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

VIABILIDADE DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO FUNCIONAL A BASE
DE FARINHA DE MESOCARPO DE BABAÇU (*Orbignya* sp.) E
FOLHAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*) MEDIANTE
FERMENTAÇÃO POR *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*

EDUARDO MARIN MORALES

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

**VIABILIDADE DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO FUNCIONAL A
BASE DE FARINHA DE MESOCARPO DE BABAÇU (*Orbignya* sp.)
E FOLHAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*) MEDIANTE
FERMENTAÇÃO POR *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***

EDUARDO MARIN MORALES

Orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientadora: Dra. Rosilene Naves Domingos

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

**Rio Claro – SP
Março - 2012**

547.29 Morales, Eduardo Marin
M828v 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* / Eduardo Marin Morales. - Rio Claro : [s.n.], 2012
85 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis
Co-Orientador: Rosilene Naves Domingos

1.Fermentação. 2. Fermentação em estado sólido. 3. Proteínas. 6. Alimentação. I. Título.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Viabilidade de obtenção de alimento funcional a base de farinha de mesocarpo de babaçu (*Orbignya* sp.) e folhas de mandioca (*Manihot esculenta*) mediante fermentação por *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*

AUTOR: EDUARDO MARIN MORALES

ORIENTADORA: Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSILENE NAVES DOMINGOS

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

Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. CASSIANA MARIA REGANHAN CONEGLIAN

UNICAMP - Universidade de Campinas, Limeira/SP

Prof. Dr. HÉRCULES MENEZES

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 13 de abril de 2012.

Dedico este trabalho à minha
querida esposa Dânia, aos meus
pais Marin e Norberto e minha
irmã Mariana.

“A mente que se abre a uma
nova ideia jamais voltará ao seu
tamanho original”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente:

À minha querida esposa Dânia pelo amor e companheirismo, pela cumplicidade e compreensão e pela amizade. Uma pessoa inteligente, justa e correta sempre pronta a me apoiar em bons e maus momentos, sempre disposta a me escutar e estar ao meu lado. Por me fazer feliz! Te amo!!

Aos meus pais, Marin e Norberto que, além de serem os responsáveis pela minha presença neste mundo, dedicaram a vida com muito amor e trabalho para possibilitar a realização dos sonhos e conquistas dos filhos. Tenho vocês como alicerce e exemplo para minha vida. Nunca deixarei de me espelhar em vocês!

À minha irmã Mariana, por estar presente na minha vida desde sempre. Pela amizade, companheirismo, sugestões e conversas sempre muito proveitosas. Nem o Oceano Atlântico pode nos distanciar.

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.

Aos meus tios e primos que tornam a família muito unida, fundamental para a concretização dos nossos sonhos.

À Vânia (sogra), Júnior (sogro) e Bruna (cunhada) por me receberem como um verdadeiro membro da família.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, brilhante e renomada pesquisadora, agradeço pela orientação neste trabalho, pelos valiosos conhecimentos, confiança e incentivos que, mesmo se dividindo entre tantos afazeres, pôde realiza-los com extrema qualidade.

À Profa. Rosilene Naves Domingos pela co-orientação, pelo apoio e envio de materiais, fundamental para a realização deste trabalho.

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 meus amigos de infância Fernando e Camila; Frederico, Carol e Felipe; Hélio que, sempre acham uma razão pra comemorar e tomar um bom vinho.

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, Sibeli, Richard, Ângela, Emily, Márcio Rozin, Héliid 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 e técnicos (Roberto José Pedro, Carmem Casonato, Fátima Aparecida Neves e Ângela Barbosa).

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

Ao Prof. Dr. Jorge José Correa Lopes e à Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian pelas valorosas opiniões que puderam aprimorar os resultados deste trabalho.

À Profa. Dra. Aureluce Demonte e à Profa. Dra. Olga Tavano, pelo grande apoio e colaboração aos experimentos com *E. zymogenes*, sem os quais não teríamos êxito nesta etapa.

À Dra. Mariana Cortezi, pela fundamental ajuda com as análises de digestibilidade *in vitro*.

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

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos gerais	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	18
4.1.1. Manutenção da cultura	18
4.1.2. Esporulação do <i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	18
4.1.3. Suspensão de esporos	18
4.2. Mesocarpo de babaçu	19
4.3. Farinha de folha de mandioca	19
4.4. Determinação da qualidade nutricional da proteína por método microbiológico	19
4.4.1. <i>Enterococcus zymogenes</i>	20
4.4.2. Preparo das soluções	20
4.4.2.1. Meio basal	20
4.4.2.2. Solução de sais de Vogel	21
4.4.2.2.1. Solução de elementos traços	21
4.4.2.3. Mistura vitamínica	21
4.4.3. Meio de cultivo para o <i>E. zymogenes</i>	22
4.4.4. Meio de manutenção por congelamento	22
4.4.5. Preparo do experimento	22
4.5. Preparo das amostras	23
4.6. Determinação de nitrogênio e proteínas totais	24
4.7. Lipídios totais por extrato em n-hexano	25

4.8. Umidade	25
4.9. Digestibilidade “ <i>in vitro</i> ”	26
4.9.1. Digestão	26
4.10. Resíduo por incineração - cinzas	26
4.11. Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Experimentos preliminares para preparo das amostras.....	28
5.2. 1º experimento de fermentação de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) por <i>Rhizopus oligosporus</i> com amostras <i>in</i> <i>natura</i>	30
5.3. 2º experimento de fermentação de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) por <i>Rhizopus oligosporus</i> com maiores concentrações de FFM com amostras <i>in natura</i>	33
5.4. 3º experimento de fermentação de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) por <i>Rhizopus oligosporus</i> com maiores concentrações de FFM com amostras tratadas termicamente.....	34
5.5. Experimento de fermentação de farinha de folhas de mandioca (FFM) por <i>Rhizopus oligosporus</i>	37
5.6. Quantificação de lipídios das amostras fermentadas e não fermentadas	38
5.7. Qualidade nutricional de proteínas – valor nutricional relativo (VNR)	40
5.8. Digestibilidade “ <i>in vitro</i> ” das amostras	42
5.9. Umidade	43
5.10. Cinzas.....	44
5.11. Aminoácidos Totais	46
5.12. Demais resultados	51
6. CONCLUSÃO.....	55
5. REFERÊNCIAS	57

Lista de Tabelas

Tabela 1. Necessidades nutricionais diárias de acordo com a faixa etária	7
Tabela 2. Composição química mineral do mesocarpo de babaçu (µg/g).....	12
Tabela 3. Composição centesimal média do mesocarpo de babaçu	12
Tabela 4. Composição centesimal média da farinha de folhas de mandioca.....	17
Tabela 5. Porcentagem de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) utilizada por amostra	23
Tabela 6. Fatores de conversão em proteínas e seus respectivos alimentos para o método de Kjeldahl	25
Tabela 7. Porcentagem dos ingredientes utilizados por amostra no 1º experimento	30
Tabela 8. Porcentagem de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) utilizada por amostra no 2º experimento.....	33
Tabela 9. Valor nutricional relativo (VNR), calculado com utilização de <i>Enterococcus zymogenes</i> , de amostras contendo farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) antes e após a fermentação do 3º experimento	40
Tabela 10. Valores percentuais da digestibilidade das amostras contendo farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) fermentadas e não fermentadas	42
Tabela 11. Porcentagem de umidade em amostras de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) fermentadas e não fermentadas, após secagem em estufa ($54 \pm 1^\circ\text{C}$ / 48 horas).....	43
Tabela 12. Composição de aminoácidos (mg/100g amostra) de substratos fermentados por <i>Rhizopus oligosporus</i> e não fermentados de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) acrescidos de diferentes concentrações de farinha de folhas de mandioca (FFM).....	48
Tabela 13. Incremento de aminoácidos pela adição de folhas de mandioca e fermentação em estado sólido por <i>Rhizopus oligosporus</i>	49

Tabela 14. Necessidade diária de aminoácidos essenciais recomendada, calculada pela média de peso corporal por idade.....	50
Tabela 15. Suprimento percentual do valor diário recomendado pela FAO de aminoácidos essenciais por idade, mediante o consumo de 100g de FMB + 32% FFM fermentada por <i>Rhizopus oligosporus</i>	51
Tabela 16. Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB)	52
Tabela 17. Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) com inclusão de 8% de farinha de folhas de mandioca (FFM) – não fermentada	52
Tabela 18. Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) com inclusão de 8% de farinha de folhas de mandioca (FFM) – fermentada	52
Tabela 19. Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) com inclusão de 32% de farinha de folhas de mandioca (FFM) – não fermentada	53
Tabela 20. Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) com inclusão de 32% de farinha de folhas de mandioca (FFM) – fermentada.....	53
Tabela 21. Caracterização bromatológica da farinha de folhas de mandioca (FFM) – não fermentada.....	53
Tabela 22. Caracterização bromatológica da farinha de folhas de mandioca (FFM) – fermentada.....	53

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Orbignya</i> sp.: (A) Palmeira do babaçu; (B) Cacho de cocos do babaçu; (C) Corte transversal do fruto babaçu: 1. Epicarpo; 2. Mesocarpo; 3. Endocarpo e 4. Amêndoa.....	10
Figura 2. Procedimento para fermentação do substrato em estufa a $30 \pm 2^\circ\text{C}$	24
Figura 3. Experimento de avaliação de crescimento do <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> em meios de cultura diferenciados com Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) - (incubação à 28°C). (A) 4% de FMB – 48 h de incubação; (B) 4% de FMB – 96 h de incubação; (C) 4% de [FMB + 10% FFM] – 48 h de incubação; (D) 4% de [FMB + 10% FFM] – 96 h de incubação; (E) 4% de FFM – 48 h de incubação; (F) 4% de FFM – 96 h de incubação.....	29
Figura 4. Recipiente de poliestireno utilizado para a fermentação das amostras.....	30
Figura 5. Aumento da quantidade de proteínas em Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) acrescido de Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) após 15 dias de fermentação por <i>Rhizopus oligosporus</i>	31
Figura 6. Box-Plot das amostras do 1º experimento antes e depois da fermentação da Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM): (A) FMB; (B) FMB + 2% FFM; (C) FMB + 4% FFM e (D) FMB + 8% FFM	32
Figura 7. Placa de Petri contendo <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> adaptado ao meio de Farinha de Mesocarpo de Babaçu + 8% de Farinha de Folhas de Mandioca.....	34
Figura 8. Contaminações por fungos nas amostras de Farinha de Mesocarpo de Babaçu e Farinha de Folhas de Mandioca fermentadas por <i>Rhizopus oligosporus</i>	34

Figura 9. Porcentagem de proteínas antes e após a fermentação por 3 dias da Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) fermentadas por <i>Rhizopus oligosporus</i> em amostras previamente pasteurizadas	35
Figura 10. Box-Plot das amostras do 3º experimento antes e depois da fermentação de Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) acrescidas de Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) por <i>Rhizopus oligosporus</i> : (A) FMB + 8% FFM; (B) FMB + 16% FFM e (C) FMB + 32% FFM.....	36
Figura 11. Porcentagem de proteínas antes e após a fermentação em amostras de FFM por <i>Rhizopus oligosporus</i> em diferentes períodos.....	37
Figura 12. Box-Plot das amostras FFM do primeiro e terceiro experimento, antes e depois da fermentação por <i>Rhizopus oligosporus</i> para avaliar a significância dos resultados.....	37
Figura 13. Porcentagem de lipídios extraída por n-hexano em aparelho Soxhlet, antes e após a fermentação de substratos contendo Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) por <i>Rhizopus oligosporus</i>	38
Figura 14. Box-Plot da porcentagem de lipídios extraída por n-hexano em aparelho Soxhlet, antes e após a fermentação dos substratos contendo Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) por <i>Rhizopus oligosporus</i> para avaliar a significância dos resultados.....	39
Figura 15. Experimento da avaliação do Valor Nutricional Relativo (VNR) das proteínas das amostras mediante o crescimento de <i>Enterococcus zymogenes</i> . (A) Amostras hidrolisadas e esterilizadas antes do início do crescimento do microrganismo (da esquerda para a direita): FMB + 8% FFM fermentada; FMB + 8% FFM não fermentada; FMB + 32% FFM fermentada; FMB + 32% FFM não fermentada; FFM fermentada; FFM não fermentada e Caseína; (B) Tubos do experimento preparados e inoculados (quadruplicatas + branco)	41

- Figura 16.** Porcentagem de cinzas obtidas por incineração de amostras contendo Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM), antes e após a fermentação dos substratos por *Rhizopus oligosporus*45
- Figura 17.** Box-Plot da porcentagem de cinzas obtidas por incineração de amostras contendo Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM), antes e após a fermentação dos substratos por *Rhizopus oligosporus* para avaliar a significância dos resultados45

RESUMO

O presente trabalho avaliou o potencial de misturas, pasteurizadas ou não, contendo farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) como substrato de fermentação para o *Rhizopus oligosporus*. As amostras foram umedecidas a 57%, inoculadas com o fungo e incubadas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ até a colonização completa manifestada pela visualização evidente dos micélios. Foram quantificados proteínas, lipídios, carboidratos totais, cinzas e umidade das amostras com variadas concentrações de FMB e FFM (FMB, FMB+2%FFM, FMB+4%FFM, FMB+8%FFM, FMB+16%FFM, FMB+32%FFM e FFM), sendo que as amostras FMB+8%FFM, FMB+32%FFM e FFM apresentaram aumento significativo quanto a quantidade de proteínas. A digestibilidade das amostras foi calculada mediante a digestão com tripsina para a conversão real do valor nutricional relativo da proteína. O valor nutricional relativo (VNR) das proteínas foi avaliado mediante o crescimento do *Enterococcus zymogenes*, antes e após a fermentação. Os resultados obtidos demonstram que a mistura contendo FMB+32%FFM, após pasteurização e fermentação, apresenta-se como um substrato eficiente para a fermentação em estado sólido pelo *R. oligosporus*, proporcionando melhorias significativas quanto ao valor de proteínas ($11,45 \pm 0,105\%$), minerais ($2,85 \pm 0,015\%$) e lipídios ($1,48 \pm 0,05\%$). A concentração de aminoácidos essenciais quantificada na amostra apresentou maior quantidade e qualidade ao final do processo, suprimindo grande parte da necessidade diária recomendada pela FAO (histidina (185,8 mg/100g), treonina (487,6 mg/100g), valina (526,3 mg/100g), metionina (123,8 mg/100g), isoleucina (417,9 mg/100g), leucina (719,8 mg/100g), fenilalanina (565,0 mg/100g), lisina (425,7 mg/100g), sendo deficiente apenas em triptofano. Os dados desta pesquisa indicam que o mesocarpo de babaçu acrescido de 32% de farinha de folhas de mandioca pode ser transformado microbiologicamente, oferecendo potencial aplicação na alimentação humana.

Palavras-chave: Mesocarpo de babaçu, folhas de mandioca, *Rhizopus oligosporus*, fermentação em estado sólido, proteínas, alimentação.

ABSTRACT

This study evaluated the potential of mixtures, pasteurized or not, containing babassu mesocarp flour (BMF) and cassava leaf meal (CLM) as substrate for fermentation by *Rhizopus oligosporus*. The samples were moisturized to 55%, inoculated with the fungus and incubated at $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ until complete colonization expressed by the clear view of mycelia. Protein, lipids, total carbohydrates, ashes and humidity were quantified of the samples with varying concentrations of BMF and CLM (BMF, BMF+2%CLM, BMF+4%CLM, BMF+8%CLM, BMF+16%CLM, BMF+32%CLM and CLM), whereas the samples containing BMF+8%CLM, BMF+32%CLM and CLM showed a significant increase in the amount of protein. The digestibility of the samples was calculated by trypsin digestion to real converting of relative nutritional value (RNV). The real relative nutritional value of proteins was checked by the growth of *Enterococcus zymogenes* before and after fermentation. The results obtained show that the mixture containing BMF + 32% CLM, after pasteurization and fermentation presented as an efficient substrate for solid-state fermentation by *R. oligosporus*, providing significant improvements in value of proteins ($11.45 \pm 0.105\%$), minerals ($2.85 \pm 0.015\%$) and lipids ($1.48 \pm 0.05\%$). The concentration of essential amino acids quantified on sample showed higher quantity and quality on final product, supplying most of diary necessity by FAO's recommendation (histidine (185.8 mg/100g), threonine (487.6 mg/100g), valine (526.3 mg/100g), methionine (123.8 mg/100g), isoleucine (417.9 mg/100g), leucine (719.8 mg/100g), phenylalanine (565.0 mg/100g), lysine (425.7 mg/100g), being deficient only in tryptophan. The results of this work indicate that babassu mesocarp increased with 32% of cassava leaf meal can be transformed microbiologically, offering potential application in human food.

Keywords: babassu mesocarp, cassava leaves, *Rhizopus oligosporus*, solid-state fermentation, proteins, feed.

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição está vinculada à deficiência específica de macro e micronutrientes, falta de higiene alimentar, como também pela ocorrência de infecções decorrentes de deficiências alimentares como proteínas, vitaminas ou minerais segundo dados da UNICEF, a subnutrição é responsável por mais da metade das mortes de crianças no mundo, atingindo cerca de 5,6 milhões por ano e está diretamente ligado à pobreza e desigualdades sociais. Um dos pontos fortes para o combate à desnutrição pode estar vinculado ao reforço do sistema imunológico mediante o enriquecimento de alimentos básicos com nutrientes essenciais.

A ingestão de alimentos ricos em micronutrientes essenciais como zinco, cálcio, ferro, magnésio, vitaminas A e C impulsiona uma resposta imunológica do organismo auxiliando o crescimento e desenvolvimento adequado de crianças em idade escolar, desde que o consumo de tais nutrientes se dê na quantidade diária recomendada. Contudo, a base de uma alimentação saudável deve estar vinculada aos significados culturais e sociais de consumo alimentar.

Segundo Domingos (2003) o mesocarpo de babaçu, além de ser tradicionalmente utilizado na cultura alimentar das comunidades do Nordeste, Norte e Centro-Oeste, trata-se de um alimento rico em ferro, cálcio, fósforo e magnésio. Tal característica o torna interessante para o uso como alimento alternativo para o combate à desnutrição. Porém, apesar dessas características, o mesocarpo de babaçu possui baixos teores de proteína em sua composição, sendo necessária sua inclusão por outros meios, como a fermentação. Para suprir essa deficiência, as folhas de mandiocas, que são produzidas em grandes quantidades, representam uma fonte rica em proteínas, vitaminas e sais minerais.

As folhas da mandioca são consideradas como resíduos no Brasil e, devido a sua relevante concentração de proteínas presente como também elevados teores de minerais,

existem propostas para sua utilização no consumo humano (PINHEIRO; RECINE; CARVALHO, 2005; CEREDA, 2001; DEL BIANCHI, 1998).

Com a finalidade de melhorar as características organolépticas e bromatológicas do produto, a fermentação em estado sólido desse material pode apresentar melhoras com relação à quantidade de proteínas presentes e assimiláveis derivadas do crescimento micelial, como também melhores valores de digestibilidade do produto pós-fermentado mediante a degradação das fibras.

O interesse no uso de microrganismos e seus produtos, derivados da fermentação, para a produção de alimentos vêm aumentando, pois, há muito tempo desempenham um papel importante na alimentação. Aromas, conservantes, antioxidantes, entre outros, são exemplos da diversidade de produtos de origem microbiana utilizados na produção de alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

Desenvolver um produto alimentício a partir da farinha de mesocarpo de babaçu com melhores teores nutricionais, pela incorporação de farinha de folhas de mandioca, rica em proteínas e por meio de processo fermentativo, realizado pelo fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*.

2.2. Objetivos específicos:

- avaliar a concentração da mistura com níveis nutricionais esperados para a caracterização de um alimento adequado, após fermentação das seguintes amostras:
 - farinha de mesocarpo de babaçu;
 - farinha de folhas de mandioca;
 - farinha de mesocarpo de babaçu com diferentes concentrações de farinha de folhas de mandioca;
- avaliar o aumento da disponibilidade protéica, após o enriquecimento com folhas de mandioca e fermentação pelo fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*;
- analisar quimicamente os nutrientes presentes nas amostras testadas;
- comprovar a efetividade do enriquecimento do composto, por meio da análise de digestibilidade das proteínas e da presença de aminoácidos nas amostras;
- avaliar a qualidade microbiológica da farinha obtida.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os alimentos, imprescindíveis a todos os seres vivos, são consumidos *in natura*, preparados ou industrializados e derivam de matérias-primas de origem animal, vegetal, microbiana e mineral. Estes alimentos podem se apresentar em variados estados físicos, composição química e caracteres organolépticos. A diminuição ou a ausência de nutrientes necessários ao desenvolvimento dos organismos podem causar déficits fisiológicos e, conseqüentemente, enfermidades aos indivíduos, afetando-os gravemente (EVANGELISTA, 2000).

A finalidade principal dos alimentos é fornecer aos organismos a energia e nutrientes destinados à formação e à manutenção dos tecidos, ao mesmo tempo em que regulam o funcionamento dos órgãos. Quimicamente, são constituídos por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, porém outros elementos são também encontrados em quantidades menores. Sua composição química em geral é descrita, em termos de seu conteúdo, quanto à porcentagem de carboidratos, proteínas, gorduras, cinzas e água, elementos estes que identificam o valor nutritivo dos alimentos (MELO et al., 2007a).

Do ponto de vista biológico, esses nutrientes agrupam-se em três classes: energéticos, plásticos e reguladores. A função energética está relacionada com a manutenção da temperatura corporal, que é exercida pelo metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. A função plástica está associada ao processo de crescimento, desenvolvimento e reparação dos tecidos vinculados ao consumo de proteínas. A função dos reguladores é conferida pelas vitaminas, minerais, fibras e pelo oxigênio (EVANGELISTA, 2000).

Os alimentos devem ser consumidos de acordo com as exigências fisiológicas de um organismo, decorrente das funções que seus nutrientes apresentam sobre o sistema orgânico. Assim, o consumo balanceado dessas três classes de nutrientes assegura o adequado

funcionamento dos processos biológicos dos organismos (EVANGELISTA, 2000). A utilização de diversos alimentos que possuem grande variedade de compostos farmacológicos com potenciais terapêuticos vem sendo estudada e publicada por cientistas ligados a áreas correlatas à nutrição (MENEZES; BERTOLA, 2001).

Doenças decorrentes de avitaminose e déficit de minerais e proteínas constam como problemas de saúde pública em diversos segmentos da população mundial, mas a carência de proteínas é o problema nutricional que excede em importância (TAVARES; KIYAN, 2002).

Segundo a FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (2012), o índice de preços dos alimentos mundial apresentou crescimento de 2010 para 2011, de 188,2 para 227,6. Considerando-se as principais fontes de proteínas dos seres humanos como carne, leite e seus derivados, esse índice também se elevou nos últimos anos. Como a fome afeta, principalmente, pessoas de baixa ou nenhuma renda, a elevação dos preços dos alimentos dificulta ainda mais o acesso a alimentos de qualidade, gerando problemas de saúde crônicos nessa população.

Problemas como anemia (falta de ferro); gengivites (carência de vitaminas do complexo B); catarata (deficiência em vitamina A); funcionamento inadequado do sistema imunológico (consumo irregular de vitamina C, E e carotenoides); osteoporose (problema decorrente de baixos índices corpóreos de vitamina D); baixo desempenho mental (baixos níveis de ácido fólico, selênio, zinco e vitaminas do complexo B), podem estar relacionados, principalmente em países em desenvolvimento, à falta de nutrientes, devido à ausência ou disponibilidade inadequada de alimentos (MENEZES; BERTOLA, 2001).

Desta maneira, uma alimentação adequada pode manter os níveis adequados do desempenho das funções fisiológicas. Contrariamente à desnutrição, que leva os indivíduos a uma situação preocupante, pelo comportamento geral do organismo, em consequência da baixa disponibilidade de nutrientes essenciais.

O número de subnutridos no mundo passou de 825 milhões, no período de 1995 a 1997, a 873 milhões entre 2004 e 2006. Em 2008, o número diminuiu de 963 milhões a 915 milhões provavelmente devido a melhor distribuição dos alimentos, mas a tendência reverteu-se com o agravamento da crise econômica e financeira do final deste mesmo ano. A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) anunciou em seu relatório anual de segurança alimentar mundial que, devido à crise, o número de desnutridos no mundo em 2009 poderia ultrapassar um bilhão de pessoas (JORNAL DO BRASIL, 2009).

Uma grande preocupação é com relação à desnutrição infantil, pois, existem evidências de que uma alimentação inadequada durante a infância induz baixa taxa de

crescimento que pode estar associada a maior mortalidade infantil, principalmente pela maior fragilidade a doenças infecciosas, podendo também gerar prejuízos para o desenvolvimento psicomotor, aproveitamento escolar e menor capacidade produtiva na idade adulta (BLACK et al., 2008; VICTORA et al., 2008).

Países em desenvolvimento apresentam como um dos maiores problemas de saúde coletiva doenças relacionadas com a desnutrição energético-protéica, que pode apresentar diferentes estágios, desde déficits discretos de crescimento e perda de peso, até quadros mais graves como Kwashiorkor (desnutrição edematosa) e o marasmo.

O marasmo, também chamado de desnutrição calórica total (desnutrição energética), se trata de um nível severo de desnutrição e está ligado à diminuição da quantidade total de alimentos ingeridos, enquanto que Kwashiorkor, outro tipo de desnutrição severa conhecida basicamente como desnutrição protéica, apresenta-se quando ocorrem alterações na qualidade da dieta. A presença ou não de edema (acúmulo anormal de líquido) é crucial para diferenciar as duas síndromes (SAWAYA, 1985).

Tais manifestações podem apresentar retardo do crescimento, perda de gordura subcutânea e massa muscular, edemas, alterações mentais e de humor. Podem afetar o couro cabeludo e cabelos, despigmentação e descamação da pele (COSTA et al., 2010).

A desnutrição infantil está vinculada à deficiência específica de macro e micronutrientes, falta de higiene alimentar, como também pela ocorrência de infecções decorrentes de deficiências alimentares como proteínas, vitaminas ou minerais (MONTEIRO, 1995). Segundo a UNICEF (2006), a subnutrição é responsável por mais da metade das mortes de crianças no mundo, atingindo cerca de 5,6 milhões por ano e está diretamente ligado à pobreza e desigualdades sociais. Um dos pontos fortes para o combate à desnutrição pode estar vinculado ao reforço do sistema imunológico mediante o enriquecimento de alimentos básicos com nutrientes essenciais.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 300 milhões de crianças no mundo tenham retardo de crescimento como consequência de déficits nutricionais, caracterizado como desnutrição (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998).

A Tabela 1 apresenta as necessidades diárias humanas de ingestão de nutrientes:

Tabela 1 – Necessidades nutricionais diárias de acordo com a faixa etária

	Unidade	Crianças 1-3 anos	Crianças 4-6 anos	Crianças 7-10 anos	Adultos
Proteínas	g	13	19	34	50
Vitamina A	µg RE *	400	450	500	600
Vitamina D	µg	5	5	5	5
Vitamina C	mg	30	30	35	45
Vitamina E	mg	5	5	7	10
Tiamina	mg	0,5	0,6	0,9	1,2
Riboflavina	mg	0,5	0,6	0,9	1,3
Niacina	mg	6	8	12	16
Vitamina B6	mg	0,5	0,5	1	1,3
Ácido Fólico	µg	160	200	300	400
Vitamina B12	µg	0,9	1,2	1,8	2,4
Biotina	µg	8	12	20	25
Ácido Pantotênico	mg	2	3	4	5
Vitamina K	µg	15	20	25	65
Cálcio	mg	500	600	700	1000
Ferro	mg	6	6	9	14
Magnésio	mg	60	73	100	260
Zinco	mg	4,1	5,1	5,6	7
Iodo	µg	75	110	100	130
Fósforo	mg	460	500	1250	700
Flúor	mg	0,7	1	2	4
Cobre	µg	340	440	440	900
Selênio	µg	17	21	21	34
Molibdênio	µg	17	22	22	45
Cromo	µg	11	15	15	35
Manganês	mg	1,2	1,5	1,5	2,3
Colina	mg	200	250	250	550

* 1 µg retinol = 1 µg RE; 1 µg β-caroteno = 0,167 µg RE; 1 µg carotenoides provitamina A = 0,084 µg RE.

O termo Vitamina A é utilizado para referir-se ao retinol presente no alimento.

Fonte: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2004.

O índice de desnutrição de crianças brasileiras, em 1989, foi de 15,4% do total da população infantil, ou seja, cerca de 2,5 milhões de crianças desnutridas. Em 2008, o número estimado de crianças que viviam em famílias de baixa renda (renda mensal menor que meio salário mínimo) era de 11,5 milhões. As populações rurais, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, apresentavam os maiores valores, que variavam entre 23 a 27,3%, enquanto que nas regiões Centro-Sul a variação foi de 8 e 9%. Neste contexto, é importante destacar que o

elevado número de crianças desnutridas nas regiões Norte e Nordeste se deve à menor renda das famílias, em comparação com a renda Centro-Sul brasileira (MONTEIRO, 1995; BRASIL, 2012).

Mesmo sendo um dos maiores produtores de alimentos do mundo, o Brasil está entre os 10 países que mais o desperdiçam, atingindo cerca de 35% da produção agrícola. Tal quantidade poderia alimentar em torno de 10 milhões de pessoas, sendo que, mais de 54 milhões vivem abaixo da linha de pobreza (GOULART, 2008).

A fome e o desperdício de alimentos são dois dos maiores problemas que o Brasil enfrenta, constituindo-se em um dos paradoxos do nosso país. Produzimos 140 milhões de toneladas de alimentos por ano, somos um dos maiores exportadores de produtos agrícolas do mundo e, ao mesmo tempo, temos milhões de excluídos sem acesso ao alimento em quantidade e/ou qualidade. Pelas dificuldades econômicas atuais, torna-se cada vez mais difícil adquirir alimentos adequados ao consumo diário, razão pela qual a alimentação equilibrada é, hoje, uma das nossas maiores preocupações (CINTRA et al., 2007).

A ingestão de alimentos ricos em micronutrientes essenciais como zinco, cálcio, ferro, magnésio, vitaminas A e C impulsiona uma resposta imunológica do organismo auxiliando o crescimento e desenvolvimento adequado de crianças em idade escolar, desde que o consumo de tais nutrientes se dê na quantidade diária recomendada (MOREIRA; PRASS; BLASI, 2006). Contudo, a base de uma alimentação saudável deve estar vinculada aos significados culturais e sociais de consumo alimentar (PINHEIRO; RECINE; CARVALHO, 2005).

Como todo homem necessita de uma alimentação de qualidade, isto é, rica em nutrientes, existe um constante interesse quanto à otimização e aproveitamento dos alimentos pela interligação de partes que normalmente são desprezadas. Desta forma, busca-se hoje, o aproveitamento integral dos alimentos, utilizando até mesmo as cascas, talos e folhas de vegetais, que seriam eventualmente descartados (CINTRA et al., 2007). A utilização dessas fontes de nutrientes apresentam vantagens como o aumento de alimentos disponíveis sem a necessidade do aumento da área cultivada, além de maior alcance e satisfação às necessidades nutricionais da população com níveis de energia, terra, água e trabalho semelhantes (MARTINS; FARIAS, 2002).

Estas fontes alternativas devem apresentar, além de boas características sensoriais e facilidade de produção, características nutricionais e funcionais desejáveis (COSTA; ROMANELLI; TRABUCO, 2008), como alto valor nutritivo e benefícios à saúde pela diminuição de riscos de doenças crônico-degenerativas (MORAES; COLLA, 2006).

Desde 1996, após a Cúpula Mundial da Alimentação em Roma, o Brasil firmou com diversos países o compromisso de diminuir pela metade os índices de insegurança alimentar até o ano de 2015. Segundo pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde em 2008, a região Nordeste apresenta os índices mais elevados de insegurança alimentar, tanto na zona rural como na urbana (KORNIZEJUK, 2008).

O pouco uso da biodiversidade regional na alimentação e, conseqüentemente, maior insegurança alimentar no mundo moderno pode ser explicado, em parte, pelo êxodo rural e a perda das tradições alimentares, como também a dependência de padrões alimentares urbanos e industriais (KORNIZEJUK, 2008).

O mesmo autor demonstrou que o uso de produtos regionais e produtos não convencionalmente usados na alimentação podem ser eficientes contra a desnutrição, quando comparou a mistura de ingredientes elaborada com alimentos regionais e sobras de alimentos industrializados (Multimistura) com produtos disponíveis no mercado. A multimistura apresenta grande quantidade de elementos essenciais à dieta infantil como potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), além de valor nutricional equilibrado, contendo cerca de 30% de carboidratos, 30% de fibras, 5% de lipídeos e 15% de proteínas. Isso representa maior quantidade de fibras e proteínas, além de, conseqüentemente, menores quantidades de lipídeos e carboidratos que os produtos existentes no mercado.

Porém, devido à falta de evidências científicas sobre a prevenção, tratamento e cura de doenças nutricionais pelo uso da multimistura devido à presença de compostos antinutricionais como glicosídeos cianogênicos, ácidos fílicos e tânico fez com que, recentemente, o Ministério da Saúde e o Conselho Federal de Nutrição emitissem notas que permitiam, com ressalvas, o consumo da multimistura (CFN, 2010).

Atualmente, a fruticultura vem se desenvolvendo como um importante setor agropecuário da região Nordeste (LOUSADA JÚNIOR et al., 2006). Dentre as plantas de exploração tecnológica destaca-se, mais recentemente, a palmeira babaçu – *Orbignya* sp. A palmeira babaçu é uma árvore nativa do Brasil, pertence à Família *Palmaceae*, encontrada em grande quantidade nos estados do Maranhão, Piauí, Tocantins e Mato Grosso. Esta planta pode alcançar, na idade adulta, 20 metros de altura com produção de frutos a partir do oitavo ano de vida (JESUS, 1988).

O babaçu é uma das plantas de maior destaque econômico na região Nordeste do Brasil (O COQUEIRO, 1963). Suas amêndoas são também conhecidas pelo mesmo nome

(babaçu) no mercado mundial e sua importância econômica foi mencionada pela primeira vez em 1820 (GONSALVES, 1955).

O Ministério da Agricultura estima que a superfície total ocupada pelo babaçu, no território nacional, seja de aproximadamente 13,4 milhões de hectares. Supõe-se que nessa superfície encontrem-se 20,1 bilhões de palmeiras que produzem, anualmente, 20.153 bilhões de cocos (FERREIRA, 1999).

Os frutos da palmeira babaçu (*Orbignya* sp.), uma planta nativa brasileira de ocorrência abundante na região Nordeste do Brasil, constituem a parte economicamente mais representativa da palmeira (DOMINGOS, 2003).

Segundo Frazão (2001), a produtividade média do coco do babaçu por hectare é de 2400 Kg, sendo 74% endocarpo/epicarpo (1780 Kg); 20% mesocarpo (480 Kg) e 6% amêndoas (140 Kg). A Figura 1 apresenta a palmeira babaçu e a morfologia do seu fruto.

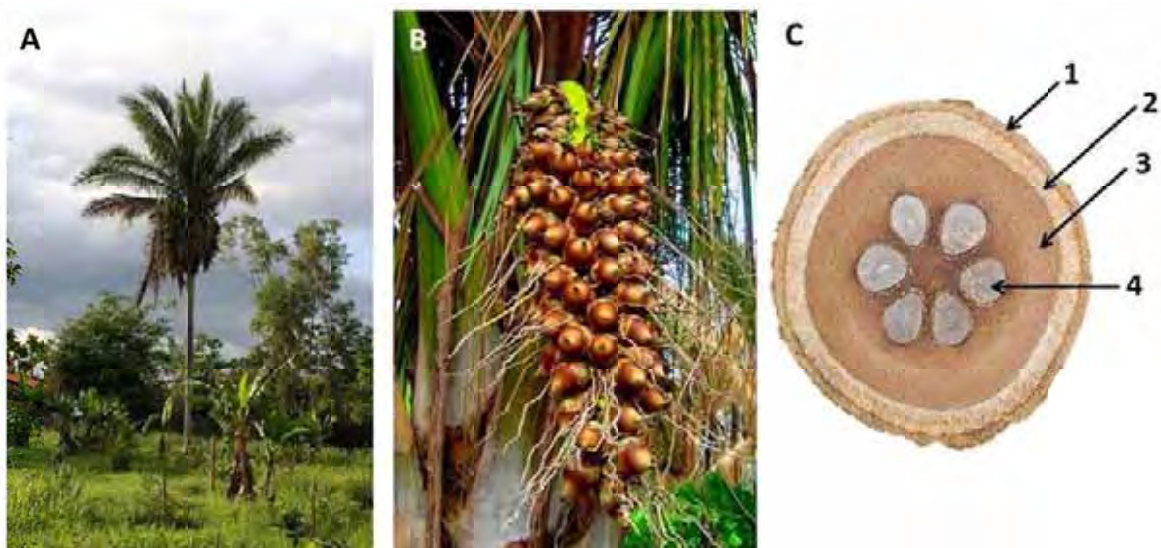


FIGURA 1 – *Orbignya* sp.: (A) Palmeira do babaçu; (B) Cacho de cocos do babaçu; (C) Corte transversal do fruto babaçu: 1. Epicarpo; 2. Mesocarpo; 3. Endocarpo e 4. Amêndoa.

A árvore produz frutos drupáceos com sementes oleaginosas e comestíveis, das quais se extrai um óleo usado na alimentação. O coco babaçu pode ser dividido em quatro partes: o *epicarpo* (12 a 18% do fruto), constituído por fibras, considerado um poderoso combustível primário com poder calorífico superior aos das melhores madeiras utilizadas como lenha, pode ser empregado na geração de calor e eletricidade; o *endocarpo* (52 a 60% do fruto) utilizado na fabricação de carvão, devido ao seu elevado poder calorífico; as *amêndoas* (cerca de 7% do fruto), contidas no endocarpo, que originam o óleo empregado na alimentação humana; o *mesocarpo* (17 a 22% do fruto), composto por aproximadamente 60% de amido,

20% de fibras, 8 a 15% de umidade, 4 a 5% de substâncias diversas, como sais minerais e taninos e uma pequena quantidade de proteínas (CECCHI, 2003).

O babaçu pode ser aproveitado em diversos segmentos como ração animal, carvão comum e ativado, sabão, margarina, fertilizante, alcatrão, álcool, palmito, produção de amido e, mais recentemente, o óleo transformado em biodiesel (OLIVEIRA; ANDRADE; SILVA, 2009). O mesocarpo do babaçu, extraído de maneira artesanal, vem sendo adicionado, sob forma de farinha, na merenda escolar em comunidades do Maranhão, como suplemento alimentar, apesar de apresentar baixos valores de proteínas (DOMINGOS, 2003; SOUZA; VIEIRA; OLIVEIRA, 2009). Outra utilização do mesocarpo sob a forma de farinha ocorre mediante a mistura com leite e açúcar, obtendo-se uma bebida semelhante ao chocolate (MAY, 1990).

A farinha de babaçu, quando comparada às demais farinhas provenientes de matérias-primas oleaginosas, apresenta baixa taxa protéica, porém, elevado teor de ferro. A digestibilidade dos nutrientes é elevada, exceto a da fibra bruta. Essa relação entre nutrientes e digestibilidade confere a esta farinha bom potencial para utilização como alimento (NOVAES, 1952). Segundo Domingos (2003), o mesocarpo de babaçu é rico, principalmente em ferro, magnésio, cálcio e fósforo, também apresentando outros minerais como manganês, zinco, cobre e outros (Tabela 2).

Estes elementos apresentam grande importância na dieta alimentar, pois, a ausência dos mesmos pode prejudicar a saúde gravemente. A ingestão de cálcio durante a infância é essencial, pois é quando ocorre o maior acúmulo deste elemento devido ao crescimento sendo o seu mecanismo de absorção dependente diretamente da vitamina D. Suas fontes mais importantes são leite, queijo e iogurte. A ausência de ferro pode causar anemia, que na infância pode prejudicar o crescimento e o desenvolvimento normais, suas principais fontes têm origem em derivados de carnes. O zinco é necessário para a formação do DNA, na divisão celular e na formação de proteínas. Suas principais fontes são ostras, carnes, fígado, especiarias e farelo de trigo. O fósforo é um dos componentes fundamentais das membranas biológicas, nucleotídeos e ácidos nucleicos, além de outras importantes funções. A deficiência de fósforo pode causar anorexia, anemia, fraqueza muscular, dores ósseas, raquitismo, maior susceptibilidade a infecções e até a morte. O fósforo pode ser encontrado em maior abundância em leite, carnes, ovos, e grãos. O magnésio participa de diversas reações nas quais se incluem o metabolismo glicídico, lipídico, protéico e dos ácidos nucleicos. Suas principais fontes são chocolate, cacau em pó, amendoim, nozes e leguminosas (MORA; BARERA,

2004; ANVISA, 2004; VITOLO, 2003; CTENAS, 2003; PRASAD, 1996; ACCIOLY; SAUNDERS; LACERDA, 2004; CASHMAN; FLYNN, 1999).

A ingestão de quantidades adequadas dos nutrientes acima citados durante a infância é fundamental tanto para o desenvolvimento do indivíduo como na diminuição dos riscos de doenças crônicas na idade adulta como osteoporose e hipertensão arterial (ACCIOLY; SAUNDERS; LACERDA, 2004; CASHMAN; FLYNN, 1999). Contudo, suas fontes apresentam preços elevados e acessibilidade diminuta para comunidades de menor condição financeira, devendo assim, obter tais micronutrientes pelo consumo de fontes alternativas de alimentos.

Baseado nesta descrição química anteriormente citada, o babaçu pode caracterizar-se em um alimento com grande potencial de aproveitamento.

Tabela 2 – Composição química mineral do mesocarpo de babaçu (µg/g)

Íons														
Mg	Ca	Sr	P	Co	Mn	Cu	Zn	Pb	Al	Ba	Cd	Ni	Fe	Cr
532	262	2,70	282	<0,25	0,93	2,67	0,97	<1,0	14,8	0,35	<0,15	<0,25	8,76	0,27

Fonte: DOMINGOS (2003)

Tais características tornam-no interessante para o uso como alimento alternativo para o combate à desnutrição. Porém, apesar dessas características, o mesocarpo de Babaçu não possui quantidades satisfatórias de proteína em sua composição, sendo necessária sua inclusão por outros meios, como a fermentação (Tabela 3).

Tabela 3 – Composição centesimal média do mesocarpo de babaçu

Componentes	Distribuição em peso (%)
Umidade	14,90
Amido	68,30
Proteína Bruta	1,54
Fibra	2,41
Gordura	0,27
Carboidratos solúveis	1,25
Pentosanas	3,36
Cinzas	1,10
Não dosados	6,87
TOTAL	100,00

Fonte: BARUQUE FILHO (1995)

Para suprir essa deficiência, as folhas de mandiocas, que são produzidas em grandes quantidades, representam uma fonte rica em proteínas, vitaminas e sais minerais (AGOSTINI, 2006). Os micro-organismos e os seus produtos advindos dos processos fermentativos, para a produção de alimentos têm aumentado, embora, há muito tempo desempenham papel importante na alimentação (COUTO; SAROMÁN, 2006).

Os primeiros registros do uso da fermentação e de alimentos fermentados pela humanidade derivam da Suméria e Babilônia (ELANDER; LOWE, 1994).

A fermentação pode proporcionar não só o aumento da vida útil e segurança dos alimentos como também torná-los mais digeríveis. No caso da folha da mandioca, a fermentação diminui a toxicidade do substrato, pela degradação dos compostos cianogênicos, além de promover melhor aproveitamento deste substrato e o melhoramento das características organolépticas do produto final (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; KODAMA et al., 2008).

Segundo Woiciechowski (1997), fungos como *Rhizopus* spp. podem melhorar o grau de digestibilidade de alimentos, mediante a degradação de fibras, e aumentar o valor protéico dos alimentos, mediante avaliação do crescimento micelial. A autora relata ainda a capacidade destes fungos em impedir a formação de produtos tóxicos típicos, como a aflatoxina B1; produzir substâncias anticarcinogênicas; controlar o crescimento de bactérias Gram positivas, mediante a síntese de substâncias que impedem o seu desenvolvimento; e detoxificar os compostos cianogênicos da mandioca.

A fermentação por *R. oligosporus* pode auxiliar na segurança microbiológica do substrato, uma vez que o composto produzido por *R. microsporus* é especialmente ativo contra algumas bactérias Gram positivas, incluindo microaerofílicas e anaeróbias, como *Streptococcus cremosis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e outras (WANG e HESSELTINE, 1979).

A obtenção de biomassa protéica microbiana; produzida em substratos sólidos como soja e arroz, exige procedimentos simples e instalações de baixo custo (SERZEDELLO, 1999), o que viabiliza a implantação de projetos semelhantes em regiões de recursos econômicos restritos. Os substratos modificados constituem alimentos que podem ser consumidos diretamente e são adaptados aos hábitos regionais onde são implantados.

Assim como as bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras podem crescer em substratos sólidos, podendo ser aplicados em processos de fermentação no estado sólido. Os

fungos filamentosos são os micro-organismos mais usados neste processo, devido às suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas (SOCCOL, 1994).

Fungos filamentosos são popularmente conhecidos como bolores, com cerca de 200.000 espécies diferentes na natureza. Seu mais importante papel está vinculado à decomposição da matéria orgânica, transformando-a em substâncias mais simples e, conseqüentemente, mais assimiláveis. Crescem pelo avanço de filamentos denominados hifas ao longo de uma superfície formando um conjunto denominado micélio (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; BONONI et al., 1999).

O fungo filamentoso *Rhizopus* sp. tem sido empregado em muitos processos nos diferentes segmentos industriais como: indústria alimentícia, farmacêutica, química, biotecnológica e na agricultura (FUNGOS, 2001 *apud* DOMINGOS, 2003).

O uso de biomassa fúngica na alimentação apresenta-se nutritiva, uma vez que suas proteínas podem conter aminoácidos essenciais e não essenciais (GHORAI et al., 2009).

Apresenta vantagens com relação à dieta vegetariana como: boa quantidade de proteínas (20 a 30% da matéria seca), presença de todos os aminoácidos essenciais que a torna um substituto alternativo para a carne, alta quantidade de vitaminas do complexo B, baixa quantidade de gordura e virtualmente livre de colesterol (GHORAI et al., 2009).

As proteínas de micro-organismos apresentam digestibilidade em torno de 74%, considerada um índice alto, cerca de 22% menor que o valor da proteína padrão (Caseína), que é de 96% (SGARBIERI, 1987). Segundo Menezes (1972), quanto maior a semelhança entre a composição de uma dada proteína com proteínas de origem animal, maior será seu valor biológico e nutricional.

Devido à digestibilidade das proteínas de origem microbiana, elas podem ser utilizadas como fonte protéica adicional, indicadas para incorporação em alimentos (VILLAS-BOAS; ESPÓSITO, 2000).

O cultivo em substrato sólido (ausência de água livre) para o crescimento microbiano vem sendo usado para obtenção de produtos de origem microbiana, sendo que o início de sua utilização decorre desde 2.600 a.C. pelos egípcios e 1.000 pelos orientais (OOIJKAAS et al., 2000).

O cultivo de micro-organismos e a utilização de suas proteínas derivadas do processo fermentativo têm sido recentemente incorporados como fonte alimentar para o povo brasileiro (ANGELIS; GOES; PIÃO, 2008), não somente pelo aspecto nutricional, mas também pela capacidade de conferir propriedades sensoriais e funcionais (RODRÍGUEZ-AMBRIZ et al., 2005).

Estudos sobre a potencialidade de enriquecimento do mesocarpo de babaçu comprovaram que o mesmo pode ser modificado pela inoculação de fungos fermentadores comestíveis. Destaca-se pela maior eficiência para este fim o fungo *Rhizopus oligosporus*, que apresentou ganho de aminoácidos na composição final (LEAL,1999; DOMINGOS, 2003). Suhet (1997) obteve o máximo teor protéico, após 65 horas de fermentação semi-sólida com os fungos filamentosos *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus niger*, quando aplicados em resíduos industriais de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merril).

Enzimas amilolíticas extraídas de micro-organismos fermentadores como o *Rhizopus oligosporus* têm aplicação em biotecnologia dos processos de hidrólise do amido nas indústrias alimentícias (panificação, cervejaria, xarope de glicose ou maltose) e farmacêuticas (DOMINGOS, 2003).

Os Zigomicetos, dentre eles o *Rhizopus* sp. distribuem-se entre sete ordens, trinta e duas famílias e cento e trinta gêneros, com cerca de novecentas espécies, sendo a ordem Mucorales a com maior número de espécies. São capazes de degradar as moléculas de estrutura mais simples como glicose e sacarose e, por tal motivo, são os primeiros a crescer em um substrato com micélios densos e eminentes que chegam a atingir de dois a três centímetros de altura (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

O *Rhizopus oligosporus* pertencente à família Mucoraceae, ordem Mucorales, é amplamente utilizado na fabricação de alimentos fermentados de origem oriental como o tempeh, alimento alternativo originário da Indonésia, caracterizado como um produto fermentado a partir de grãos de soja descascados e cozidos. Para seu preparo utiliza-se o fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* como agente fermentador e figura entre as fontes alternativas que podem integrar diversos programas de alimentação e nutrição, devido ao seu alto valor protéico (TAVARES; KIYAN, 2002; HESSELTINE; WANG, 1967).

Contudo, para um substrato ser considerado ideal, deve fornecer tanto uma fonte de carbono (energia) como uma fonte de proteínas (PANDEY et al., 1999). Sendo assim, a falta de proteínas que ocorre na farinha de mesocarpo de babaçu impõe uma dificuldade para o desenvolvimento ideal do fungo, necessitando, de enriquecimento protéico para o fornecimento dos nutrientes necessários ao desenvolvimento deste fungo.

O enriquecimento de alimentos pode ser utilizado como uma estratégia de incorporação de diversos aminoácidos essenciais e outros nutrientes e, assim, atender as necessidades orgânicas específicas de uma dada população (ANVISA, 1978).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), planta pertencente à família *Euphorbiaceae*, com provável origem na região central do Brasil, tornou-se a base alimentar de diversas

populações após a sua difusão por África e Ásia, em meados do século XVII (EL-SHARKAWY, 2004).

O tubérculo da mandioca é um alimento típico, nutritivo, saboroso e de fácil produção em várias regiões brasileiras, sendo o Brasil o 2º maior produtor do mundo. Contudo, suas folhas são consideradas como resíduos e, devido a sua relevante concentração de proteínas presente como também elevados teores de minerais, podem suplementar a carga de nitrogênio do substrato, havendo também propostas para sua utilização no consumo humano (DEL BIANCHI, 1998; CEREDA, 2001; GUERROUÉ et al., 2001; PINHEIRO; RECINE; CARVALHO, 2005).

Estima-se que a produção de folhas de mandioca tenha um potencial de cerca de 2250 Kg por hectare em peso seco, porém, grande parte é desperdiçada em todas as regiões do Brasil (CEREDA, 2001). Em termos agrônômicos, o potencial de produção de proteínas derivadas das folhas das mandiocas supera entre quatro e seis vezes a produção de proteínas derivadas do leite e praticamente 100 vezes às da carne bovina, além de apresentar conteúdo de proteínas superior aos encontrados na maioria das gramíneas e leguminosas, além de maior produtividade e adaptação em solos pobres (GUERROUÉ et al., 1996; CARVALHO; KATO, 1987; LANCASTER; BROOKS, 1983).

Como descrito anteriormente, a deficiência protéica na alimentação humana é um grave problema dos países em desenvolvimento. Desta forma, a utilização de subprodutos em alimentos como as folhas de mandioca, podem também desempenhar um importante papel, pois, neste caso, este material apresenta altos teores de proteína, vitaminas (β -caroteno, vitamina C) e minerais, como por exemplo, o ferro.

A adição de folha de mandioca triturada como fonte de alimentação alternativa a outros alimentos pode ser solução para suplementar a carência de alguns nutrientes, da farinha de mesocarpo de babaçu (CARVALHO et al., 1989).

As folhas de mandioca são referidas como boas fontes de vitaminas, principalmente vitamina C e beta-caroteno. Também possuem apreciáveis quantidades de riboflavina, niacina e tiamina, reforçando o potencial da folha de mandioca como suplemento vitamínico, além de uma boa fonte de minerais, fibras e proteínas como apresentado na Tabela 4 (MELO et al., 2007a; TEO, 2007).

Apesar da elevada concentração de proteínas presente, a digestibilidade das folhas apresentam baixos índices, devido, principalmente, à presença de fibras (OKE, 1978). Sendo assim, a fermentação em estado sólido desse material pode apresentar melhores com relação à quantidade de proteínas presentes e assimiláveis derivadas do crescimento micelial, como

também melhores valores de digestibilidade do produto pós-fermentado mediante a degradação das fibras (WOICIECHOWSKI, 1997).

Tabela 4 – Composição centesimal média da farinha de folhas de mandioca

Componentes	Distribuição em peso (%)
Umidade	8,31
Proteína Bruta	29,86
Fibra	26,50
Gordura	9,20
Carboidratos	19,98
Cinzas	6,15
TOTAL	100,00

Fonte: MELO et al. (2007a)

A farinha de folhas de mandioca (FFM) é constituída por talos primários, secundários e folhas em proporções variáveis, segundo a idade da planta, fertilidade do solo e meio ambiente (GÓMEZ; VALDIVIESO, 1984).

Avaliações realizadas por Melo et al. (2008), em cinco amostras de folhas de mandioca moídas e fracionadas em peneiras, registraram 4,56 a 20,58% de proteína. As amostras que apresentaram maior porcentagem de proteínas foram as constituídas, em sua maioria, por folhas, enquanto que as obtidas de talos apresentaram resultados inferiores aos das folhas.

As proteínas presentes nas folhas de mandioca são de ótimo valor biológico, que, somando aos teores protéicos das folhas, confere a este produto uma ótima, aceitável e útil fonte de proteínas para a nutrição humana (TERRA, 1964; CARTAY, 2004).

No Brasil, a farinha de folhas de mandioca é usada no combate à desnutrição, por ser fonte de vitaminas e sais minerais (BRANDÃO; BRANDÃO, 1989; CÂMARA; MADRUGA, 2001). Consideradas como resíduos, as folhas de mandioca apresentam baixo custo e não competem com o principal produto comercial, que são os tubérculos (RAVINDRAN; RAJAGURU, 1988).

Porém, como a folha da mandioca apresenta algumas substâncias consideradas antinutritivas e/ou tóxicas, como o HCN (ácido cianídrico), os polifenóis, o nitrato, o ácido oxálico, as saponinas, a hemaglutinina e os inibidores de tripsina (CORRÊA, 2000; MELO et al., 2007b; WOBETO et al., 2006), há a necessidade de uso de tecnologias que extraíam estes compostos, como a secagem e a fermentação, para que possa ser empregado com eficiência na alimentação e sem prejuízo ao consumidor (ALMEIDA; SANTANA; SOUZA, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*

Rhizopus microsporus var. *oligosporus* CCT 3762, utilizado neste trabalho, foi adquirido junto a Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas – SP.

O fungo, depois de cultivado e mantido em tubos de cultura, contendo meio sólido inclinado de extrato de malte 5%, a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, foi exposto à ação da luz para esporulação, sendo os esporos, em seguida utilizados em forma de suspensão nos processos de fermentação.

4.1.1. Manutenção da cultura

O fungo foi mantido em meio de Malte 5%, armazenado em câmara fria ($8 \pm 1^{\circ}\text{C}$), em placas de Petri e em tubos de cultura.

4.1.2. Esporulação do *R. microsporus* var. *oligosporus*

As placas de Petri contendo o fungo crescido foram exportas a luz por aproximadamente 24 horas, até a esporulação do mesmo, uma vez que a luz induz a formação de esporos.

4.1.3. Suspensão de esporos

A suspensão de esporos do fungo *R. microsporus* var. *oligosporus* foi preparada da seguinte maneira:

- Após esporulação do fungo pela ação da luz, foi incorporada ao recipiente uma solução de TWEEN 80 (0,02%), realizando um esfregaço com alça de Drigalsky para dispersão dos esporos;
- A suspensão foi submetida a um aparelho de ultra-som por 30 segundos, para liberar completamente os esporos e promover melhor dispersão no substrato permitindo a contagem microscópica com menor probabilidade de erros em câmara de Neubauer.

4.2. Mesocarpo de babaçu

A farinha de mesocarpo de babaçu foi fornecida pelo PROVIDA: Superintendência de Alimentação e Melhoria da Qualidade de Vida, da SETAS: Secretaria Estadual do Trabalho e Desenvolvimento Social, proveniente do município de São Miguel do Tocantins – TO.

A farinha foi acondicionada em embalagem de PVC e mantida sob refrigeração, até o momento de seu uso.

4.3. Farinha de folha de mandioca

Foram colhidas folhas de mandioca, cedidas por produtores de Rio Claro, SP. As folhas foram secas ao sol até total desidratação, semelhantemente ao realizado por Silva, Fonseca e Guedes Filho (2000).

Após secagem, as folhas foram trituradas em liquidificador convencional e o produto acondicionado em embalagens de PVC, mantidos sob refrigeração, até o momento de seu uso.

4.4. Determinação da qualidade nutricional da proteína por método microbiológico

Trata-se de um método baseado no crescimento de *Enterococcus zymogenes* relativo à qualidade da proteína presente na amostra. Apresenta vantagens quando comparados aos métodos *in vivo*, pois, necessita de menor quantidade de amostra com resposta mais simples e rápida (TAVANO *et. al*, 2004).

A resposta está relacionada à necessidade nutricional absoluta dos aminoácidos essenciais pelo micro-organismo, muito semelhantes às humanas, que depende exclusivamente de valina, metionina, isoleucina, leucina, arginina, histidina, triptofano e ácido glutâmico para seu crescimento, sendo que a deficiência em lisina (não essencial para o *E. zymogenes*) pode prejudicar também o crescimento do micro-organismo (FORD, 1962;

TAVANO *et. al*, 2004). Este método indireto de avaliação do Valor Nutricional Relativo das proteínas presentes na amostra, tem sua eficiência vinculada ao uso de enzimas do trato gastrointestinal humano, aplicadas durante a hidrólise do material e comparada a uma proteína padrão (caseína).

4.4.1. *Enterococcus zymogenes*

Enterococcus zymogenes proveniente do Agricultural Research Service (US Department of Agricultural) Northern Regional Research Center, foi gentilmente ofertado pela Profa. Dra. Aureluce Demonte do Departamento de Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara – SP.

4.4.2. Preparo das soluções

4.4.2.1. Meio basal

Glicose	30,0 g
K ₂ HPO ₄	45,0 g
Ac. Cítrico	1,25 g
Acetato de sódio	6,25 g
Adenina	12,5 mg
Guanina	12,5 mg
Uracila	12,5 mg
Xantina	12,5 mg
Ácido Ascórbico (Vit. C)	1,25 g
Mistura Vitamínica #	35,0 mg
Solução de minerais *	25,0 mL
Tween 80	2,5 mL

Levar para volume total de 500 mL

* Solução de sais de Vogel (VOGEL, 1956)

Mistura vitamínica segundo Ford (1962)

4.4.2.2. Solução de sais de Vogel

Citrato de sódio.5H ₂ O	15,00 g
KH ₂ PO ₄	25,00 g
NH ₄ NO ₃	10,00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,50 g
Solução de Biotina (0,1 mg mL ⁻¹)	0,50 g
Solução de elementos traços	0,50 g
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: Vogel (1956)

Para o uso da solução no experimento, foi realizada a diluição da solução em 50 vezes com água destilada (v/v).

4.4.2.2.1. Solução de elementos traços

Ácido cítrico · H ₂ O	5,00 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5,00 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	1,00 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,005 g
H ₃ BO ₃	0,005 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,005 g
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: Vogel (1956)

4.4.2.3. Mistura vitamínica

Tiamina (B ₁)	12,5 mg
Riboflavina (B ₂)	2,0 mg
Ácido Nicotínico (B ₃)	2,0 mg
Pantetonato de Cálcio (B ₅)	2,0 mg
Cloridrato de Piridoxina (B ₆)	2,0 mg
Biotina (B ₇)	10 µg
Ácido Fólico (B ₉)	0,2 mg
Vitamina B ₁₂	0,5 µg
Ácido p-Aminobenzóico (B _x)	2,0 mg

Fonte: Ford (1962)

4.4.3. Meio de cultivo para o *E. zymogenes*

O meio de cultivo deve ser utilizado para a ativação do *E. zymogenes*, sendo necessário 2 subculturas em intervalos de 24 horas, utilizando-se 1,0 mL do inóculo para 10,0 mL do meio de cultivo.

O preparo do meio de cultivo deve conter:

Meio basal	20,0 mL
Triptona	200,0 mg
Ajustar para 100 mL – água destilada	
Ajustar pH para 7,2	

4.4.4. Meio de manutenção por congelamento

O meio de manutenção por congelamento para a estocagem da cultura pura do *E. zymogenes* deve conter o meio de cultivo acrescido de 10% de glicerol.

Para o congelamento deve-se inserir em um frasco 3,0 mL do inóculo ativo e 10,0 mL do meio de congelamento, levando ao freezer diretamente, sem deixar crescer.

4.4.5. Preparo do experimento

As amostras obtidas antes e após a fermentação foram desengorduradas utilizando-se n-hexano em aparelho Soxhlet.

Pesou-se o equivalente a 100 mg de proteínas de cada amostra previamente desengordurada em um erlenmeyer. Adicionou-se 40 mL de solução de β -glicerofosfato de sódio Sigma G-5422 (20g L⁻¹) e ajustou-se o pH para 8,0. Acrescentou-se 4,0 mL de solução de pronase Sigma P-5147 (1 mg mL⁻¹). Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação lenta e constante a 48°C por 3 horas.

Posteriormente à hidrólise das amostras, o pH foi ajustado para 7,2 e esterilizado por microfiltração a frio (ajustou-se o pH com NaOH ou H₃PO₄).

O ensaio foi realizado mediante o preparo de cinco tubos (4 testes e 1 branco), segundo Ford (1962), que continham 2,0 mL do meio basal esterilizado a frio + 2,0 mL da amostra hidrolisada + 7,0 mL de água destilada estéril + 100 μ L do inóculo (*Enterococcus zymogenes*). No tubo branco o inóculo foi inativado (autoclavado previamente - 121°C por 15 minutos).

Após a inoculação, o material foi incubado a 37°C por 48 horas e, ao final do período, esterilizado em autoclave (121°C por 15 minutos). As medidas de crescimento foram realizadas por acidimetria, titulando-se NaOH 0,1N ou H₃PO₄ 0,1N até pH 7,2 em cada amostra.

Os resultados das médias dos volumes gastos na titulação, subtraído o volume do branco (com inóculo inativo), foram utilizados para expressar o valor nutritivo relativo (VNR) das amostras como percentuais do valor encontrado para a análise realizada com a proteína padrão caseína (Sigma C-7078) (TAVANO *et. al*, 2004).

4.5. Preparo das amostras

Para fins de comparação, foram preparadas amostras com diferentes inclusões de farinha de folhas de mandioca (FFM), bem como os produtos puros. As concentrações estudadas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Porcentagem de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) utilizada por amostra

FMB (%)	FFM (%)
100	0
98	2
96	4
92	8
84	16
68	32
0	100

As quintuplicatas de cada amostra foram preparadas, *in natura*, e umidificadas a 57%, sem tratamento térmico prévio (1° e 2° experimentos), sendo acondicionadas em estufa a 30,0 ± 2°C até crescimento completo das hifas. A umidificação das amostras do 1° experimento foi realizada mediante a incorporação de 40,0 mL de suspensão de esporos contendo 3,06 x 10⁶ esporos viáveis/mL. Para o 2° e 3° experimentos a umidificação foi realizada pela incorporação de água destilada, pois, utilizou-se o fungo adaptado ao meio (crescimento em substrato contendo Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) + 8% de Farinha de Folhas de Mandioca (FFM)) em forma de hifas. A Figura 2 apresenta as condições em que os frascos, contendo as amostras a serem fermentadas, foram acondicionados.



FIGURA 2 - Procedimento para a fermentação do substrato em estufa a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

As amostras do 3º experimento foram preparadas em quintuplicatas em frascos de vidro e umedecidas a 57% antes do tratamento térmico (pasteurização) aplicado nas amostras (cocção por 5 minutos após abertura da pressão em autoclave (121°C)). As amostras foram mantidas a $30,0 \pm 2^\circ\text{C}$ após inoculação do *R. microsporus* var. *oligosporus* durante 15 dias no 1º experimento, 7 dias para o 2º experimento e apenas 3 dias no 3º experimento.

4.6. Determinação de nitrogênio e proteínas totais

A quantificação do nitrogênio total foi realizada pelo método Kjeldahl (AOAC, 1995), utilizando-se o fator 6,25 para conversão dos teores de nitrogênio em proteínas, para as proteínas da farinha controle e da farinha fermentada. As análises quantitativas de N e proteínas foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, do Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro – SP. A Tabela 6 apresenta os fatores de conversão para proteínas e seus respectivos tipos de alimentos.

Tabela 6 – Fatores de conversão em proteínas e seus respectivos alimentos para o método de Kjeldahl

Alimento	Fator
Amêndoas	5,18
Amendoim	5,46
Arroz	5,95
Avelã, outras nozes e coco	5,30
Castanha do Brasil	5,46
Cevada, aveia, farinha de centeio e trigo	5,83
Gelatina	5,55
Leite e derivados; margarina	6,38
Macarrão	5,70
Soja e outros alimentos	6,25

Fonte: IAL (2008).

4.7. Lipídios totais por extrato em n-hexano

A obtenção de lipídios totais foi realizada mediante extração com n-hexano durante 8 horas ininterruptas em aparelho Soxhlet, pesando-se 2,0 g de amostra que fora colocada em cartucho de extração, ensaiados em triplicata. O método foi adaptado de IAL (2008), no qual utiliza éter para a extração lipídica. As análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, do Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro – SP.

4.8. Umidade

Independente do processo aos quais os alimentos são submetidos, eles ainda apresentam concentração de água em maiores ou menores proporções. A umidade representa a água contida em um alimento seja no estado livre (presente na superfície) ou água ligada (encontrada no interior), sem combinar-se quimicamente com o mesmo.

Corresponde à diminuição do peso sofrida pelo alimento em condições de aquecimento as quais a água e outras substâncias voláteis são removidas.

O resíduo obtido pela diferença do material antes e após o aquecimento direto de 5 a 10 g do material a 105°C até peso constante (processo mais usual) foi considerado resíduo seco, sendo expresso em porcentagem (IAL, 2008).

As análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, do Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro – SP.

4.9. Digestibilidade “*in vitro*”

A digestibilidade das amostras foi calculada pela diferença de proteínas totais pela quantidade medida no precipitado obtido após a digestão com pepsina e pancreatina, ambas quantificadas pelo método de Kjeldahl (IAL, 2008).

O material precipitado de cada amostra foi submetido à secagem de forma semelhante às amostras fermentadas ($54 \pm 1^\circ\text{C}$) nas quais a quantidade de proteína foi quantificada.

A digestibilidade das amostras foi expressa em porcentagem de proteínas solubilizadas.

As análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, do Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro – SP.

4.9.1. Digestão

Em frasco de 50 mL adicionou-se 1 grama da amostra e 7,5 mL de solução de pepsina (2 mg/mL em HCl 0,1 N), seguido de incubação das amostras por 3 horas a 37°C . Após, as amostras foram neutralizadas com 7,5 mL de NaOH 0,2 M e adicionou-se 3,75 mL de solução de pancreatina (2 mg/mL em tampão fosfato 0,1 M pH 8). A seguir, as amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C .

Posteriormente, a reação foi interrompida com adição de 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30% (m/v), sendo o volume ajustado para 25 mL com adição de TCA 5% (m/v). A seguir, as amostras foram centrifugadas a 10.000 *g*, 4°C por 30 minutos (AKESON; STAHPMAN, 1964).

A partir dos resultados de proteína bruta total e digestão determinou-se a digestibilidade *in vitro* das amostras analisadas.

4.10. Resíduo por incineração - cinzas

Atribuiu-se o nome de cinzas ao resíduo obtido pelo aquecimento de um produto em temperaturas entre $550\text{-}570^\circ\text{C}$. As cinzas obtidas pela incineração do material devem ser brancas ou ligeiramente acinzentadas.

A quantidade de cinzas das amostras foram obtidas pela diferença de peso entre o material antes e após a incineração, sendo expressas em porcentagem (IAL, 2008).

As análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, do Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro – SP.

4.11. Análise estatística

As análises estatísticas para a avaliação da diferença significativa entre as amostras foi realizada pela comparação dos resultados antes e após a fermentação do material com posterior aplicação do teste-t pelo programa SigmaPlot 11.0.

Para avaliar se existe diferença significativa entre as amostras utilizou-se o valor de P com nível de significância $\alpha = 0,05$. As diferenças significativas foram entendidas para $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimentos Preliminares para Preparo das Amostras

Inicialmente avaliou-se o crescimento do *R. microsporus* var. *oligosporus* em meios de cultura diferenciados contendo apenas o material a ser utilizado no experimento como fonte de alimento.

A evolução pode ser observada pela Figura 3, sendo praticamente inexistente quando utilizado apenas Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB), pois, de acordo com Domingos (2003), trata-se de um material com baixos índices de proteínas, ingrediente este, muito importante para o crescimento micelial com a inclusão crescente de Farinha de Folhas de Mandioca (FFM), com consequente aumento na concentração protéica do material, o fungo apresentou evolução mais aparente e satisfatória de crescimento. A placa de cultivo que continha apenas 4% de FFM apresentou crescimento maior que os demais, mostrando a necessidade do fungo por componentes nitrogenados para o seu desenvolvimento.

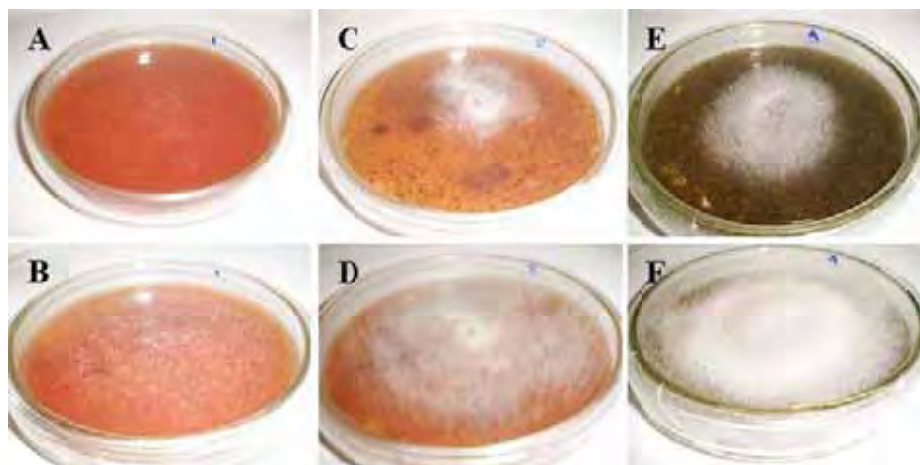


FIGURA 3 – Experimento de avaliação de crescimento do *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* em meios de cultura diferenciados com Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) – (incubação a 28°C). (A) 4% de FMB – 48h de incubação; (B) 4% de FMB – 96h de incubação; (C) 4% de [FMB + 10% FFM] – 48h de incubação; (D) 4% de [FMB + 10% FFM] – 96h de incubação; (E) 4% de FFM – 48h de incubação; (F) 4% de FFM – 96h de incubação.

Baruque Filho (1995) obteve resultados semelhantes de crescimento do *R. oligosporus* quando comparou substratos de torta de babaçu (cerca de 7,8% de proteínas) com o mesocarpo de babaçu (cerca de 1,54% de proteínas).

Outro experimento prévio ao início dos testes foi estabelecer a umidade do substrato para o desenvolvimento do agente fermentador. Foram preparadas placas de Petri em triplicatas contendo FMB + 10% FFM contendo 45, 50, 55 e 60% de umidade e incubadas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ até o crescimento aparente dos micélios do *R. oligosporus*. Os melhores resultados de crescimento/tempo foram as placas com 55 e 60%, sendo a média (57%) utilizada para a realização dos experimentos de fermentação.

5.2. 1º Experimento de Fermentação de Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) por *Rhizopus oligosporus* com amostras *in natura*

Preparou-se os primeiros testes mediante a inclusão de 30,0 g de amostras de acordo com a Tabela 7 onde foi incorporada a suspensão de esporos:

Tabela 7 – Porcentagem dos ingredientes utilizados por amostra no 1º experimento

FMB (%)	FFM (%)
100	0
98	2
96	4
92	8
0	100

As amostras (realizadas em quintuplicata) foram acondicionadas em recipientes de poliestireno (Copo Diamante com Tampa) da marca Plastilândia®, vendidos no comércio local, utilizados comumente para acondicionamento de sorvetes em massa. A Figura 4 apresenta o frasco utilizado.



FIGURA 4 – Recipiente de poliestireno utilizado para a fermentação das amostras.

Os experimentos foram preparados para garantir facilidade de produção em condições não laboratoriais, empregando material existente nas residências e de fácil aquisição no comércio, para promover a efetividade da proposta de inclusão de alimentação de melhor qualidade e de baixo custo para comunidades com acesso restrito a alimentos saudáveis.

O crescimento do fungo foi acompanhado por um período de 15 dias, quando, aparentemente, todo o substrato havia sido colonizado pelas hifas, finalizando o processo de fermentação. Contudo, devido à lenta adaptação e crescimento do *R. oligosporus* outros

fungos competidores puderam desenvolver-se, contaminando diversas amostras. Outra observação está relacionada à concentração de FFM, pois, quanto maior a inclusão de FFM, maior foi a contaminação do material pelos fungos competidores.

A quantidade de proteínas foi determinada no material pelo método de Kjeldhal e, mediante aos resultados obtidos, a amostra FMB + 8% FFM, apresentou aumento da concentração de proteínas comparada com a amostra inicial. As figuras 5 e 6 apresentam os resultados comparativos de quantidade protéica antes e após a fermentação das amostras.

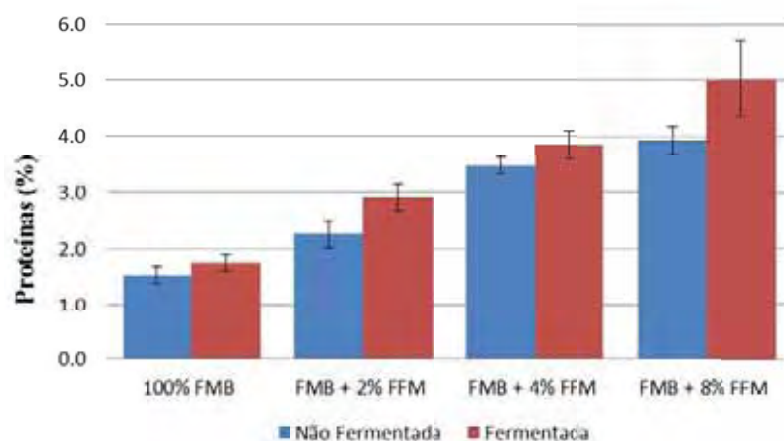


FIGURA 5 – Porcentagem de proteínas em Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) acrescido de Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) após 15 dias de fermentação por *Rhizopus oligosporus*.

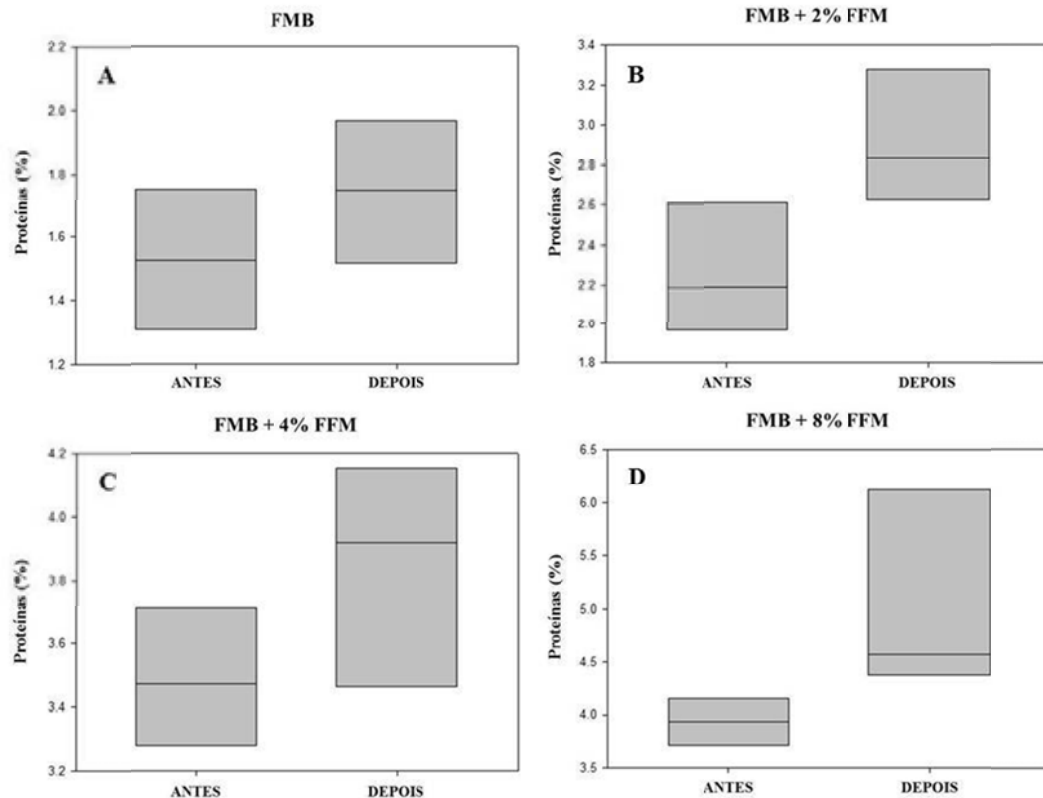


FIGURA 6 – Box-Plot das amostras do 1º experimento antes e depois da fermentação da Farinha de Mesocarpio de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM): (A) FMB; (B) FMB + 2% FFM; (C) FMB + 4% FFM e (D) FMB + 8%.

Avaliando-se as amostras que continham apenas FMB (Figura 5), pode-se observar pela análise do Box-Plot (Figura 6) que trata-se de uma mistura de baixo teor de proteínas sem diferença significativa entre as amostras fermentadas e não fermentadas. Após aplicação do teste-t pode-se constatar essa informação ($P = 0,301$, nível de significância $\alpha = 0,05$), caracterizando-se como uma mistura pobre para o crescimento do fungo e, conseqüentemente, para a incrementação protéica.

A amostra FMB + 2% FFM (Figura 6) não apresentou diferença significativa quando comparadas antes e após a fermentação ($P = 0,072$, nível de significância $\alpha = 0,05$), sendo também uma mistura não recomendada à proposta de aumento de valores protéicos pela fermentação em estado sólido.

O mesmo ocorreu com as amostras FMB + 4% FFM que não apresentaram diferença significativa ($P = 0,209$, nível de significância $\alpha = 0,05$), mostrando-se ineficiente para o aumento de proteínas por fermentação.

Analisando-se o Box-Plot das amostras contendo FMB + 8% FFM, pode-se interpretar a existência de diferença entre as amostras, porém, ao ser aplicado o teste-t verificou-se que a diferença entre as amostras antes e após a fermentação não foi significativa ($P = 0,127$, nível

de significância $\alpha = 0,05$). Os erros padrão das análises deste primeiro experimento apresentaram-se altos provavelmente devido à presença de contaminantes e podem ter interferido no teste-t aplicado às amostras para que não apresentassem um P menor.

5.3. 2º Experimento de Fermentação de Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Folhas de Mandioca (FFM) por *R. oligosporus* com maiores concentrações de FFM com amostras *in natura*

Mediante aos resultados obtidos no 1º experimento, onde apenas a amostra que continha 8% de FFM apresentou-se adequada, um novo ensaio, sem tratamento térmico prévio, foi realizado aumentando-se as concentrações de FFM, conforme descrito na Tabela 8. A amostra FMB + 8% FFM foi tomada como referência para o 2º experimento.

Tabela 8 – Porcentagem da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) utilizada por amostra no 2º experimento

FMB (%)	FFM (%)
92	8
84	16
68	32
0	100

A única mudança nas condições foi a utilização do *R. oligosporus*, na forma de hifas, com adaptação prévia no substrato FMB+8%FFM, umedecidos à 57% e incubados à $30\pm 2^\circ\text{C}$. A Figura 7 mostra uma placa de Petri contendo o *R. oligosporus* adaptado ao substrato em estudo.



FIGURA 7 – Placa de Petri contendo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* adaptado ao meio de Farinha de Mesocarpo de Babaçu + 8% de Farinha de Folhas de Mandioca.

Após 7 dias de fermentação em estufa a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, observou-se grande proliferação de fungos competidores (Figura 8) que, mesmo com a utilização de um micro-organismo adaptado ao substrato, contaminaram todas as amostras do experimento. Não foram realizadas análises com as amostras deste experimento.

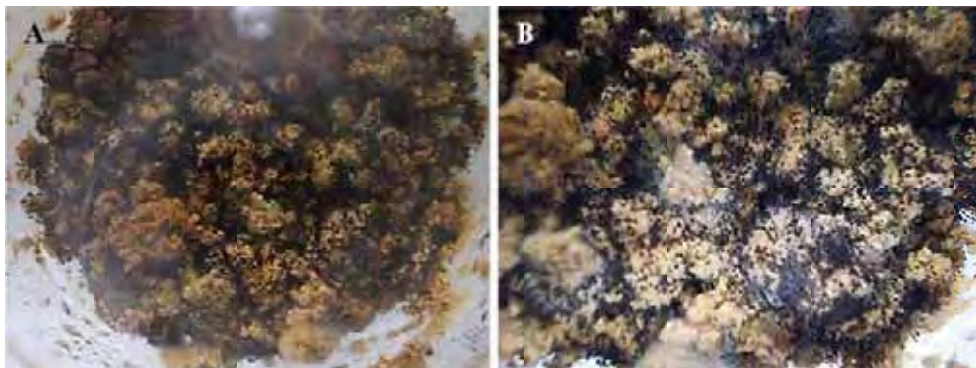


FIGURA 8 – Contaminações por fungos nas amostras de Farinha de Mesocarpo de Babaçu e Farinha de Folhas de Mandioca fermentadas por *Rhizopus oligosporus*.

5.4. 3º Experimento de Fermentação de Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Folhas de Mandioca (FFM) por *R. oligosporus* com maiores concentrações de FFM com amostras tratadas termicamente (pasteurizadas)

Mediante a grande contaminação e a impossibilidade de obtenção de resultados no 2º experimento, foi realizada outra série de testes com as mesmas concentrações do experimento

anterior, contudo, neste experimento aplicou-se um tratamento térmico brando (pasteurização) nas amostras, previamente umedecidas a 57% de umidade, em panela de pressão (cerca de 121°C), por 5 minutos de pressão não controlada por manômetro. Utilizou-se o *R. oligosporus*, posteriormente à pasteurização na forma de hifas, adaptado ao meio para este experimento.

Após 3 dias de incubação à $30 \pm 2^\circ\text{C}$, foi possível verificar que a cocção melhorou o desempenho do fungo e não foi detectado o crescimento de outro micro-organismo contaminante mas, somente do *R. oligosporus* que fora inoculado. Comparando-se os resultados do 1º experimento, verificou-se que o 3º experimento apresentou variação mais estreita quanto aos desvios padrão das amostras fermentadas, mostrando resultados de uma fermentação homogênea (Figuras 9 e 10).

As proteínas brutas foram quantificadas pelo método de Kjeldhal nas amostras, cujos resultados estão descritos na Figura 9:

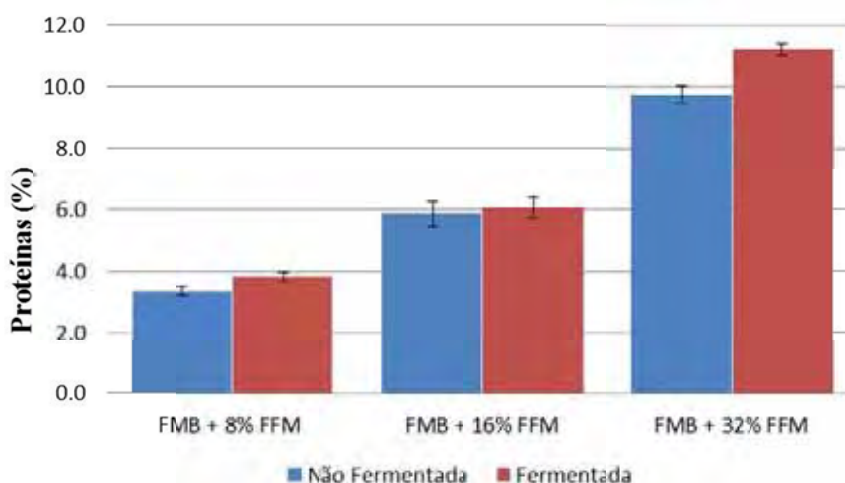


FIGURA 9 – Porcentagem de proteínas antes e após a fermentação por 3 dias da Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) fermentadas por *Rhizopus oligosporus* em amostras previamente pasteurizadas.

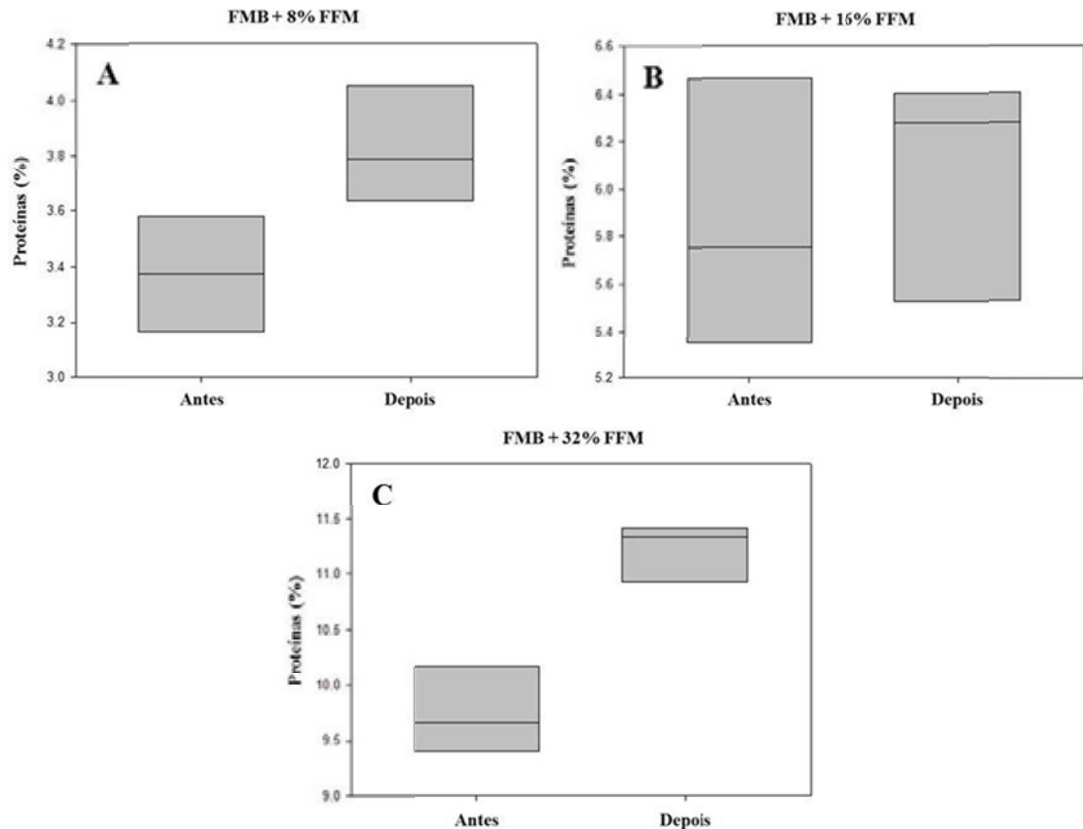


FIGURA 10 - Box-Plot das amostras do 3º experimento antes e depois da fermentação de Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) acrescidas de Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) por *Rhizopus oligosporus*: (A) FMB + 8% FFM; (B) FMB + 16% FFM e (C) FMB + 32% FFM.

Entre as amostra contendo FMB + 8% FFM, fermentada e não fermentada, mediante a comparação visual dos Box-Plots (Figura 10), foi possível avaliar diferença entre ambas (Figura 10), porém, a aplicação do teste-t mostra que esta diferença não foi considerada significativa ($P = 0,058$, nível de significância $\alpha = 0,05$), que somente ocorre para valores de $P < 0,05$. Contudo, a diferença entre as amostras apresenta resultados muito próximos de ser significativa talvez concretizada com mais um dia de fermentação. Outro fato foi a ocorrência de variação muito menor dos dados que do experimento anterior, provavelmente, em função da não ocorrência de contaminação neste terceiro experimento.

Sob as mesmas condições, as amostras contendo FMB + 16% FFM não apresentaram diferença significativa ($P = 0,645$, nível de significância $\alpha = 0,05$), caracterizando-se como uma mistura não adequada para fins de incremento de proteínas.

As amostras FMB + 32% FFM apresentaram diferença significativa entre a fermentada e a não fermentada ($P = 0,005$, nível de significância $\alpha = 0,05$), possibilitando

também seu uso como um substrato para fermentação em estado sólido destinado à obtenção de alimento com melhores valores protéicos.

5.5. Experimento de Fermentação de farinha de Folhas de Mandioca (FFM) por *R. oligosporus*

Amostras foram fermentadas contendo apenas FFM no primeiro, segundo e terceiro experimentos, contudo, devido a contaminação do segundo experimento, os dados obtidos referentes a fermentação da FFM estão relacionados ao primeiro experimento (sem tratamento térmico prévio) e o terceiro experimento (com tratamento térmico prévio - pasteurização). As Figuras 11 e 12 apresentam os resultados obtidos no primeiro e segundo experimentos.

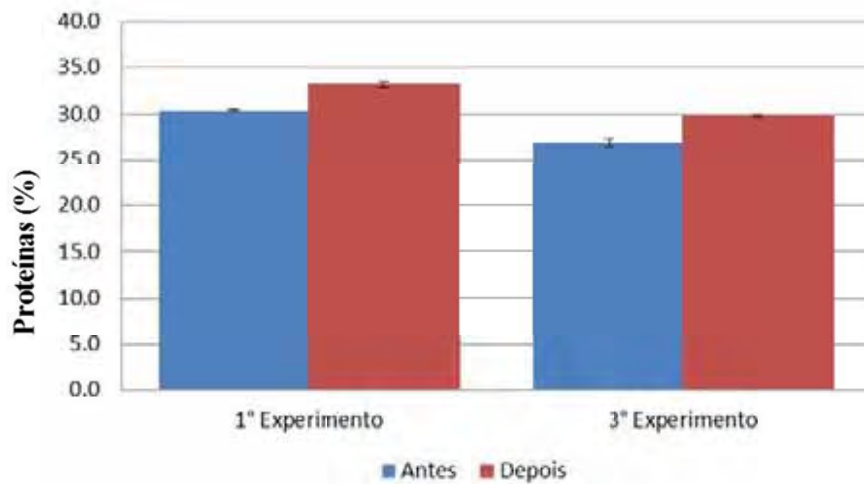


FIGURA 11 – Porcentagem de proteínas antes e após a fermentação em amostras de FFM por *Rhizopus oligosporus* em diferentes períodos.

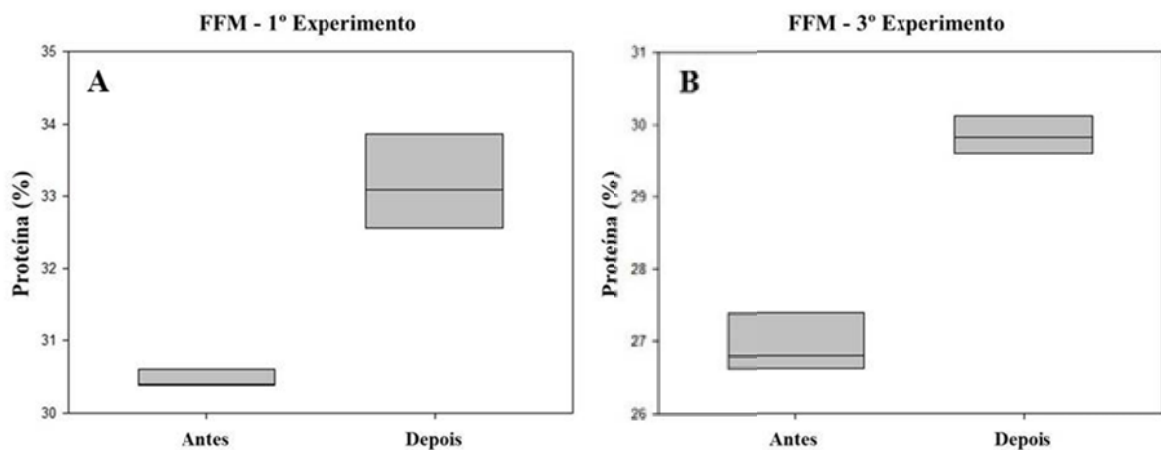


FIGURA 12 – Box-Plot das amostras FFM do primeiro e terceiro experimento, antes e depois da fermentação por *Rhizopus oligosporus* para avaliar a significância dos resultados.

As amostras dos dois experimentos apresentam diferença estatisticamente significativa mediante a observação das figuras Box-Plot (Figura 12) assim como no teste-t (1º Experimento – $P = 0,002$, nível de significância $\alpha = 0,05$; 2º Experimento – $P < 0,001$, nível de significância $\alpha = 0,05$). Esses resultados mostram a eficiência deste substrato para a fermentação em estado sólido com ênfase em aumento de valores protéicos do produto. O terceiro experimento apresentou variação menor dos dados obtidos, provavelmente pela fermentação mais homogênea realizada pela aplicação da pasteurização do meio antes da fermentação, o que inativou contaminantes, além de ter induzido a ruptura de estruturas celulares que permitiram acesso do fungo ao substrato.

Munhoz (2003) obteve aumento protéico de 151,6% em bagaço de cana-de-açúcar 45 dias após a colonização por fungos filamentosos mostrando que a fermentação em estado sólido apresenta grande eficiência quanto a utilização de proteínas microbianas derivadas de fungos filamentosos.

5.6. Quantificação de Lipídios das Amostras Fermentadas e Não Fermentadas

As amostras obtidas no terceiro experimento da farinha de mesocarpo de babaçu com acréscimo de farinha de folhas de mandioca (FMB + 8% FFM; FMB + 16% FFM, FMB + 32% FFM) e do segundo experimento da farinha de folhas de mandioca (FFM) foram submetidos à extração de lipídios por n-hexano em aparelho Soxhlet. As Figuras 13 e 14 apresentam os valores obtidos.

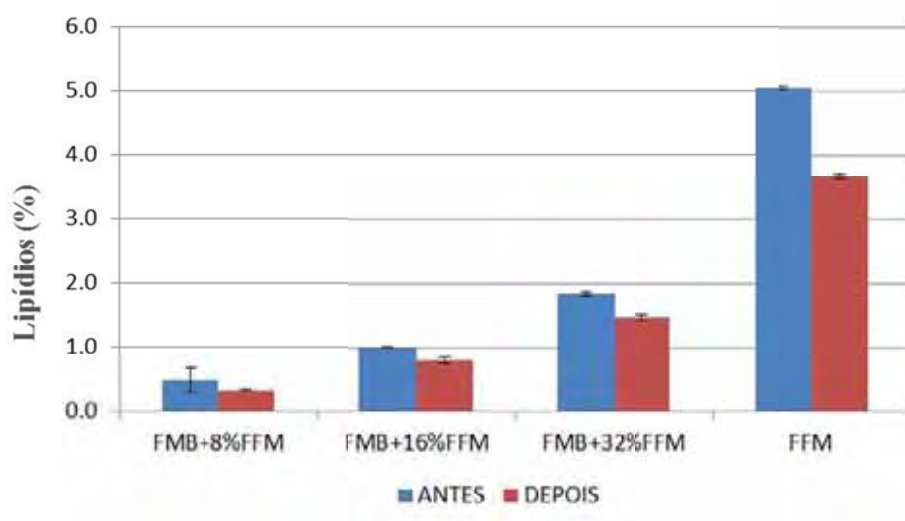


Figura 13 – Porcentagem de lipídios extraída por n-hexano em aparelho Soxhlet, antes e após a fermentação de substratos contendo Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) por *Rhizopus oligosporus*.

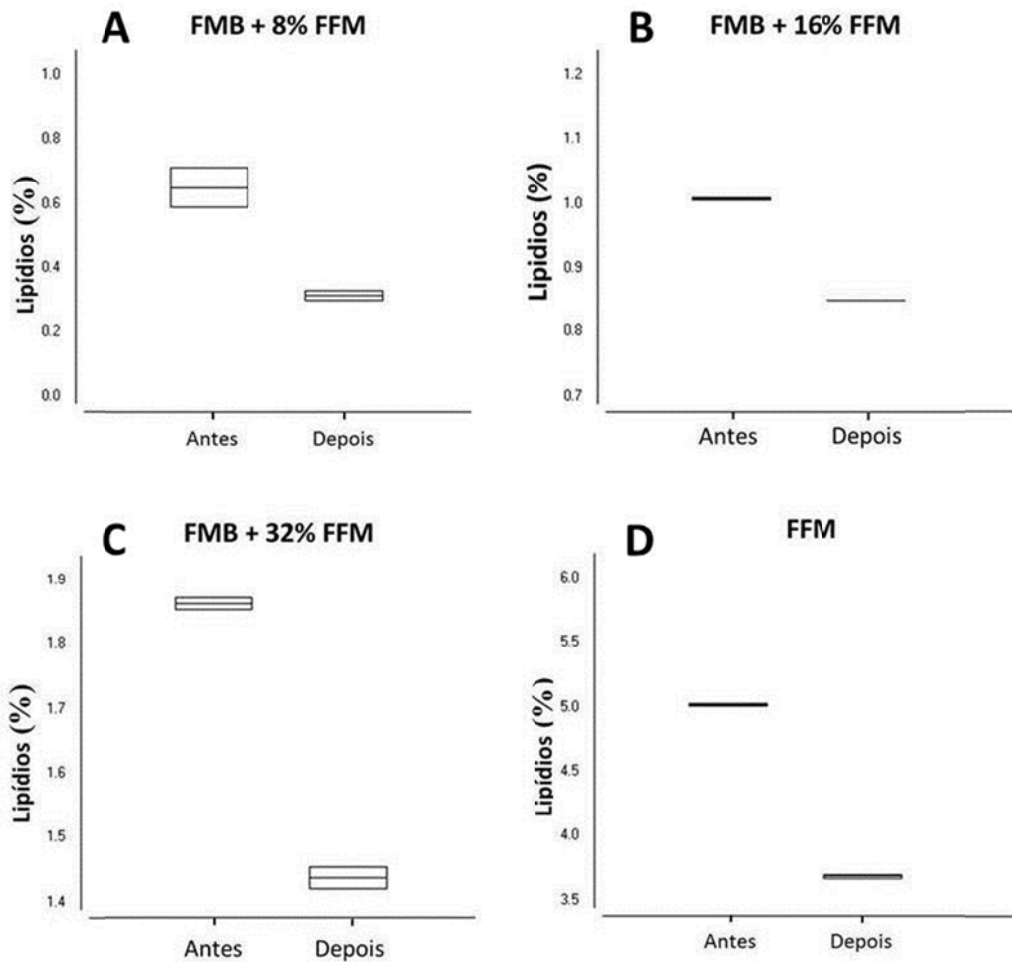


FIGURA 14 – Box-Plot da porcentagem de lipídios extraída por n-hexano em aparelho Soxhlet, antes e após a fermentação dos substratos contendo Farinha de Mesocarpio de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) por *Rhizopus oligosporus* para avaliar a significância dos resultados.

Todas as amostras submetidas à extração por hexano, com exceção da amostra FMB + 8% FFM, apresentaram decréscimo na porcentagem de lipídios com diferença significativa após a fermentação do substrato, sugerindo a sua utilização para o desenvolvimento do *R. oligosporus*.

Pode-se visualizar na Figura 14 que todas as amostras apresentam diferença significativa antes e após a fermentação, mostrando que o *R. oligosporus* utilizou-se dos lipídios em seu metabolismo para obtenção de energia durante a fermentação das amostras.

Wang e Hesseltine (1979) ressaltam que o fungo *R. oligosporus*, apesar de apresentar atividade amilolítica, pode consumir óleos vegetais para substituir os açúcares promovendo ótimo crescimento, uma vez que o fungo apresenta intensa atividade lipolítica. Para a obtenção do *tempeh*, a ação das lipases constitui a fonte primária de energia para a fermentação, pois, os açúcares da soja não são prontamente assimilados pelo *R. oligosporus*.

A diminuição da quantidade de lipídios totais pela ação de fungos filamentosos da Família Mucoraceae pode modificar o perfil de ácidos graxos insaturados do substrato simultaneamente à queda da concentração lipídica do material, melhorando as características nutricionais do produto fermentado (JANG et al., 2005; ALMEIDA, 2007). Diversos autores citam o *Rhizopus* sp. como produtor de ácido gama-linolênico (AGL - pertencente ao grupo de ácidos graxos ômega 6) utilizando-se cultivo em sistema sólido (CONTI et al., 2001; GEMA et al., 2002; GUI-YOU et al., 2004; CERTIK et al., 2006).

5.7. Qualidade Nutricional de Proteínas – Valor Nutricional Relativo (VNR)

O método biológico para a determinação do valor nutricional relativo de proteínas (VNR), utilizando-se *E. zymogenes* mostrou-se eficiente em distinguir os diferentes aspectos nutricionais de frações protéicas de grão-de-bico, obtendo uma correlação positiva significativa quanto aos métodos *in vitro* e perfil de aminoácidos que confirmam a rapidez e simplicidade do método (TAVANO et al., 2004).

As amostras obtidas no terceiro experimento de fermentação (com tratamento térmico prévio) foram submetidas ao método da avaliação da qualidade nutricional da proteína mediante a quantificação do crescimento do *E. zymogenes*. Os resultados estão expressos na Tabela 9 e o experimento na Figura 15.

Tabela 9 – Valor nutricional relativo (VNR), calculado com utilização de *Enterococcus zymogenes*, de amostras contendo farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) antes e após a fermentação do 3º experimento

Amostras	VNR (%)*
FMB + 8% FFM	23,26 ± 4,13
FMB + 8% FFM – fermentada	29,98 ± 1,45
FMB + 32% FFM	23,46 ± 1,39
FMB + 32% FFM – fermentada	127,48 ± 3,08
FFM	81,00 ± 1,02
FFM - fermentada	38,06 ± 1,43

* caseína = 100%

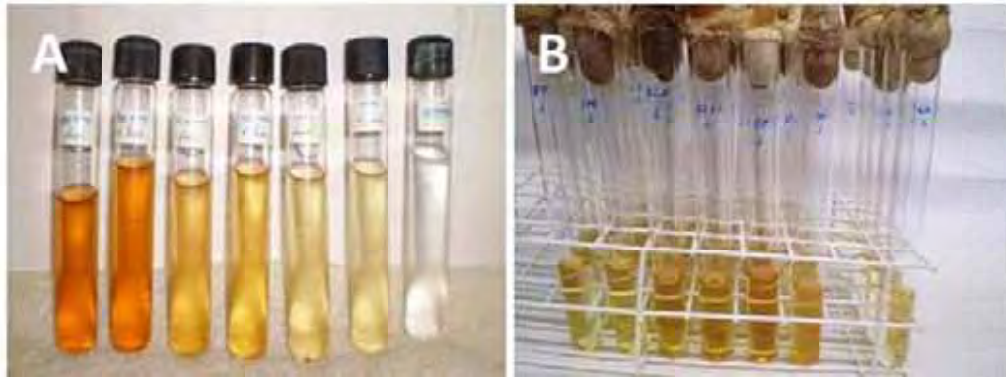


FIGURA 15 – Experimento da avaliação do Valor Nutricional Relativo (VNR) das proteínas das amostras mediante o crescimento de *Enterococcus zymogenes*. (A) Amostras hidrolisadas e esterilizadas antes do início do crescimento do micro-organismo (da esquerda para a direita): FMB + 8% FFM fermentada; FMB + 8% FFM não fermentada; FMB + 32% FFM fermentada; FMB + 32% FFM não fermentada; FFM fermentada; FFM não fermentada e Caseína; (B) Tubos do experimento preparados e inoculados (quadruplicatas + branco).

A Figura 15 expressa parte do procedimento experimental realizado para a avaliação do valor nutricional relativo das amostras fermentadas e não fermentadas, comparadas com a proteína padrão (Caseína Sigma C-7078).

Pôde-se observar que o método microbiológico apresentou variações significativas quando comparou-se as amostra previamente pasteurizadas, antes e após a fermentação. O método também apontou o aumento do VNR das amostras contendo FMB + 8% de FFM, que apresentou aumento de 28,9% no VNR (23,26% para 29,98%), após o tratamento térmico e a fermentação do material, contudo o VNR dessa amostra mostrou-se baixo quando comparado com o VNR da caseína.

A amostra contendo apenas FFM apresentou redução elevada do VNR após sua fermentação, reduzindo de 81% (*in natura*) para 38,06%, sugerindo que o tratamento térmico e a fermentação prejudicaram a qualidade nutricional protéica da amostra. Esse fato pode estar vinculado a pouca concentração de carboidratos nas folhas de mandioca (fibras em sua maior parte), que poderiam ter direcionado o metabolismo do fungo ao consumo de lipídios e proteínas para obtenção de energia e crescimento. Tais resultados insinuam que, para a folha de mandioca pura, esses tratamentos não repercutem em melhorias.

O resultado de maior interesse pode ser observado na Tabela 9 em amostra contendo FMB + 32% de FFM que, anteriormente aos tratamentos já citados apresentou resultados baixos de VNR (23,46%) quando comparado ao da caseína. Contudo, após o tratamento térmico e a fermentação do material, ficou evidente a melhora da disponibilidade do substrato ao micro-organismo, obtendo-se resultados cinco vezes melhores que a amostra não

fermentada, além de resultados cerca de 27,5% superiores aos encontrados com a caseína indicando que essa concentração apresenta potencial para a alimentação humana.

Resultados semelhantes foram obtidos em experimentos realizados com proteína de grão-de-bico, onde pesquisadores visualizaram a sensibilidade do método para diferentes tratamentos quando comparados a outros métodos convencionais de avaliação da qualidade das proteínas, inclusive de valores melhores que encontrados em caseína (TAVANO et al., 2004).

5.8. Digestibilidade “*in vitro*” das amostras

As amostras, antes e após a fermentação, foram submetidas ao processo de digestão “*in vitro*” e o precipitado foi separado por centrifugação e seco a $54 \pm 1^\circ\text{C}$ semelhante à secagem das amostras após o término da fermentação. A Tabela 10 apresenta os valores de digestibilidade obtidos após a aplicação tripsina para simulação do processo digestivo “*in vitro*”.

Tabela 10 – Valores percentuais da digestibilidade das amostras contendo farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) fermentadas e não fermentadas

DIGESTIBILIDADE	%
FMB + 8% FFM	66,9
FMB + 8% FFM – fermentada	64,5
FMB + 32% FFM	82,7
FMB + 32% FFM – fermentada	77,4
FFM	75,2
FFM - fermentada	87,3

A digestibilidade das amostras apresenta-se com resultados que, assemelham-se aos encontrados por Tavano et al. (2004) que obteve valores entre 63,95 a 103,79% de digestibilidade em proteínas de grão-de-bico e Silva; Fonseca e Guedes Filho (2000), que registraram desempenho semelhante mediante o crescimento de animais de corte (gado) mostrando que o método de Valor Nutricional Relativo apresenta resultados satisfatórios para sua aplicação neste trabalho.

Mendes et al. (2007) obteve resultados entre 83,17 a 87,54 em experimentos com ratos com dietas contendo inclusão de 21,39 a 23,50% de farinha de soja.

Analisando-se os valores obtidos com diferentes e com fontes conhecidas de proteínas, os resultados medidos com as amostras deste trabalho apresentam produtos com padrão de digestibilidade alto que podem acrescentar maior disponibilidade protéica em dietas que façam seu uso.

5.9. Umidade

A quantidade de água em um substrato interfere na cinética de crescimento dos micro-organismos. A diminuição da concentração de água retarda a velocidade de crescimento, com menor produção de biomassa (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000). A Tabela 11 apresenta os resultados de umidade obtidos das amostras antes e após a fermentação e secagem.

Tabela 11 – Porcentagem de umidade em amostras de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) fermentadas e não fermentadas, após secagem em estufa ($54 \pm 1^\circ\text{C}$ / 48 horas)

UMIDADE (%)	
FMB	$10,87 \pm 0,119$
FMB + 8% FFM – não fermentado	$10,75 \pm 0,142$
FMB + 8% FFM – fermentado	$11,28 \pm 0,086$
FMB + 32% FFM – não fermentado	$10,39 \pm 0,209$
FMB + 32% FFM – fermentado	$11,45 \pm 0,105$
FFM – não fermentado	$9,36 \pm 0,400$
FFM – fermentado	$9,32 \pm 0,228$

As folhas frescas de mandioca utilizadas neste trabalho, secas ao sol, apresentaram umidade de $69,75 \pm 0,884$ (%), semelhante ao valor encontrado por Corrêa et al. (2002), que obteve média de 70,5%. Tratando-se de material foliar vegetal, caracteriza-se como um material de umidade intermediária quando comparado a hortaliças e frutas que apresentam, respectivamente, cerca de 90% e 85% de umidade (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

A umidade dos alimentos está diretamente ligada ao crescimento microbiano e atividade enzimática, sendo que a diminuição da concentração de água pela secagem do material é um importante procedimento na conservação de alimentos (GABAS, 1998).

A presença de água em um produto pode ser medida por diferentes métodos, porém, todos indicam que a disponibilidade de água é importante para a atividade dos micro-organismos. Essa disponibilidade é constantemente indicada pela atividade de água (Aa) ou a umidade relativa. Um produto apresenta estabilidade microbiológica quando a atividade de água for menor que 0,6 (ASSUNÇÃO; PENA, 2007; BROOKER; BAKKER-ARKEMA; HALL, 1992). O termo Aa indica a intensidade das forças de ligação entre a água presente no alimento e outros componentes não aquosos (ORDÓÑEZ PEREDA et al., 2005).

Ordóñez Pereda et al. (2005) classificam os alimentos em: Aa superior a 0,98 – permite o crescimento da maioria dos micro-organismos patogênicos; Aa entre 0,93 a 0,98 – crescimento de bactérias Gram-positivas; Aa entre 0,85 a 0,93 – crescimento de cocos Gram-positivos, bolores e leveduras; Aa entre 0,6 a 0,85 – os micro-organismos que podem alterar os alimentos são bactérias halofílicas, bolores xerofílicos e leveduras osmofílicas; Aa menor que 0,6 – alimentos microbiologicamente estáveis.

Quando a umidade de um alimento está em equilíbrio com o ambiente, a umidade equivale a cem vezes a Aa (em temperatura constante) (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

Tomando-se como base as informações acima citadas, as amostras apresentaram 10,5% de umidade em média (Tabela 11), o que permite expressarmos uma Aa em torno de 0,11. Nesta Aa, as farinhas fermentadas encontram-se microbiologicamente estáveis.

Contudo, estudos sobre Aa mostram que alimentos como resíduo de camarão-rosa, cogumelos, farinhas de mandioca, caju, sapoti e café, quando apresentaram umidade em torno das obtidas neste trabalho, mostraram-se entre 0,4 a 0,6 de Aa, garantindo a estabilidade microbiológica do produto (MOURA et al., 2004; KUROSZAWA et al., 2005; ASSUNÇÃO; PENA, 2007; SANTOS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

5.10. Cinzas

As cinzas de um alimento estão relacionadas à presença de minerais, e são constituídas, principalmente, de macronutrientes, necessários em uma dieta com valores diários acima de 100 mg como K, Na, Ca, P, S, Cl e Mg; micronutrientes, requeridos em uma dieta com valores diários abaixo de 100 mg como Al, Fe, Cu, Mn e Zn; elementos traços, presentes em quantidades muito pequenas, podendo ser necessários ou prejudiciais ao organismo como Ar, I, F, Cr, Co, Cd, entre outros (FRANCO, 1992).

O organismo consegue assimilar os minerais na forma de sais, misturados ou combinados com carboidratos, lipídios e proteínas, com exceção do cloreto de sódio (BORSOI, 2001).

As Figuras 16 e 17 apresentam os resultados de cinzas obtidos nas amostras estudadas.

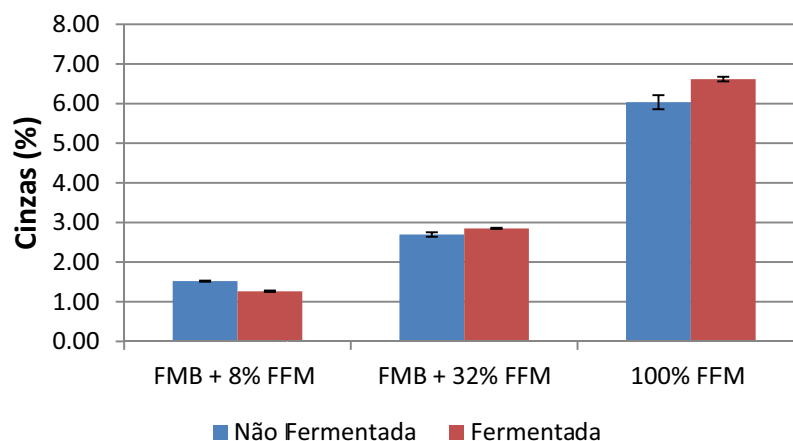


Figura 16 – Porcentagem de cinzas obtidas por incineração de amostras contendo Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM), antes e após a fermentação dos substratos por *Rhizopus oligosporus*.

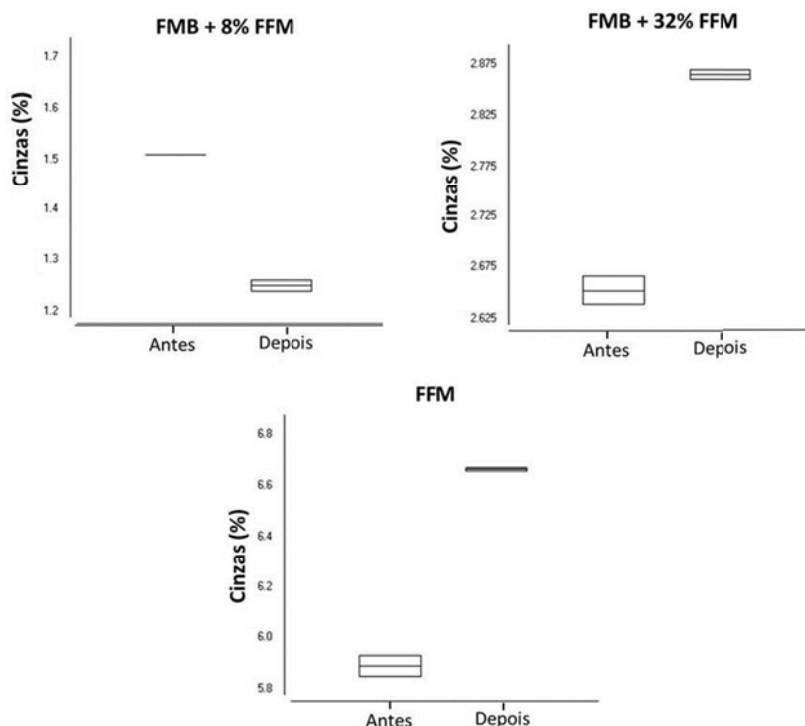


FIGURA 17– Box-Plot da porcentagem de cinzas obtidas por incineração de amostras contendo Farinha de Mesocarpo de Babaçu (FMB) e Farinha de Folhas de Mandioca (FFM), antes e após a fermentação dos substratos por *Rhizopus oligosporus* para avaliar a significância dos resultados.

O aumento da concentração de cinzas (Figuras 16 e 17) após a fermentação, com exceção às amostras contendo 8% de FFM, se explica pelo consumo da matéria orgânica do material como fonte de energia para o crescimento do fungo, induzindo o aumento dos sais minerais presentes nas amostras.

Os minerais atuam, assim como as vitaminas, como reguladores do organismo vivo, auxiliando em processos como a digestão; movimento; eliminação dos resíduos; cicatrização; obtenção da energia proveniente dos carboidratos, gorduras e proteínas; além de todos os outros processos necessários para a manutenção da vida (SIZER; WHITNEY, 2003).

5.11. Aminoácidos Totais

A proteína é formada pela junção de pequenas moléculas denominadas aminoácidos. A classificação geral dos aminoácidos é realizada pelas propriedades funcionais dos radicais (DAVID; COX, 2011), contudo, também podem ser classificados de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie pertencentes aos diferentes domínios da Biologia: Bactéria, Archaea e Eukaria. Para os seres humanos os aminoácidos são denominados essenciais (não produzidos metabolicamente) e não essenciais (sintetizados pelo organismo a partir de outros). Cerca de 20 aminoácidos constituem a maioria das proteínas dos tecidos vivos, sendo que o organismo humano não é capaz de fabricar nove deles de maneira autônoma, necessitando assim, obtê-los mediante uma dieta alimentar equilibrada (SIZER; WHITNEY, 2003).

Os aminoácidos considerados essenciais aos seres humanos são histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, fenilalanina, valina e triptofano e cada um possui uma função fundamental na sanidade e funcionamento fisiológico do organismo (FAO, 2007).

Segundo os autores White, Handler, Smith (1976), Meirelles (2004) e Silva, Bento (2009) cada aminoácido está vinculado a uma particularidade orgânica específica:

A partir da histidina origina-se bioquimicamente mediante a conversão enzimática a histamina, essencial para o crescimento de recém-nascidos e prematuros que apresentam deficiência de cisteína pela imaturidade do fígado na conversão da metionina e é utilizado no tratamento de alergias e da artrite reumatoide e contribui para melhoria da hiperacidez gástrica. A deficiência de histidina em estudos com ratos apresentou sintomas de catarata.

A isoleucina está vinculada à síntese de hemoglobina, à estabilização e regulação da glicemia. Em estudos laboratoriais com ratos, a deficiência de isoleucina gerou sintomas de anemia e hipoproteinemia.

A leucina está ligada ao aumento da capacidade de cicratização óssea, da pele e do tecido muscular. Em ensaios com ratos, sua deficiência apresentou indivíduos com hipoproteïnemia.

A lisina aumenta a imunidade pela formação de anti-corpos, é importante para o crescimento e desenvolvimento dos ossos em crianças, auxilia na absorção do cálcio e mantém o balanço de nitrogênio em adultos. A carência de lisina na dieta de ratos de laboratório apresentou sintomas de anemia, morte súbita e anestro (predomínio da progesterona sobre o estrogênio), gerando inatividade sexual nas fêmeas durante o período de inanição.

A metionina é um aminoácido que contribui para diminuir o pH da urina, é hepatoprotetor, atua na depressão histadélica (disfunção da tireóide), na esquizofrenia, doença de Parkinson e na proteção contra a incidência de certos tumores. Na deficiência deste aminoácido em animais de laboratório foram observados sintomas como anemia, hipoproteïnemia, alopecia (perda parcial de pelos), fígado gorduroso, rins hemorrágicos e cirrose.

A treonina atua no sistema imunológico, no controle aos ataques de epilepsia, doença de Parkinson, na síntese do colágeno e elastina e colabora na manutenção do balanço protéico no organismo. A carência de treonina está vinculada ao aparecimento de edema.

A fenilalanina é precursora da tirosina e das catecolaminas (mais abundantes são adrenalina, noradrenalina e dopamina), aumenta a produção de neurotransmissores, atua no tratamento da depressão, da dor e da memória. Um defeito genético no metabolismo da fenilalanina (ausência da enzima fenilalaninahidroxilase) gera uma doença chamada fenilcetonúria que está relacionada ao retardo mental e drástica perda de vitamina B6.

A valina está vinculada ao metabolismo muscular e no balanço de nitrogênio. Disfunção locomotora foi observada em animais de laboratório com dieta deficiente em valina.

O triptofano é utilizado no tratamento contra o estresse, depressão, distúrbios do sono, hiperatividade, doença de Parkinson, na síntese de colágeno e elastina, atua no balanço protéico do organismo, em dores de difícil controle (dores de cabeça, de dente e do câncer), é precursor da serotonina e melatonina. A deficiência dietética do triptofano em animais de laboratório expôs sintomas de catarata, dentição pobre, alopecia, hiperplasia gástrica (aumento no número de células na mucosa gástrica) e atrofia testicular.

A arginina, que pode ou não ser considerada um aminoácido essencial dependendo do desenvolvimento e do estado de saúde do indivíduo, estimula a liberação do hormônio do

crescimento, atua no metabolismo hepático, no metabolismo muscular, em distúrbios renais, melhora o desempenho do sistema.

A quantificação química dos aminoácidos presentes nas amostras testadas é fundamental para uma avaliação do valor biológico das proteínas presentes, como também para ponderar as melhorias obtidas após o processo de fermentação.

A Tabela 12 apresenta o cômputo de aminoácidos totais nas amostras contendo farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM) antes e após a fermentação analisadas pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) – Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

Tabela 12 – Composição de aminoácidos (mg/100g amostra) de substratos fermentados por *Rhizopus oligosporus* e não fermentados de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) acrescidos de diferentes concentrações de farinha de folhas de mandioca (FFM)

Aminoácido	FMB*	FMB + 8% FFM	FMB + 8% FFM fermentada	FMB + 32% FFM	FMB + 32% FFM fermentada	FFM	FFM fermentada
Ácido aspártico	160,00	380,00	330,00	1040,00	520,00	2910,00	2910,00
Ácido glutâmico	130,00	422,00	430,00	1298,00	1430,00	3780,00	4280,00
Serina	80,00	176,80	180,00	467,20	530,00	1290,00	1320,00
Glicina	90,00	215,60	240,00	592,40	680,00	1660,00	1780,00
Histidina	40,00	84,00	80,00	216,00	240,00	590,00	640,00
Arginina	50,00	226,80	220,00	757,20	770,00	2260,00	2260,00
Treonina	70,00	186,80	200,00	537,20	630,00	1530,00	1620,00
Alanina	90,00	235,60	250,00	672,40	740,00	1910,00	1830,00
Prolina	70,00	187,60	200,00	540,40	580,00	1540,00	1490,00
Valina	70,00	202,00	240,00	598,00	680,00	1720,00	1820,00
Metionina	0,10	28,09	40,00	112,07	160,00	350,00	470,00
Cistina	0,01	8,01	30,00	32,01	60,00	100,00	110,00
Isoleucina	50,00	156,40	200,00	475,60	540,00	1380,00	1510,00
Leucina	110,00	298,00	340,00	862,00	930,00	2460,00	2660,00
Fenilalanina	70,00	210,80	270,00	633,20	730,00	1830,00	1990,00
Tirosina	20,00	116,80	150,00	407,20	490,00	1230,00	1380,00
Lisina	80,00	202,40	260,00	569,60	550,00	1610,00	1620,00
Triptofano	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹

* Domingos (2003).

¹ND – Não detectado

A análise da Tabela 12 permite ressaltar a melhoria na quantidade de aminoácidos presentes nas amostras após a fermentação sugerindo que a ação fermentativa do *R. oligosporus* incrementou significativamente o perfil de aminoácidos disponíveis, com exceção do aminoácido triptofano, que não foi detectado em nenhuma amostra, assim como resultados obtidos por Suhett e Fioreze (2011) em resíduos de abacaxi fermentados por *R. oligosporus*. A amostra que apresentou o melhor resultado relativo, quando comparada antes e após a fermentação foi àquela contendo FMB + 32% FFM, pois, apenas o ácido glutâmico (que não se trata de um aminoácido essencial) apresentou diminuição após a fermentação. Nesta amostra, alguns aminoácidos essenciais apresentaram aumento significativo posteriormente a fermentação, a metionina aumentou sua concentração em 42,77%, a treonina 17,27%, a fenilalanina 15,29%, a valina 13,71%, a Isoleucina 13,54% e a histidina apresentou aumento de 11,11%, mostrando a eficiência da incrementação mediante a fermentação pelo fungo em estado sólido.

A farinha de mesocarpo de babaçu (FMB), segundo Domingos (2003) é comumente utilizada como suplemento alimentar em comunidades de ocorrência da palmeira babaçu, onde o acesso à alimentos de qualidade é restrito. A Tabela 13 exhibe o ganho de aminoácidos comparando-se a FMB in natura com a mistura FMB + 32% FFM fermentada.

Tabela 13 – Incremento de aminoácidos pela adição de folhas de mandioca e fermentação em estado sólido por *Rhizopus oligosporus*

Aminoácidos essenciais	FMB		FMB + 32% FFM - fermentada		% Acréscimo
	AA	Digestibilidade Corrigida (mg/100g)*	AA	Digestibilidade Corrigida (mg/100g)	
His	40.00	25.45	240.00	185.76	729.83
Tre	70.00	44.54	630.00	487.61	1094.75
Val	70.00	44.54	680.00	526.31	1181.63
Met + Cis	0.11	0.07	220.00	170.28	243276.78
Ile	50.00	31.82	540.00	417.95	1313.70
Leu	110.00	69.99	930.00	719.81	1028.40
Fen + Tir	90.00	57.27	1220.00	944.26	1648.88
Lis	80.00	50.90	550.00	425.69	836.26
Trp	ND	0,00	ND	0,00	0,00

* Digestibilidade de 63,63%, segundo REIS (2009).

AA - Aminoácidos

Os resultados obtidos depois de calculada a correção da digestibilidade mostram que o incremento protéico promovido pela adição da FFM e a fermentação por *R. oligosporus* geraram valores muito elevados,

Com relação aos aminoácidos essenciais, os seres humanos requerem determinada quantidade diária relacionada ao peso corporal do indivíduo. A Tabela 14 apresenta a média da quantidade diária recomendada de cada aminoácido essencial de acordo com a idade.

Tabela 14 – Necessidade diária de aminoácidos essenciais recomendada (mg), calculada pela média de peso corporal por idade

Aminoácido	Necessidade por idade (anos)					
	0,5	1 - 2	3 - 10	11 - 14	15 - 18	> 18
His	165,00	163,50	255,60	546,60	675,95	700,00
Tre	255,00	250,70	383,40	819,90	1044,65	1050,00
Val	367,50	392,40	617,70	1320,95	1720,60	1820,00
Met + Cis	232,50	239,80	383,40	774,35	983,20	1050,00
Ile	270,00	294,30	489,90	1002,10	1290,45	1400,00
Leu	547,50	588,60	937,20	2004,20	2580,90	2730,00
Fen + Tir	442,50	436,00	639,00	1366,50	1720,60	1750,00
Lis	480,00	490,50	745,50	1594,25	2027,85	2100,00
Trp	71,25	69,76	102,24	218,64	276,53	280,00

Fonte: FAO/WHO, 2007.

Os dados descritos na Tabela 14 mostram a quantidade de cada aminoácido essencial necessária para uma dieta equilibrada e saudável. Tais valores garantem ao indivíduo o suprimento necessário para o crescimento e desenvolvimento intelectual e motor relacionado ao consumo de proteínas.

Mediante a comparação dos valores apresentados nas Tabelas 13 e 14 é possível prescrever o suprimento dos aminoácidos essenciais pelo consumo de 100 g diárias do material estudado (FMB + 32% FFM fermentado), como descrito na Tabela 15.

Tabela 15 – Suprimento percentual do valor diário recomendado pela FAO de aminoácidos essenciais por idade, mediante o consumo de 100 g de FMB + 32% FFM fermentada por *Rhizopus oligosporus*

Aminoácido	Idade					
	0,5	1 - 2	3 - 10	11 - 14	15 - 18	> 18
His	112,58	113,61	72,67	33,98	27,48	26,54
Tre	191,22	194,50	127,18	59,47	46,68	46,44
Val	143,21	134,13	85,20	39,84	30,59	28,92
Met + Cis	73,24	71,01	44,41	21,99	17,32	16,22
Ile	154,80	142,02	85,31	41,71	32,39	29,85
Leu	131,47	122,29	76,80	35,91	27,89	26,37
Fen + Tir	213,39	216,57	147,77	69,10	54,88	53,96
Lis	88,69	86,79	57,10	26,70	20,99	20,27
Trp	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹

¹ND – Não detectado

A carga de aminoácidos essenciais suprida pelo consumo de 100 g diárias (entre 9 e 10 colheres de sopa) da FMB + 32% FFM fermentada por *R. oligosporus* atinge números maiores que a necessidade diária recomendada pela FAO (2007), para idades entre 0,5 e maiores de 18 anos, principalmente crianças, com exceção do triptofano. Usando-se a farinha fermentada como suplemento na alimentação, o material em questão pode auxiliar no equilíbrio nutricional de comunidades com acesso restrito à alimentos de qualidade. Quanto as dietas de adultos a FMB + 32% FFM fermentada pode melhorar significativamente (em média de 30%) a ingestão de aminoácidos essenciais tornando a pessoa e a alimentação mais saudável.

5.12. Demais resultados

Ao final dos experimentos a caracterização bromatológica das amostras estudadas foram computadas nas Tabelas 16 a 22, expressas a seguir.

Tabela 16 – Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB)

Farinha - Mesocarpo de Babaçu (FMB)	
	%
Umidade	10,87 ± 0,119
Proteína Bruta	1,53 ± 0,156
Lipídios Totais	0,09 ± 0,191
Carboidratos *	86,38 ± 0,117
Cinzas	1,13 ± 0,001

* Obtidos pela diferença dos demais componentes

Os resultados da caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu obtidos neste trabalho são semelhantes aos analisados por Baruque Filho (1995), mostrando que os produtos provenientes desta fonte apresentam pequenas variações.

Tabela 17 – Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) com inclusão de 8% de farinha de folhas de mandioca (FFM) – não fermentada

FMB + 8% FFM	
	%
Umidade	10,75 ± 0,142
Proteína Bruta	3,37 ± 0,146
Lipídios Totais	0,50 ± 0,193
Carboidratos	83,86 ± 0,124
Cinzas	1,52 ± 0,014

* Obtidos pela diferença dos demais componentes

Tabela 18 – Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) com inclusão de 8% de farinha de folhas de mandioca (FFM) – fermentada

FMB + 8% FFM - Fermentada	
	%
Umidade	11,28 ± 0,086
Proteína Bruta	3,82 ± 0,149
Lipídios Totais	0,33 ± 0,023
Carboidratos	83,30 ± 0,069
Cinzas	1,26 ± 0,019

* Obtidos pela diferença dos demais componentes

Observando-se as Tabelas 17 e 18, é possível verificar o aumento protéico e de umidade, o decréscimo lipídico, de carboidratos e cinzas após a fermentação, mostrando que o fungo utilizou-se dos nutrientes presentes no substrato para seu desenvolvimento proporcionando alteração química do material. Contudo, apesar do aumento na quantidade de proteínas totais, seus valores ainda apresentam-se baixos para a sua utilização como suplemento alimentar.

As Tabelas 19 e 20 expõem os valores bromatológicos obtidos nas amostras não fermentadas e fermentadas contendo inclusão de 32% de farinha de folhas de mandioca.

Tabela 19 – Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) com inclusão de 32% de farinha de folhas de mandioca (FFM) – não fermentada

FMB + 32% FFM	
	%
Umidade	10,39 ± 0,209
Proteína Bruta	9,74 ± 0,277
Lipídios Totais	1,84 ± 0,025
Carboidratos *	75,33 ± 0,142
Cinzas	2,70 ± 0,057

* Obtidos pela diferença dos demais componentes

Tabela 20 – Caracterização bromatológica da farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) com inclusão de 32% de farinha de folhas de mandioca (FFM) – fermentada

FMB + 32% FFM - Fermentada	
	%
Umidade	11,45 ± 0,105
Proteína Bruta	11,22 ± 0,184
Lipídios Totais	1,48 ± 0,050
Carboidratos *	73,30 ± 0,088
Cinzas	2,85 ± 0,015

* Obtidos pela diferença dos demais componentes

A mistura contendo FMB + 32% de FFM, após a fermentação, adquiriu maiores valores de proteína bruta, expressando melhores resultados quando comparado às necessidades diárias. Como citado anteriormente, crianças de 1 a 3 anos necessitam de 13 g de proteínas por dia; de 4 a 6 anos 19 g; de 7 a 10 anos 34 g e adultos 50 g. Sabendo-se que as farinhas resultantes deste experimento poderão vir a ser utilizadas como complemento à alimentação, apenas 100g por dia poderiam proporcionar, em dados aproximados, aplicando-se a digestibilidade encontrada, 68%; 47%; 26% e 18% da necessidade protéica de crianças de 1 a 3 anos; 4 a 6 anos; 7 a 10 anos e adultos, respectivamente.

As Tabelas 21 e 22 expõem os valores bromatológicos obtidos nas amostras não fermentadas e fermentadas contendo apenas farinha de folhas de mandioca.

Tabela 21 – Caracterização bromatológica da farinha de folhas de mandioca (FFM) – não fermentada

Farinha de Folhas de Mandioca (FFM)	
	%
Umidade	9,36 ± 0,400
Proteína Bruta	27,01 ± 0,284
Lipídios Totais	5,04 ± 0,024
Carboidratos *	52,55 ± 0,221
Cinzas	6,03 ± 0,178

* Obtidos pela diferença dos demais componentes

Tabela 22 – Caracterização bromatológica da farinha de folhas de mandioca (FFM) – fermentada

Farinha de Folhas de Mandioca (FFM) - fermentada	
	%
Umidade	9,32 ± 0,228
Proteína Bruta	29,84 ± 0,179
Lipídios Totais	3,66 ± 0,036
Carboidratos *	50,56 ± 0,125
Cinzas	6,62 ± 0,058

* Obtidos pela diferença dos demais componentes

Os resultados com as amostras de FFM deste trabalho (Tabela 21) foram semelhantes aos obtidos por Melo et al. (2007a), sugerindo que, apesar de ocorrerem variações derivadas de variedade, solo, clima, etc., os valores se mantem aproximados, facilitando o desenvolvimento padronizado desse produto.

Os valores de proteína resultantes da fermentação da FFM apresentam produto com proteínas e de digestibilidade elevada (87,3%), sugerindo ser um produto relevante ao consumo para incrementação de proteínas em dietas alimentares humanas.

Outras características interessantes estão ligadas à produção de aromas, conservantes, antioxidantes, entre outros, mediante a fermentação em estado sólido são exemplos da diversidade de produtos de origem microbiana utilizados na produção de alimentos com o diferencial de se tratarem de produtos naturais (COUTO; SAROMÁN, 2006). Feng, Larsen e Schnürer (2006) estudaram a produção de compostos voláteis em fermentação em estado sólido de soja e cevada por *Rhizopus oligosporus*, para a produção de tempeh. Segundo os autores, o fungo mostrou-se produtor de diversos compostos.

Domingos (2003) foi de ordem sensorial olfativa, sendo percebido um aroma adocicado e agradável em que, neste trabalho, mostrou-se semelhante ao de goiaba. Essa característica pode facilitar a inclusão do produto estudado em dietas, devido ao aroma agradável, resultante natural do produto fermentado. Essa característica também pode facilitar o preparo e o controle de uma fermentação durante a confecção caseira do produto, avaliada pelo aroma. Esta característica poderia ser um fator indicativo da qualidade da fermentação.

6. CONCLUSÃO

Os estudos das misturas de farinha de mesocarpo de babaçu (FMB) e farinha de folhas de mandioca (FFM), após pasteurização mostram-se substratos adequados para o desenvolvimento do *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*.

As amostras fermentadas e analisadas apresentaram aumento de proteína bruta, diminuição de lipídios totais e aumento de cinzas (minerais), indicando um incremento de nutrientes às necessidades nutricionais humanas após a fermentação pelo *Rhizopus oligosporus*, mostrando que o metabolismo do fungo sobre este substrato favorece estes parâmetros.

Comparando-se as concentrações de FMB e FFM estudadas, a FMB + 32% FFM pasteurizada e fermentada exibiu o melhor índice proteico final.

A avaliação do valor nutricional relativo (VNR) das proteínas presentes nas amostras sugere que a amostra FMB + 32% FFM possui potencial significativo de aproveitamento de aminoácidos essenciais aos seres humanos, uma vez que, mediante uma análise indireta com *Enterococcus zymogenes*, bactéria que necessita de oito dos dez aminoácidos essenciais para crescer. Os resultados apresentaram VNR 27,5% maior que o encontrado na proteína padrão (Caseína Sigma – C-7078) considerado 100%.

A digestibilidade enzimática das amostras também indica que grande parte das proteínas presentes na FMB + 32% FFM fermentada por *R. oligosporus* sugerem potencial de aproveitamento pelo organismo humano.

As amostras não apresentaram perdas de nutrientes após secagem a $54 \pm 1^\circ\text{C}/48\text{h}$, apresentando estabilidade proteica, gerando um alimento nutritivo com razoável assimilação. A secagem das amostras nesta condição mostrou-se adequada, pois, a umidade final dos

produtos foram, em média, 10,5%, assegurando a estabilidade microbiológica do produto final.

A quantificação dos aminoácidos das amostras mostrou que FMB + 32% FFM pode suprir quantidades satisfatórias de grande parte dos aminoácidos essenciais recomendados pela FAO, principalmente em crianças entre 0,5 e 10 anos, atingindo valores acima da dosagem recomendada. Na dieta de adultos o material também pode promover a ingestão de cerca de 30% da exigência nutricional diária recomendada.

O baixo custo do material estudado e a produção agrícola relativamente alta dos mesmos pode facilitar o acesso de populações a alimentos com maiores valores nutricionais melhorando o perfil de suas dietas, diminuindo a ocorrência de prejuízos à saúde de crianças e adultos.

A fermentação em estado sólido facilita a aplicação deste trabalho nas comunidades, pois, apresenta menor risco de contaminação, a temperatura de fermentação próxima à do ambiente e menor necessidade de água (sendo que as comunidades que mais sofrem com a carência de alimentos de qualidade situam-se em regiões quentes e com pouca água).

Os resultados obtidos neste trabalho foram adquiridos mediante o estudo de material padronizado de uma região específica e de uma mesma variedade de plantas, havendo a possibilidade da obtenção de resultados diferentes com o uso de outras variedades.

A farinha, ao final do processo, pode ser utilizada na alimentação indiretamente, mediante a confecção de pães e massas ou diretamente utilizando-o como integrante do prato como são utilizadas as farinhas de milho e de mandioca.

Os resultados permitem inferir que a farinha de mesocarpo de babaçu, comumente utilizada como alimento em algumas regiões brasileiras, acrescidas de folha de mandioca após fermentação com *R. oligosporus* apresenta potencial para o aproveitamento enriquecendo alimentos, especialmente em proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E. M. **Nutrição em obstetrícia e pediatria**. 2ª edição. Rio de Janeiro, 672 p. 2004.

AGOSTINI, M. R. **Produção e utilização de farinha de mandioca comum enriquecida com adição das próprias folhas desidratadas para consumo alimentar**. 2006, 96p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdades de Ciências Agrônômica UNESP – Campus de Botucatu, Botucatu, 2006.

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

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**, 4 ed., New York: John Wiley & Sons, 869p. 1996.

ALMEIDA, A. F. **Cultivo de *Mucor circinelloides* em substratos líquido e sólido para produção de ácidos graxos insaturados**. 2007. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Rio Claro, 2007.

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.

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

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; Consulta Pública nº 80 de 13 dez. 2004.

ANGELIS, D.F.; GOES, A.C. L.; PIÃO, A.C.S. ***Lentinus edodis* (Berk.) Pegler, o cogumelo shiitake**. Rio Claro – SP: <www.geocities.com>, 2008. 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., p. 95, 1995.

ASSUNÇÃO, A. B.; PENA, R. S. Comportamento higroscópico do resíduo seco de camarão-rosa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27(4), p.786-793, 2007.

BARUQUE FILHO, E. A. **Coco de babaçu** – a riqueza de um Brasil desconhecido. [S. l.]: TOBASA, 32p., 1995.

BLACK, R. E.; ALLEN, L. H.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L. E.; de ONIS, M.; EZZATI, M. **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.

BONONI, V.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2ª Ed. Ícone, São Paulo, 206p. 1999.

BORSOI, M. A. **Nutrição e dietética: noções básicas**. 14ª ed. São Paulo, SENAC, 96p. 2001.

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

BRASIL. **Brasil tem 11,5 milhões de crianças de baixa renda**. Presidência da República Federativa do Brasil. Brasília – DF <www.fomezero.gov.br> 22 de janeiro de 2008. Disponível em: <<http://www.fomezero.gov.br/noticias/brasil-tem-11-5-milhoes-de-criancas-de-baixa-renda>>. Acesso em 20 de janeiro de 2012.

BROOKER, D.B.; BAKKER-ARKEMA, F.W.; HALL, C.W. **Drying and storage of grains and oilseeds**. Westport: The AVI Publishing Company, 450 p. 1992.

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.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentation: role microorganisms in food production and preservation. **Journal of Food Microbiology**, v. 50, p.131-149, 1999.

CARTAY, R. Difusión y comercio de la yuca (*Manihot esculenta*) em Venezuela y em el mundo. **Agroalimentaria**. n. 18, p. 13-22. 2004.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; MORAIS, A. R.; PAULA, M. B. 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.

CARVALHO V. D.; KATO, M. S. A. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.13, n.145, p.23-28. 1987.

CASHMAN, K. D.; FLYNN, A. Optimal nutrition: calcium, magnesium and phosphorus. **Proceedings of the Nutrition Society**, England, v.58, p. 477-487. 1999.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análises de Alimentos**. 2º edição. Campinas, São Paulo, Editora da UNICAMP, 2003.

CEREDA, M. P. **Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca**. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas; v.4), São Paulo: Fundação Cargill. p. 13-37, 2001.

CERTIK, M.; SLAVIKOVA, L.; MASRNOVÁ, S.; SAJBIDOR, J. Enhancement of nutritional value of cereals with γ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, **44** (1), 75-82, 2006.

CFN, Conselho Federal de Nutrição. CFN define posição sobre multimistura. Brasília-DF <www.cfn.org.br>, 15 de maio de 2010. Disponível em <<http://www.cfn.org.br/novosite/conteudo.aspx?IDMenu=61>>. Acesso em 23 de janeiro de 2012.

CINTRA, V. M.; VASCONCELOS, E. T. A.; PEREIRA, I. D. F.; GUERRA, I. C. O.; MARQUES, A. A; CONCEICAO, M. L.; BARROS, J. C. 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.

CONTI, E.; STREDANSKY, M.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F. γ -linolenic acid production by solid-state fermentation of mucorales strains on cereals. **Bioresource Technology**, Essex, **76**, p.283-286. 2001.

- 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.
- CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; NATIVIDADE, M. A. E.; ABREU, C. M. P.; XISTO, A. L. R. P.; CARVALHO, V. D. Farinha de folhas de mandioca I – efeito da secagem das folhas sobre a atividade da linamarase. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 26, n. 2, p. 368-374, 2002.
- 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.
- COSTA D. P.; MOTA A. C. M.; BRUNO G. B.; ALMEIDA M. E. L.; FONTELES C. S. R. **Desnutrição energético-proteica e cárie dentária na primeira infância**. Rev. Nutr. [serial on the Internet]. 2010. 23(1): 119-126. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000100013&lng=en> <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000100013>>. Acesso em 22 ago. 2011.
- COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291–302, 2006. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022.
- CTENAS, M. L. B. **Crescendo com saúde 2**. São Paulo, C2 Editora, 320 p. 2003.
- DAVID, L.N.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Editora Sarvier. 1304p. 2011.
- DEL BIANCHI, V. L. **Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte**. 1998. 118p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.
- DOMINGOS, R. N. **Fermentação da farinha do mesocarpo do côco babaçu (*Orbignya SP.*), pela ação de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 103p., 2003.
- ELANDER, R. P.; LOWE, D. A. **Fungal biotechnology: An overview**. In: Handbook of applied mycology, p. 1–34. New York, NY. 1994.

EL-SHARKAWY, N. A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 481-501. 2004.

EVANGELISTA, J. **Alimentos – Um Estudo Abrangente**. São Paulo, Editora Atheneu, 2000.

FAO – Food Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Food Price Index**. Genebra, <www.fao.org> 12 de janeiro de 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/worldfoodsituation/wfs-home/foodpricesindex/en/>>. Acesso em 25 de janeiro de 2012.

FAO/WHO/UNU – Food Agriculture Organization of United Nations. **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. WHO Technical Report Series, n. 935, Geneva, 2007.

FENG, X. M.; LARSEN, T. O.; SCHNÜRER, J. Production of volatile compounds by *Rhizopus oligosporus* during soybean and barley tempeh fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, n.113, p. 133-141, 2006. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.025

FERREIRA, M. E. M. **Modelos Log-normal e Markoviano para estudo da evolução de abundância em uma floresta de babaçu**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) –Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, 1999.

FORD, L. E. A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins. **Journal Nutrition**, n.16, p. 409-425, 1962.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 305p. 1992.

FRAZÃO, J. M. F. Alternativas econômicas para agricultura familiar assentadas em áreas de ecossistemas de babaçuais. **Relatório técnico**. Governo de Estado do Maranhão, São Luis. 120p. 2001.

GABAS, A. L. **Secagem de uva Itália em leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), UNICAMP-FEA, Campinas, 135p. 1998.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008

- GEMA, H.; KAVADIA, A.; DIMOU, D.; TSAGOU, V.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, **58**, 303-307, 2002.
- GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**. n.42, p. 577-587. 2009. doi:[10.1016/j.foodres.2009.02.019](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.019)
- GÓMEZ, G.; VALDIVIESO, M. Cassava for animal feeding: effect of variety and plant age on production of leaves and roots. **Animal Feed Science & Technology**. 11(1), p.49-55, 1984.
- GONSALVES, A. D. **O babaçu**: considerações científicas, técnicas e econômicas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura (Estudos e Ensaios), 331p., 1955.
- GOULART, R. M. M. Desperdício de alimentos: Um problema de saúde pública. **Integração**. São Paulo, n.54, p. 285-288. 2008.
- GUERROUÉ, J-L.; DOUILLARD, R.; CEREDA, M. P.; CHIARELLO, M. D. Proteínas da folha de mandioca: aspectos fisiológicos, nutricionais e potencialidades tecnológicas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos** (Impresso). Curitiba, v. 14(2), p. 133-150. 1996.
- GUERROUÉ, J. L.; CHIARELLO, M. D.; SOUZA, P. F. A.; PESCADOR, R. **Extração e valorização das proteínas da folha de mandioca**. In: IIV Jornada de produção científica das universidades Católicas do Centro-Oeste, 2001, Goiânia. Anais da IIV Jornada de produção científica das universidades Católicas do Centro-Oeste, 2001.
- GUI-YOU, L.; SHENG, Y.; CHUAN-CHAO, D. Factors affecting γ -linolenic acid content in fermented glutinous rice brewed by *Rhizopus* sp. **Food Microbiology**, London, **21**, p.299-304, 2004.
- HESELTIME, C. W.; WANG, L. H. W. **A traditional fermented foods**. U. S. Dep. Agric. for Off. Use, v. 9, p. 275-288. 1967.
- IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. São Paulo. 1020 p., 2008.

JANG, H.D.; LIN, Y.Y.; YANG, S.S. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. **Bioresource Technology**, Essex, 2005.

JESUS, M. M. **Estudo do Mesocarpo do Côco Babaçu**; 1988. 51 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química de Alimentos) Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 1988.

JORNAL DO BRASIL. **ONU: crise deve levar número de desnutridos a mais de 1 bilhão em 2009**. Disponível em: < <http://jbonline.terra.com.br/pextra/2009/06/19/e190618044.asp> >. Acesso em: 15 jul. 2009.

KODAMA, C. S.; MIRANDA, P. R. O.; BARBOSA, M. S. R.; ANDRADE, S. S.; BANDEIRA, C. H. M. M.; SANTOS, A. S.; SCHNEIDER, M. P. C.; SILVA, A. 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. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) – Universidade de Brasília, 2008.

KUROZAWA, L. E.; EL-AOUAR, A. A.; MURR, F. E. X. Obtenção de isotermas de dessorção de cogumelo in natura e desidratado osmoticamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (Impresso), Campinas, v. 25, n. 4, p. 828-834, 2005.

LANCASTER, P. A.; BROOKS, J. E. Cassava leaves as human food. **Society for Economic Botany**. Saint Louis, v. 37, p. 331-348. 1983.

LEAL, D. D. M. **Colonização do mesocarpo de *Orbignya sp* (coco babaçu) por fungos comestíveis *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e *Lentinula edodes***. 1999. 45f. Monografia (Trabalho de Conclusão do curso de Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.

LOUSADA JÚNIOR, J. E.; COSTA, J. M. C.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M. **Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal**. Centro de Ciências Agrárias

- Universidade Federal do Ceará - Ceará. Revista Ciência Agronômica, v.37, n.1, p.70-76, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo, Printice Hall, 10^a ed., 608p. 2004.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Roca, 1179 p. 1998.

MARTINS, C. R.; FARIAS, R. M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola – Revisão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 20-32. 2002.

MAY, P. H. **Palmeiras em chamas**: transformação agrária e justiça social na zona do babaçu. Tradução de Linda Maria de Pontes Gondim. São Luís: EMAPA/FINEP/Fundação Ford, 328p., 1990.

MEIRELLES, R. S. L. Aminoácidos e atividade cerebral. **Revista do Instituto de Assistência dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro**, nº 15, p. 6-15. 2004.

MELO, L. P.; RANGEL, J. H. G.; BARRETO, N. M. F.; IBAÑEZ-ROJAS; M. O. A.; MARTINS, M. S. **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, D. S. de; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V. de; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. dos. 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, R. S.; MACHADO, L. C.; GERALDO, A.; OLIVEIRA, L. A.; FERREIRA, M.; DUTRA, R. M.; SILVA, L. M. 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.

MENDES, F. Q.; OLIVEIRA, M. G. A.; CARDOSO, L. R.; COSTA, N. M. B.; SANT'ANA, R. C. O. Digestibilidade protéica e caracterização bromatológica de linhagens de soja com

ausência ou presença do inibidor de tripsina Kunitz e das isozimas lipoxigenases. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 23, n. 1, p. 14-21. 2007.

MENEZES, H.; BERTOLA, E. **Guia culinário com alimentos funcionais: 101 receitas preventivas e terapêuticas**. Rio Claro, SP. 130p., 2001.

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.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**; v. 68, p. 61-138, 2000.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. **Estudos Avançados** 9, (24), p.197-207, 1995.

MORA, S.; BARERA, G. Bone mass and bone metabolism in pediatric gastrointestinal disorders. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v.39, p. 129-140. 2004.

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.

MOREIRA, T.R.; PRASS, F.S.; BLASI, T.C. **Estudo comparativo do estado nutricional de crianças em idade escolar matriculadas em escola pública e privada do município Santa Maria – RS**. Santa Maria - RS: Nutrição Ativa, 2006. 6 p. Disponível em: <www.nutricaoativa.com.br>. Acesso em: 23 ago. 2011.

MOURA, R. S. F.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; SOUSA, A. G.; SILVA, M. M.; OLIVEIRA, A. M. V. Modelagem matemática para isotermas em polpa de caju. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, p. 32-40, 2004.

MUNHOZ, J. S. **Aplicação de fungos comestíveis (*Pleorotus* spp.) na degradação de resíduos agroindustriais com avaliação na degradabilidade ruminal em bubalinos**. 2003. 60p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, Pirassununga, 2003.

NOVAES, D. **Valor nutritivo da farinha de babaçu**. 1952. 68p. Tese (Livre Docência em Higiene Veterinária) – Escola Nacional de Veterinária, Rio de Janeiro, 1952.

O COQUEIRO da praia. **Correio Agropecuário Bayer**, São Paulo, v.3, n.2, p. 20-21, 1963.

OKE, O. L. Problems in the use of cassava as animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.3, p. 345-380, 1978.

OLIVEIRA, H. R.; ANDRADE, T. C. G. R.; SILVA, J. O. V. **O Babaçu (*Orbignya ssp*) e seu Potencial para a Produção de Biocombustíveis no Estado do Tocantins**. II Simpósio Nacional de Biocombustíveis. ABQ – Associação Brasileira de Química, Recife, 2009.

OLIVEIRA, V. S.; COSTA, J. M. C.; AFONSO, M. R. A.; NETO, L. G. M. **Isotermas de adsorção de sapoti liofilizado**. In: V Connepi - Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, 2010, Maceió. V Connepi - Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica. Maceió: V Connepi - Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, 2010.

OOIJKAAS, L.P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation productionsystems. **Tibtech**, London, n.18, p.356-360, 2000.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos**. v.1. Componentes dos alimentos e processos. São Paulo: Artmed, 294p. 2005.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; ENIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industril enzymes. **Current Science**, Bangalore. v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PINHEIRO, A.R.O.; RECINE, E.; CARVALHO, M.F. **O que é uma alimentação saudável?:** Considerações sobre o conceito, princípios e características: uma abordagem ampliada. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 5 p., 2005.

PRASAD, A. S. Zinc deficiency in women, infants and children. **Journal of the American College of Nutrition**, United States, v.15, n. 2, p. 113-120. 1996.

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, D. D. **Estudo da composição nutricional e dos coeficientes de digestibilidade da farinha amilácea fina do babaçu determinada com suínos nas fases de crescimento e terminação**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal do Tocantins, 89p. 2009.

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.

SANTOS, F. S. A.; FIGUEIREDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M.. Isotermas de adsorção de umidade de farinhas de mandioca. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.6, n.2, p.149-155, 2009.

SAWAYA, A. L. **Aspects of energy metabolism in protein malnourished rats**. Tese de PhD, Darwin College, Cambridge, Inglaterra, 1985.

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, CD-ROM. 1999.

SGARBIERI, C. V. **Alimentação e nutrição – fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: UNICAMP, p. 243-261, 1987.

SILVA, C. P.; BENTO, E. S. Atividades metabólicas dos aminoácidos, proteínas e carboidratos nas unidades celulares do corpo humano. **Revista Conexão**. Três Lagoas, v.6, n.1, p.145-159, 2009).

SILVA, H. O.; FONSECA, R. A.; GUEDES FILHO, R. S. Características produtivas e digestibilidade da farinha de folhas de mandioca em dietas de frangos de corte com e sem adição de enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.29, n.3 , p.823-829. 2000.

SIZER, F. S.; WHITNEY, E. N. **Nutrição: conceitos e controvérsias**. 8ª ed. Barueri: Manole, 800p. 2003.

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, 228p. 1994.

SOUZA, M. G.; VIEIRA, E. C.; OLIVEIRA, P. V. **Determinação de As, Cd e Pb em amêndoas e mesocarpo de babaçu, amêndoas de sapucaia, castanha do Pará e chicha por GFAAS e HGAAS.** In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, 2009.

SUHET, M. I. **Enriquecimento protéico do resíduo da industrialização do abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) por fermentação: utilizando fungos filamentosos.** 1997. 72 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 1997.

SUHET, M. I.; FIOREZE, R. Fermentação semissólida do resíduo do abacaxi. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.5, n.1, p.47-52, 2011.

TAVANO, O. L.; SILVA JÚNIOR, S. I.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Avaliação nutricional de proteínas do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) por método químico e microbiológico. **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.

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.

UNICEF. **Um quarto das crianças do mundo têm um peso muito baixo para sua idade.** Comunicado de Imprensa, Comité Português para a UNICEF, 2006. 3p. Disponível em: < <http://www.unicef.org/progressforchildren/2006n4/> >. Acesso em: 12 set. 2011.

VICTORA, C. G.; ADAIR, L.; FALL, C.; HALLAL, P. C.; MARTORELL, R., RICHTER, L. **Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital.** *Lancet.*; 371(9609):340-57. doi: [10.1016/S0140-6736\(07\)61692-4](https://doi.org/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.

VITOLO, M. R. **Nutrição – da gestação à adolescência.** Rio de Janeiro: Reichamenn & Affonzo. 336 p. 2003.

VOGEL, H. J. A conveniente growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, n.13, p. 42-43. 1956.

WANG, H. L.; HESSELTINE, C. W. Mold – Modified foods. In: **Microbial Technology Fermentation.** New York: Academy Press, cap.4. p. 95 – 129. 1979.

WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. L. **Princípios de Bioquímica.** 5º edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1070p, 1976.

WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. dos; ABREU, J. R. 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. D. **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) Univ. Fed. PR. Curitiba. 1997.