)



Reação da atividade proteolítica em azocaseína



Espectrofotômetro: absorvância a 440 nm

Figura 1. Fluxograma da fermentação semi-sólida e determinação da atividade proteolítica

4.4 Produção de basidiomas em resíduo agroindustrial

4.4.1. Preparação do spawn

O spawn foi produzido segundo o método desenvolvido por ROLLAN (2003), modificado. Os grãos de trigo foram lavados e deixados em imersão em água por 12 h. O excesso da água foi retirado e em seguida lavados com solução de hipoclorito 1% (p/v) por 30 minutos. Ao término do tratamento, os grãos foram pré-cozidos por 15 minutos, secos, pesado (100 g) e acondicionados em sacos de polipropileno, fechados e esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Nos grãos esterilizados e resfriados foram inoculados, assepticamente, discos de micélio das culturas obtidas no item 3.1 e os cultivos mantidos na ausência de luz, a 25 °C.

Após sete dias de crescimento os grãos miceliados foram inoculados em 1000 g de substrato, acondicionados em sacos de polipropileno (25 x 40 cm). (Figura 2 pg. 50)

4.4.2 Produção de basidiomas

A partir dos resultados do item 4.2, foram selecionados para produção dos basidiomas os resíduos: SA - semente de açaí (*Euterpe oleracea*), CC - exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum), suplementado com FA - farelo de arroz (*Oryza sativa*). As proporções das misturas foram: SA+FA (2:1 p/p), CC+FA (2:1 p/p), SA+CC+FA (2:1:1 p/p/p) e CC+SA+FA (2:1:1 p/p/p).

Para a fermentação em estado sólido os substrato (1000 g) foram homogeneizados e acondicionados em embalagens de polipropileno de alta densidade, e esterilizados durante 60 minutos, a 121 °C por três dias consecutivos. Após resfriamento, em condições assépticas, o spawn foi inoculado, em triplicata. A fermentação foi realizada em dois ciclos: no primeiro, a 25 °C para o desenvolvimento do micélio, na ausência de luz até completa miceliação em ambiente com umidade ambiental equivalente a 60%.

No segundo ciclo, para a indução dos corpos de frutificação a 25 °C, com umidade ambiental a 100%, na sala de cultivo, em condições assépticas. Neste bioprocessos foi avaliada

a formação e desenvolvimento dos primórdios e tempo total de cultivo. Ao término da cada colheita, os basidiomas foram pesados e submetidos à secagem a 40 °C, em estufa de ar circulante.

4.5 Determinação da capacidade antioxidante

4.5.1 Preparo das amostras

Os extratos obtidos para análise foram preparados tanto do basidioma desidratado, quanto *in natura*. Procedeu-se à pesagem de 1 g do produto triturado, o qual foi submetido a extração sólido-líquido com 100 mL de solvente. Os solventes utilizados foram: água, água:metanol na proporção 1:1 e metanol, com agitação a 180 rpm durante 1h à temperatura ambiente. Seguidamente, os extratos (aquoso, hidroalcoólico e alcoólico) obtido foi filtrado com papel de filtro Whatman n.º1 em seguida filtrados em membrana de polietersulfônica (0,22 µm). Os extratos obtidos foram então utilizados para avaliar a capacidade antioxidante através de diferentes ensaios colorimétricos.

4.5.2 Teor de fenólicos totais

A concentração de fenóis totais foi quantificada pelo método descrito por KIM et al. (2003) com algumas modificações. Inicialmente, em cada poço da placa multipoços foi colocado 10 µL dos extratos numa concentração de 1 mg/mL, mais 50 µL de Folin-Ciocalteu 10% (SIGMA®), código F952-500 mL. Em seguida, as placas foram mantidas no escuro, a temperatura ambiente. Após 8 minutos foi adicionada uma solução saturada de carbonato de sódio 0,4% (ANIDROL®), código A2275 e, incubado novamente por 3 minutos. Em seguida, foi feita a leitura em 620 nm, no Multimode Detetor DTX 800 da Beckman. O teor fenólico das amostras foi expressa em mgEAG, ácido gálico (SIGMA®), código G7384-100G.

4.5.3 Teor de flavonóides totais

Os flavonóides totais foram quantificados pelo método descrito por KUMAR et al. (2008) com modificações. Inicialmente foi adicionado 30 µL do extrato na concentração de 1 mg/mL, incluindo o branco (90 µL de etanol). A primeira leitura foi realizada a 405 nm. Após a leitura adicionou 6 µL de cloreto de alumínio 10%, 6 µL de acetato de potássio, 168 µL etanol nas microplacas e incubadas no escuro, a temperatura ambiente. Após 30 minutos a incubação a leitura foi realizada a 405 nm, no Multimode Detetor DTX 800 da Beckman. O cálculo foi semelhante da quantificação de fenóis totais. O padrão usado foi a quercetina (SIGMA®), código Q4951-10G e os resultados foram apresentados em mgEQ.

4.5.4 Atividade sequestrante do radical DPPH

A atividade sequestrante do radical lipossolúvel DPPH foi realizado segundo metodologia de BURITS e BUCAR (2000) com modificações. Para o testes foi preparada uma solução de 2 µg/mL de DPPH (SIGMA®) com código D9132-5G em etanol. Esta solução foi diluída com etanol até à absorvância do controle (DMSO) de $1,000 \pm 0,1$. Em seguida adicionado nos poços da microplaca 30 µL das amostras e/ou padrão ácido gálico na concentração de 1 mg/mL. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro e feita a leitura em 492 nm, no Multimo de Detetor DTX 800 da Beckman. Os cálculos de inibição, baseado na absorvância do controle foi expresso em µg/mL de extrato. O porcentual de inibição das amostras que foi maior a 50%, foi feito até 8 diluições seriadas para obter o CI_{50} que é interpolado a partir de um gráfico utilizando a percentagem de inibição (eixo Y) em função da concentração (eixo X) do extrato. O padrão foi o ácido gálico (SIGMA®) com código G7384-100G.

4.5.5 Atividade sequestrante do radical ABTS

Para determinar a atividade antirradical ABTS foi seguido o método descrito por JOHN et al. (2014) com pequenas modificação, para possibilitar que o teste fosse realizado com utilização de microplacas de 96 poços. Inicialmente, foi preparada a solução de ABTS (SIGMA[®]), código A1888-5G, pela reação de 0,7 mM do radical ABTS dissolvido em 5 mL de água deionizada e adicionado 5 mL de perssulfato de potássio 2,4 mM. A microplaca foi incubada em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 12 horas para se obter uma solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Em seguida a solução foi diluída com água deionizada até à absorvância do controle (DMSO) de $1,000 \pm 0,1$, em 620 nm. Em seguida, foi adicionado nos poços da microplaca 30 μ L das amostras, na concentração de 1mg/mL e 270 μ L da solução de ABTS. A microplaca foi incubada por 15 minutos, na ausência de luz, à temperatura ambiente e feita a leitura em Multimode Detetor DTX 800 da Beckman. Os cálculos foram realizados usando a formula de inibição. O porcentual de inibição das amostras que foram maior a 50%, foi feito até 8 diluições seriadas para obter o CI_{50} que foi interpolado a partir de um gráfico construído utilizando percentagem de inibição (eixo Y) em função da concentração (eixo X) do extrato com um $R = 0,99$.

FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE *PLEUROTUS ALBIDUS*

Preparo do spawn

E
T
A
P
A
I



Repique de *P. albidus* em meio BDA



Grão de trigo: lavado, cozido, pesado (100g) e esterilizado



Spawn: micélio de *P. albidus* em grão de trigo

Inoculação do spawn em resíduos agroindustriais

E
T
A
P
A
II



Mistura, pesagem (1Kg) e esterelização dos resíduos: a) semente de açaí; b) exocarpo de cupuaçu e c) farelo de arroz



7º dia do Spawn



Inoculação do spawn nos resíduos tratados e esterelizados.

Produção dos basidiomas

E
T
A
P
A
III



1º Ciclo: cultivo mantido no escuro a 25 °C até completa miceliação



2º Ciclo: cultivo mantido a 25° em fotoperíodo de 12h



Aparecimento dos primórdios

Basidiomas maduros

E
T
A
P
A
IV



Basidiomas maduros



Pesagem dos basidiomas



Microplaca – teste antioxidante

Figura 2. Fluxograma da produção dos basidiomas de *Pleurotus albidus*.

4.6 Formulação das massas alimentícias tipo macarrão

4.6.1 Matérias-primas e elaboração do macarrão

Os macarrões tipo talharim foram produzidos em três etapas: pesagem e mistura das farinhas, abertura e corte das massas e secagem (Figura 03 pg.54). Neste bioprocesso foram utilizados os seguintes materiais:

- I) Biomassa de cogumelo *P.albidus* DPUA 1692;
- II) Farinha de arroz;
- III) Azeite de oliva;
- IV) Ovo *in natura* e
- V) Goma xantana.

Para a elaboração do macarrão adicionado de cogumelo, a biomassa de *P. albidus* foi misturada com farinha de arroz, na proporção de 15% e 25% (p/v) (Tabela 2). Tanto na formulação Padrão quanto na Teste, o ovo foi usado na forma *in natura*, e adicionado azeite de oliva e goma xantana. Cada produto (Padrão e o Teste) foi preparado em processador, até a homogeneização completa dos ingredientes, obtendo uma massa uniforme. Posteriormente a massa mantida sob refrigeração ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos, depois de descanso foi feita a extrusão no formato de espaguete, e levado a câmara de circulação de ar a 40°C para secagem.

Tabela 2. Ingredientes e proporções usadas nas formulações de macarrão contendo biomassa de *P. albidus*.

Ingredientes	Padrão	Teste	
		Biomassa Cogumelo	
		15%	25%
Farinha de Arroz	100 (g)	85 (g)	75 (g)
Cogumelo (<i>P. albidus</i>)	0 (g)	15 (g)	25 (g)
Ovo <i>in natura</i>	50 (g)	50 (g)	50 (g)
Goma xantana	3 (g)	3 (g)	3 (g)
Azeite de Oliva	7 (mL)	7 (mL)	7 (mL)

4.6.2 Determinação da propriedade de cozimento do macarrão

O teste de cozimento foi realizado segundo o método 16-50 da *American Association of Cereal Chemists-AACC* (2000). Os parâmetros avaliados foram: Tempo de cozimento, aumento de massa do produto cozido e perda de sólidos na água de cozimento.

- *Tempo de cozimento*

O tempo de cozimento foi determinado pela cocção de 10 g de amostra em 140 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”, em estufa a 105 °C, até massa constante. Os resultados dos sólidos perdidos é calculado pela equação V:

$$S.S. (\%) = \frac{PR (g) \times Vc (mL)}{PA (g) \times Va (mL)} \times 100 \quad (V)$$

S.S = Sólidos solúveis perdidos (%)

PR = peso do resíduo evaporado (g)

PA = peso da amostra (g)

Vc = volume da água de cozimento (mL)

Va = Volume da alíquota (mL)

4.6.3 Textura do produto cozido

A textura das massas alimentícias cozidas foram realizadas no Laboratório de Análise de Instrumentação para Produtos Agroindústrias da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foi determinada utilizando-se o aparelho Texturômetro TA-XTplus (Stable Micro Systems), com corpos de prova HDP/BS e A/SPR, para avaliação do seguinte parâmetro:

- *Firmeza*

Para analisar a firmeza das massas, as amostras foram cortadas, com 5 cm de comprimento, e cozidas em água destilada (300 mL água para 25 g de massa), segundo método 16-50 da AACC (2000). Após a drenagem da água, a massa foi lavada com 50 mL de água destilada e mantida por um minuto em 300 mL de água fria, sendo então drenada para as análises no texturômetro, de acordo com os seguintes parâmetros de operação: medida de força em compressão (g); velocidade pré-teste (0,5 mm/s); velocidade de teste (0,17 mm/s); velocidade pós-teste (10,00 mm/s); distância (4,50 mm), base (altura inicial de 5,00 mm) e corpo de prova HDP/BS.

FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE ELABORAÇÃO DO MACARRÃO



Figura 3. Fluxograma da formulação das massas alimentícias fortificadas com *Pleurotus albidus*.

4.7 Análise da composição da biomassa de *Pleurotus albidus* e massas alimentícias

Os basidiomas de *P. albidus* e as massas alimentícias foram submetidas à determinação de atividade de água, pH e dos teores de umidade, cinzas, fibras, lipídios, proteínas totais, carboidratos, e energia, segundo metodologia descrita pela AOAC (2005). As análises e os métodos que foram empregados estão descritos a seguir:

- A atividade de água foi determinada por higrômetro marca Bras-Eq, a temperatura de 25° C.

- Determinação do pH: para a determinação da medida de pH foram pesados cerca de 10g de cada amostra e homogeneizados com 100 mL de água destilada. A solução foi agitada por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi coletado utilizado para realização da leitura do pH metro marca Quimis.

- Para determinar a acidez titulável das massas de macarrões, após o pH ter sido determinado, sob agitação magnética constante, titulou-se com a solução padronizada de NaOH a 0,1 N até atingir o pH 8,2 a 8,3 através do potenciômetro, anotando-se o volume gasto (São Paulo, 2005). $\text{Acidez Normal em ml/100g de amostra} = V \cdot F \cdot 100 / P$

Onde:

V = quantidade de NaOH em mL gastos na titulação;

F = Normalidade da solução de NaOH usadas (0,01 ou 0,1 N);

P = Peso em g da amostra;

- Determinação da umidade: o conteúdo de umidade das amostras foi determinado por dessecação em estufa a 105 °C, até peso constante.

- Determinação de cinzas: para a determinação do conteúdo de cinzas foi utilizado o método de incineração em mufla a 550 °C até os resíduos apresentarem uma coloração cinza claro ou branca. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao peso seco da amostra.

- Determinação de fibras: para determinar o teor de fibras as amostras foram submetidas a digestão ácida com solução de ácido sulfúrico 1,25%, seguida por digestão alcalina com hidróxido de sódio 1,25%. As amostras foram filtradas a vácuo com papel de filtro e o resíduo resultante da hidrólise foi incinerado em mufla a 550 °C até a formação de cinzas. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao peso seco da amostra.

- Determinação de lipídios: para determinar o teor de lipídios foi utilizado o método de BLIGH e DYER (1959). Nesse método são extraídas todas as classes de lipídios sem aquecimento que são obtidos por pesagem e os resultados expressos em gramas por 100g de amostra.

- Determinação de nitrogênio total e proteínas: a determinação de nitrogênio total foi feita com 0,2 g de amostra pelo método de *Kjedahl*. Para calcular o fator de conversão em proteína bruta referente aos resíduos foi utilizada a fórmula $P (\%) = N \times 6,25$, enquanto para os basidiomas foi de $P (\%) = N \times 4,38$. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao peso seco da amostra.

- Determinação de carboidratos: o teor de carboidratos totais das amostras foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula: $C (\%) = (100g - (\text{total g proteína} + \text{cinzas} + \text{lipídios} + \text{fibra}))$.

- Determinação de energia: o valor calórico foi determinado utilizando-se fatores de conversão de Atwater: kcal = 4 kcal/g (proteína), 4 kcal/g (carboidratos) e 9 kcal/g (lipídios), conforme a fórmula: $(4 \times \text{g proteína}) + (4 \times \text{g carboidratos totais} - \text{fibras}) + (9 \times \text{g lipídios})$.

4.8 Composição mineral dos basidiomas de *Pleurotus albidus* e massas alimentícias

A determinação dos minerais foi realizado no Laboratório de Análises de Solos e Plantas da Embrapa Amazonia Ocidental, onde para composição de minerais (cálcio, potássio, magnésio, sódio, fosfato, cobre, ferro, zinco, cobalto, cromo e manganês) dos basidiomas de *P. albidus* e dos macarrões elaborados foram utilizados 0,5 g de amostra, que em tubos *Kjedhal* foram submetidas à digestão com 10 mL de ácido nítrico (HNO₃). A digestão completa foi realizada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e em seguida foi adicionada uma solução de 1,0% de La₂O₃ (óxido de lantânio) e as amostras foram diluídas em água ultra pura (MACHADO et al., 2016).

A leitura das amostras foi realizada em espectrômetro de absorção atômica de chama ar/acetileno marca GBC, modelo Avanta Sigma (APAT 2003; MALAVOLTA et al. 1989). O fósforo foi determinado utilizando espectrofotômetro UP/Pis da Thermo, modelo Helyos Beta.

4.9 Análise microbiológica das massas alimentícias

Foram realizadas análises de Coliformes a 45 °C, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus* e *Estafilococos* coagulase positiva nas massas alimentícias e amostra controle, segundo determinações da ANVISA - Resolução RDC nº 12 de 02/01/2001 (BRASIL, 2001), de acordo com a metodologia DOWNES e ITO (2001). A preparação das amostras para as análises microbiológicas foi precedida de diluições decimais (exceto para *Salmonella* sp.) 25 gramas da amostra foram homogeneizadas com 225 mL do diluente (água peptonada 0,1 %) em homogeneizador da marca CERTOMAT®, obtendo-se a diluição 10⁻¹. Diluições decimais subsequentes foram preparadas quando necessário.

4.10 Teste de Toxicidade

4.10.1 Ação citotóxica do extrato proteolítico em sangue comercial de carneiro

A atividade hemolítica do extrato bruto de *Pleurotus albidus* DPUA 1693 contra hemácias de carneiro foi realizada pela técnica de hemólise em tubos contendo sangue de carneiro desfibrinado (Ebefarma) (CARNEIRO et al., 2011). Para determinação do índice de hemólise (Equação VI) e o cálculo da concentração que produz 50% de hemólise (CH₅₀), a leitura foi realizada a 540 nm após 60 minutos e 24 horas.

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Absorvância (teste)} - \text{Absorvância (HM)}}{\text{Absorvância (HT)} - \text{Absorvância (HM)}} \times 100 \quad (\text{VI})$$

4.10.2 Citotoxicidade em célula

Foram utilizados fibroblastos humanos (MRC5) do Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM por intermédio da Professora Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos. As linhagens foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Ampicilina-Estreptomicina. As células foram

acondicionadas em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C. O modelo de estudo proporcionou a comparação do efeito citotóxico do extrato de cogumelo, em diferentes concentrações, sobre linhagens de fibroblastos humanos MRC5.

A citotoxicidade dos extratos de cogumelos foi avaliada por meio do teste do Alamar Blue, conforme metodologia descrita por AHMED et al. (1994). Neste teste o Alamar Blue (resazurina) de cor azul e não fluorescente, é reduzido a resofurina, de cor rosa e fluorescente, pelas células viáveis. As células foram transferidas para placas com 96 poços na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço. Esta placa foi mantida em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este período as células foram tratadas na concentração única de 200 µg/mL de extrato de cogumelo durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina (1720 µM). Os poços controle negativo receberam DMSO (diluyente da amostra) 0,1%. Três horas antes do final de cada tempo de tratamento foi acrescentado 10 µL do Alamar Blue na concentração de 0,02% e foi realizada a leitura das placas em Leitor de microplaca na região da fluorescência nos comprimentos de onda em 465 nm e 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 5.0. Para amostras que apresentassem percentual de viabilidade celular inferior a 60% na concentração única testada seria determinada a CI₅₀ (concentração inibitória de 50% da viabilidade celular).

4.11 Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados por análise de Variância ANOVA e Teste de Tukey ao nível de 5% de. Os resultados do planejamento fatorial foram avaliados utilizando o software Minitab program, version 16.0 (MINITAB, 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. **Approved methods of analysis**. 10th ed. American Association of Cereal Chemists, AACC International, St. Paul, MN, 2000.

AHMED, S.A., GOGAL, R.M., WALSH, J.E.A. New rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **J Immunol Methods**, v.70, n. 2, p. 211-24, 1994;

AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. Official methods of analysis. 15 ed. Washington: AOAC, 2005.

APAT. **Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici**. ISRA. Istitute di Ricerca sulle acque. Metodi analitici per Le acque. Roma, 2003. 1178p.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 12, de 02/01/2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 janeiro de 2001.

BURITS, M.; BUCAR, F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. **Phytother Res**, v. 14, n. 5, p. 323-8, Aug 2000.

CARNEIRO, A.L.B.; OLIVEIRA, V.M.A.; VASQUES, T.G.S.; MAGALHÃES, S.A.; ALVES, L.B.; BRANDÃO, P.C.; FREIRE, R.S. e SILVA, R.F. Testes de citotoxicidade (atividade hemolítica). Capítulo 12. Em: Teixeira et al. **Fungos da Amazonia: uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. Edua, Fapeam. 2011.

DOWNES, F.P, ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. Washington, DC: American Public Health Association; 2001.

KIM, D. O., CHUN, O. K., KIM, Y. J., MOON, H. Y., LEE, C. Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.22, p. 6509-6515, 2003.

KUMAR, S., KUMAR, D., JUSHA, M., SAROHA, K., SINGH, N., VASHISHTA, B. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, n. 2, p. 215-220, 2008.

MALAVOLTA, E; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: **Associação brasileira para pesquisa da potassa e do fosfato**, 1989, p. 201.

JOHN, K.M., GANSUKH ENKHTAIVAN, M. T., HWAN KIM, DOO. Variation in major phenolic compounds and quality potential of CTC black tea elicited by *Saccharomyces cerevisiae* and its correlation with antioxidant potential: **Elsevier Science**, v. 55, p. 289-294, 2014.

MINITAB. **Minitab statistical software**. LEAD Technologies, Inc. Version 16.0, 2010.

ROLLAN, M.G. **Cultivation of mushrooms and truffles (Cultivo de Setas y Trufas)**. 4ª Ed. España: Artes Gráficas Cuesta, S.A, 2003, 239p.

SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo, 2005. 1020 p.

Capítulo IV

Artigo I

PROTEASES COM PROPRIEDADES INDUSTRIAIS DE UMA ESPÉCIE DE COGUMELO SELVAGEM DA AMAZÔNIA

CHARACTERIZATION OF PROTEASES FROM AMAZONIC EDIBLE MUSHROOM

Adrya da S Figueiredo, Salomão R Martim, Mircella M Alecrim e Maria Francisca S Teixeira
Coleção de Cultura DPUA, Universidade Federal do Amazonas, Manaus 69077-000, Brasil.

RESUMO: As proteases são facilmente encontradas em diferentes micro-organismos, apresentam uma grande diversidade bioquímica que beneficiam seu uso em diversas aplicações comerciais. Cogumelos do gênero *Pleurotus*, conhecidos por ser fonte de proteínas, aminoácidos, diversas vitaminas e minerais, também são fonte de enzimas. Nesta pesquisa foi investigada a produção e a caracterização de proteases por *Pleurotus albidus* (Berk.) cultivado em resíduos da agroindústria amazônica, com o objetivo de determinar as condições ótimas de temperatura, pH, estabilidade e efeito de inibidores sobre a atividade da enzima. A espécie estudada *P. albidus* cresceu e excretou proteases em todos os substratos testados: exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum) e semente de açaí (*Euterpe oleracea*), suplementados com farelo de arroz (*Oryza sativa*) e crueira (resíduo grosseiro da *Manihot esculenta*). O padrão proteolítico das enzimas em extrato bruto usando inibidores indica ser cisteína e metaloprotease, pH 6,0 e temperatura ótima 40 °C e 50 °C. As enzimas mantiveram estáveis entre 60 a 90 minutos nas temperaturas de 30 °C a 50 °C, com declínio a partir de 120 minutos de exposição da enzima, e mantiveram estáveis de 60 a 120 minutos no pH 3,0, 4,0 e 6,0. Esses resultados indicam que as proteases produzidas por *P. albidus* apresentam potencial para aplicação na indústria de alimentos, bem como agente de modificação de propriedades funcionais.

Palavras-chave: *Pleurotus albidus*, Protease, Metaloprotease, Cisteína

ABSTRACT

Proteases are enzymes easily produced by different microorganisms as fungi. They have a great biochemical diversity that promotes their use in several commercial applications. *Pleurotus* are known to be source of proteins, amino acids, vitamins, minerals and also enzymes. The aim of this research was to investigate the production and characterization of proteases from *Pleurotus albidus* (Berk.) cultivated in Amazon agro industrial residues. Parameters as temperature, pH, stability and effect of inhibitors on enzyme activity were determined. *P. albidus* excreted proteases in all substrates evaluated [(exocarp cupuaçu and açaí seeds, both supplemented with rice bran and crueira (residue of the processing of the manioc flour)]. The proteolytic pattern of the enzymes indicates two types of proteases: cysteine and metalloprotease. The optimum conditions of activity were at pH 6.0 and 40 °C and 50 °C. The enzymes remained stable for 60 to 90 minutes at temperatures of 30 °C to 50 °C, with a decline from 120 minutes of enzyme exposure. They remained stable for 60 to 120 minutes at pH 3.0, 4.0 to 6.0. These results indicate that the proteases produced by the edible mushroom *P. albidus* have potential for application in food industry, as well as functional properties modifying agent.

Keywords: *Pleurotus albidus*, Protease, Metalloprotease, Cysteine

Introdução

Pleurotus spp. são cogumelos sapróbios, classificado no filo Basidiomycota, ordem Agaricales, família Pleorotaceae, representado por mais de 40 espécies que habitam áreas de clima tropical e temperado. Nas últimas décadas tem se tornado uma das melhores opções como produto de importância alimentícia e medicinal (Wani et al., 2010; Gupta et al., 2016a).

Espécies do gênero *Pleurotus* produzem diversos compostos bioativos, enzimas extracelulares, polissacarídeos, antioxidantes, antimicrobiais, terpenóides, vitaminas, entre outros. Das enzimas sintetizadas por cogumelos, as protease são as de maior valor comercial, tem aplicação predominante na indústria de alimentos, na preparação de hidrolisados de

proteínas, fabricação de queijo, amaciamento de carne e dietas ricas em proteína (González et al. 2016; Machado et al., 2016; Sewalt et al., 2016).

O mercado mundial de enzimas industriais atingiu em 2012, aproximadamente US\$4,5 bilhões, com aumento previsto para US\$ 7,1 bilhões, em 2018. Desse mercado, 75% são enzimas hidrolíticas, das quais 2/3 são enzimas proteolíticas (Savitha et al., 2011; Jisha et al., 2013).

A utilização de protease aumentou notavelmente em outros processos industriais, incluindo ração animal, aditivo em fármaco, detergente, indústria têxtil e recuperação da prata em filmes de Raio X ou fotografia (Savitha et al., 2011; Souza et al., 2015). As proteases também desempenham papel importante nos processos de germinação e esporulação nos fungos, bem como, na produção de enzimas extracelulares importantes, indicativas da patogenicidade, para a degradação e transporte de nutrientes para a célula e no processo de patogênese (Orlandelli et al., 2012; Inácio et al., 2015; Cheong et al., 2016).

As proteases de origem microbiana são produzidas por fermentação submersas e fermentação no estado sólido. Entre essas tecnologias, para obtenção de compostos bioativos por fungos, tem sido muito utilizada a fermentação no estado sólido que consiste no uso de matriz sólida com umidade adequada para o crescimento celular (Freitas et al., 2014; Souza et al. 2015).

No processo de fermentação a produção de proteases pode ser influenciada pela variação na relação C/N, a presença de certos compostos facilmente metabolizáveis, como glicose e íons metálicos, além de vários outros fatores físicos, como aeração, inóculo, densidade, pH, temperatura e tempo de incubação (Vranova et al., 2013; Souza et al. 2015).

Nesta pesquisa *P. albidus* foi cultivado em matriz sólida para selecionar uma mistura de substrato para produção de protease com características para futura aplicação na indústria de alimentos.

Materiais e Métodos

Cogumelo

Pleurotus albidus DPUA1692 (Berk.), do acervo da Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, preservado sob óleo mineral foi cultivado em BDA [Ágar Batata Dextrose + Extrato de Levedura 0,5% (p/v)], em placas de Petri (90 mm x 15 mm), a 25 °C, por sete dias, na ausência de luz.

Fermentação semi-sólida (FSS)

Na tabela 1 estão relacionados os substratos base, os respectivos suplementos e a proporção desses resíduos utilizados no bioprocesso. Os substratos utilizados foram, SA - semente de açaí (*Euterpe oleracea*), CC – exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum), CRU – crueira (resíduo grosseiro da *Manihot esculenta*) e FA – farelo de arroz (*Oryza sativa*). Inicialmente, os resíduos lignocelulosico foram lavados em água corrente e imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (p/p) durante 15 minutos, seco a 60 °C em forno de ar forçado durante 12 h, em seguida triturados em processador marca METIVISA®.

Os resíduos com 60% de umidade foram armazenados em tubos de ensaio (200 mm x 25 mm), até a formação de coluna de 150 mm, contendo algodão umedecido com água destilada esterilizada. Os tubos foram esterilizados a 121 °C, 60 minutos por dois dias consecutivos. Na superfície do substrato esterilizado e resfriado foi inoculado três discos miceliais de 8 mm de diâmetro de *P. albidus*. A fermentação foi conduzida a 25 °C por 15 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1. Substratos utilizados para fermentação de *Pleurotus albidus*: Substrato base (SA = Semente de açaí, CC = exocarpo de cupuaçu) e Substrato suplementar (FA = farelo de arroz, CRU= crueira).

Experimento	Substrato Base	Substrato Suplementar	Proporção
1	SA	FA	2:1
2	CC	FA	2:1
3	SA+CC	FA	2:1:1
4	CC+SA	FA	2:1:1
5	SA	CRU	2:1
6	CC	CRU	2:1
7	SA+CC	CRU	2:1:1
8	CC+SA	CRU	2:1:1

Extração das enzimas

As enzimas foram extraídas em água destilada esterilizada na proporção 1:10 (resíduo miceliado/mL de água destilada) em frascos de *Erlenmeyer* de 125mL. Os frascos foram mantidos a 30 °C, 180 rpm. Após 30 minutos os extratos brutos foram recuperados por filtração em tecido de algodão e filtrados em membrana de polietersulfônica (0,22µm) para determinação da atividade das protease.

Determinação da atividade de protease

Para determinação da atividade de protease, em cada tubo de ensaio foi adicionado 0,15 mL do extrato bruto adicionado e 0,25 mL 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 1 hora, em câmara escura. A reação foi interrompida com 1,2 mL de TCA [ácido tricloroacético 10% (p/v)] seguido de centrifugação por 10 minutos, a 4 °C. Posteriormente, do sobrenadante foi retirado 0,8 mL e adicionado a 1,4 mL 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.

Determinação do efeito do pH, temperatura e estabilidade da enzima

O efeito do pH foi determinado na faixa de 3,0 a 10,0 utilizando o sistema de reação formulado com azocaseína 1% em tampão: citrato, fosfato e carbonato-bicarbonato a 0,1M. Os sistemas foram incubados durante uma hora na ausência de luz e, em seguida foi determinada a atividade proteolítica. O branco e os sistemas de reação foram preparados em triplicata. O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado na faixa de 30 °C a 80 °C por 1 hora. Ao término do período de incubação, a atividade enzimática foi determinada conforme descrito anteriormente. Para a estabilidade do pH, o extrato bruto foi disperso (1: 1) nas seguintes soluções de tampão 0,1 M: citrato (4,0, 5,0 e 6,0), fosfato (7,0 e 8,0) e carbonato bicarbonato (9,0 e 10,0) e mantido a 25 °C durante 24 h. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado a diferentes temperaturas na gama de 25 a 80 °C durante 1 h.

Efeito de inibidores de protease e iões metálicos sobre a atividade enzimática

O efeito de inibidores e iões metálicos sobre a atividade enzimática foi investigado a 40 °C utilizando íons metálicos 100 mM [Cloreto de cálcio (CaCl_2), Cloreto de potássio (KCl), Cloreto de sódio (NaCl), Sulfato de cobre (CuSO_4), Sulfato ferroso (FeSO_4), Sulfato de zinco (ZnSO_4)] e de compostos inibidores de protease [EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), ácido iodoacético] e, pepstatina (10 mM). O efeito inibidor foi determinado por pré-incubação com o extrato bruto durante 1 hora e a atividade enzimática residual foi determinada e comparada com o controle que corresponde a 100% de atividade. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Análise estatística

Em todas as experiências, os dados foram submetidos a análise estatística de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando Minitab programa, versão 16.0 (Minitab, 2010).

Resultados

Atividade proteolítica

A figura 1 mostra os resultados referentes a média da atividade de protease de *Pleurotus albidus* cultivado em resíduos lignocelulósicos. Em todas as misturas de substratos quando utilizado farelo de arroz como suplemento, a influência na atividade proteolítica foi positivo em comparação à crueira como suplemento. O farelo de arroz como fonte de carbono demonstra favorecer a produção de protease (Chaud et al. 2009; Fonseca et al. 2015).

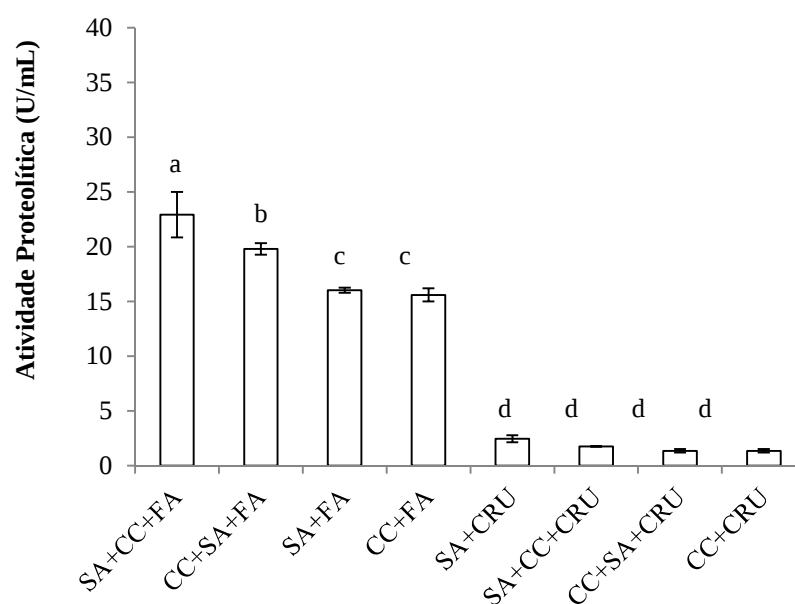


Figura 1. Média da atividade de protease produzida por *P. albidus* em substratos agroindustriais durante 15 dias por fermentação semi-sólida. Meios: SA (semente de açaí); CC (exocarpo de cupuaçu); SA+CC (semente de açaí+exocarpo cupuaçu (2:1 p/p); CC+SA (exocarpo cupuaçu+semente de açaí (2:1 p/p), suplementados com farelo de arroz (FA) e crueira (CRU). Médias seguidas por letras iguais não são diferentes significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 5\%$).

A atividade de protease significativa (22,93 U/mL) foi determinada em resíduo de semente de açaí mais exocarpo de cupuaçu, suplementados com farelo de arroz [2:1:1, p/p/p (SA+CC+FA)]. Em CC+SA+FA (2:1:1 p/p/p), SA+FA (2:1 p/p) e CC+FA (2:1 p/p), a atividade das enzimas foi 13,65%, 30,09% e 31,97% inferior ao valor determinado em SA+CC+FA, respectivamente. Nas demais misturas de substrato contendo crueira (CRU), as atividades de protease foram inferiores numa média de 93%. Provavelmente o farelo de arroz, com reduzido conteúdo de carboidrato, proporcionou uma maior disponibilidade de nutrientes assimiláveis enquanto a crueira, com aporte de carbono elevado viabilizou o fenômeno de repressão enzimática. O mesmo foi observado por Ravikumar et al. (2012) onde o aumento da fonte de carbono afetou negativamente a produção de protease em *Pleurotus sajor-caju* em ambiente FSS. Além do carbono, é possível que o aporte nutricional do resíduo tenha influência direta na produção enzimática do fungo com absorção de nutrientes diferenciada nos diferentes resíduos agrícolas.

Nesta pesquisa, a atividade proteolítica de *P. albidus* em CC+FA foi superior 49,42% quando comparado aos achados por Fonseca et al. (2014) para *P. ostreatoroseus* (7,89 U/mL), em resíduos e condições experimentais similares. Fungos pertencentes a diferentes grupos ecológicos produzem diferentes enzimas que refletem a sua adaptação no substrato. Além disso, a filogenia fúngica está sendo referida como um fator chave no perfil da secreção de enzimas, assim como, as condições físicas e nutricionais do bioprocessamento (Iandolo et al., 2011; Inácio et al., 2015; Semenova et al., 2017).

Pleurotus albidus, além de prover a reciclagem de nutrientes, beneficiando o meio ambiente, também é uma espécie promissora proteolítica, desempenhando, portanto, um importante papel na área da biotecnologia voltado ao mercado de enzimas industriais.

Efeito do pH e temperatura na enzima proteolítica

As proteases constituem um grande e complexo grupo de enzimas que diferem em propriedades, tais como especificidade de substrato, sítio ativo e mecanismo catalítico, pH e temperatura ótima e perfil de estabilidade. As enzimas produzidas por fungos apresentam muitas vantagens, normalmente são extracelulares, tornando mais fácil a sua recuperação

(Inácio et al., 2015; Gupta et al., 2016b). A Figura 2 mostra a determinação do pH (A) e temperatura (B) ótima do meio SA+CC+FA (semente de açaí/exocarpo de cupuaçu/farelo de arroz - 2:1:1 p/p/p).

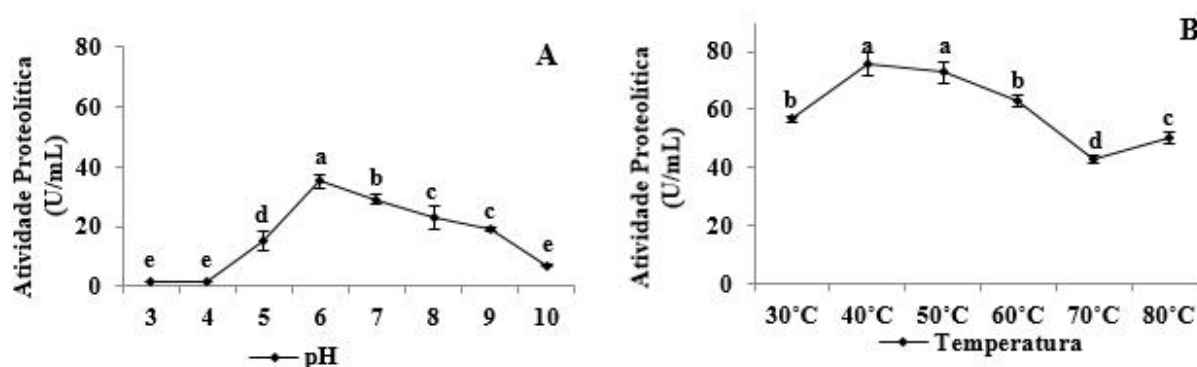


Figura 2. pH (A) e temperatura °C (B) ótima de protease de *P. albidus* produzidas por FSS em SA+CC+FA (semente de açaí+exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz). Médias seguidas por letras iguais não são diferentes significativamente pelo Teste de Tuke (p≤ 5%).

O pH ótimo das protease de *P. albidus* foi determinado em pH 6 (35,16 U/mL) e temperatura ótima a 40 °C e 50 °C, com atividade residual de 75,38 U/mL e 72,71 U/mL, respectivamente, representando o dobro da atividade quando comparado ao valor determinado no pH ótimo. Pushpa & Naidu (2010) confirma a importância de tais propriedades (pH e temperatura) no desenvolvimento do processo biológico. As proteases ligeiramente ácidas e neutras possuem baixa termotolerância e são bastante utilizadas na indústria de alimentos devido hidrolisar aminoácidos hidrofóbicos, restritos ao pH neutro, consequentemente melhorando o sabor dos alimentos (Zambare, 2010; Sandhya et al., 2005).

Dados da caracterização das proteases produzidas pela espécie *P. albidus*, ainda é limitado, porém, dentro do gênero *Pleurotus* é possível encontrar uma gama de variação de temperatura e pH ótimo. Fonseca et al. (2014) obteve dados semelhantes com *P. ostreatoroseus*, cuja média da temperatura ótima para a atividade proteolítica foi determinada a 40 °C, e atividade máxima foi determinada em pH 6,0. Eisele et al. (2011) apresentou dados de atividade ótima de protease em pH mais alcalino (7.5) e temperatura de 37 °C para *Pleurotus ostreatus*.

Já Leonhardt et al. (2016), determinou uma temperatura ótima de 40 °C e um pH ótimo a pH 8,5-9,0 para *Pleurotus pulmonarius*. Essa variação de pH e temperatura para atividade ótima de produção enzimática se justifica pelos fungos produzirem protease tanto ácidas, neutras, como 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) (Nirmal et al., 2011). Os dados desta pesquisa demonstram a potencialidade de *P. albidus* na produção de protease com características para serem utilizadas na indústria alimentícia e compatível para utilização na fabricacaod edetergentes.

Efeito do pH e temperatura na estabilidade das protease

A atividade e estabilidade térmica de enzimas são parâmetros importantes que devem ser estudados para avaliar a viabilidade econômica de processos industriais baseados em biocatalisadores. Na figura 3, está descrito a estabilidade da enzima proteolítica de *P. albidus*, em diferentes tipos de pH e temperatura.

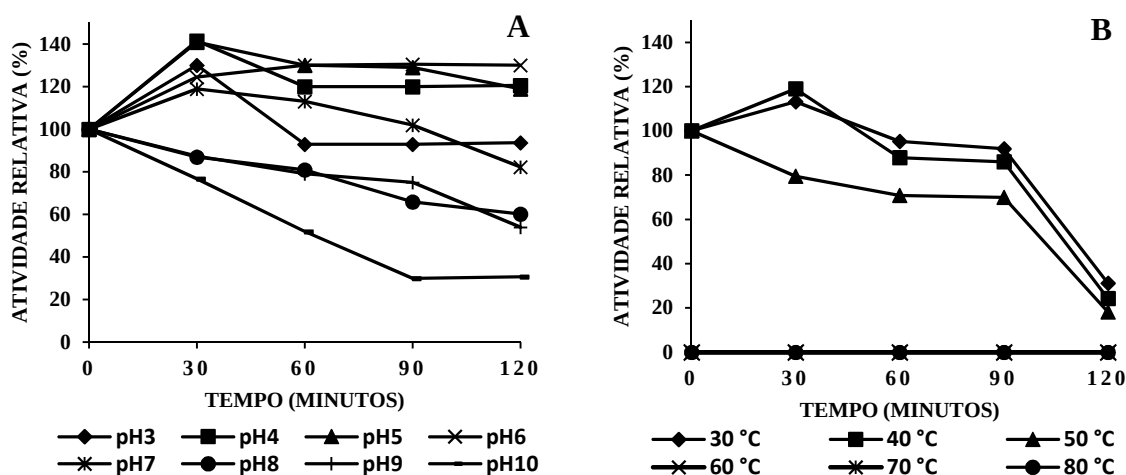


Figura 3. Estabilidade do pH (A) e temperatura °C (B) de protease produzida por *P. albidus* em SA+CC+FA (semente de açaí+exocarpo de cupuaçu+farelo de arroz).

A protease produzida por *P. albidus* em SA+CC+FA (2:1:1 p/p/p) durante 15 dias por fermentação no estado sólido, demonstrou atividade em todas condições de temperatura e pH, todavia no pH 3,0, 4,0 e pH 6,0 as enzimas permaneceram estáveis por 60 a 120 minutos e no pH 5,0 de 60 a 90 minutos, a maior estabilidade foi observada em pH 6,0. Quando a protease foi submetida ao teste de estabilidade entre 30 °C a 80 °C, por até 120 minutos, as enzima se mostraram estáveis entre 60 a 90 minutos de 30 °C a 50 °C, com declínio em 120 minutos de exposição da enzima, já nas temperaturas mais altas não houve atividade (Figura 3).

Alta estabilidade é geralmente considerada uma vantagem econômica por causa da redução do consumo de enzima; portanto, antes de prosseguir para desenvolver formulações contendo enzimas, é necessário acumular informações sobre a estabilidade da enzima em diferentes condições (Gohel & Singh, 2012).

Efeito de inibidores de protease e íons metálicos sobre a atividade enzimática

Os agentes inibidores de protease são componentes que reduzem a medida da taxa de hidrólise de um dado substrato. A tabela 2 demonstra o efeito dos inibidores e o efeito dos íons metálicos na atividade enzimática de *P. albidus*.

A alta redução da atividade das proteases de *P. albidus* foi observada na presença do ácido iodoacético (92%) e EDTA (90%), apontando a predominância de cisteína-potase e metalo-protease. Os extratos brutos de *P. albidus* também proporcionaram redução de 69% da atividade das enzimas na presença dos inibidores PMSF e pepstatin A, indicando serina-protease e aspartil-protease.

Sabotic et al. (2007) obteve resultado semelhante demonstrando predominância de cisteino-protease e metalo-protease em extratos aquosos realizados com *P. ostreatus*. Detectar o tipo de enzima proteolítica presente no extrato significa indicar o compartimento celular no qual a proteinase atuará, e a inibição destas enzimas por inibidores específicos pode constituir uma importante estratégia para a produção de potentes agentes antimicrobiano e aplicação industrial (López, 2010; Sabotic & Kos 2012).

O efeito dos íons metálicos na atividade enzimática de *P. albidus*, demonstraram que a atividade das protease foi inibida por Fe^{2+} (41%), Mg^{2+} , (42%) e Ca^{2+} (48%), sendo aumentada por Cu^{2+} (97%), seguido do Zn^{2+} (95%). Diversas enzimas necessitam da presença de íons, entre as quais estão incluídas as metaloproteases, a exemplo do Zn^{2+} na atividade de carboxipeptidase (Campbell, 2001).

Em certas proteases, como as protease alcalinas, exigem íons metálicos divalentes, como o Ca^{2+} e Mg^{2+} ou a combinação desses cátions para maior atividade. Para protease de *P. albidus*, nas condições experimentais foi observado um percentual de inibição de 48% e 42%, respectivamente, na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Tabela 2. Efeito dos inibidores e íons na atividade enzimática de *Pleurotus albidus*.

Íons	inibição (%)
Controle	100± 0,01
Cu^{2+}	97 ± 2,12
Zn^{2+}	95 ± 1,10
Fe^{2+}	41 ± 0,29
Mg^{2+}	42 ± 1,15
Ca^{2+}	48 ± 1,02
K^{+}	57 ± 2,02
Na^{+}	54 ± 2,40
Ácido iodoacético	92 ± 0,01
EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)	90 ± 0,12
PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila)	69 ± 0,20
Pepstatin A	69 ± 0,14

Conclusão

Pleurotus albidus expressa protease do tipo cisteína e metaloprotease. O pH e a temperatura ótima de atividade das protease foi determinado em pH 6,0, 40 °C e 50 °C, respectivamente. A estabilidade das enzimas se manteve entre 60 a 90 minutos, a 30 °C - 50 °C,

e de 60 a 120 minutos nos pH 3,0, 4,0 e 6,0. Na presença de íons metálicos tais como Cu^{2+} (97%), seguido do Zn^{2+} a atividade da enzima aumentou, enquanto que Fe^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} inibiram a atividade enzimática. Na fermentação no estado sólido, semente de açaí e exocarpo de cupuaçu suplementado com farelo de arroz promoveu a produção de forma significativa das enzimas.

Referencias

CAMPBELL, M. K., 2001. Bioquímica: 196-199. 3 ed. Porto Alegre: Artmed.

CHAIA, A. A., GIOVANNI-DE-SIMONE, S., PETINATE, S. D. G., LIMA, A. P. C. A., BRANQUINHA, M. H. & VERMELHO, A. B., 2000. Identification and properties of two extracellular proteases from *brevundimonas diminuta*. Brazilian Journal of Microbiology. 31:25-29.

CHAUD, L. C. S., ARRUDA, P. V. & FELIPE, M. G. A., 2009. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. Nucleus. 6(2):33-46.

CHEONG, P.; GLARE, T. R.; ROSTÁS, M. & HAINES, S. R., 2016. Measuring Chitinase and Protease Activity in Cultures of Fungal Entomopathogens. Microbial-Based Biopesticides. 1477:177-189.

EISELE, N.; LINKE, D.; NIMTZ, M. & BERGER, R. G., 2011. Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from *Pleurotus ostreatus*. Process Biochemistry. 46(9):1840–1846.

FONSECA, T. R. B, BARRONCAS, J. F. & TEIXEIRA, M. F. S, 2014. Production in solid matrix and partial characterization of proteases of edible mushroom in the Amazon rainforest. Rev. Bras. Tecnol. Ind. 8:1227-1236. (in Portuguese).

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

FREITAS, L.S; MARTINS, E.S. & FERREIRA, O.E., 2014. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. *Rev. Bras. Bioci.* 12(4):226-232.

GOHEL, S. D. & SINGH, S. P., 2012. Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardioopsis alba* OK-5. *Journal Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 889(890):61-8.

GONZÁLEZ, V. M.; TANACA, L. V.; REYES, M.A.A. & FLORES, Y. M., 2016. Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Rev Iberoam Micol.* 33(2):76–82.

GUPTA, V.K.; SHARMA, G.D.; TUOHY, M.G. & GAUR, R., 2016a. *The Handbook of Microbial Bioresources*. CABI.720 pg.

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A. & FILHO, E. X.F., 2016b. Thaddeus Ezeji. *Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass*. *Trends in Biochemical Sciences*. 41(7):633-645.

IANOLO, D., A.PISCITELLI, A., SANNIA, G. & FARACO, V., 2011. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 163(1):40-51.

INÁCIO, F. D.; FERREIRA, R. O.; ARAUJO, C. A. V.; PERALTA, R. M.; BRUGNARI, T.; CASTOLDI, R. & SOUZA, C. G. M., 2015. Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. *BioMed Research International*.1-10

JISHA, V. N., SMITHA, R. B. & PRADEEP, S., 2013. Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*. 1(3):39–51.

LEONHARDT, R. H; KRINGS, U., BERGER, R.G. & LINKE, D., . 2016. Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 39(5):845-53.

- MACHADO, A.R.G; TEIXEIRA, M.F.S; KIRSCH, L.S.; CAMPELO, M.C.L. & OLIVEIRA, I.M.A., 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.
- MATHUR, R.; NAVYA, P. N.; BASAVARAJ, K. & MURTHY, P. S., 2015. Bioprocess of robusta cherry coffee with polyphenol oxidase and quality enhancement. European Food Research and Technology. 240(2):319–325.
- NIRMAL, N. P.; SHANKAR, S. & LAXMAN, R. S., 2011. Fungal proteases: An overview. Internacional Journal of Biotechnology and Biosciences. 1(1):1-40.
- ORLANDELLI, R. C., SPECIAN, V., FELBER, A. C. & PAMPHILE, J. A., 2012. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. SaBios: Rev. Saúde e Biol. 7(3):97-109.
- PUSHPA, S. M. & NAIDU, M. M., 2010. Protease Production by *Aspergillus oryzae* in Solid-State Fermentation Utilizing Coffe By-Products. World Applied Sciences Journal. 8(2):199:205.
- RAVIKUMAR, G., GOMATHI, D., KALAISELVI, M. & UMA, C., 2012. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(1):411–417.
- SABOTIC, J., TRCEK, T., POPOVIC, T., BRZIN, J., 2007. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. J. Biotechnol. 2:297–307.
- SANDHYA, C., SUMANTHA, A., SZAKACS, G. & PANDEY, A., 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. Process Biochemistry. 40:2689-2694.
- SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S. & SWAMINATHAN, K., 2011. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. J Taiwan Inst Chem Eng. 42:298-304.
- SEMENOVAA, T. A., DUNAEVSKYB, Y. E, BELJAKOVAA, G. A., BORISOVC, B. A., SHAMRAICHUKB, I. L. & BELOZERSKY, M. A., 2017. Extracellular peptidases as possible markers of fungal ecology. Applied Soil Ecology. 113:1-10.

SEWALT, V.; SHANAHAN, D.; GREGG, L.; MARTA, J.L. & CARRILLO, R., 2016. The Generally Recognized as Safe (GRAS) Process for Industrial Microbial Enzymes. *Industrial Biotechnology*. 12(5):295-302.

SOUZA, P. M., BITTENCOURT, M. L. A.B., CAPRARA, C. C., FREITAS, M., ALMEIDA, R. P. C., SILVEIRA, D., FONSECA, Y. M., FERREIRA FILHO, E. X., PESSOA JUNIOR, A. & MAGALHÃES, P. O., 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* .46(2):337-346.

VRANOVA, V., REJSEK, K. & FORMANEK, P., 2013. Proteolytic activity in soil: A review. *Applied Soil Ecology*. 70:23–32.

WANI, B. A.; BODHA, R. H. & WANI, A. H., 2010. Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(24):2598-2604.

ZAMBARE, V., 2010. Purification and characterization of neutral serine protease from *Bacillus* sp. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*. 03:183-192.

Capítulo V

Artigo II

QUALIDADE NUTRICIONAL DE MACARRÃO FORTIFICADO COM BIOMASSA DE UMA ESPECIE DE COGUMELO COMESTIVEL

Adrya da S Figueiredo, Maria Francisca S Teixeira; Lorisa S Teixeira; Ana Rita G Machado, Maria da Conceição Loureiro Campelo; Jose Rego, Emerson Silva, Mircella Marialva

Resumo

Os cogumelos comestíveis estão entre os alimentos com alto potencial nutricional e diversificação de uso. Este estudo foi realizado com objetivo de elaborar massas de macarrão fortificadas com biomassa de *P. albidus*. A biomassa desta espécie mostrou capacidade antioxidante em DPPH (68,47 μ g/ml), radical ABTS (93,99 μ g/mL), fenóis totais (79,9 mgEq/g) e flavonóides (14,8 mgEq/g). Não apresentou toxicidade nos testes de hemólise em sangue comercial de carneiro e na avaliação citotóxica em célula de fibroblasto humana. Na qualidade nutricional, a biomassa apresentou teor de carboidratos totais de 60,3%, 36,3% de proteínas, 2,7% de fibra bruta, 0,8% de cinzas, 0,4% de lipídios e 376,3 Kcal. O potássio foi o macromineral mais abundante, seguido de fósforo, enxofre, magnésio, e cálcio com 21,08 g.Kg⁻¹, 10,31 g.Kg⁻¹, 2,08 g.Kg⁻¹, 1,33 g.Kg⁻¹ e 0,26 g.Kg⁻¹, respectivamente. Já entre os microminerais o ferro (131,85 mg.Kg⁻¹) e zinco (95,78 mg.Kg⁻¹) estão em maior quantidade, seguido do boro, sódio, manganês e cobre, 39,48 mg.Kg⁻¹, 33,04 mg.Kg⁻¹, 7,27 mg.Kg⁻¹, e 2,0 mg.Kg⁻¹, respectivamente. Na avaliação da qualidade microbiológica os macarrões elaborados com a biomassa de *P. albidus* foram consideradas seguras para consumo humano. A adição da biomassa elevou o teor de minerais e apresentou um aumento de 53% e 64% de proteínas e fibras, respectivamente, as massas demonstraram qualidade no teste de cozimento e textura, mostrando que a adição de *P. albidus* tem potencial para o desenvolvimento de produto alimentício com qualidades nutricionais.

Palavras-chave: Massa, *Pleurotus albidus*, Qualidade nutricional

ABSTRACT

The increase of world population stimulates diverse studies in the search of alternative food sources. Edible mushrooms are among the foods with high nutritional potential and diversification of use. This study aimed to develop a pasta supplemented with *P. albidus* biomass. The biomass showed antioxidant capacity in DPPH (68.47 $\mu\text{g} / \text{ml}$), ABTS (93.99 $\mu\text{g} / \text{mL}$), total phenols (79.9 mgEq / g) and flavonoids (14.8 mgEq / g). It did not present toxicity in the hemolysis and cytotoxic evaluation in human fibroblast cell tests. In the nutritional quality, the biomass presented total carbohydrate content of 60.3%, 36.3% of protein, 2.7% of crude fiber, 0.8% of ash, 0.4% of lipids and 376.3 Kcal. Potassium was the most abundant macromineral, followed by phosphorus, sulfur, magnesium, and calcium with 21.08 g.Kg^{-1} , 10.31 g.Kg^{-1} , 2.08 g.Kg^{-1} , 1.33 g.Kg^{-1} and 0.26 g.Kg^{-1} , respectively. Among the microminerals, iron (131.85 mg.Kg^{-1}) and zinc (95.78 mg.Kg^{-1}) are higher, followed by boron, sodium, manganese and copper, 39.48 mg.Kg^{-1} , 33.04 mg.Kg^{-1} , 7.27 mg.Kg^{-1} , and 2.0 mg.Kg^{-1} , respectively. In the evaluation of microbiological quality the noodles supplemented with *P. albidus* biomass were considered safe for human consumption. The addition of biomass increased proteins, fiber and mineral content. The noodle also showed quality in the cooking and texture test. The addition of *P. albidus* has potential for development of food products with nutritional qualities.

Keywords: Pasta, *Pleurotus albidus*, Nutritional quality

INTRODUÇÃO

Pleurotus crescem em condições rústicas e tem papel importante na decomposição da matéria orgânica, são conhecidos como fungos de podridão branca, por ação de enzimas clivam celulose, hemicelulose e lignina de resíduos lignocelulósicos causando a degradação desses polímeros (Bernardi et al., 2013; Héctor et al., 2013; Machado et al., 2016).

Espécies de *Pleurotus* estão em segundo lugar no mercado mundial de cogumelos, cresce em regiões tropicais e subtropicais e são cultivados artificialmente sem grandes problemas (Inácio et al., 2015; Bellettini et al., 2016). *Pleurotus* são alimentos ricos em nutrientes, particularmente de proteínas, minerais e vitaminas e sintetizam importantes

moléculas bioativas de interesse medicinal, alimentícia e farmacêutica (Adjapong et al., 2015; Sartori et al., 2015).

Apesar dos cogumelos promoverem benefícios sociais, econômicos e ecológicos, na América Latina a produção é muito reduzida, ocorrendo no México (58,6%), Chile (17,6%) e Brasil (10,6%), representando 86,8% da produção total de cogumelos. Nesses países, predomina a comercialização de produtos frescos e o menor volume na forma processada, com estimativa de consumo *per capita* de aproximadamente 125g/ano (Muhammad e Suleiman, 2015).

Nos últimos anos a demanda crescente por produtos para melhoria da qualidade de vida associada as novas abordagens científicas e biotecnológicas estão incentivando a introdução de alimentos inovadores para consumo humano. Neste contexto, os cogumelos comestíveis tem destaque para elaboração de produtos convencionais pelos seus benefícios multifuncionais (Ulziijargal et al., 2013; Muhammad e Suleiman, 2015).

O aumento da popularidade e a aceitação dos cogumelos como alimentos saudáveis são alternativas que substituem matérias-primas menos nutritivas por outras com qualidades superiores e sem alteração do sabor. Portanto, os cogumelos comestíveis podem ser usados para fortificação de alimentos, condição que atende as exigências para compor dietas saudáveis (Coelho e Salas-Mellado, 2014; Farzana e Mohajan, 2015; Tomicki et al., 2015).

Esta pesquisa teve como objetivo a produção de *P. albidus* para incorporação de sua biomassa em produto de panificação do tipo massas alimentícias e avaliar o efeito de diferentes combinações da massa micelial desidratada do cogumelo sobre a qualidade nutricional das massas elaboradas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Origem e obtenção da cultura matriz do cogumelo

A espécie usada no presente estudo foi *Pleurotus albidus* DPUA 1692, do acervo da Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Amazonas-Brasil.

A cultura matriz foi preparada em BDA+YE [ágar Batata Dextrose suplementado com Extrato de levedura 0,5% (p/v)]. Os cultivos foram incubados a 25 °C, na ausência de luz. Após 7 dias as culturas foram utilizadas para obtenção do inóculo nos grãos de trigo.

Produção de *P. albidus* em resíduo lignocelulósico

O inóculo para produção de *P. albidus* foi preparado em 100g grãos de trigo pré-cozido por 15 minutos. Os grãos foram armazenados em saco de polietileno esterilizado a 121 °C durante 15 min. Após resfriamento, 25 discos miceliais retirados da cultura matriz foram inoculados nos grãos e os cultivos foram incubados a 25 °C, na ausência de luz (Machado et al., 2016). Para produção dos basidiomas de *P. albidus* foi utilizado como substrato suporte os resíduos lignocelulósicos, SA [semente de açaí (*Euterpe oleracea*)]; CC [exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum)] e, como suplemento FA [farelo de arroz (*Oryza sativa*)]. Os grãos colonizados com *P. albidus* foram inoculados nas seguintes misturas de substratos: SA+FA (2:1, p/p); SA+CC+FA (2:1:1, p/p/p); CC+FA (2:1, p/p); CC+SA+FA (2:1:1, p/p/p). Os substratos em sacolas de polipropileno de alta densidade foram esterilizados três dias consecutivos durante 60 minutos, a 121 °C. Em condições assépticas, os cultivos foram realizados em dois ciclos: (1) desenvolvimento do micélio, na ausência de luz até completa miceliação do substrato, em ambiente com umidade ambiental 60%, 25 °C; (2) indução dos corpos de frutificação a 25 °C, com umidade ambiental a 100%, na sala de cultivo. Depois da colheita os basidiomas foram pesados e desidratados em desidratador de ar circulante a 40 °C para posterior análise da composição nutricional.

Avaliação do Efeito Biológico da Biomassa

Preparação dos Extratos

Os extratos brutos da biomassa de *P. albidus* na proporção 1:10 [p/v (basidiomas secos e desidratado/soro fisiológico)] foram preparados em frascos de *Erlenmeyer* de 125 mL mantidos a 30 °C, 180 rpm. Após 30 minutos os extratos foram recuperados por filtração em

tecido de algodão e membrana de polietersulfônica de 0,22 µm para determinação da atividade de toxicidade em sangue comercial de carneiro e em célula (fibroblasto humano).

Atividade hemolítica *in vitro*

Para determinação da atividade hemolítica com sangue de carneiro desfibrinado (Ebefarma[®]), foi preparada suspensão de hemácias 2% (p/p) em soro fisiológico e usado nos experimentos *in vitro* (tubos teste) e no controle (Carneiro et al, 2011). Os extratos recuperados da biomassa do cogumelo foram inicialmente dissolvidos em soro fisiológico, a concentrações de amostra conhecidas. Estas soluções de amostra foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1000 µL de suspensão de hemácias 2%. Os extratos foram avaliados nas seguintes concentrações de 100 a 1000 µL. A atividade hemolítica dos extratos foi avaliada por comparação com os efeitos do controle positivo, Triton X-100 1% (p/p) (Sigma-Aldrich). Como controle negativo foi utilizado soro fisiológico 0,9% (p/v). A leitura foi realizada a 540 nm após 60 minutos e 24 horas para determinação do índice de hemólise. Equação I.

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Absorvância (teste)} - \text{Absorvância (HM)}}{\text{Absorvância (HT)} - \text{Absorvância (HM)}} \times 100 \quad (\text{I})$$

Bioensaio da ação de citotoxicidade em célula

Cogumelo e Condições de Cultivo

Neste estudo foi usado fibroblastos humano (MRC5) 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 mantidas a 37 °C com 5% de CO₂. O modelo de estudo proporcionou a comparação do efeito citotóxico do extrato de cogumelo, em diferentes concentrações, sobre linhagens de fibroblastos humanos (MRC5). A citotoxicidade dos extratos de cogumelos 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 cogumelo 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%. 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.

Determinação da capacidade antioxidante

Os extratos obtidos foram preparado tanto do basidioma desidratado, quanto *in natura*. Procedeu-se à pesagem de 1 g do produto triturado, o qual foi submetido a extração sólido-líquido com 100 mL de solvente. Os solventes utilizados foram: água, água:metanol na proporção 1:1 e metanol, com agitação a 180 rpm durante 1h à temperatura ambiente. Seguidamente, os extratos (aquoso, hidroalcoólico e alcoólico) obtido foi filtrado com papel de filtro Whatman n.º1 em seguida filtrados em membrana de polietersulfônica (0,22 µm). Os extrato obtido foram então utilizados para avaliar a capacidade antioxidante através de diferentes ensaios colorimétricos.

- *Teor de fenólicos totais*

A concentração de fenóis totais foi quantificada pelo método descrito por KIM et al. (2003) com algumas modificações. Inicialmente, em cada poço da placa multipoços foi colocado 10 µL dos extratos numa concentração de 1 mg/mL, mais 50 µL de Folin-Ciocalteu 10% (SIGMA®), código F952-500 mL. Em seguida, as placas foram mantidas no escuro, a temperatura ambiente. Após 8 minutos foi adicionada uma solução saturada de carbonato de sódio 0,4% (ANIDROL®), código A2275 e, incubado novamente por 3 minutos. Em seguida, foi feita a leitura em 620 nm, no Multimode Detetor DTX 800 da Beckman. O teor fenólico das amostras foi expressa em mgEAG, ácido gálico (SIGMA®), código G7384-100G.

- *Teor de flavonóides totais*

Os flavonóides totais foram quantificados pelo método descrito por KUMAR et al. (2008) com modificações. Inicialmente foi adicionado 30 µL do extrato na concentração de 1 mg/mL, incluindo o branco (90 µL de etanol). A primeira leitura foi realizada a 405 nm. Após a leitura adicionou 6 µL de cloreto de alumínio 10%, 6 µL de acetato de potássio, 168 µL etanol nas microplacas e incubadas no escuro, a temperatura ambiente. Após 30 minutos a incubação a leitura foi realizada a 405 nm, no Multimode Detetor DTX 800 da Beckman. O cálculo foi semelhante da quantificação de fenóis totais. O padrão usado foi a quercetina (SIGMA®), código Q4951-10G e os resultados foram apresentados em mgEQ.

- *Atividade sequestrante do radical DPPH*

A atividade sequestrante do radical lipossolúvel DPPH foi realizado segundo metodologia de BURITS e BUCAR (2000) com modificações. Para o testes foi preparada uma solução de 2 µg/mL de DPPH (SIGMA®) com código D9132-5G em etanol. Esta solução foi diluída com etanol até à absorbância do controle (DMSO) de $1,000 \pm 0,1$. Em seguida adicionado nos poços da microplaca 30 µL das amostras e/ou padrão ácido gálico na concentração de 1 mg/mL. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro e feita a leitura em 492 nm, no Multimo de Detetor DTX 800 da Beckman. Os cálculos de inibição, baseado na absorvância do controle foi expresso em µg/mL de extrato. O porcentual de inibição das amostras que foi maior a 50%, foi feito até 8 diluições seriadas para obter o CI_{50} que é interpolado a partir de um gráfico utilizando a percentagem de inibição (eixo Y) em função da concentração (eixo X) do extrato. O padrão foi o ácido gálico (SIGMA®) com código G7384-100G.

- *Atividade sequestrante do radical ABTS*

Para determinar a atividade antirradical ABTS foi seguido o método descrito por JOHN et al. (2014) com pequenas modificação, para possibilitar que o teste fosse realizado com utilização de microplacas de 96 poços. Inicialmente, foi preparada a solução de ABTS (SIGMA®), código

A1888-5G, pela reação de 0,7 mM do radical ABTS dissolvido em 5 mL de água deionizada e adicionado 5 mL de persulfato de potássio 2,4 mM. A microplaca foi incubada em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 12 horas para se obter uma solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Em seguida a solução foi diluída com água deionizada até à absorvância do controle (DMSO) de $1,000 \pm 0,1$, em 620 nm. Em seguida, foi adicionado nos poços da microplaca 30 μ L das amostras, na concentração de 1mg/mL e 270 μ L da solução de ABTS. A microplaca foi incubada por 15 minutos, na ausência de luz, à temperatura ambiente e feita a leitura em Multimode Detetor DTX 800 da Beckman. Os cálculos foram realizados usando a fórmula de inibição. O percentual de inibição das amostras que foram maior a 50%, foi feito até 8 diluições seriadas para obter o CI_{50} que foi interpolado a partir de um gráfico construído utilizando percentagem de inibição (eixo Y) em função da concentração (eixo X) do extrato com um $R = 0,99$.

Preparação do Macarrão

Os basidiomas secos de *P. albidus* foram triturados em processador modelo HC32-BR (Black & Decker®), depois passadas no crivo de malha 60 mesh. Os macarrões foram preparados com 15% (p/p) e 25% (p/p) da biomassa do cogumelo em substituição da farinha de arroz, as misturas possuem os seguintes ingredientes: farinha de arroz (100 g) ovo *in natura* (50 g), goma xantana (3 g) e óleo vegetal (7 mL). Os ingredientes de cada formulação foram misturados em processador até formar uma massa homogênea. As massas incluindo o padrão, depois de amassada, moldada e embaladas em filme de PVC transparente foram deixadas em repouso a 10 °C por 15 minutos. Depois em cada massa foi passado rolo várias vezes até formar uma lâmina lisa e na máquina de macarrão foram cortados os filamentos de macarrão de 5 mm de largura e 1 mm de espessura. Para outras análises, as amostras foram secas a 40 °C no desidratador com circulação de ar, seguido o resfriamento foram embaladas em recipiente de vidro com tampa rosqueável.

Determinação dos atributos de qualidade do macarrão

O teste de cozimento foi realizado segundo o método 16-50 da AACC (2000). E os parâmetros (1), (2) e (3) foram avaliados.

(1) **Tempo de cozimento:** 10 g de cada amostra de macarrão foi colocada em 140 mL de água destilada, em um Becker e submetida à ebulição até atingir a gelatinização do amido em toda a seção da massa, avaliado entre duas placas de vidros, a cada 30 segundos, até o desaparecimento do eixo central;

(2) **Aumento de massa do produto cozido:** determinado considerando a massa de macarrão cozido/ massa macarrão cru x 100 (expresso em %);

(3) **Perda de sólidos solúveis,** determinado em 25 mL na água de cozimento armazenado numa cápsula de vidro com peso conhecido, a 105 °C, em base seca, conforme a equação [(volume de água x resíduos seco)/10/ peso do macarrão cru] x 100. Todos os parâmetros avaliados foram realizados em triplicata.

Textura instrumental

A textura das massas pré-cozidas (2min) foi realizada em um texturômetro TA-XT.PLUS (Stable Micro Systems), analisando-se a firmeza com o corpo de prova (probe) A/LKB-F, conforme método 66-50.01 da AACC (2010).

Qualidade nutricional da biomassa de *P. albidus* e do Macarrão

Avaliação da composição centesimal e minerais

A biomassa de *P. albidus* e as amostras de macarrão foram submetidas à determinação de pH e dos teores de umidade, cinzas, fibras, lipídios, proteínas totais, carboidratos e energia A.O.A.C. (2005). A atividade de água foi determinada por higrômetro marca Bras-Eq, a 25 °C.

A acidez titulável das massas de macarrões foi determinada segundo método padronizado pelas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 2005). Na determinação dos minerais foi utilizado o método citado por Machado et al. (2016). As amostras foram submetidas a digestão ácida em $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (3:1ratio) para determinação de macronutrientes (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Na). O teor de fósforo foi determinado por espectrofotometria com azul de molibdênio e os demais minerais por espectrofotometria de absorção atômica (EAA).

Qualidade Microbiológica do Macarrão

Para avaliar a qualidade microbiológica das amostras de macarrão foi realizada a contagem total de bactérias mesófilas, determinação de coliformes totais e fecais e fungos contaminantes (Silva et al. 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição centesimal

A tabela 1 mostra composição centesimal do basidioma de *P. albidus* DPUA 1692 cultivado na Amazônia brasileira em condições controladas em diferentes resíduos lignocelulolítico (SA+FA; CC+FA; SA+CC+FA; CC+SA+FA). Não houve diferença significativa no teor de proteína da biomassa de *P. albidus*, sendo observado no cultivo SA+FA (36,3%) o maior valor, seguido de CC+FA (33,6%). Este resultado é superior ao registrado para o gênero *Pleurotus* em diferentes resíduos que variam 8,75 a 30,4% g/100 de biomassa (Fonseca et al. 2015; Iqbal et al., 2016). Outro fator importante demonstrado na composição centesimal da espécie estudada foi o baixo teor de lipídeos que variaram de 0,1 a 0,4%. Dados de fibra bruta (3%) e cinzas (1%) são inferiores daqueles relatadas na literatura para o gênero *Pleurotus* [fibra (5 a 51%) e cinzas (1 a 28%)] cultivado nos mais variados meios: serragem, amêndoas, milho, folha de bananeira, casca de mandioca, entre outros (Adebayo e Martinez-Carrera, 2015; Garuba et al., 2017).

Os carboidratos em *P. albidus* foram determinados em maior teor (60,3%) e os valores energéticos variaram de 323 a 376,3 kcal, superior ao encontrado na literatura para cogumelos do mesmo gênero. Fonseca et al. (2015) relata que espécies de *Pleurotus*, como *P. ostreatus*, *P. flabellatus*, *P. sajor-caju* e *P. djamor* apresentam teor médio de carboidratos de 25,69% a 60%, energia total em média 302 a 310 kcal, parâmetros que variam de acordo com a espécie e o substrato de cultivo (Hoa et al., 2015).

Tabela 1. Média da composição centesimal dos basidiomas de *Pleurotus albidus* DPUA.

Parâmetros	<i>P. albidus</i> em diferentes meios de cultivo (g/100g)			
	SA+FA	CC+FA	SA+CC+FA	CC+SA+FA
Umidade	16,1 ± 0.80 ^a	12,2 ± 0.45 ^b	12,2 ± 0.50 ^b	16,0 ± 0.82 ^a
Cinza	0,6 ± 0.02 ^b	0,6 ± 0.08 ^b	0,4 ± 0.04 ^c	0,8 ± 0.01 ^a
Lipídios	0,2 ± 0.02 ^b	0,1 ± 0.02 ^c	0,3 ± 0.05 ^{ab}	0,4 ± 0.06 ^a
Proteína	36,3 ± 1.11 ^a	33,6 ± 1.14 ^a	33,1 ± 1.75 ^a	33,1 ± 0.66 ^a
Nitrogênio	5,6 ± 0.17 ^a	5,2 ± 0.18 ^a	3,9 ± 0.27 ^b	3,4 ± 0.10 ^b
Fibras	2,7 ± 0.03 ^a	1,7 ± 0.09 ^b	1,7 ± 0.14 ^b	1,5 ± 0.25 ^b
Carboidratos	44,1 ± 1.35 ^c	51,8 ± 1.58 ^b	60,3 ± 2.06 ^a	59,1 ± 1.56 ^a
Kcal	323,4 ± 3.23 ^c	342,6 ± 1.64 ^b	376,3 ± 1.42 ^a	372,4 ± 4.42 ^a

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tuke (α= 5%).

SA+FA = Semente de açaí + Farelo de arroz (2:1 p/p); CC+FA= Exocarpo de cupuaçu + Farelo de arroz (2:1 p/p); SA+CC+FA= Semente de açaí + Exocarpo de cupuaçu + Farelo de arroz (2:1:1 p/p/p); CC+SA+FA= Exocarpo de cupuaçu + Semente de açaí + Farelo de arroz (2:1:1 p/p/p).

O teor de minerais também contribui para o valor nutricional dos cogumelos, muitas espécies fornecem quantidade razoável desses elementos quando comparado a diversas espécies de vegetais (Ahmed et al., 2013). Em *P. albidus*, o conteúdo de minerais diferiram na biomassa obtida dos diversos substratos, houve predominância significativa de ferro (131,85%) e zinco (95,78%) nos basidiomas dos cultivos em CC+SA+FA (2:1:1 p/p/p) e SA+CC+FA (2:1:1 p/p/p) e SA+FA (2:1 p/p), respectivamente. Dados para *P. ostreatoroseus* cultivado em exocarpo de cupuaçu misturado com farelo de arroz [CC+FA (2:1 p/p)] foram inferiores 45% e 18%, respectivamente para Fe e Zn (Fonseca et al., 2015). Quanto a outros minerais, como fósforo, potássio, enxofre, boro, cobre e zinco, o teor foi significativo na biomassa dos cultivos

em SA+CC+FA (2:1:1 p/p/p). Com relação ao sódio, a ocorrência foi de 21 a 33,04 mg/, boro foi outro mineral em que o valor encontrado variou de 33% a 39,48% mg Kg⁻¹. Os demais minerais, Ca, Mg, Na e Mn, foram registrados em valores significativos em CC+SA+FA (2:1:1 p/p/p). A diferença nos níveis de minerais nos cogumelos está relacionada a composição dos resíduos utilizados nos cultivos, à acumulação e absorção destes elementos dos substratos e pela tecnologia de cultivo (Gucia et al., 2012; Oyetayo e Ariyo, 2013; Machado et al., 2016). Além disso, os diferentes métodos aplicados para determinação mineral podem ser responsáveis por essa variação (Khan e Tania, 2012).

Nas espécies de cogumelo comercialmente cultivados, o conteúdo de nutrientes é similar aos do tipo selvagens. No entanto, existem diferenças qualitativas e quantitativas no teor de nutrientes dependendo da linhagem, origem e condições de cultivo (Deepalakshmi e Sankaran, 2014; Khani et al., 2017).

Tabela 2. Minerais dos basidiomas de *Pleurotus albidus* DPUA 1692, cultivado em resíduos da agroindústria amazônica.

Nutrientes	Substrato (g/100g)			
	SA+FA	CC+FA	SA+CC+FA	CC+SA+FA
P (g.Kg ⁻¹)	8,31 ± 0,01 ^c	8,00 ± 0,01 ^d	10,31 ± 0,01 ^a	9,36 ± 0,01 ^b
K (g.Kg ⁻¹)	15,08 ± 0,01 ^c	13,12 ± 0,01 ^d	21,08 ± 0,01 ^a	16,66 ± 0,01 ^b
Ca (g.Kg ⁻¹)	0,23 ± 0,01 ^b	0,23 ± 0,01 ^b	0,23 ± 0,01 ^b	0,26 ± 0,01 ^a
Mg (g.Kg ⁻¹)	1,01 ± 0,01 ^c	1,01 ± 0,01 ^c	1,24 ± 0,01 ^b	1,33 ± 0,01 ^a
S (g.Kg ⁻¹)	1,60 ± 0,01 ^c	1,59 ± 0,01 ^c	2,08 ± 0,01 ^a	1,75 ± 0,01 ^b
Na (mg.Kg ⁻¹)	21,02 ± 0,01 ^c	21,00 ± 0,01 ^c	21,09 ± 0,01 ^b	33,04 ± 0,01 ^a
B (mg.Kg ⁻¹)	34,48 ± 0,01 ^c	33,89 ± 0,01 ^d	39,48 ± 0,01 ^a	36,03 ± 0,01 ^b
Cu (mg.Kg ⁻¹)	1,57 ± 0,01 ^c	1,53 ± 0,01 ^d	2,00 ± 0,01 ^a	1,70 ± 0,01 ^b
Fe (mg.Kg ⁻¹)	92,13 ± 0,01 ^b	91,80 ± 0,01 ^c	92,13 ± 0,01 ^b	131,85 ± 0,01 ^a
Mn (mg.Kg ⁻¹)	6,79 ± 0,01 ^b	6,79 ± 0,01 ^b	6,79 ± 0,01 ^b	7,27 ± 0,01 ^a
Zn (mg.Kg ⁻¹)	95,78 ± 0,01 ^a	95,59 ± 0,01 ^b	95,78 ± 0,01 ^a	77,01 ± 0,01 ^c

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tuke (α= 5%).

SA+FA = Semente de açaí + Farelo de arroz (2:1 p/p); CC+FA= Exocarpo de cupuaçu + Farelo de arroz (2:1 p/p); SA+CC+FA= Semente de açaí + Exocarpo de cupuaçu + Farelo de arroz (2:1:1 p/p/p); CC+SA+FA= Exocarpo de cupuaçu + Semente de açaí + Farelo de arroz (2:1:1 p/p/p).

Dosagem de Fenóis Totais e Flavonóides

Fenóis e flavanóides foram encontrados nos extratos dos basidiomas secos e *in natura* de *P. albidus* (Tabela 3). A média do quantitativo de fenóis (69,36 mg EAG/g de extrato) e flavanóides (8,92 mg EQ/g) foi superior 87,16% e 42,15%, respectivamente, nos extratos extraídos dos basidiomas secos quando comparado aos fenóis (8,91 mg EAG/g extrato) e flavanóides (3,76 mg EQ/g extrato) dos basidiomas *in natura*. Silva et al. (2009) cita que, o processo desidratação, extração e composição do substrato contribuem para a maximização do rendimento de biocompostos.

A tabela 3 mostra também que o rendimento significativo de fenóis totais foi determinado nos extratos hidroalcoólico e aquoso (79,9, 71,4 mg EAG/g de extrato), ambos extraídos dos basidiomas seco. Resultado oposto foi observado para o conteúdo de flavanóides, o valor significativo foi determinado no extrato aquoso e hidroalcoólico, 14,77 mg EQ/g de extrato e 11,33 mgEQ/g de extrato, respectivamente. Conforme dados da literatura, o teor de fenóis totais e flavanóides para o gênero *Pleurotus* são diferenciados entre espécies (Arbaayah et al., 2013; Vamanu, 2014; Rezaeian et al 2015).

Os polifenóis são constituídos por várias classes de substâncias com ação antioxidante, tendo destaque os ácidos fenólicos e os flavonóides. A atividade antioxidante desses compostos está associada às propriedades redutoras.

Todavia a diferença da intensidade da atividade antioxidante desses compostos depende basicamente do número e posição das hidroxilas na molécula. Nos cogumelos comumente os polifenóis expressam atividade antioxidante que promovem benefícios a saúde humana (Stefanello et al., 2015; Orsine et al., 2014; Heleno et al., 2015).

Tabela 3. Quantitativo de fenóis e flavanóides extraídos dos basidiomas secos e *in natura* de *Pleurotus albidus*.

Extrato	Contéudo (mg/g de extrato)	
	Fenóis (EAG)	Flavonoides (EQ)
Extrato aquoso do badioma seco (água)	71,39 ± 2,05 ^b	14,77 ± 7,68 ^a
Extrato hidroalcoólico do badioma seco (água:metanol 1:1)	79,89 ± 0,87 ^a	11,33 ± 6,05 ^{ab}
Extrato alcoólico do badioma seco (metanol)	57,82 ± 1,37 ^c	0,64 ± 2,32 ^c
Extrato aquoso do badioma <i>in natura</i> (água)	24,03 ± 1,05 ^f	3,56 ± 1,25 ^{abc}
Extrato hidroalcoólico do badioma <i>in natura</i> (água:metanol 1:1)	53,06 ± 1,68 ^d	1,38 ± 4,17 ^{bc}
Extrato alcoólico do badioma <i>in natura</i> (metanol)	36,03 ± 2,23 ^e	6,34 ± 1,59 ^{abc}

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo Teste de Tuke (α= 5%).
EAG = equivalentes de ácido gálico; EQ = Equivalente de Quercitina.

Atividade Antioxidante

Em todos os extratos da biomassa seca e *in natura* de *P. albidus* foi observada a atividade antioxidante pelo método DPPH (Tabela 4).

O valor significativo (68,47%) foi determinado no extrato hidroalcoólico originário do basidioma seco. O segundo maior valor de atividade antioxidante (53,45%) também foi determinado na mesma biomassa, mas no extrato alcoólico. Dados da literatura revelam que no gênero *Pleurotus* a inibição de antioxidantes varia de 14 a 69% (Lam e Okello, 2015; Corrêa et al., 2016; Prabu e Kumuthakalavalli, 2016).

Para os extratos hidroalcoólico e metanólico do basidioma seco, a quantidade de extrato necessário para reduzir o radical DPPH em 50% (IC₅₀) foi 54,00 µg/mL e 94,33 µg/mL, respectivamente. Estes resultados de IC₅₀ foram superiores comparados aos dados de Gambato

et al. (2016), ao avaliar pelo método de DPPH compostos do basidioma de *P. albidus* extraídos em etanol 70%, cuja IC₅₀ foi 3,50 mg/mL.

Na avaliação feita pelo método ABTS, a atividade antioxidante significativa foi observada no extrato hidroalcoólico e aquoso, valor superior 28,58% em relação aos valores de atividade determinados pelo método DPPH (Tabela 4), provavelmente as substâncias presentes nos extratos são do tipo hidrofílicas, visto que o ABTS responde melhor a compostos mais hidrofílicos, enquanto que o DPPH responde melhor a compostos hidrofóbicos (Christodouleas et. al., 2015; Moo-Huchin et al., 2015).

Neste contexto, os valores de IC₅₀ revelaram a eficiência antioxidante de *P. albidus* nas condições de análise e, dos extratos analisados, o hidroalcoólico foi o de maior eficiência antioxidante. Dentre os extratos do basidioma *in natura*, no extrato hidroalcoólico o teor antioxidante equivaleu a 57,11 µg/mL (IC₅₀ 32,23 µg/mL).

Tabela 4. Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH e ABTS dos extratos de *Pleurotus albidus*.

Extrato	Contéudo (µg/mL de extrato)			
	DPPH	CI ₅₀	ABTS	CI ₅₀
Extrato aquoso do badioma seco (água)	42,47 ± 1,28 ^c		93,99 ± 0,19 ^a	24 ± 0,21
Extrato hidroalcoólico do badioma seco (água:metanol 1:1)	68,47 ± 1,26 ^a	54 ± 3,00	95,87 ± 0,22 ^a	21 ± 0,77
Extrato alcoólico do badioma seco (metanol)	53,45 ± 2,06 ^b	94 ± 3,05	77,56 ± 3,24 ^b	33 ± 2,77
Extrato aquoso do badioma <i>in natura</i> (água)	3,67 ± 0,69 ^e		42,29 ± 1,03 ^d	
Extrato hidroalcoólico do badioma <i>in natura</i> (água:metanol 1:1)	27,54 ± 1,49 ^d		57,11 ± 1,22 ^c	32 ± 2,33
Extrato alcoólico do badioma <i>in natura</i> (metanol)	23,71 ± 1,38 ^d		37,64 ± 2,60 ^d	

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl); ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

Qualidade nutricional do macarrão com biomassa de cogumelo

A tabela 5 mostra a composição centesimal das massas alimentícias, macarrão elaborado com 15% e 25% de biomassa de *P. albidus*, e produto padrão (sem cogumelo) (Figura 1).

As massas de macarrão elaboradas com o cogumelo, predominantemente, apresentaram característica de acordo com a concentração de biomassa adicionada no produto final e dentro dos padrões determinados pela RDC nº 93 (Brasil, 2000). Este documento determina que massa de macarrão fresca devam apresentar umidade 35% e cinzas 2,5%. O macarrão adicionado de *P. albidus* apresentou 35% umidade e o valor significativo de cinza foi 2,1%, valores que atendem as exigências da legislação brasileira. Valor inferior de umidade foi encontrado por Maluf et al. (2010) na massa de macarrão fresca enriquecida com pacu (*Piaractus mesopotamicus*) defumado (32,37%). Aquino et al. (2008), avaliando a composição centesimal de três formulações de macarrão fresco, elaborado com ovo de avestruz desidratado, encontrou valores semelhantes aos obtidos nesta pesquisa (35%), parâmetros máximos permitidos pela legislação em massa fresca.

Os demais parâmetros avaliados nas massas alimentícias foram cinza, lipídio, proteína, fibra alimentar, carboidrato e o valor calórico, cujos valores variaram de 1,9 a 2%; 4,4 a 6,0%; 8,5 a 13,0%; 41 a 48% e o valor calórico 267 a 275%, respectivamente. Entre estes parâmetros os quantitativos de cinzas e lipídios em cinco amostras de macarrão estão próximos ou iguais aos do padrão, somente em uma amostra de macarrão (M1) com biomassa de *P. albidus* 15% (p/p), que os lipídios foram reduzidos em 38,63% (Tabela 2). Comparado ao produto padrão, resultados relevantes foram observados em relação aos teores de proteínas e fibras, que ao se adicionar a biomassa de *P. albidus* foi registrado aumento de 29 para 53% e de 45 para 64% respectivamente. Entre os macarrões, o valor significativo de proteína foi observado na amostra com 25% (p/p) de biomassa de cogumelo o qual cresceu em M2. O aumento no teor de proteína é importante, pois proporciona uma melhor qualidade do cozimento do macarrão (Chang e Flores, 2004).

Outro dado relevante observado nesta invenção foi a redução do teor de carboidrato em torno de 6 a 15%, assim como, o valor calórico entre 2 a 5%. Provavelmente a redução desses parâmetros esteja associada ao efeito do substrato utilizado para o crescimento de *P. albidus*,

ou seja, a resposta fisiológica e bioquímica dos fungos é diretamente expressa em função dos nutrientes disponíveis para absorção e durante o ciclo biológico do cogumelo (Inácio et al., 2015; Semenova et al., 2017).



Figura 1. A. Macarrão padrão; B. Macarrão fortificado com 15% (p/p) de biomassa de cogumelo; C. Macarrão fortificado com 25% (p/p) de biomassa de cogumelo.

Tabela 5. Composição centesimal do macarrão contendo biomassa de cogumelo 15 e 25% (p/p) e o macarrão padrão.

Parâmetros (%)	Massa de Macarrão						
	Padrão	Biomassa de cogumelo (%)					
		Amostra M1		Amostra M2		Amostra M3	
		15%	25%	15%	25%	15%	25%
Umidade	34.7± 1.01 ^a	35± 0.54 ^a	34.9± 0.54 ^a	35.5± 0.35 ^a	35.2± 0.85 ^a	35± 2.20 ^a	35.1± 0.74 ^a
Cinzas	1.9 ± 0.04 ^d	2.0± 0.03 ^{bc}	1.9± 0.05 ^d	2.0± 0.03 ^{bc}	2.1± 0.00 ^a	1.9± 0.02 ^{cd}	2.0± 0.06 ^b
Lipídios	6.1 ± 0.09 ^a	4.4± 0.08 ^a	5.8± 0.05 ^a	5.9± 1.40 ^a	6.0± 0.45 ^a	5.8± 2.16 ^a	5.6± 0.44 ^a
Nitrogênio	1.4 ± 0.16 ^d	1.9± 0.17 ^a	1.9± 0.22 ^a	1.7± 0.05 ^c	2.0± 0.05 ^a	1.8± 0.12 ^b	2± 0.15 ^a
Proteína (N x 6,25)	8.5 ± 1.02 ^d	12± 1.05 ^b	12± 1.39 ^b	11± 0.29 ^c	13± 0.30 ^a	11.5± 0.74 ^c	12.4± 0.91 ^b
Fibras	1.1 ± 0.04 ^d	1.6 ± 0.07 ^c	1.8± 0.00 ^a	1.6± 0.09 ^c	1.8± 0.13 ^a	1.7± 0.07 ^b	1.8± 0.00 ^a
Carboidratos	48 ± 0.20 ^a	45± 1.46 ^b	44± 1.13 ^c	44± 1.59 ^c	41± 1.42 ^d	44± 3.69 ^c	43± 1.19 ^c
Valor Calórico (kcal)	280± 3.70 ^a	267± 2.02 ^d	275± 2.14 ^b	272± 5.59 ^c	274± 2.16 ^b	275± 2.04 ^b	272± 4.61 ^c

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha=5\%$). M1: Biomassa de cogumelo produzido em semente de açaí com farelo de arroz [SA+FA (2:1 p/p)]; M2: Biomassa de cogumelo produzido em exocarpo de cupuaçu, semente de açaí com farelo de arroz [CC+SA+FA (2:1:1 p/p/p)]; M3: Biomassa de cogumelo produzido em semente de açaí, exocarpo de cupuaçu com farelo de arroz [SA+CC+FA (2:1:1 p/p/p)]

As respostas para os macrominerais (g.Kg^{-1}) e microminerais (mg.Kg^{-1}) das sete formulações de macarrão isentos de glúten, incluindo o padrão, estão descritas na tabela 6.

O teor de ferro das formulações de macarrões foi de $45,79 \text{ mg Kg}^{-1}$ para amostra padrão e de 48 a $65,74 \text{ mg Kg}^{-1}$ nas amostras adicionada de biomassa de cogumelo, apresentando um aumento de 30,35%. Este dado mostra que, quanto maior o percentual da biomassa de cogumelo (25% p/p) nas amostras teste, maior é o teor de ferro, isto demonstra que o cogumelo é uma matéria prima que agrega maior aporte desse mineral ao produto final.

Os dados revelam ainda que o zinco quando comparados com o produto padrão (28 mg.Kg^{-1}), teve aumento significativo de 51,43% no macarrão adicionado de 15% com biomassa de cogumelo cultivado em M1. O zinco entra na constituição de numerosas enzimas que catalisam importantes reações no nosso organismo, afeta o comportamento e a aprendizagem, auxilia na função imunológica, e é essencial para a cicatrização de feridas, produção de esperma, percepção do gosto, desenvolvimento fetal, e crescimento e desenvolvimento da criança (Sizer e Whitney, 2003).

O teor de boro, quando comparado com o produto padrão, teve um aumento significativo de 53 a 74%, esse mineral é essencial para saúde, previne a perda de cálcio e a desmineralização óssea, o boro está presente em alimentos, em particular em nozes, frutas e vegetais verdes (Nielsen, 2014).

O teor de cobre houve diferença significativa na amostra adicionada de 15% de biomassa de cogumelo cultivado em M2 ($3,44 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Quanto ao teor de sódio e manganês, os macarrões teste apresentaram valores de sódio semelhante ao da amostra padrão e o Mn foi o único micromineral a apresentar teor superior na amostra padrão.

Os macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) dos macarrões padrão e teste, descritos na tabela 6, demonstram aumento no teor desses minerais nos macarrões elaborados com biomassa de cogumelo, com exceção do Mg, que apresentou valor ligeiramente superior na amostra padrão, porém sem valor significativo. Estes resultados demonstram que ao elaborar a massa de macarrão, sem glúten, adicionando em sua formulação a biomassa do cogumelo *P. albidus*, as características nutricionais foram melhoradas tornando uma alternativa de alimento saudável principalmente aos portadores de enteropatia.

Tabela 6. Determinação de macro e microminerais das amostras de macarrão padrão e teste.

	Padrão	Teste					
		Biomassa de Cogumelo					
		Amostra M1		Amostra M2		Amostra M3	
	MP	15%	25%	15%	25%	15%	25%
P (g.Kg ⁻¹)	5,13± 0.01 ^d	5,64± 0.01 ^{bc}	5,47± 0.01 ^c	5,76± 0.01 ^b	6,16± 0.01 ^a	5,53± 0.01 ^{bc}	5,17± 0.01 ^d
K (g.Kg ⁻¹)	4,4± 0.01 ^f	5,15± 0.01 ^e	5,78± 0.01 ^d	6,22± 0.01 ^c	8,04± 0.01 ^a	5,7± 0.01 ^d	6,84± 0.01 ^b
Ca (g.Kg ⁻¹)	0,8± 0.01 ^b	0,96± 0.01 ^{ab}	0,82± 0.01 ^a	0,85± 0.01 ^b	1,01± 0.01 ^{ab}	0,81± 0.01 ^b	1,2± 0.01 ^b
Mg (g.Kg ⁻¹)	1,86± 0.01 ^a	1,72± 0.01 ^a	1,59± 0.01 ^a	1,83± 0.01 ^a	1,67± 0.01 ^a	1,79± 0.01 ^a	1,59± 0.01 ^a
S (g.Kg ⁻¹)	0,71± 0.01 ^b	1,18± 0.01 ^a	1,13± 0.01 ^a	0,99± 0.01 ^a	1,04± 0.01 ^a	1,04± 0.01 ^a	0,97± 0.01 ^{ab}
Na (mg.Kg ⁻¹)	670± 0.01 ^a	563± 0.01 ^a	575± 0.01 ^a	597± 0.01 ^a	476± 0.01 ^a	545± 0.01 ^a	633± 0.01 ^a
B (mg.Kg ⁻¹)	0,95± 0.01 ^d	3,64± 0.01 ^a	3,31± 0.01 ^b	2,01± 0.01 ^c	2,01± 0.01 ^c	3,07± 0.01 ^b	3,07± 0.01 ^b
Cu (mg.Kg ⁻¹)	2,96± 0.01 ^b	2,81± 0.01 ^{bc}	2,62± 0.01 ^{cd}	3,44± 0.01 ^a	2,37± 0.01 ^d	2,59± 0.01 ^{cd}	2,55± 0.01 ^{cd}
Fe (mg.Kg ⁻¹)	45,79± 0.01 ^g	55,71± 0.01 ^d	60,69± 0.01 ^b	52,47± 0.01 ^e	65,74± 0.01 ^a	48,06± 0.01 ^f	59,44± 0.01 ^c
Mn (mg.Kg ⁻¹)	49,17± 0.01 ^a	43,26± 0.01 ^b	41,03± 0.01 ^d	41,95± 0.01 ^c	36,21± 0.01 ^g	39,09± 0.01 ^e	37,28± 0.01 ^f
Zn (mg.Kg ⁻¹)	28± 0.01 ^f	47,65± 0.01 ^a	34,21± 0.01 ^d	31,27± 0.01 ^e	35,52± 0.01 ^c	34,42± 0.01 ^d	37,36± 0.01 ^b

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha=5\%$). M1: Biomassa de cogumelo produzido em semente de açaí com farelo de arroz [SA+FA (2:1 p/p)]; M2: Biomassa de cogumelo produzido em exocarpo de cupuaçu, semente de açaí com farelo de arroz [CC+SA+FA (2:1:1 p/p/p)]; M3: Biomassa de cogumelo produzido em semente de açaí, exocarpo de cupuaçu com farelo de arroz [SA+CC+FA (2:1:1 p/p/p)]

Valores de pH e atividade de água (a_w) do Macarrão

A tabela 7 demonstra valores de pH, acidez total titulável e atividade de água das amostras de macarrão padrão e teste. Em todas as amostras de massa de macarrão adicionadas com a biomassa de cogumelo, a atividade de água foi inferior a 0,51 e, os valores pH variaram de 6,5 a 6,8, resultados estes satisfatórios para o produto, níveis baixos de pH com valor médio de 3,5 a 5,5 foi descrito por Garcia et al. (2016) ao elaborar macarrão isentos de glúten substituindo a farinha de arroz por farinha de casca jabuticaba 15% e 30% e por Ferreira et al. (2016) ao usar sorgo, arroz, farinhas de milho com amido de batata para a preparação de macarrão sem glúten. A atividade de água (a_w) e o pH também são características intrínsecas dos alimentos que interferem no desenvolvimento microbiano (Jay, 2005; Damodaran et al., 2010; Resta e Oliveira, 2013). O percentual da acidez total titulável das massas de macarrões elaboradas com biomassa de cogumelo foram de 4%, enquanto o macarrão padrão foi de 2%, estes resultados demonstraram que os produtos elaborados estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente (Brasil, 2001).

Tabela 7. Análise do pH e atividade de água de macarrão padrão e teste.

Macarrão	pH	Acidez total titulável (%)	Atividade de água (a_w)
Padrão	6,8	2%	0,4143
M1 - 15%	6,8	4%	0,5035
M1 - 25%	6,5	4%	0,4427
M2 - 15%	6,7	4%	0,4449
M2 - 25%	6,5	4%	0,4277
M3 - 15%	6,5	4%	0,4743
M3 - 25%	6,5	4%	0,4410

M1: Biomassa de cogumelo produzido em semente de açaí com farelo de arroz [SA+FA (2:1 p/p)]; M2: Biomassa de cogumelo produzido em exocarpo de cupuaçu, semente de açaí com farelo de arroz [CC+SA+FA(2:1:1 p/p/p)]; M3: Biomassa de cogumelo produzido em semente de açaí, exocarpo de cupuaçu com farelo de arroz [SA+CC+FA (2:1:1 p/p/p)]

Qualidade dos macarrões fortificados com *Pleurotus albidus*

Os resultados do teste de cozimento (tempo de cozimento, aumento de peso e perda de resíduos sólidos) estão citados na tabela 8. Um dos parâmetros de qualidade de maior importância para os consumidores de massa de macarrão é o comportamento das massas alimentícias durante e após o cozimento. Os resultados obtidos nas análises de cozimento dos macarrões mostraram que o maior tempo (8,5 minutos) foi para a massa fresca preparada com biomassa de cogumelo 25% (p/p), produzida no resíduo formulado com M3. Os demais macarrões tiveram um tempo de cozimento de 6 e 7 minutos, independente do resíduo e da concentração utilizado para crescimento do cogumelo. O tempo de cozimento demorado influência de forma direta na textura e também contribui para a qualidade da massa, ou seja, o produto pode se apresentar brando e viscoso. Dessa forma pode se inferir que a proteína presente na biomassa do cogumelo proporcionou a consistência e a elasticidade, tendo assim papel fundamental na aparência e textura do macarrão.

Os macarrões elaborados nesta pesquisa (tabela 8) apresentaram o aumento do peso de 200% a 288%. O aumento de volume define o rendimento das massas alimentícias, parâmetro cujo aumento adequado está na faixa de 200 a 300% (Hummel, 1966). Nesta pesquisa, o macarrão que apresentou aumento de volume significativo foi aquele contendo 25% de biomassa de cogumelo cultivado em M1, esse aumento significativo é importante visto que o baixo aumento de massa indica baixa capacidade de absorção de água, resultando em macarrões mais duros e com qualidade inferior.

Os valores encontrados na determinação das perdas de sólidos solúveis mostraram que os macarrões elaborados com biomassa de cogumelo perderam entre 2% a 5,2% e, o produto padrão uma perda de 4,0% de sólidos. 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 característicos 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 de cozimento e baixa tolerância ao cozimento (Bhattacharya et al., 1999).

O percentual de perda de sólidos em água e o aumento de peso da massa são dois fatores importantes, que influenciam na qualidade das massas alimentícias. O macarrão elaborado com

biomassa de cogumelo tem características organolépticas de qualidade por apresentarem baixa perda de sólido e aumento significativo no peso da massa após cozimento.

Tabela 8. Características relacionadas com a cocção dos macarrões padrão e adicionadas de biomassa de cogumelo.

Macarrão	Tempo de cozimento (min)	Aumento de peso (%)	Sólidos Solúveis (%)
Padrão	5,0±0.02 ^c	200±0.05 ^d	4,0±0.02 ^a
M1 - 15%	6,0±0.05 ^b	262±0.03 ^b	4,0±0.02 ^a
M1 - 25%	7,0±0.04 ^b	288±0.10 ^a	5,2±0.02 ^a
M2 - 15%	6,0±0.05 ^b	238±0.12 ^c	2,0±0.02 ^b
M2 - 25%	7,0±0.02 ^b	226±0.09 ^c	5,0±0.02 ^a
M3 - 15%	7,0±0.07 ^b	205±0.09 ^d	5,2±0.02 ^a
M3 - 25%	8,5±0.02 ^a	202±0.10 ^d	2,6±0.02 ^b

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

M1: Biomassa de cogumelo produzido em semente de açaí com farelo de arroz [SA+FA (2:1 p/p)]; M2: Biomassa de cogumelo produzido em exocarpo de cupuaçu, semente de açaí com farelo de arroz [CC+SA+FA (2:1:1 p/p/p)]; M3: Biomassa de cogumelo produzido em semente de açaí, exocarpo de cupuaçu com farelo de arroz [SA+CC+FA (2:1:1 p/p/p)]

A qualidade da massa cozida é diretamente influenciada pela formação da rede protéica e pela gelatinização do amido das farinhas de trigo. As várias qualidades de textura e de cozimento desses produtos estão relacionadas às propriedades desses dois biopolímeros quando expostos em água (Li et al. 2014). Os resultados mostraram que a substituição da farinha de arroz por 15% e 25% de biomassa de cogumelo teve um efeito positivo na textura, resultando nos valores de firmeza de 126,27 g.f. e 116,25 g.f, respectivamente. Alguns autores relatam que o teor de proteína incorporado as massas está diretamente relacionado à firmeza da massa cozida (Sarawong et al., 2014; Larrosa et al. 2016). Outros que a firmeza das massas é significativamente correlacionada com a perda de cozimento (Kim e Wiesenborn 1996). O que explica a pequena redução de firmeza ao se adicionar 25% da biomassa de *P. albidus*, produto onde houve maior perda de sólidos solúveis durante o cozimento.

A figura 2 ilustra o equilíbrio entre as propriedades mecânicas no produto padrão e no fortificado com biomassa de cogumelo em diferentes concentrações (15% e 25% p/p), resultados confirmaram a similaridade da textura dos macarrões teste com o macarrão padrão, característica que demonstra que a biomassa do cogumelo pode ser facilmente incorporados na matriz deste alimento. A utilização da biomassa do cogumelo permitiu desenvolver uma massa de macarrão com qualidade e textura de cozimento aceitáveis, atendendo, portanto, às expectativas dos consumidores por alimentos inovadores.

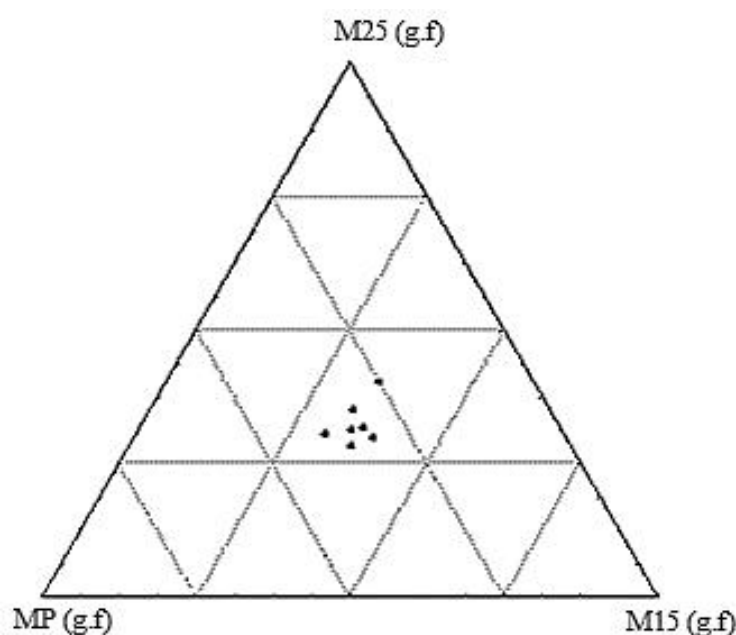


Figura 2. Gráfico ternário da relação entre as propriedades mecânicas do macarrão padrão (MP) com os macarrões acrescidos de biomassa de cogumelo a 15% (M15) e 25% (M25)

Qualidade microbiológica

Quando avaliado a qualidade microbiológica do produto, dados apresentarem condições higiênico-sanitárias satisfatórias, uma vez que os valores obtidos estão abaixo dos padrões exigidos na legislação vigente, indicando que a matéria-prima e o macarrão foram processados em condições adequadas onde apresentou ausência de *Salmonella* sp., baixa população de bolores e leveduras encontrada, com valores <1 para coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C e <2 para *Bacillus cereus*, atendendo, portanto, à legislação vigente (BRASIL, 2001). Os padrões microbiológicos para massas alimentícias incluem limites para *Bacillus cereus* (5×10^3

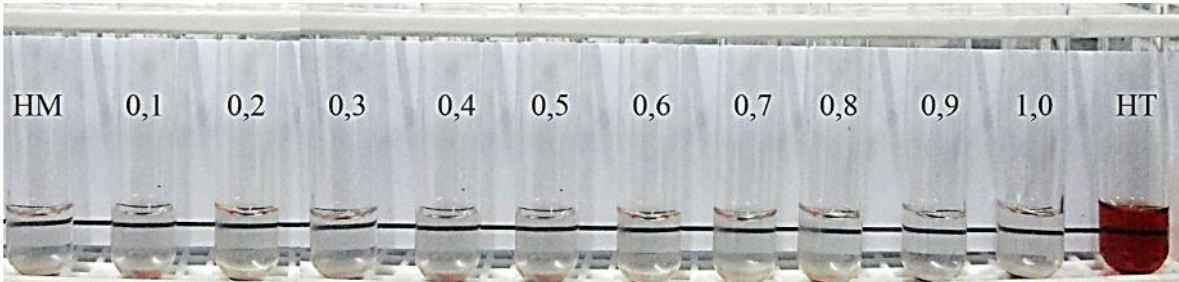
UFC/g), Coliformes a 45 °C (102 UFC/g), *Salmonella* sp. (Ausência em 25 g) e *Estafilococos* Coagulase Positiva (5×10^3 UFC/g) (Brasil, 2001). Os dados demonstram, que a utilização da biomassa do cogumelo analisadas com segurança enquanto ingredientes, torna o produto viável para consumo humano.

Ação citotóxica em sangue comercial de carneiro

A tabela 7 e a figura 4 mostram que o extrato bruto da biomassa de *P. albidus* em sangue de carneiro desfibrado comercial não apresentou atividade hemolítica. Dados da literatura revelam que espécies de *Pleurotus* sintetizam hemolisinas, como as ostreolisinas que são proteínas citadas como agentes hemolíticos, mas são termolábeis e, geralmente degradadas no trato gastrointestinal. Berne et al (2007) relata que essas proteínas não atuam como toxinas, são sintetizadas e excretadas, atuando no ciclo de desenvolvimento dos cogumelos.

Tabela 9. Atividade hemolítica do extrato bruto da biomassa de *Pleurotus albidus* em sangue de carneiro comercial.

C-	Extrato proteolítico de <i>Pleurotus albidus</i> (mL)										C+
HM	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	HT
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++++



C - controle negativo (solução salina) e C+ controle positivo (tritonx -100 a 1%), HM (hemólise mecânica) e HT (hemólise total). Graus de hemólise: 0= negativo; + = muito fraco; ++ = fraco; +++ = moderado e ++++ = total (controle positivo)

Bioensaio da ação de citotoxicidade em célula

A Figura 3 mostra a exposição do extrato de *P. albidus* em células de fibroblasto humano. Com resultados obtidos foi observado que não houve a presença de citotóxicos, demonstrando que *P. albidus* apresenta viabilidade celular de 100%. A avaliação da citotoxicidade é parâmetro importante por permitir compreender o mecanismo biológico que produz o efeito citotóxico e o mecanismo de ação de diferentes substâncias durante a sua interação com os tecidos (Marreiro et al., 2014).

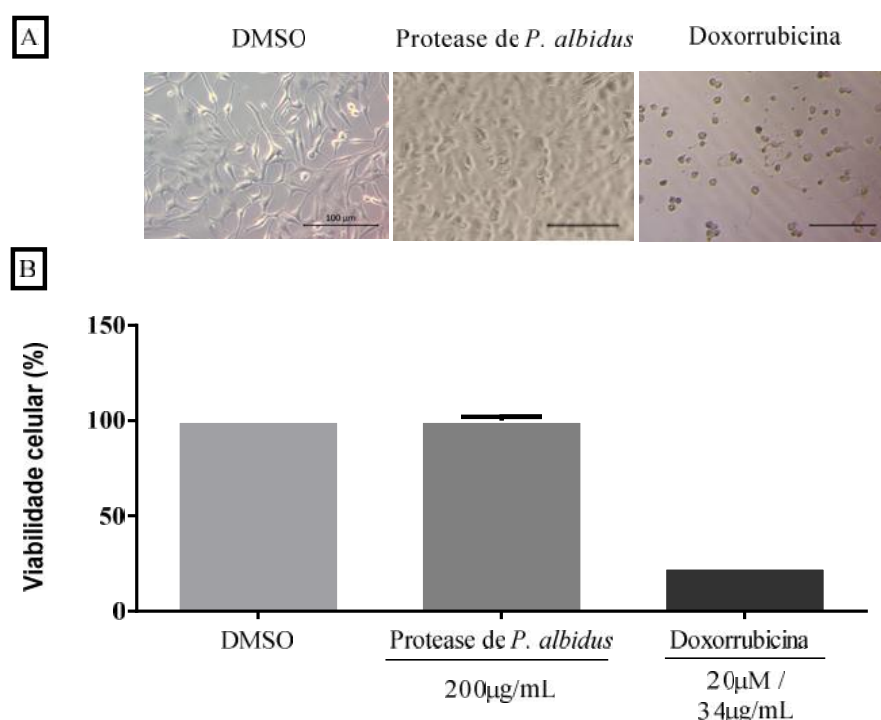


Figura 3. Efeito do *Pleurotus albidus* após 72h de tratamento em cultura de MRC5 pelo método de Alamar Blue™.

Conclusão

Os dados desta pesquisa demonstraram que *Pleurotus albidus* cultivado nos substratos exorcapo de cupuaçu, semente de açaí e farelo de arroz apresentou a melhor composição nutricional dentre todas as combinações utilizadas. O extrato bruto obtido não foi tóxico frente a sangue de carneiro comercial e a fibroblastos humanos. Na atividade antioxidante, expressou atividade de fenóis totais e flavonóides e captura de radicais DPPH e ABTS. Os macarrões desenvolvidos com a incorporação da biomassa de *P. albidus* demonstraram aumento dos

conteúdos de proteínas, fibras e minerais e redução dos teores de carboidratos e valor energético total. As características de qualidade no cozimento e textura foram mantidas quando comparadas ao macarrão padrão e as condições microbiológicas foram consideradas seguras. Portanto, o uso da biomassa de *P. albidus* é promissora fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de produtos alimentícios com valor nutricional agregado, contribuindo no desenvolvimento de tecnologia de processamento comercial para a utilização deste cogumelo na indústria alimentícia, especialmente na fabricação de massas de macarrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC (2000). Approved methods of analysis. 10th ed. American Association of Cereal Chemists, AACC International, St. Paul, MN,

AOAC (2005). Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists International, 18th ed.. Maryland: AOAC International.

AACC (2010). American Association of Cereal Chemists International Approved Methods of Analysis, 11th ed. Minnesota: AACC.

Adebayo EA, Martinez-Carrera D (2015). Oyster mushroom (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. *African Journal of Biotechnology*, 14(1):52-67.

Adjapong AO, Ansah KD, Angfaarabung F, Sintim HO (2015). Maize Residue as a Viable Substrate for Farm Scale Cultivation of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Advances in Agriculture*.

Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JEA (1994). New rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods*, 70(2):211-24.

Ahmed M, Abdullah N, Ahmed KU, Bhuyan MHM (2013). Yield and nutritional composition of oyster mushroom strains newly introduced in Bangladesh. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(2), 197-202.

Aquino JDS, Silva JAD, Prado JP, Cavaleiro, JMDO (2008). Análise dos constituintes de gema de ovo de avestruz desidratada por meio de duas metodologias de secagem. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 67(3), 190-195.

Arbaayah HH, Umi Kalsom Y (2013) Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. *Mycosphere* 4(4), 661–673, Doi 10.5943/mycosphere/4/4/2

Bellettini MB, Fiorda FA, Maievas HA, Teixeira GL, Ávila S, Hornung PS, Maccari-Júnio A, Ribani RH (2016). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Bernardi E, Minotto E, do Nascimento JS (2013). Avaliação do crescimento e da produção de *Pleurotus* sp. em substratos esterilizados. *Arquivos do Instituto Biológico*, 80(3), 318-324.

Berne S, Pohleven J, Vidic I, Rebolj K, Pohleven F, Turk T, Maček P, Sonnenberg A, Sepčić K (2007). Ostreolysin enhances fruiting initiation in the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological research*, 111(12), 1431-1436.

Bhattacharya M, Zee SY, Corke H (1999). Physicochemical properties related to quality of rice noodles. *Cereal chemistry*, 76(6), 861-867.

Brasil (2000). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 93, de 31 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília.

Brasil (2001). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília.

Burits M, BUCAR F (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res*, 14(5):323-8.

Carneiro ALB, Oliveira VMA, Vasques TGS, Magalhães AS, Alves LB, Brandão PC, Freire RS, Silva RF (2011). Testes de citotoxicidade (atividade hemolítica). Capítulo 12. Em: Teixeira et al. *Fungos da Amazonia: uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)*. Edua, Fapeam.

Chang YK, Martínez-Flores HE (2004). Quality of fresh pastas obtained from blends of durum wheat semolina (*T. durum* L.) and wheat flour (*T. aestivum* L.). *Food Science and Technology (Campinas)*, 24(4), 487-493.

Christodouleas DC, Fotakis C, Nikokavoura A, Papadopoulos K, Calokerinos AC (2015). Modified DPPH and ABTS assays to assess the antioxidant profile of untreated oils. *Food Analytical Methods*, 5(8), 1294-1302.

Coelho MS, Salas-Mellado MDLM (2014). Chemical composition, functional properties and technological applications of chia (*Salvia hispanica* L) seeds in foods. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17(4), 259-268.

Corrêa RCG, Brugnari T, Bracht A, Peralta RM, Ferreira IC (2016). Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp.(Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 103-117.

Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. 4. ed., Porto Alegre: Artmed,.900 p.

Deepalakshmi K, Sankaran M (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology*, 5(2), 718-726.

Farzana T, Mohajan S (2015). 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

Ferreira SMR, Mello AP, Anjos MCR, Kruger CCH, Azoubel PM, Alves MAO (2016). Utilization of sorghum, rice, corn flours with potato starch for the preparation of gluten-free pasta. *Food Chemistry*, 191:147-151.

Fonseca TRB, Silva TA, Alecrim MM, Cruz-Filho RF, Teixeira MFS (2015). Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from. *Res North Brazil. Afr. J. Microbiol.* 9(30):1814-1822.

Gambato G, Todescato K, Pavão EM, Scortegagna A, Fontana RC, Salvador M, Camassola M (2016). Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource technology*, 207:46-51.

Garcia LGC, e Silva AHS, de Castro Cunha P, Damiani C (2016). Preparation of Gluten-free Noodles Incorporated of Jabuticaba Peel Flour. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(2), 82-87.

Garuba T, Abdukkareem KA, Ibrahim IA, Oyebamiji OI, Shoyooye OA, Ajibade TD (2017). Influence of substrates on the nutritional quality of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus*. *Ceylon Journal of Science*, 46(1).

Gucia M, Jarzyńska G, Rafał E, Roszak M, Kojta AK, Osiej I, Falandysz J (2012). Multivariate analysis of mineral constituents of edible Parasol Mushroom (*Macrolepiota procera*) and soils beneath fruiting bodies collected from Northern Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(2), 416-431.

Héctor SV, Evaristo EV, Luis CA (2013). Sustainable Production of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Chiapas, Mexico. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 7(7), 534-537.

Heleno SA, Ferreira RC, Antonio AL, Queiroz MJR, Barros L, Ferreira IC (2015). Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Bioscience*, 11:48-55.

Hoa HT, Wang CL, Wang CH (2015). The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*, 43(4), 423-434.

Hummel, C. (1966). Macaroni products: manufacture processing and packing. 2. ed. London: Food Trade 287p. In: CRUZ, R.S.; SOARES, N.F.F. Efeito da adição de CO₂ nas características tecnológica e sensorial do macarrão massa fresca tipo talharim. Lavras: Ciência e Agrotecnologia, v.28, n.4, p.848-855, 2004.doi:10.1590/S141370542004000400017.

Inácio FD, Ferreira RO, Araujo CAV de, Brugnari T, Castoldi R, Peralta RM e Souza CGM de (2015) Review Article: Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. *BioMed Research International*, 10 p.

Iqbal B, Khan H, Saifullah IK, Shah B, Naeem A, Ullah W, Ahmed N (2016). Substrates evaluation for the quality, production and growth of oyster mushroom (*Pleurotus florida* Cetto). Jay JM, Tondo EC (2005) *Microbiologia de alimentos*. 6^a ed. Artmed: Porto Alegre.

Khan MA, Tania M (2012). Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: an overview. *Food Reviews International*, 28(3), 313-329.

Khani R, Moudi M, Khojeh V (2017) Contamination level, distribution and health risk assessment of heavy and toxic metallic and metalloid elements in a cultivated mushroom *Pleurotus florida* (Mont.) singer. *Environmental science and pollution research international*, 24(5), 4699-4708.

Kim YS, Wiesenborn DP, Lorenzen JH, Berglund P (1996). Suitability of edible bean and potato starches for starch noodles. *Cereal chemistry*, 73(3), 302-308.

Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY (2003) Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6509-6515.

Kumar S, Kumar D, Jusha M, Saroha K, Singh N, Vashishta B (2008) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmaceutica*, 58(2):215-20.

Lam YS, Okello EJ (2015). Determination of lovastatin, β -glucan, total polyphenols, and antioxidant activity in raw and processed oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (higher Basidiomycetes). *International journal of medicinal mushrooms*, 17(2).

Larrosa V, Lorenzo G, Zaritzky N, Califano A (2016). Improvement of the texture and quality of cooked gluten-free pasta. *LWT-Food Science and Technology*, 70:96-103.

Machado ARG, Teixeira MFS, Kirsch LS, Campelo MCL, 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.

Maluf MLF, Weirich CE, Dallagnol JM, Simões MR, Feiden A, Boscolo WR (2010) Elaboração de massa fresca de macarrão enriquecida com pescado defumado. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 69(1):84-90.

John KM, Thiruvengadam M, Enkhtaivan G, Kim DH (2014). Variation in major phenolic compounds and quality potential of CTC black tea elicited by *Saccharomyces cerevisiae* and its correlation with antioxidant potential. *Industrial Crops and Products*, 55:289-294.

Moo-Huchin VM, Moo-Huchin MI, Estrada-León RJ, Cuevas-Glory L, Estrada-Mota IA, Ortiz-Vázquez E, Betancur-Ancona D, Sauri-Duch E (2015) Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 166:17-22.

Muhammad BL, Suleiman B (2015) Global development of mushroom biotechnology. International Journal of Emerging Trends in Science and Technology, 2(06).

Nielsen FH (2014) Update on human health effects of boron. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 28(4), 383-387.

Orsine JC, Novaes MRCG, Asquieri ER, Cañete R (2014) Determination of chemical antioxidants and phenolic compounds in the Brazilian Mushroom *Agaricus sylvaticus*. The West Indian Medical Journal, 63(2), 142.

Oyetayo OV, Ariyo OO (2013) Micro and macronutrient properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fries) cultivated on different wood substrates. Jordan Journal of Biological Sciences, 6(3), 223-226.

Prabu M, Kumuthakalavallia R (2016) Antioxidant activity of oyster mushroom (*Pleurotus florida* [Mont.] Singer) and milky mushroom (*Calocybe indica* P and C). Int J Curr Pharmaceut Res, 8(3), 1-4.

Resta MSA, Oliveira TCRMD (2013) Evaluation of the coagulase-positive staphylococci standard required by Brazilian regulations for pasta. Brazilian Journal of Food Technology, 16(4), 319-325.

Rezaeian S, Saadatm S, Sattari TN, Mirshamsi A (2015) Antioxidant potency of Iranian newly cultivated wild mushrooms of *Agaricus* and *Pleurotus* species. Biomedical Research, 26(3).

Sarawong C, Gutiérrez ZR, Berghofer E, Schoenlechner R (2014) Effect of green plantain flour addition to gluten-free bread on functional bread properties and resistant starch content. International journal of food science & technology, 49(8), 1825-1833.

Sartori SB, Ferreira LFR, Messias TG, Souza G, Pompeu GB, Monteiro RTR (2015) *Pleurotus* biomass production on vinasse and its potential use for aquaculture feed. Mycology, 6(1), 28-34.

Semenova TA, Dunaevsky YE, Beljakova GA, Borisov BA, Shamraichuk IL, Belozersky MA (2017) Extracellular peptidases as possible markers of fungal ecology. *Applied Soil Ecology*, 113:1-10.

Silva AC, Oliveira MC, Del-Re PV, Jorge N (2009) Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. *Ciênc. Agrotec*, 33(4):1103-1108.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA (2001) Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2aed. Livraria Varela. São Paulo, 229 p.

Sizer FS, Whitney E (2003) *Nutrição*. Editora Manole Ltda.

Stefanello FS, Cavalheiro CP, Ludtke FL, da Silva MDS, Fries LLM, Kubota EH (2015) Efeito da adição de extrato de cogumelo do sol em linguiça suína e avaliação da estabilidade oxidativa e microbiológica do produto. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(1), 171-186.

Tomicki L, Rigo AA, Durigon A, Gutkoski LC, Zeni J, Valduga E, Steffens C, Toniazzo G (2015) Elaboração e avaliação da qualidade de macarrão isento de glúten. *Ciência Rural*, 45(7), 1311-1318.

Ulziijargal E, Yang JH, Lin LY, Chen CP, Mau JL (2013) Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. *Food chemistry*, 138(1):70-76.

Vamanu E (2014) Antioxidant properties of mushroom mycelia obtained by batch cultivation and tocopherol content affected by extraction procedures. *BioMed research international*.

Capítulo VI

Propriedade Intelectual

Submissão:



PRÓ-REITORIA DE
**INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA**

 /protec

 (92) 3305-1758 / 9318-3195

 protec@ufam.edu.br



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PRÓ-REITORIA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – PROTEC



DEPARTAMENTO DE PROPRIEDADE INTELECTUAL E TRANSFERÊNCIA DE
TECNOLOGIA

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS para os devidos fins que **ADRYA DA SILVA FIGUEIREDO**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC e sua orientadora professora Dra. **MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA**, da Universidade Federal do Amazonas, deram entrada, nesta pró-reitoria, no formulário da proposta de Declaração de Invenção referente ao produto "**MACARRÃO ELABORADO COM BIOMASSA DE COGUMELO ...**", como resultado do doutorado do referido programa, para ser avaliada para registro de propriedade industrial.

Manaus, 09 de maio de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica
.....
Maria do Perpétuo Socorro de L. V. Coelho
Diretora do Depto. de Propriedade Intelectual e
Transferência de Tecnologia - DnPI

CONCLUSÃO

Neste estudo, *Pleurotus albidus* foi submetido à caracterização de suas propriedades de produção de enzimas, toxicidade, composição nutricional e incorporação em produto alimentício. De acordo com os resultados foram determinadas as seguintes conclusões:

- No crescimento micelial vertical, o substrato que apresentou a maior atividade de enzimas proteolíticas foi composto de exocarpo de cupuaçu com semente de açaí e farelo de arroz;
- O pH e a temperatura ótima de atividade das protease foi determinado em pH 6, a 40 °C e 50 °C expressando característica de proteases do tipo cisteína e metaloprotease;
- *P. albidus* produzido em exocarpo de cupuaçu com semente de açaí e farelo de arroz apresentou as melhores características nutricionais quando comparado aos cultivos em exocarpo de cupuaçu com farelo de arroz e em semente de açaí com farelo de arroz;
- O extrato bruto obtido do basidioma de *P. albidus* não foi tóxico quando submetido a teste de hemólise e frente a fibroblastos humano;
- A atividade antioxidante foi determinada e expressou fenóis totais e flavonóides e melhor captura de radicais pelo método ABTS, em comparação ao DPPH;
- Os macarrões produzidos com a incorporação de diferentes concentrações da biomassa de *P. albidus* apresentaram aumento do conteúdo de proteínas, minerais e fibras e redução de açúcares e valor calórico total;
- As propriedades na qualidade de cozimento e textura das massas de macarrões foram satisfatórias;
- Na avaliação da qualidade microbiológica os macarrões fortificados com biomassa de *P. albidus* os produtos foram consideradas seguras para consumo humano;
- O produto padronizado é fácil de preparar e tem escopo para comercialização.