

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/08/2017.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**BIOCONVERSÃO MEDIANTE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
DE BAGAÇO E FOLHAS DE MANDIOCA POR FUNGOS VISANDO
MELHORIA DA QUALIDADE NUTRICIONAL**

EDUARDO MARIN MORALES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada.

**Rio Claro - SP
Abril - 2016**

**BIOCONVERSÃO MEDIANTE FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO DE BAGAÇO E FOLHAS DE MANDIOCA POR FUNGOS
VISANDO MELHORIA DA QUALIDADE NUTRICIONAL**

EDUARDO MARIN MORALES

Orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista, Campus de Rio Claro, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Biológicas – Microbiologia Aplicada.

**Rio Claro – SP
Abril - 2016**

547.29 Morales, Eduardo Marin
M828b Bioconversão mediante fermentação em estado sólido de bagaço e
folhas de mandioca por fungos visando melhoria da qualidade nutricional /
Eduardo Marin Morales. - Rio Claro, 2016
122 f. : il., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientadora: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Fermentação. 2. Microbiologia e bioquímica das fermentações. 3.
Manihot esculenta. 4. Rhizopus oligosporus. 5. Pleurotus ostreatus. 6.
Lentinula edodes. 7. Biodisponibilidade proteica. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BIOCONVERSÃO MEDIANTE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE BAGAÇO E FOLHAS DE MANDIOCA POR FUNGOS VISANDO MELHORIA DA QUALIDADE NUTRICIONAL

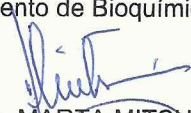
AUTOR: EDUARDO MARIN MORALES

ORIENTADORA: DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. MARTA MITSUI KUSHIDA
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / Universidade de São Paulo



Prof. Dr. JORGE HORII
Departamento de Agronomia / ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA



Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. AURELUCE DEMONTE
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Rio Claro, 16 de agosto de 2016

Dedico este trabalho à minha
querida família: meus pais
Marin e Norberto, minha irmã
Mariana e, em especial, minha
querida esposa Dânia.

“A razão é o passo, o aumento
da ciência o caminho, e o
benefício da humanidade é o
fim.”

— Thomas Hobbes

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento de um trabalho de doutorado depende, não somente, da obtenção dos dados e resultados mas, da convivência e apoio de familiares, profissionais e amigos que muito colaboraram com a construção deste trabalho. Sendo assim, expresso meus mais profundos agradecimentos:

À minha querida e amada esposa Dânia pelo amor e companheirismo, pelo apoio, pelas sugestões, pela compreensão, pela cumplicidade, e por sempre estar ao meu lado mesmo a milhas de distância. Uma pessoa inteligente, justa e correta que está sempre pronta a me apoiar em bons e maus momentos. Você me torna uma pessoa muito mais feliz! Te amo!!

Aos meus pais, Marin e Norberto que sempre me ensinaram a ser uma pessoa respeitosa e correta. Instruindo para levar a vida com muito amor e trabalho para possibilitar a realização dos sonhos e conquistas. Obrigado pela caminhada, pela luta e pela vida. Nunca deixarei de me espelhar em vocês!

À minha irmã Mariana, por estar presente na minha vida desde sempre. Pela amizade, sugestões e conversas sempre muito proveitosas. Me ensinando a ser uma pessoa determinada e criativa.

Aos meus avós Bortolo e Roberto que, com certeza, olham por mim onde quer que estejam; Benê e Carmem, mulheres fortes que sempre me proporcionaram alegria pelo convívio e conselhos sempre bem vindos. Também aos meus avós de coração, D. Cecília e Seu Nelson, por todas as histórias e desejos de conquistas.

À Vânia (sogra), Júnior (sogro), Bruna (cunhada) e Caio (cunhado) por me considerarem um verdadeiro membro da família e sempre estarem prontos a ajudar da melhor maneira possível.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, um exemplo de pessoa e pesquisadora. Agradeço, sinceramente, pelo tempo dedicado pela orientação deste trabalho, pelos valiosos conhecimentos, ensinamentos, confiança e incentivos que, mesmo se dividindo entre tantos afazeres, pôde realiza-los com extrema qualidade.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro concedido.

Ao Instituto de Biociências da UNESP e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Microbiologia Aplicada pela oportunidade e apoio.

Aos muitos amigos que fiz no Departamento, não citarei nomes, pois, corro o risco de esquecer algum nome caso nomeie-os aqui, o que seria injusto.

À todos os companheiros do Laboratório de Toxicidade de Águas: Márcio Ramos, Zito, Inês, Maria Luiza, Nair, Márcio Rozin, Juliane, Amanda e Letícia que colaboraram muito para o desenvolvimento deste trabalho.

À turma do Laboratório de Mutagênese Ambiental pelas divertidas horas por que passamos.

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia pelo espaço e apoio de todos os professores, técnicos (Roberto José Pedro, Carmem Casonato, Fátima Aparecida Neves, Adriano Uemura e Ângela Barbosa) e servidores (Samantha e Priscila).

À Dra. Dilza Nalin pelas ótimas dicas, apoio, disponibilidade e incentivo para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Holger Zorn do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Justus-Liebig, Giessen, Alemanha, por ter me recebido de braços abertos como um membro de sua equipe e possibilitar o aprimoramento deste trabalho e de meus conhecimentos. Também agradeço a todo o pessoal do Instituto pela ajuda e receptividade (Florian Prell, Adrian, Florian Birk, Michael, Tobias, Maria, Nadja, Theresia, Marco, Viktor, Anja, Maxi, Marcus, Ilya, Jenny, Martina, Astrid, Marina, Madeleine, Vanessa, Nicole, Yanyan, Mizgin, Dailyn, Peter Bianka, Marco Fraatz, Martin, Joline, Stella and Prof. Dr. Hamsher).

Enfim, muito obrigado a todos que, de uma forma ou outra, participaram no desenvolvimento deste trabalho e da pessoa que o assina.

BIOGRAFIA

Eduardo Marin Morales, nascido em Limeira, interior do Estado de São Paulo, realizou sua graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), na cidade de Santa Bárbara D'Oeste, entre os anos de 2001 a 2005. Durante o 3º semestre de sua graduação iniciou estágio na área de Microbiologia, no Laboratório de Microbiologia III do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus Rio Claro, sob a supervisão da Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, onde adquiriu conhecimento e grande afinidade pela área de microbiologia das fermentações. Após 1 ano e meio de estágio no referido laboratório, iniciou outro estágio na área de indústria de alimentos, junto a fábrica de doces RICLAN S.A., onde, posteriormente, veio a trabalhar profissionalmente. Após 4 anos, transferiu-se para a Ad'oro S.A., empresa especializada em abate e comercialização de frangos, onde permaneceu por mais 2 anos antes de ingressar na vida acadêmica. No ano de 2009, iniciou seu mestrado sob orientação da Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, a qual permaneceu como sua orientadora até os dias atuais. Seu mestrado foi realizado na área de fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais com fungo comestível, para melhoria do conteúdo proteico e da biodisponibilidade das proteínas, visando a utilização e melhor gestão de resíduos com potencial alimentício, área esta que continua se dedicando, como pode ser visto neste trabalho apresentado para a obtenção do seu título de doutor.

RESUMO

O Brasil destaca-se como um dos principais produtores e processadores de mandioca (*Manihot esculenta*) do mundo e, portanto, gera grande quantidade de produtos considerados resíduos mas, com potencial de utilização. Folhas e bagaço de mandioca são os dois principais co-produtos gerados, e juntos apresentam quantidade elevada de proteínas e carboidratos, com qualidade propícia para o processo de fermentação em estado sólido (FES). A utilização de subprodutos da agroindústria constitui uma oportunidade para aumentar e diversificar a produção de alimentos uma vez que eles apresentam composição química de carboidratos, proteínas, gorduras e minerais compatíveis com outros produtos de tradição alimentar. Além de melhorar o aproveitamento do esforço agrícola de produção, pode aumentar o rendimento financeiro e diminuir a geração de resíduos. O bagaço de mandioca é o principal subproduto resultante da extração do amido de seu tubérculo, gerando enorme quantidade de resíduos com cerca de 90 % de carboidratos com potencial de aproveitamento. As folhas de mandioca, também considerados resíduos, apresentam cerca de 40 % de proteína bruta. Estas características tornam esses resíduos ideais para serem utilizados como substrato no processo de FES. A fermentação predispõe a melhorar a biodisponibilidade de aminoácidos (incluindo os essenciais) e os ácidos graxos. Com o objetivo de verificar a influência de FES em substratos contendo folhas e bagaço de mandioca, foram realizadas avaliações quanto aos teores de aminoácidos das proteínas, ácidos graxos e cianeto em processos de FES promovidos pela ação de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus blazei* e *Rhizopus oligosporus*. A qualidade da proteína foi determinada pelos métodos de Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) e Relative Nutritional Value (RNV) que medem a capacidade da proteínas em fornecer aminoácidos essenciais (AAE). O conteúdo de cianeto e de carboidratos totais foi quantificado por método colorimétrico. O perfil de aminoácidos foi obtido utilizando a cromatografia líquida (HPLC) e os ácidos graxos por cromatografia gasosa (GC). Os resultados obtidos em testes realizados com o *Agaricus blazei* não apresentaram dados substanciais, mostrando-se assim, uma alternativa pouco eficiente, além de difícil controle e aplicação em um processo de FES neste substrato. Todos os experimentos de FES realizados com *Rhizopus oligosporus*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* mostraram significativa diminuição na concentração de cianeto, atingindo níveis seguros de consumo após a fermentação. Os experimentos realizados com *Rhizopus oligosporus* indicam melhoras quanto a quantidade de histidina, isoleucina e leucina, com condições de fornecer mais do que 60% da necessidade diária para crianças de 2-5 anos de idade. Quantidades elevadas de ácidos graxos insaturados (AGI) foram registradas para o ácido cis-13,16-docosadienóico (22:2), ácido α -linolênico (18:3^{9,12,15}) e ácido oleico (18:1). Resultados obtidos para PDCAAS foram baixos em comparação com a caseína, contudo, os resultados do RNV revelaram grande diferença para a qualidade da proteína após a fermentação. O processo de FES realizado com *Pleurotus ostreatus* evidenciaram a formação de produto final com

melhorias significativas de AAE (valina, isoleucina, leucina e metionina) e AGI (ácido oleico - 18:1; ácido linoleico - 18:2^{9,12}; e γ -linolénico - 18: 3^{6,9,12}). Embora o PDCAAS e RNV tenham revelado valores abaixo aos encontrados na caseína, os resultados indicaram melhoria na biodisponibilidade da proteína microbiologicamente modificada. As fermentações efetuadas com *Lentinula edodes* registraram razoáveis quantidades de histidina, isoleucina, valina, metionina (com cisteína) e fenilalanina (com tirosina), quando comparado com os requisitos de crianças de 2-5 anos de idade. Alguns ácidos graxos insaturados foram estimados em quantidades consideráveis, tais como o ácido linoleico (18: 2^{9,12}); cis-13,16-docosadienóico ácido (22: 2); cis-11-eicosenóico de ácido (20: 1) e ácido α -linolénico (18: 3^{9,12,15}). Os dados obtidos permitiram concluir que houveram aumentos significativos de biodisponibilidade dos nutrientes (aminoácidos, ácidos graxos e minerais) e que a utilização de subprodutos ainda subutilizados da agroindústria poderão tornar-se fontes alternativas de alimentos não convencionais e que aumentariam a quantidade de nutrientes essenciais.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*; *Rhizopus oligosporus*; *Pleurotus ostreatus*; *Lentinula edodes*; biodisponibilidade proteica.

ABSTRACT

Brazil stands out as one of the leading producers and processors of cassava (*Manihot esculenta*) in the world and therefore generates large quantity of products considered as waste but with potential use. Cassava leaves and bagasse are the two main byproducts generated, and together they present a high amount of proteins and carbohydrates, with quality suitable for the process of solid-state fermentation (SSF). The use of agro-industry by-products is an opportunity to increase and diversify food production since they present chemical composition of carbohydrates, proteins, fats and minerals compatible with other food tradition products. Besides improving the use of agricultural production effort may increase the financial income and reduce the generation of waste. Cassava bagasse is the main by-product of starch extraction from its tuber, generating huge amount of waste with about 90% of carbohydrate, presenting exploitation potential. Cassava leaves also regarded as waste, has about 40% crude protein. These features make these by-products suitable for use as the substrate in the SSF process. Fermentation predisposes to improve the bioavailability of amino acids (including the essential) and fatty acids. In order to check the influence of SSF on substrates containing leaves and cassava bagasse, evaluations were carried out as the amino acid content of proteins, fatty acids and cyanide in SSF processes promoted by *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus blazei* and *Rhizopus oligosporus*. The quality of the protein was determined by the methods of Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) and Relative Nutritional Value (RNV) that measure the ability of proteins to provide essential amino acids (EAA). Cyanide content and total carbohydrates were measured by colorimetric method. The amino acid profile was obtained using liquid chromatography (HPLC) and fatty acids by gas chromatography (GC). The results obtained in tests with *A. blazei* showed no substantial data, being thus a less efficient alternative, besides presenting difficult to control and application in the process of SSF in this substrate. All FES experiments with *R. oligosporus*, *P. ostreatus* and *L. edodes* showed significant decrease in cyanide concentration reaching safe levels of consumption after fermentation. The experiments with *R. oligosporus* indicated improvements about the amount of histidine, isoleucine and leucine, with conditions to provide more than 60% of the daily requirement for children 2-5 years old. High amounts of unsaturated fatty acids (UFA) were registered for the cis-13,16-docosadienoic acid (22: 2), α -linolenic acid (18: 3^{9,12,15}) and oleic acid (18: 1). Results for PDCAAS were low in comparison with casein, however, the results showed a

RNV higher to the quality of protein before fermentation. The SSF process performed with *P. ostreatus* showed a final product with significant improvements of AAE (valine, isoleucine, leucine and methionine) and unsaturated fatty acids (oleic acid - 18:1, linoleic acid - 18:2^{9,12}, and γ -linolenic - 18:3^{6,9,12}). Though the PDCAAS and RNV revealed values below those found in casein, the results show improvement in the bioavailability of microbiologically modified protein. The fermentations carried out with *L. edodes* register reasonable amounts of histidine, isoleucine, valine, methionine (with cysteine) and phenylalanine (with tyrosine), when compared with the requirements of children 2-5 years old. Some unsaturated fatty acids have been estimated at considerable quantities, such as linoleic acid (18:2^{9,12}); cis-13,16-docosadienoic acid (22:2); cis-11-eicosenoic acid (20:1) and α -linolenic acid (18:3^{9,12,15}). The data obtained showed there were significant increases in bioavailability of nutrients (amino acids, fatty acids and minerals) and the use of by-products, that are still underutilized in agro-industry may become alternative sources of unconventional food and increase the amount of essential nutrients.

Keywords: *Manihot esculenta*; *Rhizopus oligosporus*; *Pleurotus ostreatus*; *Lentinula edodes*; protein bioavailability.

Lista de Figuras

Figura 1. Curvas de produção de CO ₂ nos processo de fermentação em estado sólido	46
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Percentuais de co-produtos testados no preparo dos substratos para a fermentação em estado sólido	36
Tabela 2. Determinação da umidade de bagaço e folhas de mandioca.....	45
Tabela 3. Correção da umidade nos substratos para fermentação	45

Artigo 1

Tabela 1. Characterization of fatty acids (mg/100g of Edible Portion) before and after SSF process.....	68
Tabela 2. Characterization of Essential Amino Acids (EAA mg g ⁻¹ of Protein)	69
Tabela 3. Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) of Cassava Bagasse and Cassava Leaves (1:1), casein standard and daily necessity in mg of EAA /g of protein for children of 2-5 years old.....	70

Artigo 2

Tabela 1. Characterization of fatty acids (mg/100g of Edible Portion) before and after SSF process.....	91
Tabela 2. Characterization of Essential Amino Acids (EAA mg g ⁻¹ of Protein)	92
Tabela 3. Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS), Cassava Bran and Cassava Leaves (1:9), casein standard and daily necessity in mg of amino acid/g of protein for children of 2-5 years old.....	93

Artigo 3

Tabela 1. Characterization of fatty acids (mg/100g of Edible Portion) before and after SSF process.....	113
Tabela 2. Characterization of Essential Amino Acids (EAA mg g ⁻¹ of Protein)	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácido/Amino acid
AAE/EAA	Aminoácido Essencial/ Essential Amino Acid
AGI/UFA	Ácidos Graxos Insaturados/Unsaturated Fatty Acids
AGM/MUFA	Ácidos Graxos Monoi-insaturados/ Monounsaturated Fatty Acids
AGP/PUFA	Ácidos Graxo Poli-isaturados/ Polyunsaturated Fatty Acids
AGS/SFA	Ácidos Graxos Saturados/ Saturated Fatty Acids
Ala	Alanina/Alanine
ANOVA	Análise de Variância/ Analyzes of Variance
BCAA	Branched-Chain Amino Acids
BM/CB	Bagaço de Mandioca/Cassava Bagasse
Ca	Cálcio
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Cys	Cisteína/Cysteine
DIAAS	Digestable Indispensable Amino Acid Score
F	Flúor
FAME	Fatt Acids Methyl Esters
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe	Ferro
FES/SSF	Fermentação em Estado Sólido/Solid-State Fermentation
FM/CL	Folha de Mandioca/Cassava Leaves
g	Grama
GC	Gas Chromatography
GLA	Ácido Gama-Linoleico/Gamma-Linoleic Acid
Gln	Glutamina/Glutamine
H ₂ O	Água
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HCl	Ácido Clorídrico
HCN	Cianeto de Hidrogênio
His	Histidina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Iodo
Ile	Isoleucina/Isoleucine
ITS	Internal Transcribed Spacer
K	Potássio
Kcal	Quilo Caloria
Kg	Quilograma
LA	Ácido Linoleico/Linoleic Acid
Leu	Leucina/Leucine
Lys	Lisina/Lysine
Met	Metionina/Methionine
mg	Miligrama

Mg	Magnésio
mL	Mililitro
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NEAA	Aminoácidos Não Essenciais/Non-essential Amino Acids
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/World Health Organization
PDCAAS	Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score
pH	Potencial Hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina/Phenylalanine
PP	Polipropileno/Polypropylene
ppm	Parte Por Milhão
S	Enxofre
SAA	Amino Ácidos Sulfurados/Sulfur Amino Acids
Se	Selênio
TCA	Ácido Tricloroacético/Trichloroacetic Acid
Thr	Treonina/Threonine
Trp	Triptofano/Tryptophane
Tyr	Tirosina/Tyrosine
Val	Valina/Valine
VNR/ RNV	Valor Nutricional Relativo/Relative Nutricional Value
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. A importância da nutrição adequada	20
3.2. Produção de alimentos: novas fontes e possibilidades	21
3.2.1. O uso de co-produtos na obtenção de alimentos: bagaço de mandioca.....	22
3.2.2. O uso de co-produtos na obtenção de alimentos: folhas de mandioca	24
3.3. Fermentação em estado sólido como estratégia de melhoria nutricional	25
3.3.1. <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	27
3.3.2. <i>Lentinula edodes</i>	28
3.3.3. <i>Agaricus blazei</i>	28
3.3.4. <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
3.4. Aminoácidos essenciais (AAE)	29
3.4.1. Ferramentas de avaliação de qualidade da proteína.....	30
3.4.1.1. Avaliação da qualidade proteica pelo cálculo de aminoácidos corrigido pela digestibilidade (PDCAAS – Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score)	31
3.4.1.2. Avaliação da qualidade proteica determinada pelo cálculo de aminoácidos indispensáveis digeríveis (DIAAS – Digestible Indispensable Amino Acid Score).....	31
3.4.1.3. Avaliação do valor nutricional relativo (RNV – Relative Nutritional Value) da proteína.....	32
3.5. Ácidos graxos insaturados	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Micro-organismos.....	35
4.2. Bagaço de mandioca (BM)	35
4.3. Folha de mandioca.....	36
4.4. Preparo das amostras	36
4.5. Análises	37
4.5.1. Determinação de nitrogênio e proteínas	37
4.5.2. Determinação da digestibilidade proteica.....	37
4.5.3. Valor nutricional relativo (VNR) da proteína.....	37
4.5.3.1. <i>Enterococcus zymogenes</i>	37

4.5.3.2. Preparo do experimento.....	37
4.5.4. Lipídios totais	38
4.5.5. Umidade.....	38
4.5.6. Aminoácidos essenciais (AAE)	39
4.5.7. Cianeto	39
4.5.8. Ácidos graxos	40
4.5.9. Cômputo de aminoácidos corrigido pela digestibilidade (Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score – PDCAAS).....	41
4.5.10. Cômputo de aminoácidos essenciais digeríveis (Digestible Indispensable Amino Acid Score – DIAAS)	41
4.5.11. Respirometria de Bartha e Pramer	41
4.5.12. Carboidratos totais	42
4.5.13. Análise estatística	42
4.5.14. Confirmação por sequenciamento das espécies fúngicas utilizadas.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Escolha do substrato para desenvolvimento da FES	44
5.2. Peso seco dos subprodutos da mistura para adequação da umidade	44
5.3. Aplicação da respirometria de Bartha e Pramer para avaliar a adaptação e crescimento dos basidiomicetos.....	45
5.4. Experimentos com <i>Agaricus blazei</i>	46
5.5. Confirmação por sequenciamento das espécies fúngicas utilizadas.....	47
5.6. Artigos	47
Artigo 1	48
Artigo 2	71
Artigo 3	94
6. CONCLUSÃO	115
7. REFERÊNCIAS	117
8. ANEXOS	124

1. INTRODUÇÃO

O principal cultivar agrícola cianogênico é a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), a qual representa a sexta cultura alimentar mais importante do mundo. Este cultivar caracteriza-se pela sua fácil adaptação, principalmente em regiões tropicais. Sua importância está vinculada ao fato de ser a base alimentar de cerca de 700 milhões de pessoas. Apesar de sua intensa utilização como alimento básico, sua principal aplicação industrial ocorre pela produção de farinha e fécula (amido), gerando enorme quantidade de resíduo. Este resíduo, predominantemente sólido é gerado desde a colheita até o final do beneficiamento destacando-se o bagaço e as folhas. Quanto ao bagaço, o processamento de cerca de 300 toneladas de tubérculos gera um montante de aproximadamente 280 toneladas do resíduo (hidratado pelo processo de extração), que não apresenta interesse para a indústria. As folhas da mandioca compõem, após a colheita, um residual de cerca de 2,25 toneladas por hectare. O Brasil, sendo o quarto maior produtor de mandioca do mundo, gera enorme quantidade de resíduos, seja como bagaço, seja como folhas e seu aproveitamento para fins alimentares, embora ainda sem significância, poderia ser aperfeiçoado para aumentar a quantidade de alimentos produzidos em conjunto com a diminuição de resíduos gerados.

Para a utilização de resíduos ou sub-produtos, a aplicação de micro-organismos tem-se mostrado uma via de alto interesse comercial. A fermentação em estado sólido (FES) vem se destacando quanto à eficiência na bioconversão de resíduos ou co-produtos agroindustriais voltados para a alimentação humana, com benefícios na alimentação, refletidos na saúde. Os fatores estão relacionados ao baixo custo de processo e instalações para o desenvolvimento da FES e facilidade da aplicação de micro-organismos (principalmente os fungos filamentosos), na modificação do substrato e também das características proporcionadas pelo processo como, melhora da digestibilidade, melhor valor nutricional, detoxificação, entre outros.

O cultivo e consumo de micro-organismos é recente na dieta brasileira, contudo, o seu uso pode melhorar os aspectos nutricionais, sensoriais e funcionais após a bioconversão de resíduos agrícolas, tornando-os possíveis fontes de alimentos. Esta afirmação fica evidenciada pelo número crescente de pesquisas e processos que se utilizam de micro-organismos, principalmente fungos na indústria química e de alimentos como obtenção de xaropes de glicose e maltose, alimentos como o tempeh e o koji, além dos conhecidos cogumelos (*Pleurotus ostreatus*, conhecido como shimeji; *Lentinula edodes*, conhecido como shiitake; *Agaricus bisporus*, conhecido como cogumelo paris, etc.).

A proteína microbiana apresenta considerável digestibilidade, podendo ser utilizada como fonte adicional de proteína a ser incorporada na dieta. O consumo de proteínas está relacionado às necessidades de ingestão de aminoácidos essenciais (AAE). Esses nutrientes exercem papel determinante na eficiência do metabolismo do organismo, estando diretamente ligados à construção de proteínas, regulação de processos celulares, precursores de moléculas, entre outros. São considerados aminoácidos essenciais pois, não podem ser sintetizados pelos organismos e, conseqüentemente, devem ser supridos mediante dieta adequada. Quanto à avaliação da qualidade biológica das proteínas dos alimentos, métodos como os cálculos de aminoácidos corrigidos pela digestibilidade (PDCAAS), o de aminoácidos indispensáveis

digeríveis (DIAAS) e o valor nutricional relativo (VNR) foram desenvolvidos e reconhecidos como importantes parâmetros de avaliação. Estes parâmetros permitem visualizar a real biodisponibilidade da proteína de um determinado alimento.

Tratando-se de alimentação, a ingestão de ácidos graxos insaturados deve ser considerada pois, são essenciais dado ao fato de não serem sintetizados pelo organismo, necessitando assim, terem sua demanda metabólica suprida pela ingestão de alimentos. Os principais grupos recomendados nas dietas alimentares são os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados (que apresentam duplas ligações na cadeia carbônica), que apresentam características antioxidantes e auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares.

Dessa forma, o emprego de tecnologias que possam promover uma biotransformação que beneficie a biodisponibilidade de nutrientes e o uso de fungos reconhecidamente comestíveis, bem como ensaios e métodos que avaliem o potencial do uso de resíduos e co-produtos da agroindústria, podem proporcionar o melhor aproveitamento destes e, consequentemente, aumentar a disponibilidade de alimentos com valores nutricionais adequados.

6. Considerações Finais

Os substratos formulados pela mistura de bagaço de mandioca (BM) e de folhas de mandioca (FM), mostram-se adequados para o desenvolvimento dos fungos estudados *R. oligosporus*; *P. ostreatus*; e *L. edodes*. Contudo, o fungo *A. blazei* apresentou baixa adaptação ao substrato, impedindo a avaliação. Desta maneira, fica evidente que a utilização do fungo *A. blazei* para tratamento de resíduos e co-produtos da agroindústria necessita de estudos mais específicos. Assim, conclui-se que:

- *R. oligosporus* apresentou: rápido crescimento do fungo no substrato (BM:BF – 1:1); diminuição da concentração de cianeto para patamar considerado “não tóxico”; características nutricionais interessantes como aumento da quantidade de ácidos graxos mono e poli-insaturados (oleico; γ -linolênico; e ácidos graxos insaturados de cadeia longa) e alterações no conteúdo de aminoácidos essenciais (histidina; isoleucina; valina; e leucina); além da melhora biológica da proteína, observada pelo aumento do VNR;
- *P. ostreatus*: reduziu a quantidade de cianeto para valores insignificantes; apesar da baixa quantidade de proteínas mostrou significativo aumento em 7 de 9 AAE (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e valina); maior biodisponibilidade das proteínas observada pelo VNR; significativo aumento em ácidos graxos (ácido oleico; linoleico; e γ -linolênico). Conclui-se que o material fermentado por *P. ostreatus* se caracteriza como uma interessante fonte de carbono “enriquecida” com proteína com melhores valores nutricionais referentes à AAE e AGI;
- *L. edodes*: promoveu desintoxicação significativa do substrato, atingindo concentração considerada segura de cianeto; quantidade importantes de AGI (ácido linoleico; ácido *cis*-13,16-docosadienóico; α -linolênico); importantes quantidades de histidina,

isoleucina e valina além de boa quantidade de metionina e fenilalanina; o VNR observado após a fermentação mostrou um aumento de cerca de 33 vezes na biodisponibilidade da proteína; apresenta potencial de aproveitamento como uma boa fonte de proteínas com interessantes quantidade de AAE, AGI essenciais e minerais.

A redução do cianeto para níveis seguros de consumo observada após o processo de FES mostram que a aplicação de fungos comestíveis permitem detoxificar substratos alternativos e favorecer sua aplicação na obtenção de novos alimentos. Esse importante fator, bem como o aumento da quantidade e biodisponibilidade de proteínas pode proporcionar o aumento no valor agregado de produtos produzidos a partir de materiais considerados de baixo custo, como resíduos agroindustriais. O aproveitamento desses resíduos com provável acréscimo de valor agregado pode tornar rentável materiais que, anteriormente, gerariam custos com seu manejo.

Desta maneira, a utilização de resíduos agroindustriais podem ser biotransformados a fontes de alimentos que apresentam boas quantidades de AAE e AGI trazendo boas quantidades de nutrientes para os consumidores. Assim, os resultados obtidos pelo uso de resíduos e co-produtos da agroindústria como o BM e a FM mediante a FES, mostram que o aproveitamento de outras fontes alternativas na obtenção de novos alimentos podem aumentar a disponibilidade de alimentos e, conseqüentemente, diminuir a concentração de subnutridos, principalmente pelo seu baixo custo de produção.

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; Gerência-Geral Alimentos. Ministério da Saúde. Resolução – CNNPA nº. 12 de 1978. D. O. de 24/07/1978.

AKESON, W. R.; STAHPMAN, M. A. A pepsin-pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, v.83, p.257-261, 1964.

AKINFEMI, A. Bioconversion of peanut husk with white rot fungi: *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*. **Livestock Research for Rural Development**, v. 22, n. 3, p. 49, 2010.

ALMEIDA, K. O. L.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. Análise sensorial de alimentos funcionais enriquecidos com folha de *Manihot spp.* **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.5, n.2, p.127-131, 2003.

ANGELIS, D. F.; GOES, A. C. L.; PIÃO, A. C. S. *Lentinus edodis* (Berk.) Pegler, o cogumelo shiitake. Disponível em: <<http://www.geocities.com/~esabio/cogumelo/lentinusedodis.htm>>. Acesso em: 03 jul. 2009.

AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**: 13 ed., Washington, D. C., 1995. p. 95.

ARO, S. Improvement in the nutritive quality of cassava and its by-products through microbial fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4789–4797, 2008.

BALDISSERA, B. L. **Absorção/adsorção de cádmio, cromo e chumbo por *Agaricus blazei***. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

BARTHA, R.; PRAMER, D. (1965), Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, 100 (1), 68-70.

BLACK, R. E. et al. **Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences**. *Lancet*., 371(9608):243-60. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61690-0. 2008.

BRANDÃO, C. T.; BRANDÃO, R. F. **Alternativas alimentares**. Brasília: CNBB - Pastoral da Criança, 1989. 51 p.

BRENE, W. M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, v.53, n.10, p.883-894, 1990.

BRITO, V. H. S. et al. Colorimetric Method for Free and Potential Cyanide Analysis of Cassava Tissue. **Gene Conserve**, v. 8, n. 34, p. 841–852, 2009.

CÂMARA, F. S.; MADRUGA, M. S. Cyanic acid, phytic acid, total tannin and aflatoxin contents of a Brazilian (Natal) multimistura preparation. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 33-36, 2001.

- CAPELARI, M. **Atividade biodegradadora e cultivo de três espécies comestíveis de basidiomicetos: *Pleurotus* sp. e *Agrocybe perfecta* (Rick) Sing.** 1996. Tese (Doutorado em Botânica), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 1996.
- CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentation: role microorganisms in food production and preservation. **Journal of Food Microbiology**, v. 50, p.131-149, 1999.
- CARTA, F. S. et al. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 1, p. 23–28, 1999.
- CARVALHO, V. D. et al. Efeitos da época de colheita na produtividade e teores de vitamina C e β -caroteno da parte aérea de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **RBM: Revista Brasileira de Mandioca**, v. 8, n. 1, p. 25-35, 1989.
- CEREDA, M. P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil. São Paulo: Paulicéia**, p. 11-50, 1994.
- CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate analysis: a practical approach**. IRL Press Ltd, 1994.
- CINTRA, V. M. et al. Farinha de Banana e de Albedo: opções de enriquecimento alimentar para comunidades carentes. In: IX ENCONTRO DE EXTENSÃO DA UFPB, 2007, João Pessoa. **Anais/catálogo de Resumos do IX Encontro de Extensão da UFPB**. Editora Universitária, v. 1. p. 13-13. 2007.
- CORRÊA, A. D. **Farinha de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Baiana): efeito de processamentos sobre alguns nutrientes e antinutrientes**. 2000. 108 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- COSTA, D. P. S.; ROMANELLI, P. F.; TRABUCO, E. Aproveitamento de vísceras não comestíveis de aves para elaboração de farinha de carne. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 746-752, 2008.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291–302, 2006.
- DOMINGOS, R. N. **Fermentação da farinha do mesocarpo do côco babaçu (*Orbignya SP.*), pela ação de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 103p., 2003.
- EGGUM, B., O. The protein quality of cassava leaves. **British Journal of Nutrition**, p.24, p.761-768. 1970.
- EVANGELISTA, J. **Alimentos – Um Estudo Abrangente**. São Paulo, Editora Atheneu, 2000.
- FAO; IFAD; WFP. **The State of Food Insecurity in the World. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress**. Rome: FAO, 2015.
- FAO. **The state of food and agricultural 2010-11: Women in agriculture – Closing the gender gap for development**. Rome, 160p., 2011.
- FAO/WHO. **Dietary protein quality evaluation in human nutrition**. Auckland: Food and

Agriculture Organization of the United Nations, 2013.

FARVID, M. S. et al. Dietary linoleic acid and risk of coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **Circulation**, v. 130, n. 18, p. 1568–1578, 2014.

FORD, J. E. A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins. **The British journal of nutrition**, v. 14, n. 2, p. 485–97, 1960.

GILANI, G. S. Background on international activities on protein quality assessment of foods. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S2, p. S168–S182, 2012.

GIRAUD, E., 1993. **Physiologique et enzymologique d' une novele souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique en relation avec la croissance e degradation des composes cynogeniques du manioc et la production d'acide lactique**. Ph.D. Thesis, University of Provence, France. 1993.

GROXKO, M. **Mandiocultura**. Análise da conjuntura agropecuária safra 2011/2012. Aspectos econômicos da mandioca. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Economia Rural. 14p., 2011.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 17, 71–74. 2001.

HERRERA, O. M. **Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Agaricus blazei*: um enfoque de cadeia produtiva**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp - campus Botucatu. Botucatu, 145p., 2001.

HESELTIME, C. W.; WANG, L. H. W. **A traditional fermented foods**. U. S. Dep. Agric. for Off. Use, v. 9, p. 275-288. 1967.

HUGHES, G. J. et al. Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) for soy protein isolates and concentrate: Criteria for evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12707–12712, 2011.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. São Paulo. P. 1020. 2008.

JASKO, A. C. et al. Caracterização Físico-Química De Bagaço De Mandioca in Natura E Após Tratamento Hidrolítico. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, n. S1, p. 427–441, 2011.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, n. 1, p. 1–5, 2000.

KODAMA, C. S. et al. Análise da diversidade bacteriana endofítica por DHPLC durante o processo de fermentação da mandioca (*Manihot esculenta*). 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador. **Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética**, p.203, 2008.

KORNIZEJUK, N. B. S. **Segurança alimentar e nutricional: uma questão de direito**. 2008. 116f. Tese (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) – Universidade de Brasília, 2008.

- KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems—An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1–30, 2005.
- LATIF, S.; MÜLLER, J. Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, n. 2, p. 147–158, 2015.
- LEE, C. **Influences of the Extract of Agaricus Blazei Murill on Hepatitis, Cancer and Immunity**. 2015. Tese de Doutorado.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Roca, 1179 p. 1998.
- MATTHÄUS, B.; BRÜHL, L. Comparison of different methods for the determination of moisture content in biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 1, p. 95–102, 2001.
- MAU, J. L., CHAO, G-R., WU, K-T. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49, 5461–5467. 2001.
- MELO, D. S. et al. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 420-428, mar./abr. 2007. (b)
- MELO, L. P. et al. **Análise físico-químicas do pão enriquecido com mesocarpo de babaçu**. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa, PB, 2007. (a)
- MELO, R. S. et al. Avaliação químico-bromatológica e do conteúdo de compostos cianogênicos residual de cinco frações obtidas a partir do processamento da rama da mandioca. In: I Semana de Ciência e Tecnologia do CEFET Bambuí, 2008, Bambuí. **Anais da I Semana de Ciência e Tecnologia do CEFET Bambuí**, 2008.
- MENEZES, T. J. B. Alimentos e molhos obtidos por fermentação da soja e de cereais. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 49-64, 1972.
- MINOTTO, E. et al. Mycelium growth *in vitro* of *Pleurotus ostreatoroseus* and colonization of the elephant grass substrate (*Pennisetum purpureum* Schum.) supplemented with different brans. **Arquivos do Instiuto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 379–383, 2008.
- MOORE, S.; SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1185–1190, 1958.
- MONTAGNOLLI, R. N. **Incêndios de petróleo e pretoquímicos: biorremediação de áreas afetadas**. 2015. 267f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. **Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde**. Revista Eletrônica de Farmácia. v. 3 (2), p. 99-112, 2006.
- MORALES, E. M. **Viabilidade de obtenção de alimento funcional a base de mesocarpo de babaçu (*Orbignya* sp.) e folhas de mandioca (*Manihot esculenta*) mediante fermentação por *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***. 2012. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

NASSAR, N. M. A.; MARQUES, A. O. Cassava leaves as a source of protein. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 4, n. 1, p. 187–188, 2006.

NUNES, L. B.; SANTOS, W. J. DOS; CRUZ, R. S. Income from extraction and chemical and functional characterization of starch of cassava from semi-arid region of Bahia. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 129–134, 2009.

OLIVEIRA, M. M. **Enriquecimento nutricional por bioconversão de resíduos agroindustriais para utilização na alimentação animal**. 2007. 147f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2007.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. July 2002, p. 1–5, 2003.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Bangalore. v. 77, n. 1, pg. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000 (a).

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II. Cassava bagasse. **Biores. Technol.** 74, 81-87. 2000 (b).

PEREIRA, D. M. et al. Amino acids, fatty acids and sterols profile of some marine organisms from Portuguese waters. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2412–2417, 2013.

PINTO, G. A. S. et al. **Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais**. Fortaleza: [s.n.].

PIRES, C. V. et al. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 179–187, 2006.

PRZYBYLOWICZ, P; DONOGHUE, J. **Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation**. Kendall/Hunt Publishing Company. Dubuque, 127p. 1990.

RAMANI, B.; ZORN, H.; PAPENBROCK, J. Quantification and fatty acid profiles of sulfolipids in two halophytes and a glycophyte grown under different salt concentrations. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 59, n. 11-12, p. 835–842, 2004.

RAVINDRAN, V.; RAJAGURU, A. S. B. Effect of stem pruning on cassava root yield and leaf growth. **Journal of Agricultural Science**, v. 25, p. 32-37, 1988.

REIS, F. S. et al. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 191–197, 2012.

- RODRÍGUEZ-AMBRIZ, S. L.; MARTÍNEZ-AYALA, A. L.; MILLÁN, F.; DÁVILA-ORTIZ, G. Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolates. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.60, p. 99-107, 2005.
- ROYSE, D. J. Cultivation of shiitake on natural and synthetic logs. College of Agricultural Sciences. PennState. 12p. 2005.
- RÜFENACHT, U. et al. Nutritional counseling improves quality of life and nutrient intake in hospitalized undernourished patients. **Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 53–60, 2010.
- RUSTAN, A. C.; DREVON, C. A. **Fatty Acids: Structures and Properties**. [s.l: s.n.].
- SADLER, M. Nutritional properties of edible fungi. **Nutrition Bulletin**, v. 28, n. 3, p. 305–308, 2003.
- SAGRILO, E. **Produtividade de três cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em diferentes épocas de colheita no segundo ciclo vegetativo**. [s.l.] Universidade estadual de Maringá, 2001.
- SCHMIDT, P. et al. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1866-1871, 2003.
- SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Mandiocultura: farinha e fécula**. Estudos de mercado SEBRAE/ESPM. Série mercado. Relatório completo. 80p., 2008.
- SERZEDELLO, A. Aspectos históricos do uso de microrganismos na alimentação. In: Simpósio de Recursos Genéticos para América Latina e Caribe, 2., 1999, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1999. 1 CD-ROM.
- SGARBIERI, C. V. **Alimentação e nutrição – fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: UNICAMP, 1987, p. 243-261.
- SHARIF, N. F. A. et al. Preparation and Characterization of Cassava Leaves/ Cassava Starch Acetate Biocomposite Sheets. **BioResources**, v. 10, n. 3, p. 4339–4349, 2015.
- SHIMADA, Y., MORITA, T., SUGIYAMA, K. Dietary eritadenine and ethanolamine depress fatty acid desaturase activities by increasing liver microsomal phosphatidylethanolamine in rats. **Journal of Nutrition**, 3, 758–765. 2003.
- SILVA, A.J. **Análise de alimentos – métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG Imprensa Universitária–UFV. 166p. 1998.
- SOCCOL, C. R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico. Biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basideomacromicetos do Gênero *Pleurotus***. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 228f. 1994.
- TAVANO, O. L. et al. Nutritional evaluation of chickpea protein: microbiological and chemical methods. **Alimentos e Nutrição (UNESP)**, Araraquara, v.15, n. 1, p. 17-22, 2004.

- TAVARES, S. G.; KIYAN, C. Avaliação da qualidade nutricional da proteína da farinha de Tempeh, produto fermentado, obtido a partir da soja. **Alimentos e Nutrição**. São Paulo, 13: 23-33, 2002.
- TEIXEIRA, E. M. **Cogumelo do sol. Jaboticabal**: FUNEP, 38p, 1999.
- TEO, C. R. P. A. **Propriedades físico-químicas, funcionais e nutricionais e aplicação tecnológica de concentrado protéico de folhas de mandioca**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, 2007.
- TERRA, G.J.A. The significance of leaf vegetables, especially of cassava in tropical nutrition. **Tropical and Geographical Medicine**, 16:97-108. 1964.
- TIRAPEGUI, J.; MACEDO, M. Metabolismo de Proteínas. In: **Fisiologia da Nutrição Humana. Aspectos Básicos, Aplicados e Funcionais**. [s.l: s.n.]. p. 69–109.
- UEMURA, A.; MARIN-MORALES, E.; ANGELIS, D. F. **Manual de protocolos de laboratório**. Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Rio Claro: Publicação interna / UNESP - IB, 2013.
- VANNICE, G.; RASMUSSEN, H. Position of the academy of nutrition and dietetics: Dietary fatty acids for healthy adults. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 114, n. 1, p. 136–153, 2014.
- VICTORA, C. G. et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **Lancet**.; 371(9609):340-57. DOI: 10.1016/S0140- 6736(07)61692-4. 2008.
- VILLAS-BOAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã – enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, p. 38 – 42. 2000.
- WOBETO, C. et al. de. Nutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf meal at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 865-869, dez. 2006.
- WOICIECHOWSKI, A. L. **Bioconversão de hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda*, obtido pelo processo de explosão a vapor, na produção de ácido l(+) láctico pelo fungo *Rhizopus oryzae***. 101p. Dissertação (Mestrado) Uiv. Fed. PR. Curitiba. 1997.
- WU, G. **Amino Acids: Biochemistry and Nutrition**. [s.l.] Taylor & Francis Group, LLC, 2013.
- WU, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2009.
- YANG, J. H., LIN, H. C., MAU, J. L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, 77, 229–235. 2002.