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

JULIANE CRISTINA MIRANDA

**BIOCONVERSÃO ENERGÉTICA DA FOLHA E BAGAÇO DE MANDIOCA
PELO FUNGO *Rhizopus oligosporus* PARA OBTENÇÃO DE ALIMENTO
FUNCIONAL**

Rio Claro-SP

2014



JULIANE CRISTINA MIRANDA

**BIOCONVERSÃO ENERGÉTICA DA FOLHA E BAGAÇO DE MANDIOCA
PELO FUNGO *Rhizopus oligosporus* PARA OBTENÇÃO DE ALIMENTO
FUNCIONAL**

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

Orientador: Profª. Dra. Dejanira de Francechi de Angelis.

Co-orientador: Prof. Dr. Hércules Menezes.

Rio Claro
2014

JULIANE CRISTINA MIRANDA

**BIOCONVERSÃO ENERGÉTICA DA FOLHA E BAGAÇO DE MANDIOCA
PELO FUNGO *Rhizopus oligosporus* PARA OBTENÇÃO DE ALIMENTO
FUNCIONAL**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas. (Microbiologia
Aplicada).**

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Profa. Dra. Luciana Fontes Coelho

Profa. Dra. Marta Siviero Guilherme Pires

Rio Claro, 21 de maio de 2014

“Dedico orgulhosamente este trabalho a minha família. Aos meus amados pais, Vagner Miranda e Doroti Candido Miranda, e minhas queridas irmãs, Poliane de Cassia Miranda Carrilo e Anataly Candido Miranda”.

AGRADECIMENTO

À Prof. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, minha orientadora, tenho o imenso prazer de, nesta oportunidade, poder transmitir, com a total sinceridade do meu coração, a gratidão pelo grande apoio que recebi. Trabalhar ao seu lado foi uma honra e agradeço todos os dias pela benção da sua orientação. Ao Prof. Dr. Hércules Menezes, co-orientador, que depositou sua confiança, e que me abriu as portas necessárias para a minha vitória. Obrigada pela oportunidade concedida.

Agradeço também ao Eduardo Marin Morales por todos os seus ensinamentos que contribuíram para elaboração desse trabalho. Agradeço, mais uma vez, sua paciência e pelo seu tempo gasto voluntariamente.

Gostaria de registrar o meu mais profundo agradecimento aos colegas de laboratório Dilza, Marianne, Nair, Marcio Ramos, Marcio Rozin, Sibeli, Letícia, Luiza, Inês, Oscar e Zito, a essa gente valorosa, competente e comprometida que me acompanhou neste período e que contribuiu para o meu maior e melhor patrimônio, o conhecimento.

Aos amigos Cinthia, Ícaro, Marcos, Adriano, Noelle, Aline e Giordanni, eu quero muito agradecer-lhes por tudo o que me proporcionaram com sua atenção, carinho e amizade. Quero agradecer de coração por tudo o que me ajudaram a realizar.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo suporte financeiro concedido, ao Instituto de Biociências da UNESP e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Microbiologia Aplicada, pelo apoio.

“Nenhum homem realmente produtivo pensa
como se estivesse escrevendo uma dissertação”.

Albert Einstein

RESUMO

*O aumento da população mundial e, conseqüentemente, a crescente demanda por alimentos, gera grande quantidade de resíduos agroindustriais, como a folha (FFM) e bagaço (FBM) de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), onde a folha é descartada no campo e o bagaço é um resíduo sólido proveniente da extração do amido. Uma alternativa de agregar valor a estes resíduos é a biotransformação utilizando microrganismos. O objetivo deste trabalho foi promover a bioconversão proteica da folha e bagaço de mandioca pelo fungo *Rhizopus oligosporus* por meio da fermentação em estado sólido e avaliar a contribuição do adubo NPK (30:10:10) na fermentação e nos parâmetros analisados. Os resultados obtidos mostraram que a folha e bagaço de mandioca são eficientes para produção de biomassa, e que a bioconversão dos mesmos, por meio da fermentação, promoveu o enriquecimento proteico de até 8% no substrato, que por sua vez, apresentou maior digestibilidade obtendo valores de até 79,5%, valor este semelhante aos encontrados em proteínas de origem animal, além de aumentar os teores de lipídio, cinza e fibra bruta, e diminuir o teor de umidade. O processo de biotransformação também indicou diminuição de até 60,2% na toxicidade do substrato, devido a presença de ácido cianídrico, promovendo maior segurança alimentar. Os dados estatísticos mostram que a utilização do adubo NPK não contribuiu para o processo de biotransformação, evidenciando assim, que para a biotransformação da folha e bagaço de mandioca, não é necessário a adição de suplementos, tornando-a uma técnica simples e de baixo custo. Concluiu-se que estes resíduos, após a bioconversão a baixo custo, possuem as qualidades necessárias para suprirem a grande demanda por alimento, principalmente em regiões onde há situações graves de desnutrição.*

Palavras-chave: bagaço de mandioca; Fermentação; folha de mandioca; Mandioca; *Rhizopus oligosporus*.

ABSTRACT

The increasing world population and the growing demand for food, generates lots of organic residues such as leaf (FFM) and bagasse (FBM) cassava (*Manhit esculenta* Crantz), where the leaf is discarded in the field and bagasse is a solid residue from the extraction of starch. An alternative to adding value to these residues is the biotransformation using microorganisms. The objective of this work was to promote protein bioconversion of leaf and cassava bagasse by the fungus *Rhizopus oligosporus* by solid state fermentation and evaluate the contribution of NPK fertilizer on fermentation and the parameters analyzed. The results showed that the leaf and bagasse cassava are effective for biomass production and bioconversion thereof by means of fermentation, promoted the enriched protein up to 8% in the substrate, which in turn had higher digestibility obtaining values of up to 79.5% which is similar to those found in animal proteins, and improve the amount of lipid, ash and crude fiber, and reduce the moisture content. The biotransformation process also indicated decreased to 60.2% in the toxicity of the substrate due to the presence of hydrocyanic acid, promoting greater food security. The statistics show that use of the fertilizer NPK not contributed to the biotransformation, thus evidencing that for biotransformation of leaf and bagasse cassava, the addition of supplements is not necessary, making it a simple and inexpensive technique. It was concluded that these wastes after bioconversion at low cost, have the necessary qualities to feed the great demand for food, particularly in regions where there are serious cases of malnutrition.

Key-words: Bagasse cassava; Cassava; Fermentation; Leaf cassava; *Rhizopus oligosporus*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema do respirômetro de Bartha e Pramer | 29 |
| Figura 2. Frasco Erlenmeyer com substrato (mistura de folha e bagaço) | 30 |
| Figura 3. Placa de Petri contendo meio SNA com o fungo <i>Rhizopus oligosporus</i> var. <i>microsporus</i> | 32 |
| Figura 4. Experimento 2: frasco Erlenmeyer contendo meio de grão de soja com o fungo <i>R. oligosporus</i> | 33 |
| Figura 5. Respirômetros em estufa a 29°C | 33 |
| Figura 6. Amostra A (100% FFM): teste (direita) e controle (esquerda) após 5 dias de fermentação | 37 |
| Figura 7. Amostra B (100% FBM): teste (esquerda) e controle (direita) após 5 dias de fermentação | 37 |
| Figura 8. Amostra C (30% FFM + 70% FBM): teste (direita) e controle (esquerda) após 5 dias de fermentação | 37 |
| Figura 9. Amostra D (50% FFM + 50% FBM): teste (direita) e controle (esquerda) após 5 dias de fermentação | 37 |
| Figura 10. Amostra E (60% FFM + 40% FBM): teste (esquerda) e controle (direita) após 5 dias de fermentação | 38 |
| Figura 11. Experimento 1: Produção diária de CO ₂ devido a biodegradação de todas as amostras | 38 |
| Figura 12. Experimento 1: Produção acumulada de CO ₂ durante 15 dias de fermentação das amostras teste | 39 |
| Figura 13. Experimento 1: Teor de umidade de todas as amostras (valores expressos em porcentagem/100 gramas de matéria seca) | 39 |
| Figura 14. Experimento 1: Teor de cinzas das amostras controle e teste (valores expressos em porcentagem/100 gramas de matéria seca) | 40 |
| Figura 15. Experimento 1: Comparação do teor de lipídeo entre as amostras controle e teste (valores expressos em porcentagem/100 gramas de matéria seca) | 41 |
| Figura 16. Experimento 1: Quantidade de fibra bruta das amostras controle e teste (valores expressos em porcentagem/1 grama de matéria seca) | 43 |
| Figura 17. Experimento 1: Teor de proteína bruta das amostras controle e teste (valores expressos em porcentagem/100 gramas de matéria seca) | 45 |
| Figura 18. Experimento 1: Porcentagem do valor nutricional relativo (VNR) das | |

| | |
|--|----|
| amostras controle e teste (porcentagem/100g de proteína) | 47 |
| Figura 19. Experimento 1: Quantidade de aminoácidos em mg/100g presentes na amostra D controle e teste | 49 |
| Figura 20. Experimento 1: Quantidade em porcentagem de aminoácidos em mg/100g das amostra A controle, B controle e D controle e teste | 51 |
| Figura 21. Experimento 1: Teor de carbono orgânico total em porcentagem de todas as amostras | 53 |
| Figura 22. Experimento 1: Teor de carbono orgânico total em porcentagem de todas as amostras | 56 |
| Figura 23 Experimento 1: Quantidade de ácido cianídrico em ppm de todas as amostras | 58 |
| Figura 24. Experimento 2: Produção diária de CO ₂ devido a biodegradação das amostras testadas | 60 |
| Figura 25. Experimento 2: Produção acumulada de CO ₂ da amostras estudadas | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Composição do meio Synthetischer Nährstoffamer Agar (SNA) (Nirenberg 1990) | 25 |
| Tabela 2. Composição do meio de cultivo para <i>E. zymogenes</i> | 26 |
| Tabela 3. Composição do meio basal para preparo do meio de cultivo para <i>E. zymogenes</i> | 26 |
| Tabela 4. Composição da solução de sais de Vogel (VOGEL, 1956) | 27 |
| Tabela 5. Composição da solução de elementos traços (VOGEL, 1956) | 27 |
| Tabela 6. Composição da mistura vitamínica (FORD, 1962) | 28 |
| Tabela 7. Experimento 1: Porcentagem de farinha de folha de mandioca (FFM) e farinha de bagaço (FBM) de mandioca em 15g da mistura | 31 |
| Tabela 8. Experimento 2: Identificação das amostras, concentrações de substrato e concentrações de NPK em porcentagem (%) | 31 |
| Tabela 9. Digestibilidade de algumas fontes de proteína em relação a digestibilidade da farinha de folha de mandioca (FFM) e farinha de bagaço de mandioca (FBM) | 52 |
| Tabela 10. Experimento 1: Quantidade em porcentagem de aminoácidos em mg/100g das amostra A controle, controle e D controle e teste | 54 |
| Tabela 11. Resultados obtidos em g/100g de amostras relativas aos parâmetros analisados das amostras do grupo A, B e D, suplementadas com diferentes concentrações de NPK e das amostras A, B e D teste do experimento 1 | 63 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 Objetivo geral | 16 |
| 2.2 Objetivo específico | 16 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 3.1 Resíduos agroindustriais | 18 |
| 3.2 <i>Manihot esculenta</i> Crantz (mandioca) | 18 |
| 3.2.1 Folhas de mandioca | 19 |
| 3.2.2 Bagaço de mandioca | 20 |
| 3.3 Fermentação | 20 |
| 3.3.1 Controle da bioconversão pelo método de fermentação em estado sólido | 21 |
| 3.4 Micro-organismos | 22 |
| 3.4.1 <i>Rhizopus oligosporus</i> var <i>microsporus</i> | 23 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODO | 24 |
| 4.1 Materiais | 24 |
| 4.1.1 Folhas de mandioca | 24 |
| 4.1.2 Bagaço de mandioca | 24 |
| 4.1.3 Suplemento nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) | 24 |
| 4.1.4 Micro-organismos utilizados | 25 |
| 4.1.5 Meios de cultivo | 25 |
| 4.1.6 Equipamentos e vidraria | 28 |
| 4.2 Métodos | 29 |
| 4.2.1 Ensaios preliminares | 30 |
| 4.2.2 Experimento 1 e 2 | 31 |
| 4.2.3 <i>Rhizopus oligosporus</i> | 32 |
| 4.2.4 Avaliação do tempo de conversão pelo método Respirométrico de Bartha e Pramer | 33 |
| 4.2.5 Parâmetros analisados | 34 |
| 4.2.5.1 Umidade | 34 |
| 4.2.5.2 Cinza | 34 |
| 4.2.5.3 Lipídeos totais | 34 |
| 4.2.5.4 Fibra bruta | 34 |
| 4.2.5.5 Nitrogênio total (Proteína bruta) | 35 |
| 4.2.5.6 Valor nutricional relativo das proteínas (VNR) | 35 |
| 4.2.5.7 Aminoácidos Totais | 35 |
| 4.2.5.8 Carbono orgânico total (COT) e Cianeto | 36 |
| 4.2.6 Análise estatística | 36 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 5.1 EXPERIMENTO 1 | 37 |
| 5.1.1 Fermentação em estado sólido e respirometria de Bartha e Pramer | 37 |
| 5.1.2 Umidade | 39 |
| 5.1.3 Cinza | 42 |
| 5.1.4 Lipídeos totais | 44 |
| 5.1.5 Fibra bruta | 47 |
| 5.1.6 Nitrogênio total (proteína bruta) | 48 |
| 5.1.7 Valor nutricional relativo das proteínas (VNR) | 50 |
| 5.1.8 Aminoácidos totais | 52 |
| 5.1.9 Carbono orgânico total (COT) | 56 |
| 5.1.10 Ácido cianídrico (HCN) | 57 |

| | |
|---|----|
| 5.2 Experimento 2 | 59 |
| 5.2.1 Fermentação em estado sólido e respirometria de Bartha e Pramer | 60 |
| 5.2.2 Parâmetros analisados | 62 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 65 |
| 7. REFERÊNCIAS | 67 |

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 300 milhões de crianças no mundo têm o crescimento comprometido como seqüela da desnutrição. No Brasil, segundo o indicador altura/idade, o índice de prevalência de desnutrição no ano de 2013 é de 10,5%, sendo mais acentuado na Região Nordeste 17,9%. Esses dados estatísticos têm preocupado os pesquisadores que tem apresentado alternativas para amenizar o problema, como por exemplo propostas centradas no uso de fontes alimentares não convencionais e nutricionalmente ricas, de baixo custo e ampla disponibilidade.

No Brasil, alguns pesquisadores têm estudado as folhas de mandioca procurando uma possível alternativa para substituir alimentos convencionais, pois seu teor de proteínas, vitaminas e minerais é relativamente alto, quando comparado a hortaliças folhosas e grãos de cereais, além de apresentarem baixo custo e alta disponibilidade. As folhas são produzidas em quantidade superior à 2 ton/ha, em base seca, porém, a quantidade de folha produzida varia de acordo com a variedade da planta.

Vários processos têm sido desenvolvidos em busca da utilização consciente dos resíduos agroindustriais como aqueles gerados na cadeia produtiva da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Numerosos resíduos existentes na agroindústria são hoje utilizados como matéria-prima para produção de outros insumos de maior valor agregado, como cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, entre outros.

No Brasil, a farinha de folhas de mandioca (FFM) vem sendo usada no combate à desnutrição, por ser fonte de vitaminas e minerais. Além disso, apresentam baixo custo de produção, pois as folhas são consideradas resíduos e não competem com o principal produto comercial, as raízes.

A mandioca pertence à classe das Dicotiledôneas, à família Euphorbiaceae, ao gênero *Manihot*, sendo a espécie *Manihot esculenta* Crantz uma planta tropical cultivada amplamente em várias regiões do mundo, sob condições de altas temperaturas e precipitação acima de 500 mm, possuindo uma variabilidade genética ainda pouco conhecida, no entanto, já foram catalogadas no Brasil, mais de 4 mil variedades de mandioca, e estas são mantidas em coleções e bancos de germoplasma de várias instituições de pesquisa. Para a indústria de amido, as variedades devem apresentar altos teores de amido nas raízes, polpa branca, córtex e película clara, ausência de cintas nas raízes, destaque fácil da película, raízes grossas e bem conformadas.

As unidades industriais que processam a mandioca produzem altas quantidades de descartes considerados agressivos ao ambiente. O bagaço é o principal descarte sólido produzido nas

fecularias e, em geral, é deixado em valas que extravasam carreando grande carga orgânica. No entanto, a massa, ou bagaço, da mandioca é composto pelo material fibroso da raiz contendo parte do amido que não foi possível extrair no processamento. O bagaço é gerado na etapa de separação da fécula e é embebido em água e, nestas condições, apresenta volume maior que a própria matéria-prima, contendo cerca de 75% de umidade.

O presente trabalho promoveu a biotransformação da folha e bagaço de mandioca pelo fungo *Rhizopus oligosporus* por meio da fermentação em estado sólido, objetivando-se o melhoramento destes resíduos para posterior utilização na alimentação humana.

2. OBJETIVOS

a. Objetivo geral

Promover a biotransformação da folha e bagaço de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), resíduos agroindustriais, a partir da fermentação em estado sólido promovida pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, visando o enriquecimento proteico e obtenção de um alimento funcional a ser utilizado na alimentação de pessoas, principalmente àquelas que vivem em países produtores de mandioca e que possuem altos índices de pobreza e má nutrição.

b. Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento micelial do *R. oligosporus*.
- Determinar o tempo de biotransformação da folha e bagaço de mandioca, em diferentes concentrações, utilizando o método de respirometria de Bartha e Pramer.
- Determinar a concentração de nitrogênio no substrato promovido por *R. oligosporus* após o processo de fermentação em estado sólido.
- Determinar as características bromatológicas da folha e bagaço de mandioca antes e após a bioconversão promovida por *Rhizopus oligosporus*.
- Avaliar possível diminuição da toxicidade do ácido cianídrico por meio do processo de biotransformação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Resíduos agroindustriais

Um dos maiores desafios da sociedade contemporânea é a busca por uma gestão adequada dos resíduos sólidos. O crescimento populacional e os modernos padrões de consumo, cada vez mais acentuados, induzem os sistemas agropecuários e agroindustriais a aumentarem a sua produção. Os rendimentos tem apresentado intensa expansão nos últimos anos devido a diversidade das atividades agrícolas, avanços tecnológicos, desenvolvimento de novos produtos e melhoria da qualidade nas diversas vertentes do setor. Como consequência do aumento da produtividade grande quantidade de resíduos são gerados e, quando disponibilizados inadequadamente, podem acarretar danos ao meio ambiente, criando problemas de amplas proporções de ordem social, econômica e ambiental (VERAS e POVINELLI, 2004; MORALES et al., 2013).

Grande parte dos vegetais cultivados em terra arável é descartada como resíduos. Na Europa são produzidos anualmente mais de 200 milhões de toneladas de resíduos e subprodutos alimentares. A legislação Europeia, relativa a esta área, encoraja a diminuição da deposição de resíduos biodegradáveis e incentiva a recuperação, reciclagem e valorização de resíduos alimentares da agroindústria e outros resíduos biodegradáveis para obtenção de produtos úteis, inclusive para a produção de energia. Visando o aproveitamento desses resíduos, que podem apresentar características utilitárias, muitos estudos vêm sendo realizados para transformá-los em novos produtos ou mesmo utilizá-los como substrato para processos como a fermentação em estado sólido (IYAYI et al., 2004).

A composição química da maioria dos resíduos não é equilibrada, embora possuam considerável teor de nutrientes. A ciência e a tecnologia atuais concentram-se principalmente nos 5% da produção anual de resíduos que podem ser facilmente utilizados como nutrientes após operações simples de processamento. Os outros 95% requerem técnicas de processamentos mais complexos (físico, químico ou biotecnológico), antes da sua utilização como alimentos ou rações para animais. Dentre os 95%, os resíduos orgânicos são àqueles que mais facilmente podem ser convertidos em alimentos (IYAYI et al., 2004; ALTIERI, 2010). Atualmente, as alternativas de valorização de resíduos mediante aproveitamento em diversas atividades são incentivadas, uma vez que podem contribuir positivamente para a minimização da poluição ambiental, bem como diminuir os custos de produção e permitir a utilidade econômica (FERNANDES et al, 2008).

A busca da utilização dos resíduos agroindustriais como aqueles gerados na cadeia produtiva da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), tem propiciado o desenvolvimento de vários processos

objetivando utilizá-los como matéria-prima na produção de outros insumos de maior valor agregado, como cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, entre outros (PANDEY e SOCCOL, 1998). A utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos possibilita sua utilização como substratos alternativos, além de colaborar com a atenuação de problemas de poluição, que sua disposição poderia causar. Com o advento das inovações biotecnológicas, novas perspectivas foram visualizadas para a sua utilização, principalmente na área de tecnologia enzimática e fermentação para obtenção de bioprodutos.

3.2 *Manihot esculenta* Crantz (mandioca)

A mandioca pertence à classe das Dicotiledôneas, à família Euphorbiaceae, ao gênero *Manihot*, sendo a espécie *Manihot esculenta* Crantz uma planta tropical cultivada amplamente em várias regiões do mundo, sob condições de altas temperaturas e precipitação acima de 500 mm, possuindo uma variabilidade genética ainda pouco conhecida (CERQUEIRA, 1992).

A planta é um arbusto e apresenta sistema radicular subterrâneo espessado (raízes tuberosas) resistente à seca, o qual acumula grande quantidade de amido (EL-SHARKAWY, 2006). Contudo, o conhecimento dos aspectos anatômicos dos diferentes cultivos da mandioca pelos agricultores são pouco estudados, porém são de importância econômica para os produtores, uma vez que os cultivos apresentam grande variabilidade estrutural (NASSAR et al., 2008). As folhas de mandioca foram descritas por Ueno e Agarie (1997) como hipoestomáticas, com parênquima paliçádico e esponjoso definido. As ceras cuticulares da mandioca são ricas em triterpenos e possuem alcanos e ácidos carboxílicos em menor quantidade, podendo variar entre os genótipos (ZINSOU et al., 2006).

A mandioca possui a notável capacidade de adaptação às diversas condições agroecológicas e é considerada também, como uma cultura de baixo risco, pois apresenta natureza resistente à seca e não possui exigência de quaisquer condições específicas de crescimento. Portanto, muita atenção tem sido direcionada nos últimos 20 anos para seus aspectos agrícolas a fim de aumentar a sua produção em todo o mundo (PANDEY e SOCCOL, 1998).

A cultura da mandioca destaca como a principal fonte de carboidrato para mais de 925 milhões de pessoas e em 105 países das zonas tropicais e subtropicais, sendo cultivada em todos os estados brasileiros (FELIPE et al. 2010). A produção nacional de mandioca no ano de 2011 foi estimada em 27,1 milhões de toneladas, colocando o Brasil como o 2º maior produtor mundial, superado apenas pela Nigéria. A participação brasileira na produção mundial, que já atingiu até 30%, atualmente situa na média de 11%. Este diferencial é atribuído pelo forte avanço de plantios

em outros países com destaque principalmente da Nigéria que passou nesse período de 10 milhões para 45 milhões de toneladas (SILVA et al. 2012).

3.2.1 Folhas de mandioca

As folhas de mandioca representam uma excelente fonte de proteínas, em cerca de 20 a 30 % de peso seco, e são produzidas em quantidade superior à 2 ton/ha, em base seca. Entretanto, o potencial proteico das folhas é descartado, pois normalmente, permanecem no campo após a colheita das raízes. Estima-se que são perdidas mais de 178.000 toneladas de folhas por ano. Este material descartado no campo representa perda de 30% de proteína bruta, além das vitaminas do grupo A (CARVALHO; KATO, 1987; LANCASTER e BROOKS, 1983), vitamina C e riboflavinas (CALDWELL, 1972). Segundo Carvalho (1994), apenas 20% do total das ramas produzidas em uma área são aproveitadas para o replantio, restando, no campo, 80%. Embora a riqueza proteica das folhas de mandioca seja conhecida há décadas, sua utilização tecnológica é ainda precária com poucos índices de processamento (LANCASTER e BROOKS, 1983; OLIVIERA, 1984). No Brasil, o descarte das folhas da mandioca é praticamente total em todas as regiões (CARVALHO et al., 1987).

O teor em proteínas totais das folhas varia segundo a idade fisiológica da planta e em função do cultivar, ou seja, a composição dos aminoácidos das proteínas varia entre as espécies de mandioca (DILLY e MATHAN, 1978). O perfil de aminoácidos da folha de mandioca pode ser comparado ao do ovo, do leite, do queijo, da soja e do peixe, embora apresente deficiência em metionina, cistina, lisina e isoleucina (FASUYI e ALETOR, 2005).

O conteúdo de proteína das folhas de mandioca é superior àqueles encontrados na maioria das gramíneas e leguminosas. Além disso, a mandioca tem a vantagem de oferecer maior produtividade e de adaptar-se a solos pobres (GUERROUÉ et al., 1996). Entretanto, em nível de aproveitamento tecnológico e nutricional, estas proteínas não foram ainda devidamente exploradas (CARVALHO et al., 1987).

No Brasil, a farinha de folhas de mandioca vem sendo usada no combate à desnutrição (MADRUGA e CÂMARA, 2000), por apresentarem baixo custo de produção e por não competirem com o principal produto comercial, as raízes (RAVINDRAN e RAJAGURU, 1988). Porém, a toxicidade, devido à presença de cianeto, pode restringir seu uso na alimentação humana. A secagem das folhas de mandioca apresenta influência sobre os níveis de cianeto, mostrando sua maior liberação, quando a secagem é feita em temperaturas mais baixas (GÓMEZ e VALDIVIESO, 1985; PADMAJA, 1989; CORRÊA et al., 2002).

3.2.2 Bagaço de mandioca

O processamento da mandioca para obtenção da fécula, feito por indústrias brasileiras, gera em grande quantidade um resíduo denominado bagaço, que também é conhecido como farelo de mandioca. Seu descarte enquadra-se como agente poluidor de meio ambiente, sendo que apenas uma pequena parte desse material é utilizado na alimentação animal, principalmente devido a sua baixa qualidade nutricional como também a sua toxicidade. O bagaço é o principal descarte sólido produzido nas fecularias e, em geral, é deixado em valas, que por vezes extravasam e carregam grande carga orgânica (FIORETO, 1987; LEONEL, 1998).

O bagaço de mandioca é um resíduo fibroso e a sua composição em amido varia de acordo com o processamento que pode atingir até 50%. A variação é, provavelmente, devido ao fato de que a maioria do processamento da mandioca, matéria-prima, é feito sob condições tecnológicas nem sempre otimizadas. Além disso, a composição pode também diferir devido as diferentes variedades. O amido é o principal componente, composto de hidratos de carbono polimerizado no qual a glicose é o monômero (CARTA et al., 1998).

A partir da queima da matéria orgânica obtém-se o resíduo orgânico constituído de macronutrientes K, Na, Ca, P, S, Cl e Mg e os micronutrientes Al, Fe, Cu, Mn e Zn. O bagaço de mandioca obtém inúmeras vantagens quando comparado com outros resíduos agroindustriais, como a palha de arroz e palha de trigo, para o emprego nos processos de bioconversão utilizando culturas microbianas. Comparando-se com outros resíduos agrícolas, o bagaço de mandioca pode ser considerado um reservatório de energia e apresenta vantagens por não necessitar de qualquer tratamentos prévios em diferentes processos tecnológicos além de apresentar-se como substrato facilmente colonizado por microrganismos (PANDEY et al., 2000).

O bagaço que ainda apresenta em sua composição amido que pode ser biotransformado em alimento para humanos e animais utilizando culturas de fungos comestíveis (SOCCOL et al., 1995). Este resíduo tem sido empregado para cultivo de cogumelos por meio da fermentação em estado sólido (FES), nesta utilização destacando-se *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus sajor-caju* (shimeji), onde mostrou-se ser um substrato adequado para a produção destes cogumelos (BEUX et al., 1995; BARBOSA et al., 1995).

3.3 Fermentação

A fermentação no estado sólido, tradução do inglês “solid state fermentation” ou “solid state culture” pode ser definida como uma técnica de crescimento de microrganismos na superfície e no

interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida), onde a quantidade de líquido contido nesta matriz deve ser mantido em nível correspondente à atividade de água mínima para crescimento. Desta maneira, assegura-se o crescimento e o metabolismo celular que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz. O suporte sólido pode ser constituído por um substrato naturalmente úmido ou por uma matriz inerte capaz de absorver os nutrientes que se encontram em solução reproduzindo as condições de baixa atividade de água e alta transferência de oxigênio (VANDENBERGHE et al., 2000).

A conversão microbiana empregando processos fermentativos, frequentemente, gera produtos mais enriquecidos com proteína. Se os microrganismos utilizados forem mantidos em conjunto com os resíduos orgânicos que passam a funcionar como substrato, o produto designa-se por produto de biomassa microbiana. Se os microrganismos forem separados do substrato, o produto designa-se proteína unicelular, cuja composição nutricional é superior à dos substratos iniciais e cuja digestibilidade muitas vezes supera a de fontes clássicas de proteína de elevada qualidade. Desta forma, os resíduos agroindustriais podem ser valorizados por via microbiana (IYAYI et al., 2004).

Na Nigéria, resíduos de cereais utilizados na indústria cervejeira, farelo de arroz, farinha de palmito, farelo de milho e películas de mandioca foram tratados com fungos, de modo a aumentar o teor em proteínas e reduzir o teor de hidratos de carbono complexos. Estes processos permitem aumentar a quantidade e qualidade de proteína em zonas do planeta nas quais os alimentos tradicionais são sobre tudo ricos em amido. Os alimentos podem ser produzidos a nível artesanal e possuem sabor, textura e valor nutricional aceitáveis (DOUILLARD e MATHAN, 1994).

A fermentação é uma das mais antigas biotecnologias aplicadas, tendo sido utilizada no processamento de alimentos e preservação bem como a produção de bebidas há mais de 6000 anos. O processo de fermentação de grãos serve como um meio de proporcionar uma fonte importante de alimento para animais mediante silagem. A fermentação aumenta o teor de nutrientes dos alimentos, mediante a biossíntese de vitaminas, aminoácidos essenciais e proteínas, melhorando qualidade da proteína e a digestibilidade da fibra (ACHINEWHU et al., 1998).

3.3.1 Controle da bioconversão pelo método de fermentação em estado sólido.

O desempenho da respiração do solo é considerado como um indicador da sua atividade microbiana, bem como do efeito de toxicidade e da biodegradação de compostos orgânicos a ele adicionados. A respiração pode ser avaliada mediante quantificação do gás carbônico produzido, durante a biodegradação. O respirômetro de Bartha e Pramer é um sistema fechado, constituído de

duas câmaras interligadas, onde ocorre a biodegradação, este processo gera CO₂ que mediante sua quantificação, pode-se estimar a respiração de um solo ou substrato. O respirômetro de Bartha e Pramer foi proposto inicialmente para avaliar a emissão de CO₂ do solo em que foi adicionado o resíduo (COSTA, 2009).

No frasco Erlenmeyer ocorre a biodegradação dos compostos orgânicos por microrganismos nativos ou introduzidos ocorrendo a produção do gás carbônico. O gás carbônico neutraliza uma parte da solução de hidróxido de potássio (KOH) de concentração conhecida, situada no braço lateral. A quantificação do gás carbônico é feita regularmente pela retirada e titulação da solução de hidróxido de potássio com solução de ácido clorídrico (HCL). Pela quantidade de KOH neutralizado pode avaliar o comportamento da atividade microbiana, ou seja, o CO₂ produzido (MELLO et al., 2007). Entretanto, outro método para avaliar a produção de CO₂ vem sendo utilizado por muitos pesquisadores, onde o gás produzido é quantificado por condutividade elétrica da solução de KOH, que tende a diminuir em relação à produção de CO₂. Segundo Rodella e Saboya (1999), este método de quantificação de gás produzido por meio da condutividade elétrica do KOH ou NaOH utilizado na respirometria, fornece resultados mais precisos.

Este método foi empregado para avaliar a colonização dos fungos nesta pesquisa.

3.4 Microrganismos

Muitos microrganismos apresentam capacidade de crescimento em substratos sólidos, sendo os fungos filamentosos os mais utilizados, devendo-se esta aplicação pela capacidade de crescimento na ausência de água livre, versatilidade de aplicação e manipulação. O uso destes microrganismos como suplemento ou substituto alimentar mostra-se vantajoso, uma vez que se multiplicam rapidamente promovendo a rápida formação de biomassa microbiana e possuem aminoácidos essenciais, além de enriquecerem o substrato onde são cultivados com enzimas e vitaminas (MARTINS et al., 2002).

3.4.1 *Rhizopus oligosporus* var *microsporus*

Os fungos do gênero *Rhizopus* sp. são classificados como filo: Zygomycota, classe: Zygomycetes, ordem: Mucorales, família: Mucoraceae, gênero: *Rhizopus*. Dentre as espécies do gênero *Rhizopus*, tem-se as espécies *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus circicans*,

Rhizopus delemar, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus formosa*, *Rhizopus stolonifer* (MIYAOKA, 2012).

O fungo *R. oligosporus* apresenta os filamentos ramificados chamados hifas que crescem e se ramificam formando redes complexas chamadas micélio. O micélio estende-se sobre a superfície formando uma colônia, mostrando diferentes padrões de ramificação miceliais (DHANANJAY et al, 1993; FERRET et al, 1999).

Este gênero de fungo é importante a julgar pelo número de espécies descritas. No entanto, no passado foi a diferenciação de espécies baseados frequentemente em pequenas diferenças, por exemplo, a abundância de esporulação, ou caracteres não utilizados atualmente nos Zygomycetes, tais como a capacidade de crescer ou para fermentar os componentes fornecidos (SCHIPPER, 1984).

Rhizopus é um gênero importante de fungos filamentosos que tem sua aplicação tanto no processo fermentativo de alimentos, como na produção industrial de enzimas. Este gênero é classificado quanto à sua morfologia e temperatura máxima de crescimento e, de acordo com esta classificação, o fungo da espécie *R. microsporus* pode ser classificado como termotolerante, pois cresce em temperaturas de 30 a 45°C (KITPREECHAVANICH et al., 2008). Um fungo é considerado termotolerante quando sua temperatura de crescimento máximo é de cerca de 50°C, podendo se desenvolver também a 20°C (COONEY e EMERSON, 1964).

O fungo *Rhizopus oligosporus* é utilizado para a produção de tempê, um alimento fermentado à base de soja de origem asiática (AIKAT e BHATTACHAIRYYA, 2000). Além de produzir alimentos, este micro-organismo aumenta a digestibilidade e o teor de proteína, também diminui a concentração de substâncias tóxicas do mesmo. O *Rhizopus oligosporus* também apresenta atividade anticarcinogênica e produz uma substância com atividade antimicrobiana contra vários microrganismos gram-positivos (ZHU et al., 1989).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ensino e Pesquisa de Toxicidade de Águas, Departamento de Microbiologia Aplicada e Bioquímica, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, campus Rio claro – SP.

4.1 Materiais

4.1.1 Folhas de mandioca

As folhas de mandioca foram fornecidas por produtores de Rio Claro – SP. As folhas foram colhidas, picadas manualmente e secadas ao sol até a perda de cerca de 70% do peso. A seguir foram trituradas em liquidificador até a obtenção de um pó homogêneo denominado de farinha de folha de mandioca (FFM). As folhas trituradas foram acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno, identificadas e armazenadas em ambiente seco, protegido da luz até o momento de seu uso.

4.1.2 Bagaço de mandioca

O bagaço obtido da área industrial após secagem ao ar livre foi triturado em liquidificador até a obtenção de um pó fino denominado farinha de bagaço de mandioca (FBM), o mesmo também foi acondicionado em sacos plásticos, identificados e armazenados em ambiente seco e protegido da luz até o momento de seu uso.

4.1.3 Suplemento nitrogênio, fósforo e potássio (NPK)

O suplemento (adubo granulado) NPK, suplemento mineral de macronutrientes nitrogênio, fósforo e potássio, de proporções 30:10:10, respectivamente, foi adquirido no comercio.

4.1.4 Microrganismos utilizados

O *Rhizopus oligosporus* var. *microsporus* CCT 3762 (ATCC 22959) foi adquirido junto a Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas – SP. A bactéria *Enterococcus zymogenes*, proveniente do Agricultural Research Service (US Department of Agricultural) Northern Regional Research Center, foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Aureluce Demonte do Departamento de Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara – SP.

4.1.5 Meios de cultivo

Os meios de cultivo para os microrganismos utilizados neste trabalho estão demonstrados a seguir.

Meio de cultivo para o *Rhizopus oligosporus* var *microsporus*.

- Meio Synthetischer nährstoffamer Agar (SNA) acrescido de 5% de mistura de bagaço de mandioca (BM) e folha de mandioca (FM) em proporções iguais (Tabela 1).

Tabela 1- Composição do meio Synthetischer Nährstoffamer Agar (SNA) (Nirenberg 1976).

| SYNTHETISCHER NAHRSTOFFAMER AGAR | |
|---|---------|
| KH₂PO₄ | 1,0g |
| KNO₃ | 1,0g |
| MgSO₄ 7H₂O | 0,5g |
| KCL | 0,5g |
| Glucose | 0,2g |
| Saccharose | 0,2g |
| Agar | 20,0g |
| Folha de mandioca | 2,5% |
| Bagaço de mandioca | 2,5% |
| Água destilada (qsq) | 1000 mL |

- Meio de cultivo para *E. zymogenes* (Tabela 2, 3, 4, 5 e 6).

Tabela 2 – Composição do meio de cultivo para *E. zymogenes*

| MEIO DE CULTIVO | |
|-----------------------------|---------------|
| Meio basal | 20 mL |
| Triptona | 200 mg |
| Água destilada (qsq) | 100 mL |
| pH | 7,2 |

Tabela 3 – Composição do meio basal para preparo do meio de cultivo para *E. zymogenes*

| MEIO BASAL | |
|-------------------------------------|----------------|
| Glicose | 30,0 g |
| K₂HPO₄ | 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 |
| Água destilada (qsq) | 500 mL |

*Mistura vitamínica segundo Ford (1962);

**Solução de sais de Vogel (VOGEL, 1956)

Tabela 4 – Composição da solução de sais de Vogel (VOGEL, 1956)

| SOLUÇÃO DE SAIS DE VOGEL | |
|--|---------|
| Citrato de sódio.5H₂O | 15,00 g |
| KH₂PO₄ | 25,00 g |
| NH₄NO₃ | 10,00 g |
| MgSO₄.7H₂O | 1,00 g |
| CaCl₂.2H₂O | 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 |

Diluir a solução de sais de Vogel em 50 vezes com água destilada (v/v).

Tabela 5 – Composição da solução de elementos traços (VOGEL, 1956).

| SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS | |
|---|---------|
| Ácido cítrico · H₂O | 5,00 g |
| ZnSO₄ · 7H₂O | 5,00 g |
| Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O | 1,00 g |
| CuSO₄ · 5H₂O | 0,25 g |
| MnSO₄ · H₂O | 0,005 g |
| Na₂MoO₄ · 2H₂O | 0,005 g |
| Água destilada qsp | 100 mL |

Tabela 6 – Composição da mistura vitamínica (FORD, 1962).

| MISTURA VITAMÍNICA | |
|--------------------------------------|--------|
| Tiamina (B1) | 25 mg |
| Riboflavina (B2) | 4,0 mg |
| Ácido Nicotínico (B3) | 4,0 mg |
| Pantetonato de Cálcio (B5) | 4,0 mg |
| Cloridrato de Piridoxina (B6) | 4,0 mg |
| Biotina (B7) | 20 µg |
| Ácido Fólico (B9) | 0,4 mg |
| Vitamina B12 | 1,0 µg |
| Ácido ρ-Aminobenzóico (Bx) | 4,0 mg |

- Meio de preservação para *E. zymogenes*.

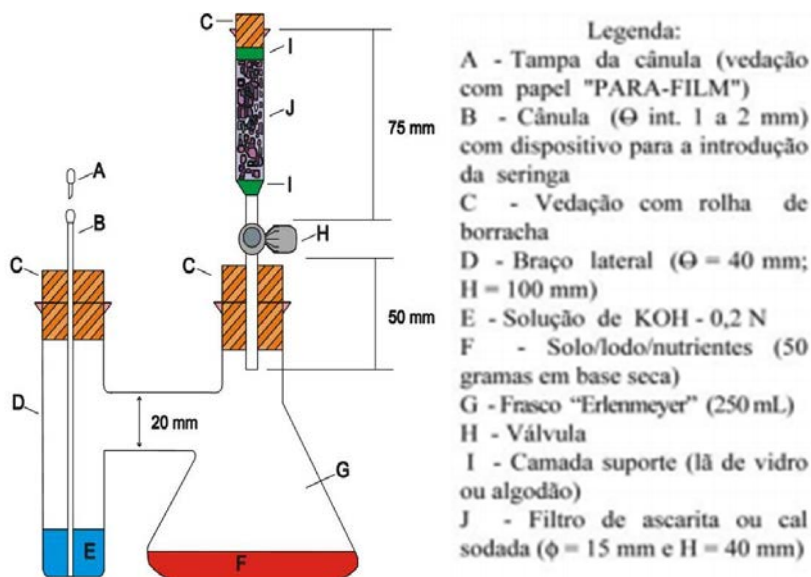
O meio para manutenção de *E. zymogenes* deve ser preparado a partir do acréscimo de 10% de glicerol no meio de cultivo (Tabela 2). Deve-se adicionar 3,0 mL do inóculo ativo em 10,0 mL do meio de preservação, colocando a seguir no freezer a -20°C, até o momento de uso.

4.1.6 Equipamentos e vidraria

Equipamentos e vidraria de uso rotineiro em laboratório de microbiologia, além dos frascos de Bartha e Pramer (Figura 1).

Figura 1 – Esquema do respirômetro de Bartha e Pramer

Fonte: Lopes e Bidóia (2009)



4.2 Métodos

Para avaliar a biotransformação da folha e bagaço de mandioca promoveu-se dois ensaios fermentativos nas mesmas condições de fermentação (temperatura e umidade), denominados de "experimento 1" e "experimento 2". No experimento 1, diferentes concentrações de folha e bagaço de mandioca foram avaliadas e as concentrações que apresentaram melhores resultados foram testadas no experimento 2. Para o experimento 2, adicionou-se aos substratos uma fonte inorgânica de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), em diferentes concentrações.

Também foram examinados dois meios de cultivo para o micro-organismo. No experimento 1, o *R. oligosporus* foi mantido em meio SNA acrescido de mistura de 5% de folha e bagaço de mandioca na proporção de 1:1, em placa de Petri. No experimento 2, o *R. oligosporus* foi mantido em meio de cultivo de 30 gramas de grãos de soja em frasco Erlenmeyer. O meio de soja foi utilizado a fim de facilitar a inoculação do *R. oligosporus* no substrato, de forma que este procedimento possa ser executado facilmente por qualquer indivíduo. Ambos foram mantidos nas mesmas condições de incubação.

Os diferentes métodos de manutenção do micro-organismo, foram utilizados com o objetivo de verificar o melhor meio de cultura para a manutenção do *R. oligosporus* e determinar a melhor técnica de inoculação do mesmo. O suplemento NPK foi utilizado com o objetivo de avaliar a

possibilidade do *R. oligosporus* promover melhor metabolismo com auxílio dos nutrientes inorgânicos para a conversão em biomassa, bem como para o aumento no teor e qualidade de proteína.

4.2.1 Ensaio preliminares

Com o objetivo de determinar as melhores condições para os processos de fermentação em estado sólido, ensaios preliminares foram programados para analisar os parâmetros ideais de umidade, temperatura e concentrações do substrato. Frascos Erlenmeyers de 250 mL (Figura 2) contendo diferentes concentrações da mistura de bagaço e folha de mandioca (tabela 7) totalizando 15 gramas com 60% de umidade foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. A partir dos resultados obtidos nos ensaios preliminares foram montados o experimento 1 e posterior experimento 2.

Figura 2 – Frasco Erlenmeyer com substrato mistura de folha e bagaço de mandioca (1:1)



4.2.2 Experimento 1 e 2

Experimento 1: após esterilização do substrato, o micro-organismo cultivado em placas de Petri em meio de SNA de Nirenberg (1976) foi inoculado. Foram recortados assepticamente 10 quadrados de 5 mm com o meio contendo o micro-organismo e transferidos de forma asséptica ao substrato. Os frascos foram incubados em estufa em $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e seu crescimento foi analisado. O CO_2 produzido foi quantificado pelo método de titulação com HCL.

As proporções e identificação das concentrações utilizadas no experimento 1 estão dispostas na Tabela 7:

Tabela 7 – Experimento 1: Porcentagem de farinha de folha de mandioca (FFM) e farinha de bagaço (FBM) de mandioca em 15g da mistura

| Amostra | FFM | FBM |
|----------------|------------|------------|
| A | 100 | - |
| B | - | 100 |
| C | 30 | 70 |
| D | 50 | 50 |
| E | 60 | 40 |

Experimento 2: para este experimento as concentrações de substrato analisadas foram divididas em três grupos (Tabela 8): grupo A (100% FFM); B (100% FBM); e D (50% FFM + 50% FBM). Para cada grupo foram examinadas em triplicata, três concentrações de suplemento NPK: 0,5%, 1,0% e 1,5%. O NPK foi dissolvido em 10 mL de água destilada, e esta solução foi adicionada ao substrato de forma homogênea, respeitando a condição de fermentação de 60% de teor de umidade. Neste experimento, o CO₂ produzido foi quantificado por meio da condutividade elétrica do KOH.

As concentrações e identificação das amostras testadas estão dispostas na tabela 8:

Tabela 8 – Experimento 2: Identificação das amostras, concentrações de substrato e concentrações de NPK em porcentagem (%).

| Amostras | *FFM | **FBM | NPK | <i>R. oligosporus</i> |
|--------------------|-------------|--------------|------------|------------------------------|
| Amostra A controle | 100 | - | - | - |
| Amostra A1 | 100 | - | 0,5 | + |
| Amostra A2 | 100 | - | 1,0 | + |
| Amostra A3 | 100 | - | 1,5 | + |
| Amostra B controle | - | 100 | - | - |
| Amostra B1 | - | 100 | 0,5 | + |
| Amostra B2 | - | 100 | 1,0 | + |
| Amostra B3 | - | 100 | 1,5 | + |
| Amostra D controle | 50 | 50 | - | - |
| Amostra D1 | 50 | 50 | 0,5 | + |
| Amostra D2 | 50 | 50 | 1,0 | + |
| Amostra D3 | 50 | 50 | 1,5 | + |

*FFM: farinha de folha de mandioca; **FBM: farinha de bagaço de mandioca

Para analisar o possível melhoramento dos parâmetros analisados promovidos pela suplementação do substrato com o NPK, os dados obtidos das amostras testadas no experimento 2,

foram comparadas aos dados obtidos das amostras A, B e D do experimento 1, pois estas amostras foram fermentadas sem a adição de suplementos.

4.2.3 *Rhizopus oligosporus*

Para o experimento 1: retirou-se da cultura estoque de *Rhizopus oligosporus* inóculos que foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura SNA (Synthetischer nahrstoffamer Agar) (NIRENBERG, 1976) e mistura a 5% do substrato (50% de FFM e 50% de FBM). Estas placas foram mantidas em estufa na temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$, até que o meio de cultura fosse completamente colonizado (Figura 3). O micélio contido nas placas foi seccionado em quadrados de cerca de 5mm. Foram utilizados 10 quadrados como inóculo em cada respirômetro de Bartha e Pramer (Figura 1).

Figura 3 – Placa de Petri contendo meio SNA com o fungo *Rhizopus oligosporus* var. *microsporus*.



Para o experimento 2: 30 gramas de grãos de soja foram colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, após atingir temperatura ambiente, inoculou-se o *R. oligosporus*, de forma asséptica em câmara de fluxo contínuo (Figura 4). As condições de incubação foram as mesmas utilizadas no experimento 1. Após a colonização dos grãos, 10 deles foram transferidos assépticamente para os respirômetros de Bartha e Pramer.

Figura 4 – Experimento 2: frasco Erlenmeyer contendo meio de grão de soja com o fungo *R. oligosporus*



4.2.4 Avaliação do tempo de conversão pelo método Respirométrico de Bartha e Pramer

Utilizou-se o respirômetro de Bartha e Pramer, de acordo com a norma ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR 10004:2004 – Resíduos sólidos: NBR 30504, para determinar a taxa de bioconservação, ou seja, colonização do substrato pelo micro-organismo. Neste experimento, os frascos com o substrato foram esterilizados em autoclave durante 121°C por 15 minutos. A seguir adicionou-se o inóculo misturando-o ao substrato de forma asséptica. Para cada amostra foram feitos 3 frascos teste e 3 frascos controles. Os frascos foram incubados em estufa a $28\pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 dias (Figura 5).

Experimento 1: para a técnica de respirometria utilizou-se solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2 para as amostras controle e 0,4N para as amostras teste e para titulação utilizou-se o ácido clorídrico (HCL) a 0,1N para as amostras controle e 1N para as amostras teste.

Experimento 2: para a técnica de respirometria utilizou-se solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2 para todas as amostras (controle e teste). No entanto, o CO_2 produzido foi mensurado pela técnica de condutividade.

Figura 5 – Respirômetros de Bartha e Pramer com os substratos na estufa



4.2.5 Parâmetros analisados.

Após o processo de biotransformação do substrato (fermentação), avaliado após o decaimento da produção de CO₂ os seguintes parâmetros foram determinados: umidade, cinza, lipídeo, fibra bruta, nitrogênio total, valor nutricional relativo da proteína, perfil de aminoácidos totais, dosagem de cianeto e teor de carbono inicial e final. Os resultados obtidos das amostras biotransformadas foram comparados ao controle (não inoculado).

4.2.5.1 Umidade

A umidade foi determinada pelo processo de secagem em estufa a 105°C até a obtenção de peso constante (AOAC, 1995).

4.2.5.2 Cinza

O teor de cinzas foi determinado pelo processo de incineração em mufla a 550°C por duas horas. A diferença entre o peso inicial e final determinou a quantidade de mineral presente na amostra (IAL, 2008).

4.2.5.3 Lipídeos totais

O teor de lipídeo foi determinado por meio da extração com refluxo de n-hexano em aparelho soxhlet durante oito horas, segundo o método adaptado de IAL (2008).

4.2.5.4 Fibra bruta

O teor de fibra bruta foi avaliado pela digestão ácido-base da amostra, seguida de incineração em mufla por 1 hora a 550°C. A diferença entre o peso inicial e o peso final da amostra determinou a quantidade presente de fibra bruta. O método foi adaptado de IAL (2008).

4.2.5.5 Nitrogênio total (Proteína bruta)

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl, e o fator de correção do nitrogênio em proteínas utilizado foi de 6,25.

4.2.5.6 Valor nutricional relativo das proteínas (VNR)

A qualidade nutricional da proteína foi determinada pelo método microbiológico com a bactéria *Enterococcus zymogenes*. Para determinar o VNR das proteínas utilizou-se um método baseado no crescimento de *E. zymogenes* que é proporcional a qualidade da proteína presente na amostra, sendo que a resposta deste método está relacionada às necessidades de alguns aminoácidos essenciais para crescimento desse micro-organismo. Para determinar o VNR, a digestibilidade de cada amostra é comparada a digestibilidade da caseína, substância referência no teste de digestibilidade microbiológica onde o VNR desta substância é tido como 100%.

No ensaio de VNR, para ativação da *E. zymogenes* é necessário preparar o meio de cultivo, onde acrescenta-se 1,0 mL do inoculo em 10,0 mL do meio de cultivo. Fazem-se necessários dois repiques em intervalo de 24 horas para realizar o ensaio. As amostras foram previamente hidrolisadas com uso de pronase (1:25, enzima:substrato) em tampão - glicerofosfato de sódio, pH 8,0, 48°C/3 h, sob agitação. Após ajuste de pH para 7,2 e esterilização a frio por ultrafiltração, foram ensaiadas em quadruplicata, com base no descrito por Ford (1962), pela inoculação de cultura de *Enterococcus zymogenes* sem meio contendo todos os nutrientes necessários para seu crescimento excetuando-se os aminoácidos, provenientes da proteína teste.

A cultura foi incubada por 48 horas a 37°C. Ao final do período as amostras foram esterilizadas em autoclave (121°C/15 min) e as medidas de crescimento realizadas por acidimetria, titulando-se o conteúdo de cada tubo com NaOH 0,1N até pH 7,2. Os resultados das médias dos volumes gastos na titulação, subtraído o volume do branco de cada amostra (com inóculo inativo), foram utilizados para expressão do valor nutritivo relativo (VNR) das amostras como percentuais do valor encontrado para a caseína (Sigma C-7078) (TAVANO et. al, 2004).

4.2.5.7 Aminoácidos Totais

Os aminoácidos totais das amostras secas foram analisados e quantificados pelo Instituto de Tecnologia em Alimentos – ITAL. A partir dos resultados observados na análise de valor

nutricional relativo e teor de proteína bruta foram selecionadas três amostras para análise de identificação e quantificação dos aminoácidos totais presentes. As amostras selecionadas foram: A controle de FFM, B controle de FBM e D teste. As amostras A e B controle foram selecionadas para a caracterização do perfil de aminoácidos presentes nestes resíduos e a amostra D teste foi selecionada devido o valor nutricional relativo encontrado nesta amostra e por apresentar concentrações iguais de folha e bagaço de mandioca (1:1), possibilitando assim, avaliar o aproveitamento ou incremento dos aminoácidos presentes no substrato pelo *R. oligosporus*. var *microsporus*.

4.2.5.8 Carbono orgânico total (COT) e Cianeto

O teor de carbono orgânico total e teor de cianeto das amostras secas foram analisados pelo Centro de Raízes Tropicais – CERAT, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu-SP.

4.2.6 Análise estatística

A análise estatística 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 12.0. 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 EXPERIMENTO 1

5.1.1 Fermentação em estado sólido e respirometria de Bartha e Pramer

Quanto à colonização e formação de biomassa, a técnica de respirometria de Bartha e Pramer mostrou que tanto a FFM quanto a FBM são substratos eficientes para formação de biomassa pelo *R. oligosporus* var *microsporus*, pois houve rápida colonização do substrato.

A formação de biomassa mostrou mais intensa nas primeiras 48 horas, período em que a produção de gás carbônico atingiu valor máximo. Após 5 dias de fermentação, o substrato foi completamente colonizado (Figura 6, 7, 8, 9 e 10). A partir deste período, o substrato já fora consumido em sua parte mais facilmente biodegradável pelo fungo de tal forma que a quantidade de CO₂ produzido diminuiu até tornar-se constante.

Figura 6 – Amostra A (100% FFM): teste (esquerda) e controle (direita) após 5 dias de fermentação.



Figura 7 – Amostra B (100% FBM): teste (esquerda) e controle (direita) após 5 dias de fermentação.



Figura 8 – Amostra C (30% FFM + 70% FBM): teste (esquerda) e controle (direita) após 5 dias de fermentação.



Figura 9 – Amostra D (50% FFM + 50% FBM): teste (esquerda) e controle (direita) após 5 dias de fermentação.

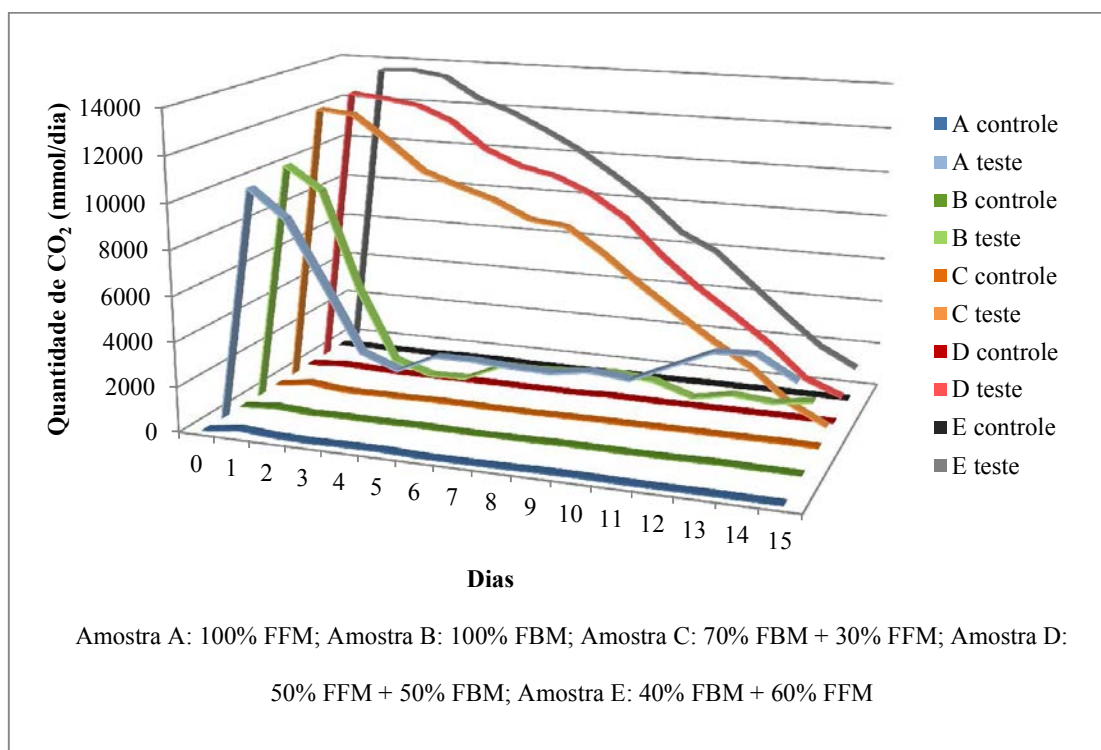


Figura 10 – Amostra E (60% FFM + 40% FBM): teste (esquerda) e controle (direita) após 5 dias de fermentação.

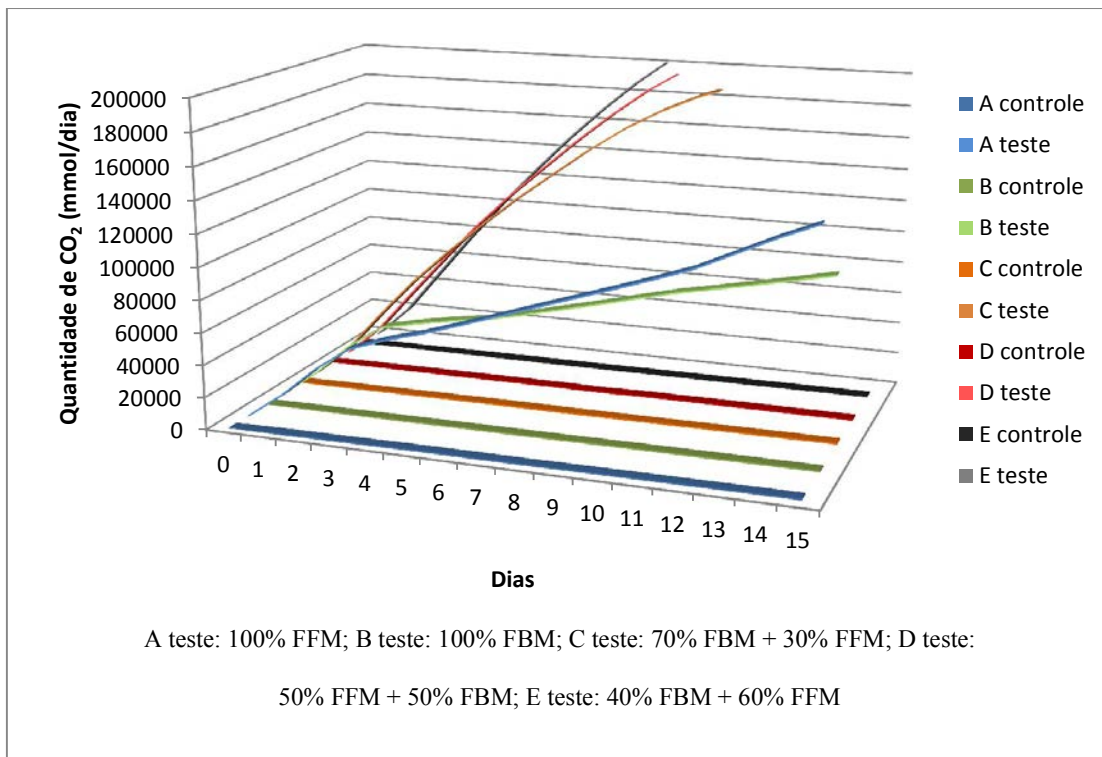
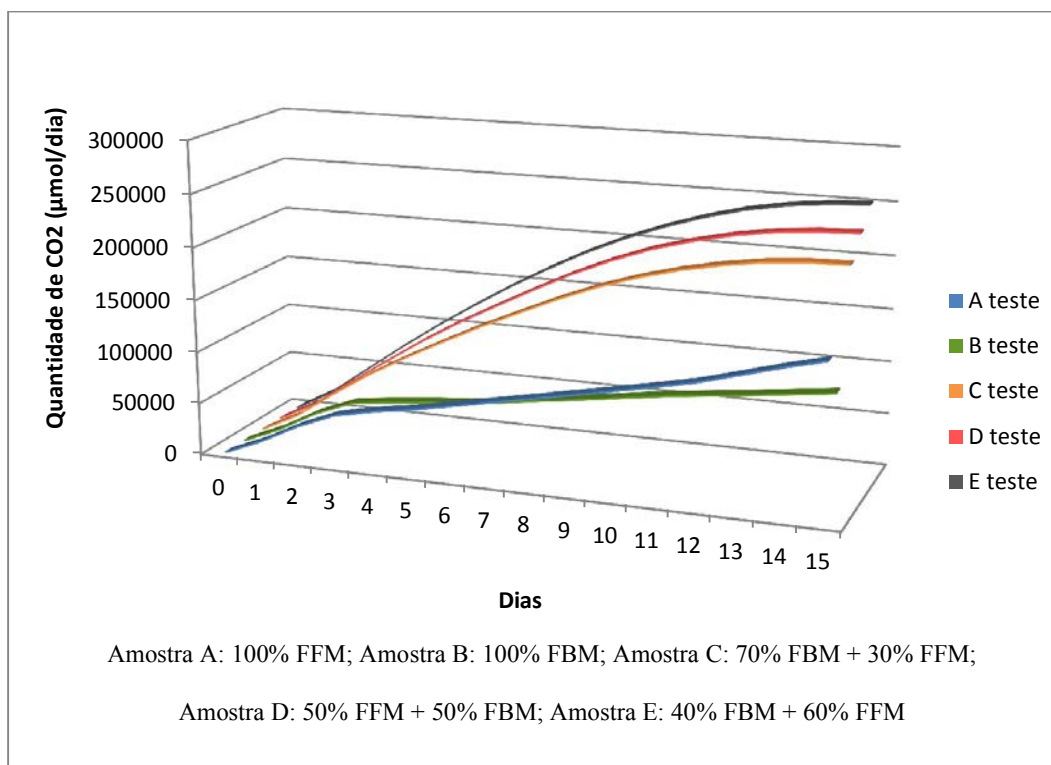


Os resultados obtidos da quantificação de CO₂ produzido estão demonstrados na Figura 11 e 12, respectivamente.

Figura 11 – Experimento 1: Produção diária de CO₂ de todas as amostras



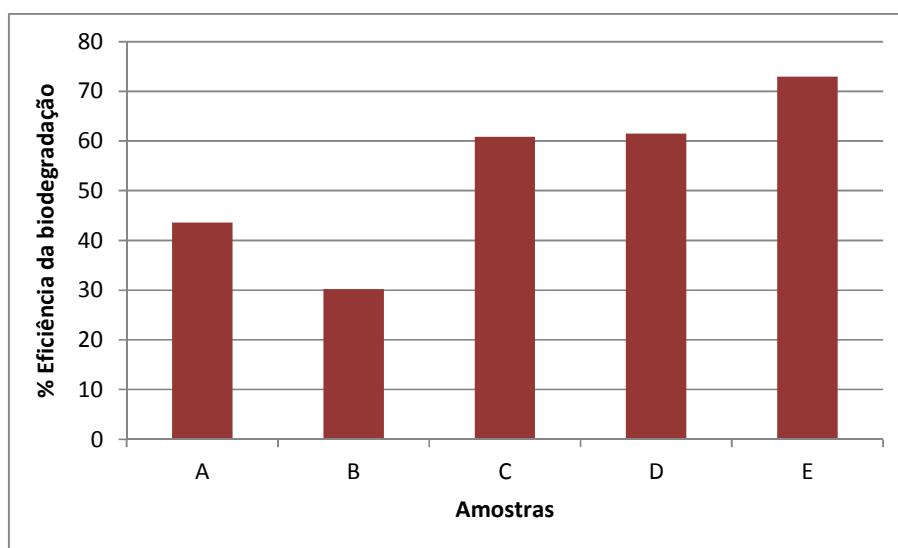
Legenda: os valores dos pontos 1 e 2 são estimados

Figura 12 – Experimento 1: Produção acumulada de CO₂ durante 15 dias de fermentação das amostras testeFigura 13 – Experimento 1: Produção acumulada de CO₂ devido a biodegradação das amostras teste

Na figura 12 que mostra os resultados obtidos na técnica de respirometria revelou que a colonização do meio pelo *Rhizopus oligisporus* var *microsporus* e a formação de biomassa ocorreu mais rapidamente na amostra E, seguida pelas amostras D, C, B e A. As amostras E e D possuíam quantidade equilibradas de proteína e amido, devido a mistura entre folhas e bagaço de mandioca, o que propiciou crescimento do fungo. As FFM e FBM quando avaliadas em proporções diferentes de proteína e amido, alterou a taxa de crescimento do micro-organismo.

Os resultados obtidos mostram que independente da concentração de folhas ou bagaço a colonização ocorreu de forma rápida em todas as amostras após 6 dias, sendo que o acompanhamento da evolução de CO₂ foi efetuado até 15 dias (Figura 11, 12, 13). Este ensaio indicou a dinâmica de biodegradação (Figura 14) e poderá ser de grande importância para uso em escala industrial. Para a aplicação em larga escala estas informações são fundamentais quando se objetiva retorno econômico.

Figura 14 – Experimento 1: Eficiência de biodegradação (EB) das amostras estudadas

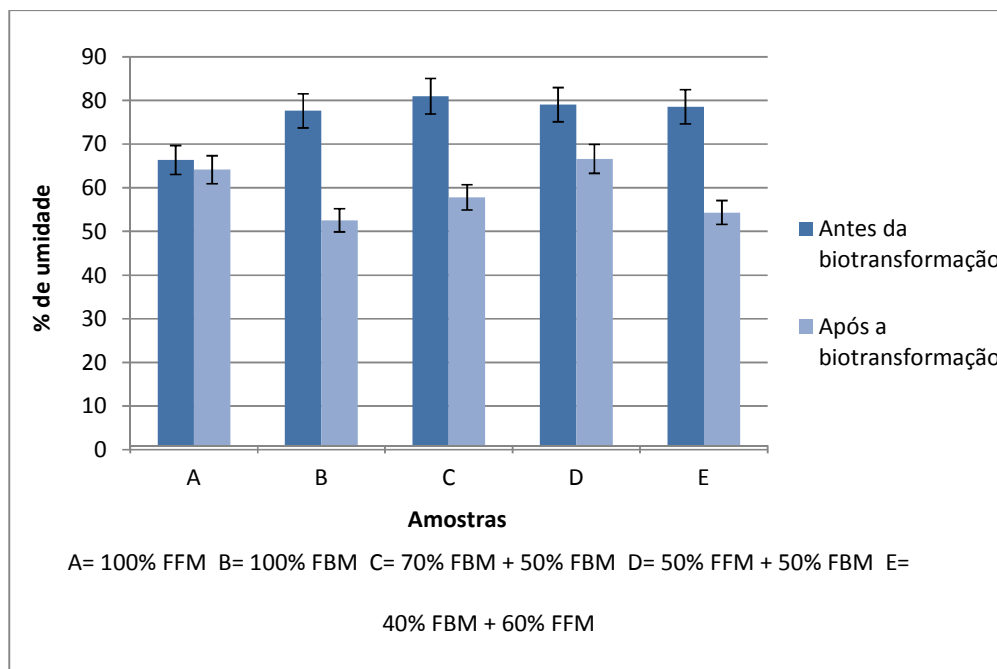


5.1.2 Umidade

A umidade é um fator que está intimamente ligado ao processo de fermentação em estado sólido, onde ocorreu a biotransformação das amostras. A importância da água no sistema provém do fato de que as células vivas necessitam de alta umidade para sobrevivência. A água é importante não só para a sobrevivência, mas para a biossíntese de novas células durante a fermentação (LAURENTINO, 2007).

Teores de umidade, acima de 66%, foram encontrados no experimento 1, os valores obtidos estão apresentados na Figura 15.

Figura 15 – Experimento 1: Teor de umidade das amostras após fermentação de 15 dias (valores expressos em porcentagem/100 gramas de matéria seca).



Considerando que no início do experimento a umidade foi ajustada para 60%, todas as amostras antes da biotransformação apresentaram aumento significativo no teor de umidade, este incremento pode ser relacionado à incorporação da umidade do ar no substrato devido a ausência do micro-organismo, que utiliza a água presente no meio para promover formação da biomassa. Entre essas amostras, o maior acréscimo de água no substrato foi apresentado pela amostra C, 20,96%, e o menor acréscimo foi apresentado pela amostra A, 6,38%. As demais amostras apresentaram 17,64%, 19,03%, e 18,67%, para as amostras B, D e E, respectivamente.

O teor de umidade obtido das amostras antes da biotransformação corroboram com aquelas encontradas por Castiglioni et al (2013) que obtiveram o valor de 80,10% de umidade na massa fibrosa de mandioca (bagaço), Soccol (1996) que obteve teor de 65,50% de umidade, Cereda (1994) que obteve valor de 65% e Wobeto et al (2004) que determinaram umidade de 69,05% para farinha de folhas de mandioca.

A maior quantidade de água foi encontrada na amostra C e a menor na amostra A, onde os valores de umidade foram de 80,96 e 66,38%, respectivamente. Mitchell et al (2000) citam que a quantidade de água em um substrato interfere no crescimento dos microrganismos e que a diminuição da concentração de água retarda a velocidade de crescimento, com menor produção de

biomassa. As amostras A e B, embora possuam umidade elevada, apresentaram os menores teores de água que pode justificar a velocidade baixa de formação de biomassa durante o processo de biotransformação quando comparadas as demais amostras.

Após a biotransformação das amostras, ocorreu diminuição significativa no teor de umidade, o maior decréscimo ocorreu na amostra B que apresentou teor de umidade de 77,64% na amostra antes e 52,54% na amostra após a biotransformação. Pode-se sugerir que o decréscimo no teor de umidade está ligado diretamente ao crescimento do *Rhizopus oligosporus*, onde a água presente no substrato é utilizada no crescimento do micro-organismo, mas também podemos associar este fato ao processo natural de biodegradação do próprio substrato. Ressalta-se que o teor de umidade, denominado de atividade de água (a_w) é de grande importância na conservação de alimentos, pois dificulta o crescimento de microrganismos contaminantes (GABAS, 1998). Entretanto, os resultados obtidos foram diferentes dos obtidos por Morales (2012), que no processo de biotransformação de folhas de mandioca pelo *Rhizopus oligosporus*, mostrou pouca influência no teor de umidade obtendo diferença ínfima entre a amostra inicial e final. Tal diferença pode ter ocorrido devido ao tempo de fermentação, que ocorreu em três dias.

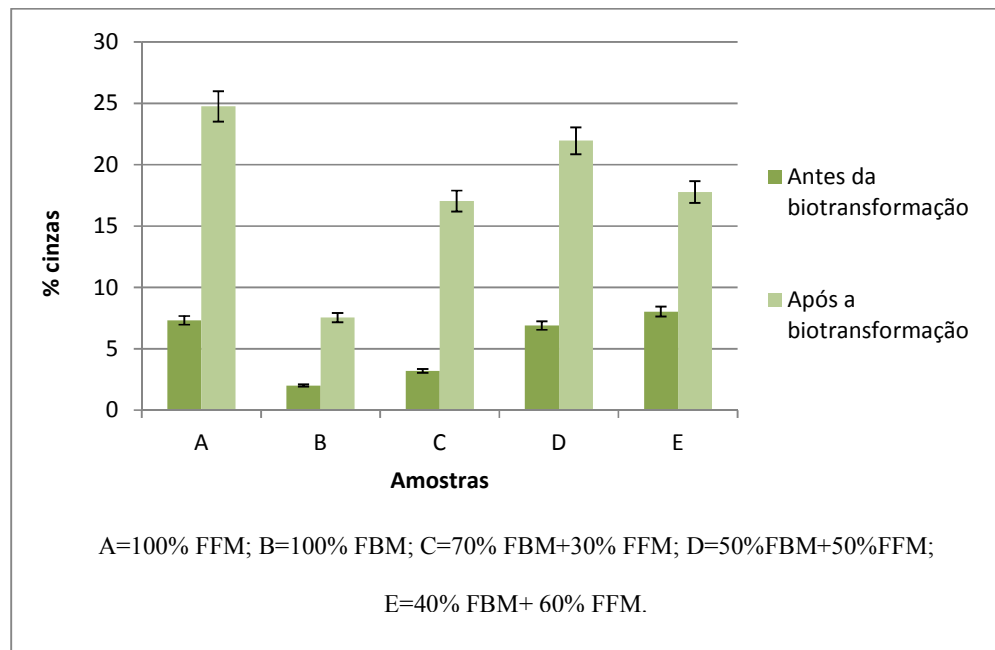
Embora a amostra A tenha apresentado diminuição no teor de umidade entre as amostras antes e após a biotransformação, estatisticamente a mesma não apresentou diferença significativa, onde adotou-se: $P < 0,05$, nível de significância $\alpha = 0,05$. O valor obtido na análise estatística da amostra A foi $P = 0,061$, Excetuando-se esta amostra, as demais apresentaram diferenças estatísticas relevantes entre as amostras antes e após a fermentação, pois obteve-se o valor de $P < 0,05$.

5.1.3 Cinza

Os valores obtidos das amostras referentes ao teor de cinza antes e após o processo de fermentação foram expressos em porcentagem e estão dispostos na Figura 16.

Figura 16 – Experimento 1: Teor de cinzas das amostras controle e teste (valores expressos em porcentagem/100

gramas de matéria seca)



Todas as amostras apresentaram relevância significativa na análise estatística entre a amostra antes e após a biotransformação, os valores obtidos foram: $P=0,012$ para amostra A, $P=0,042$ para B; $P=0,017$ para C; $P=0,023$ para D; e $P=0,036$ para E. A análise estatística também determinou diferenças significativas na comparação das amostras, $P=0,039$.

Os teores de cinza obtidos neste experimento evidenciam que os substratos usados, folha e bagaço de mandioca, proporcionalmente tem mais matéria orgânica. Esta matéria foi consumida pelo fungo sendo aproveitada na biossínteses para compor a biomassa do mesmo, o que resultou no aumento da concentração de minerais no meio, como pode ser averiguado na Figura 11 estando em concordância com os dados de Morales (2012) que obteve resultado similar. A amostra A antes da fermentação apresentou 7,30% de cinza e a amostra após a biotransformação apresentou 24,74%. O significativo aumento na concentração de cinzas ocorreu devido ao fato de se tratar de uma amostra pura de folhas de mandioca, onde a matéria orgânica presente na folha é utilizada como fonte de nutriente para desenvolvimento do *Rhizopus oligosporus*, sendo que parte é transformada em CO_2 . Assim, resulta em enriquecimento mineral do substrato metabolizado. Estas amostras foram formadas por uma mistura de diferentes concentrações de folhas e bagaço, possuindo assim, proporções diferentes de nutrientes. Nos estudos com as folhas de mandioca, estas apresentam-se como fonte rica de nutrientes, sendo parte deles minerais, especialmente cálcio e micronutrientes (RAVINDRAN e RAVINDRAN, 1988).

O bagaço de mandioca (amostra B) apresentou maior teor de matéria orgânica, apresentando o menor teor de cinza em relação às demais, apenas 2% de cinza na amostra antes da biotransformação e 7,53% após este processo. Também o bagaço de mandioca tornou-se mais mineralizado, com a evolução de matéria orgânica na forma de CO₂. A pesquisa de Christen et al (2000) indica também baixo teor de matéria mineral, 0,83%, em seu estudo com bagaço de mandioca.

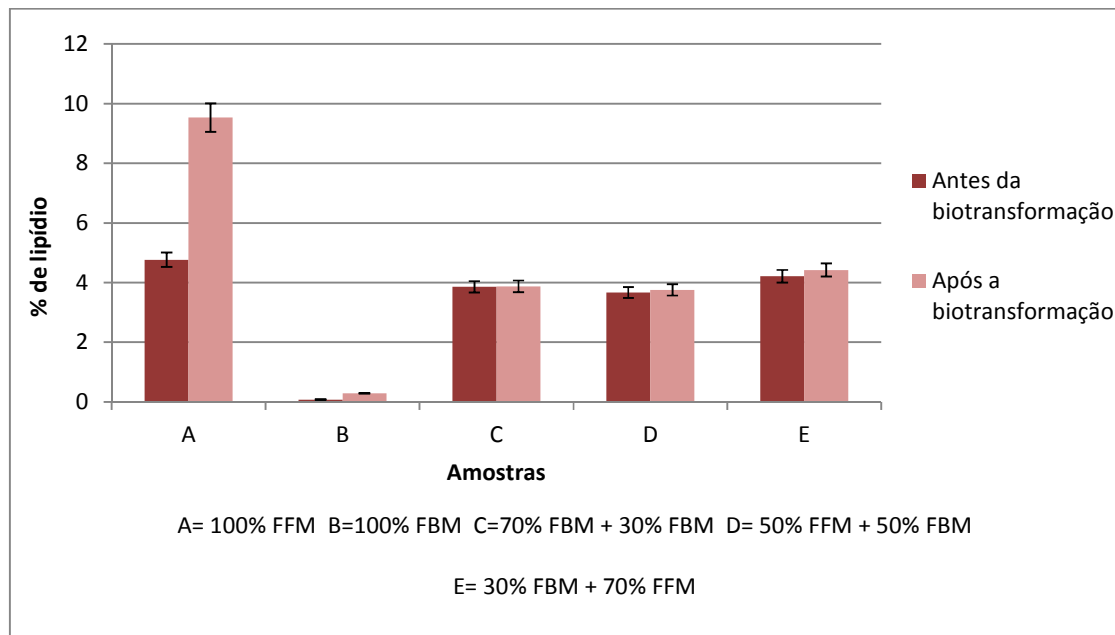
Embora rico em matéria orgânica, o bagaço de mandioca puro, não se apresenta como substrato suficientemente nutritivo para formação de biomassa de *R. oligosporus* var. *microsporus*, pois observou-se menor crescimento do micro-organismo e baixa colonização do substrato durante o processo de biotransformação. As demais amostras apresentaram acréscimo no teor de cinza, os valores obtidos nas amostras antes e após a fermentação foram de 3,17 para 17,02% na amostra C, de 6,88 para 21,94%, na amostra D, e 8,01 para 17,76% na amostra E, respectivamente.

Os resultados obtidos das amostras não fermentadas confirmam os resultados obtidos por outros autores, Modesti et al (2007) averiguaram teor de 6,52% de cinza em farinha de folha mandioca em seu experimento, Melo et al (2008) em experimento similar com farinha de folha de mandioca, verificaram teor de 6,15% de cinza. Entretanto, Ravindran e Ravindran (1988), afirmaram que o teor de cinza é influenciado pela maturidade da folha de mandioca.

5.1.4 Lipídeos

Os lipídeos atuam no organismo como portadores de elétrons, transportadores de substâncias nas reações enzimáticas, compõem as membranas biológicas e servem como reserva energética (MCDONALD et al., 1999). Os lipídeos são moléculas altamente energéticas encontradas em tecidos vegetais e animais, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, possibilitando sua extração. A Figura 17 apresenta o teor de lipídeo encontrado nas amostras do experimento 1.

Figura 17 – Experimento 1: Comparação do teor de lipídeo entre as amostras controle e teste (valores expressos em porcentagem/100 gramas de matéria seca).



Os baixos valores encontrados na extração do lipídeo das amostras estudadas corroboram com os resultados obtidos por Somerville et al (2000), onde os lipídeos aparecem em quantidades baixas em frutos e hortaliças e os maiores teores são encontrados em sementes, principalmente nas oleaginosas. Na análise estatística não houve diferença relevante entre as amostras C, D e E, pois apresentaram valores de $P > 0,05$. O mesmo ocorreu nos valores obtidos da comparação entre as amostras antes e após a fermentação de B, C, D e E. A amostra A, foi a única a apresentar valor estatístico relevante dos dados obtidos na comparação entre as demais amostras e entre as amostras antes e após a biotransformação, $P = 0,033$ e $P = 0,01$, respectivamente.

No resultado obtido da amostra A antes do processo de fermentação observa-se que a quantidade de lipídeo encontrada é de 4,76%, teor similar descrito por Morales (2012), onde o valor encontrado foi de 5%. Entretanto, este valor encontra-se abaixo dos encontrados por Agostini (2006), onde o valor obtido na análise de lipídeo das folhas de mandioca pulverizadas foi de 7,70% e de Melo et al (2008) onde a farinha de folha de mandioca apresentou 9,20%. Embora, não apresente diferença significativa na análise estatística, o teor de lipídeo encontrado na amostra B antes da biotransformação foi de aproximadamente 0,08%, quantidade semelhante à encontrada por Castiglioni et al (2013), Pandey et al (2000) e Costa (2004), onde foi determinado o teor de 0,97, 0,1 e 0,3%, respectivamente. Valores semelhantes também foram citados por Soccol (1994), Cereda (1994), Sterz (1997) e Vandenberghe (1998), que encontraram teores de 1,06, 0,83, 0,53, e 0,54%,

respectivamente. Estes valores mostram que o bagaço de mandioca possui baixo teor de lipídeo, esta característica bromatológica pode ser justificada devido ao bagaço ser constituído, em peso seco, por cerca de 50% de fibras.

As diferenças nos valores obtidos podem ser justificadas por fatores ligados ao vegetal, dos quais pode-se destacar os fatores fisiológicos, sazonalidade, além da qualidade do solo onde foi cultivada, época de colheita, variação entre as espécies estudadas, entre outros fatores (DIAS e LEONEL., 2006). Entre as possíveis causas de discrepância nos resultados, o método empregado na determinação do teor de lipídeo, variações entre as técnicas como o solvente empregado e o tempo de extração, pode acarretar em diferenças significativas nos valores encontrados em cada trabalho. Fato que ressalta tais fatores é a semelhança existente nos valores encontrados neste trabalho com os de Morales (2012), onde o método de extração aplicado foi o mesmo, além da proximidade da região de origem do vegetal, que não possibilita variações significantes de sazonalidade.

Excetuando a amostra A que apresentou aumento significativo no teor de lipídeo, as demais amostras apresentaram aumento ínfimo após o processo de biotransformação. O aumento obtido entre as amostras antes e após o processo foram de 0,07 para 0,28% na amostra B, de 3,85 para 3,87% na amostra C, de 3,66 para 3,75% na amostra D, e de 4,21 para 4,42% na amostra E, respectivamente. Morales (2012) obteve resultados opostos em seu estudo, onde utilizou como substrato, em seu processo de biotransformação pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, farinha de folha de mandioca e mesocarpo de babaçu. Os teores de lipídeo verificados pelo pesquisador mostraram que houve decréscimo do mesmo após o processo de biotransformação, apontando que o micro-organismo utilizou o lipídeo como fonte de energia para produção de biomassa.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que diferente dos resultados obtidos por Morales (2012), o micro-organismo não utilizou o lipídeo como nutriente para seu crescimento, e que os substratos aqui testados possuem outras fontes de energia facilmente acessíveis para formação de biomassa do *Rhizopus oligosporus*, não havendo atividade lipolítica apresentada pelo fungo, como citam Wang e Hesseltine (1979) que afirmam que o *Rhizopus oligosporus* pode consumir óleo vegetal por meio da enzima lipase, na ausência de açúcares. A farinha de folha de mandioca não somente apresentou a maior concentração de lipídeo, 4,79%, comparada a amostra pura de bagaço e as demais misturas, mas apresentou também significativo acréscimo no teor de lipídeo após a biotransformação, de 4,79% para 32,83%. Relaciona-se o aumento no teor de lipídeo ao consumo dos demais nutrientes presentes no substrato, que resultou no aumento da concentração do lipídeo presente.

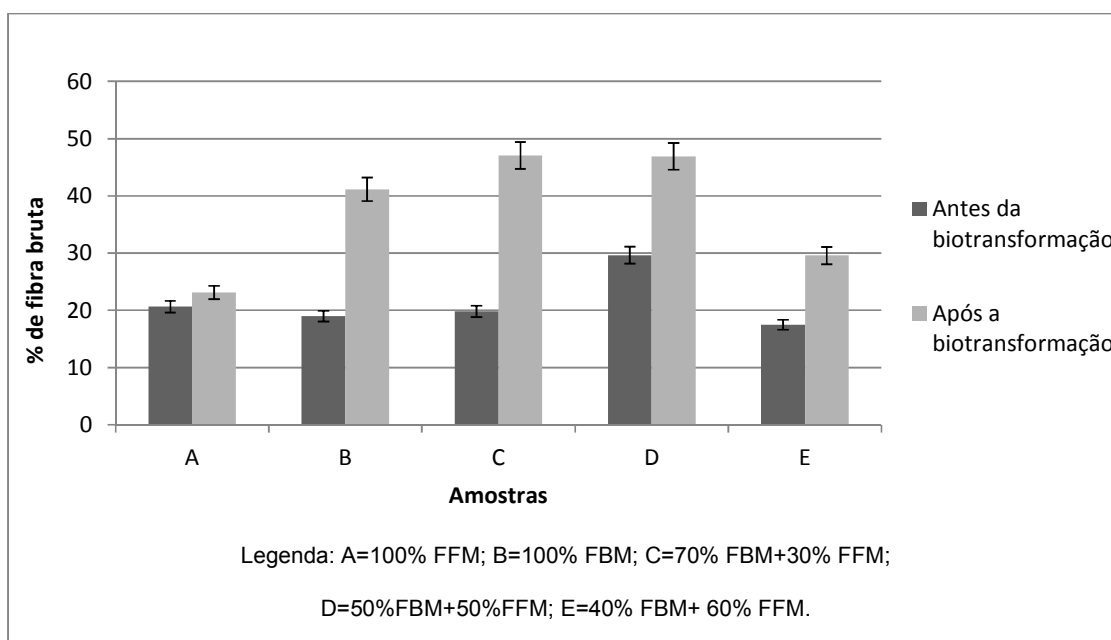
5.1.5 Fibra bruta

Existem diferentes definições de fibra bruta encontradas na literatura, uma delas afirma que fibra alimentar consiste em remanescentes de plantas comestíveis, polissacarídeos, lignina e substâncias associadas resistentes à hidrólise por enzimas digestivas humanas. Para Almeida (1999) fibras alimentares, na maior parte, são materiais das paredes celulares das plantas, que por sua resistência à digestão por meio de enzimas, sofrem modificações muito limitadas em sua estrutura e são eliminadas praticamente na forma integral.

Para análise de fibra bruta utilizou-se o método referente à técnica descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), por processo de digestão ácido-base e posterior incineração em mufla a 550°C por 1 hora.

O teor de fibras encontradas nas amostras está disposto na Figura 18.

Figura 18 – Experimento 1: Quantidade de fibra bruta das amostras controle e teste (valores expressos em porcentagem/1 grama de matéria seca)



Os resultados estatísticos obtidos na análise de teor de fibra bruta entre a amostra antes e após a fermentação, indicam que os resultados são relevantes, pois atingiram valores de $P < 0,05$. Porém, na comparação entre o teor de fibra bruta das amostras antes da biotransformação, em relação aos diferentes substratos, a amostra D foi a única que mostrou resultado significativo, quando comparado as demais ($P = 0,035$).

O teor de fibra bruta encontrada na amostra A não biotransformada, 20,63%, foi similar ao encontrado por Modesti et al (2007) de 21,40% em farinha de folha de mandioca. A amostra B não biotransformada, apresentou teor de 18,97%, valor 5% maior comparado ao teor encontrado por Oboh (2006) que encontrou o teor de 12,5% de fibra bruta em farinha de bagaço de mandioca.

Ressalta-se que a composição aproximada de fibras da folha de mandioca, é influenciada pelo estágio de maturidade da planta. A composição de fibra bruta varia de 8,3% em folhas muito novas a 27,4% em folhas maduras (RAVINDRAN e RAVINDRAN, 1988).

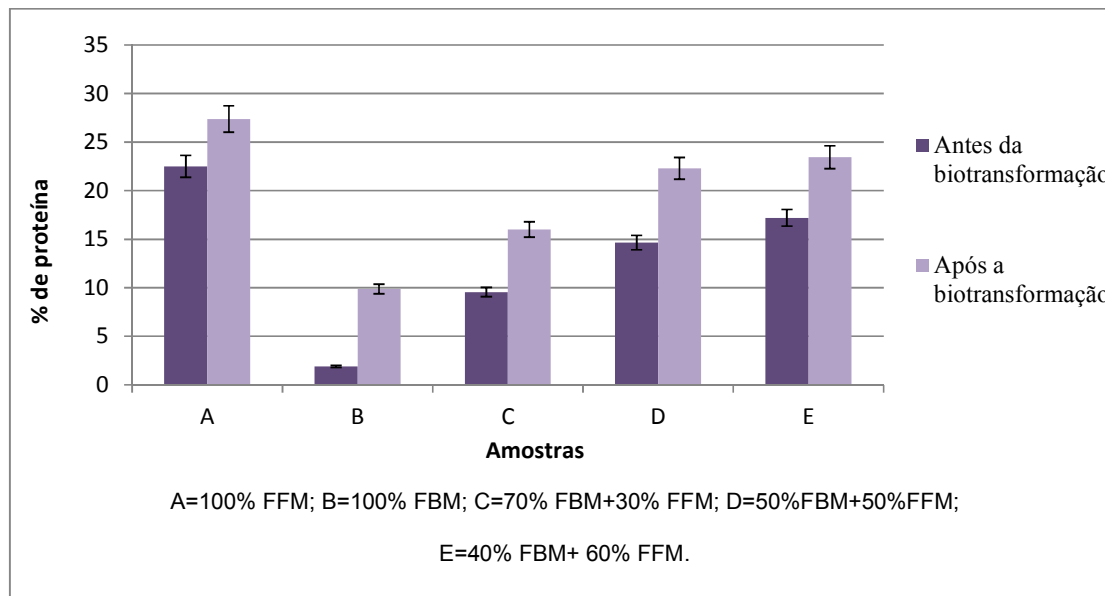
As demais amostras não fermentadas apresentaram teores de 29,62; 19,82 e 17,48%, para as amostras D, C e E, respectivamente. Após a fermentação, os teores de fibra bruta aumentaram significativamente em todas as amostras, apresentando valores de 24,40; 41,13; 47,05; 46,90 e 29,56% para as amostras A, B, C, D e E, respectivamente.

O alto teor de fibra bruta não é de interesse nutricional, pois a dieta com altos teores de fibra pode causar irritação intestinal, baixa digestibilidade e diminuição da utilização de nutrientes (JOHNSON, 1968; FASUYI, 2005). Entretanto, esta característica possibilita que a farinha de folha de mandioca seja melhor aproveitada na pecuária (RAVINDRAN e RAVINDRAN, 1988).

5.1.6 Nitrogênio total (proteína bruta)

A conversão microbiana, empregando-se processos fermentativos, gera produtos mais ricos em proteína. Se os microrganismos utilizados forem mantidos em conjunto com o restante dos resíduos orgânicos empregados como substrato, o produto é designado como produto de biomassa microbiana. A Figura 19 mostra o teor de proteína bruta obtido.

Figura 19 – Experimento 1: Teor de proteína bruta das amostras controle e teste (valores expressos em porcentagem/100 gramas de matéria seca).



O teor de proteína bruta obtida na amostra A antes da biotransformação foi de 22,5%, valor próximo ao teor de 21,87% citado por Braga et al (2010), porém, abaixo do encontrado por Modesti et al (2007) que encontraram o teor de 34% de proteína. As variações na quantidade de proteína podem ocorrer devido a disponibilidade sazonal deste nutriente e a variedade do vegetal (GUERROUÉ et al., 1996; DIAS e LEONEL., 2006). Num estudo feito por Rogers (1959) o teor de proteína bruta variou de 17,8% a 34,8% em diferentes variedades de mandioca. Ravindran e Ravindran (1988) também concluíram em seu trabalho que a quantidade de proteína na folha de mandioca é influenciada pelo estágio de maturidade da planta e que as folhas jovens são excelentes fontes de proteína para a nutrição humana.

O valor de 1,9% de proteína bruta obtida da amostra B não biotransformada foi semelhante ao descrito na literatura, Christen et al (2000), Costa (2004) e Sriroth et al (2000) que obtiveram os teores de 2,3; 1,7; 1,5% de proteína bruta na farinha de bagaço de mandioca, respectivamente. Devido ao baixo teor de proteína encontrado no bagaço da mandioca, o aproveitamento deste resíduo na alimentação exige a inserção de uma quantidade considerável de proteína. Portanto, o processo de enriquecimento com proteína microbiana, é uma abordagem alternativa e um processo relativamente econômico (TONGKRATOK et al., 2010).

Os resultados obtidos das amostras após a fermentação comprovam a eficiência do processo de biotransformação quanto ao incremento proteico. Em todas as amostras houve aumento na concentração de proteína entre as amostras antes e após a fermentação, principalmente na amostra

B, que apresentou aumento de 7,98%, seguida pelas amostras D, que apresentou incremento de 7,66%, amostra C, aumento de 6,45%, amostra E, acréscimo de 6,24% e amostra A, que apresentou o menor resultado quanto ao aumento de proteína, 4,88%. A expansão da concentração proteica é importante, pois a utilização dos resíduos de mandioca como alimento depende, principalmente, do seu valor nutricional em relação a outras fontes alternativas de energia.

Embora a amostra A apresente o menor incremento no teor de proteína, a porcentagem obtida assemelha aos encontrados por Morales (2012), onde o processo de biotransformação da folha de mandioca pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, também proporcionou incremento em torno de 5% de proteína. Raimbault et al (1985) que após o processo de fermentação obtiveram incremento de 14% no teor de proteína.

Os resultados obtidos confirmam que o processo de enriquecimento promovido pelo fungo *Rhizopus oligosporus*, a partir do processo de fermentação em estado sólido, é eficaz. Raimbault et al (1985) afirmam que este processo também pode ser aplicado de forma eficiente para enriquecimento de outros resíduos, e que outros microrganismos podem ser utilizados.

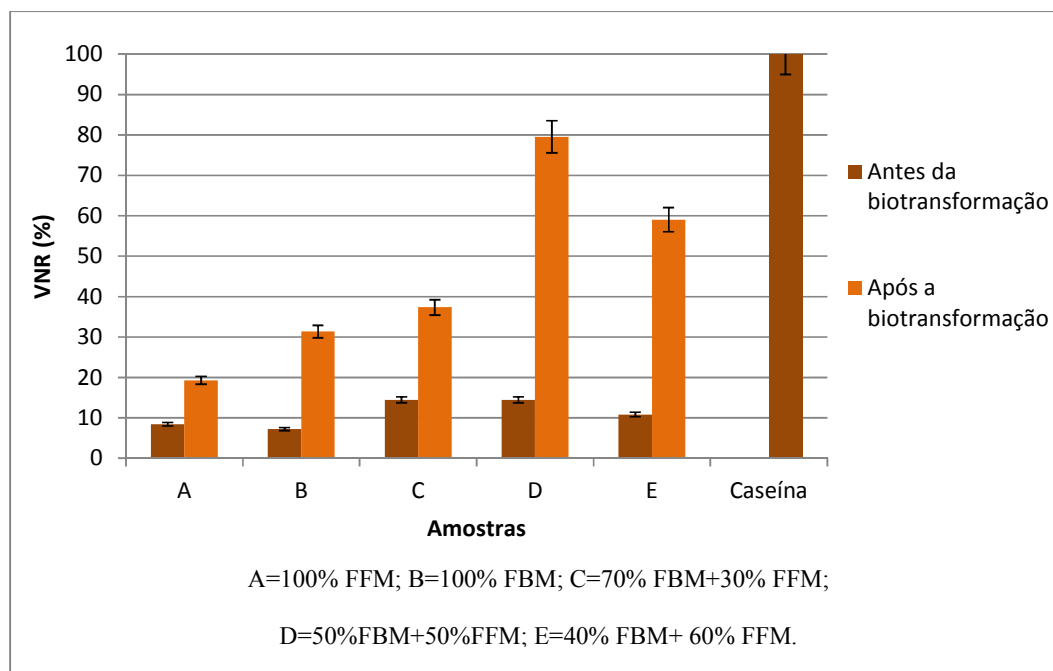
Todos os resultados obtidos em relação a comparação dos teores encontrados nas amostras antes e após a biotransformação, e também àqueles obtidos na comparação entre os substratos foram confirmados estatisticamente, apresentando valores de $P < 0,05$.

5.1.7 Valor nutricional relativo das proteínas (VNR)

Conhecer os valores de VNR, da energia e nutrientes dos alimentos permite a formulação de rações que atendam as exigências nutricionais dos animais e humanos (BOSCOLO et al., 2002).

A VNR foi determinada pelo método microbiológico utilizando a bactéria *E. zymogenes*, os resultados obtidos neste teste estão disposto na Figura 20.

Figura 20 – Experimento 1: Porcentagem do valor nutricional relativo (VNR) das amostras controle e teste (porcentagem/100g de proteína)



As amostras não fermentadas apresentaram VNR baixo, apresentando valores de 8,43% para amostra A, 7,23% para amostra B, 14,46% para amostra C e D e 10,84% para amostra E. Entretanto a bioconversão protéica aumentou não somente o teor de proteínas, mas seu valor nutricional relativo.

Todas as amostras fermentadas estudadas mostraram aumento expressivo do VNR. O valor mais proeminente foi detectado na amostra D, que atingiu valor de 79,52%, valor muito próximo ao da caseína (proteína padrão considerada 100%). Aumento relevante, devido a biotransformação, também foi encontrado na amostra E, de 10,84 para 59,04%, seguida da amostra C, que apresentou após a fermentação a porcentagem de 37,35%, amostra B, 31,33% e amostra A 19,28%.

Pezzato et al. (2004), em experimento com tilápia do Nilo, encontraram VNR de 81,92% e Ng e Wee (1989), relataram valor de VNR de 67,7%, para a farinha de folha de mandioca. Quanto ao bagaço de mandioca RAMOS et al (2000) encontraram VNR em torno de 60%, valor superior ao encontrado neste trabalho. Porém, estes utilizaram o método convencional, empregando o uso de animais, e avaliando o valor nutricional relativo de forma indireta por meio de análises das fezes. A Tabela 9 apresenta os valores de digestibilidade encontrada em algumas fontes de proteína, segundo a literatura.

Tabela 9 – Digestibilidade de algumas fontes de proteína em relação a digestibilidade da farinha de folha de mandioca (FFM) e farinha de bagaço de mandioca (FBM)

| Fonte de proteínas | Digestibilidade (%) |
|---------------------------------|----------------------------|
| *Carne bovina | 92,38 |
| *Trigo | 89,44 |
| *Milho | 82,38 |
| *Feijão pérola | 78,70 |
| *Soja | 71,76 |
| FFM | 19,28 |
| FBM | 31,33 |
| Mistura 1:1 de FFM e FBM | 79,52 |

*Segundo Pires et al. (2006).

A presença de taninos, assim como outros fatores antinutricionais, a exemplo do cianeto e saponinas, pode ter influenciado negativamente na digestibilidade da proteína das folhas da mandioca (MELO et al., 2008). Segundo Furuya et al. (2001), a presença de fatores antinutricionais e a forma de processamento aplicada influenciam o valor nutritivo dos alimentos, o que pode explicar as variações nos coeficientes de digestibilidade aparente encontrados por diferentes autores.

Altos teores de VNR são importantes para determinar a qualidade da proteína existente na amostra. A caseína é considerada referência, pois trata-se de uma substância completa, portanto, determina-se em 100% o seu VNR. Quando as amostras apresentam valores mais próximos ao valor da porcentagem de VNR da caseína, melhor é a sua qualidade da proteína.

Os resultados obtidos em relação a comparação dos teores encontrados nas amostras fermentadas e não fermentadas, e também àqueles obtidos na comparação entre os substratos foram confirmados estatisticamente, apresentando valores de $P < 0,05$.

5.1.8 Aminoácidos totais

A análise de aminoácidos totais das amostras apontou que os dados obtidos da amostra D teste são de grande relevância e confirmam a eficiência do processo de biotransformação da FFM e FBM, quanto a sua alteração, principalmente quantitativa. As análises dos aminoácidos totais presentes nas amostras A e B não biotransformadas, forneceram também, dados que permitem a

visualização qualitativa e quantitativa dos aminoácidos presente nos dois resíduos, folha e bagaço de mandioca. A Tabela 10 insere os dados das amostras de FFM e FBM e da amostra D antes e após a fermentação. Verifica-se que ambos os substratos apresentaram aminoácidos e que quando misturados, completam-se. Entretanto, a Tabela 10 mostra a carência de aminoácidos da FBM, quando comparado à FFM. Quando estes dois substratos são misturados, resulta em um produto de melhor qualidade. Quando a mistura é submetida a fermentação, os dados indicam que houve melhoria, especialmente na quantidade de aminoácidos (Figura 22).

Os resultados obtidos na biotransformação dos resíduos e o perfil detalhado dos aminoácidos encontrados nos mesmos, então dispostos na Figura 21 e Tabela 10, respectivamente.

Figura 21 – Experimento 1: Quantidade de aminoácidos em mg/100g presentes na amostra D controle e teste

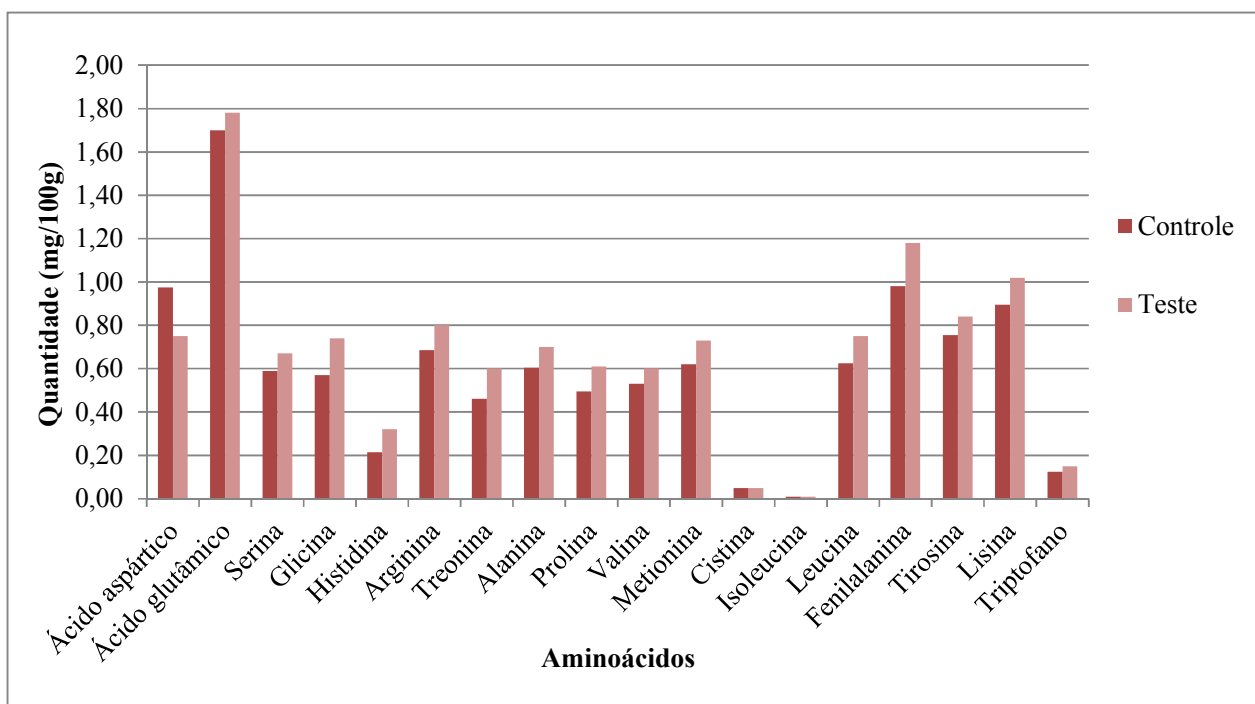


Tabela 10 – Experimento 1: Quantidade em porcentagem de aminoácidos em mg/100g das amostra A (100% FFM) controle, amostra B (100% FBM) controle e amostra D (50% FFM e 50% FBM) controle e teste

| AMINOÁCIDOS | AMOSTRA A CONTROLE | AMOSTRA B CONTROLE | AMOSTRA D CONTROLE | AMOSTRA D TESTE | % ALTERAÇÃO |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|----------------|
| Ácido aspártico | 1,90 | 0,05 | 0,98 | 0,75 | ↓23,08 |
| Ácido glutâmico | 3,27 | 0,13 | 1,70 | 1,78 | ↑4,71 |
| Serina | 1,10 | 0,08 | 0,59 | 0,67 | ↑13,56 |
| Glicina | 1,07 | 0,07 | 0,57 | 0,74 | ↑29,82 |
| *Histidina | 0,41 | 0,02 | 0,22 | 0,32 | ↑48,84 |
| Arginina | 1,30 | 0,07 | 0,69 | 0,80 | ↑16,79 |
| *Treonina | 0,87 | 0,05 | 0,46 | 0,60 | ↑30,43 |
| Alanina | 1,12 | 0,09 | 0,61 | 0,70 | ↑15,70 |
| Prolina | 0,90 | 0,09 | 0,50 | 0,61 | ↑23,23 |
| *Valina | 1,03 | 0,03 | 0,53 | 0,60 | ↑13,21 |
| *Metionina | 1,14 | 0,10 | 0,62 | 0,73 | ↑17,74 |
| Cistina | 0,10 | ND | 0,05 | 0,05 | 0,00 |
| *Isoleucina | 0,02 | ND | 0,01 | 0,01 | 0,00 |
| *Leucina | 1,17 | 0,08 | 0,63 | 0,75 | ↑20,00 |
| *Fenilalanina | 1,84 | 0,12 | 0,98 | 1,18 | ↑20,41 |
| Tirosina | 1,45 | 0,06 | 0,76 | 0,84 | ↑11,26 |
| *Lisina | 1,60 | 0,19 | 0,90 | 1,02 | ↑13,97 |
| **Triptofano | 0,25 | ND | 0,13 | 0,15 | ↑20,00 |

*Aminoácidos essenciais; **Aminoácido não produzido pelo organismo; ↑ = aumento; ↓ = diminuição; = sem alteração no valor.

Os resultados obtidos e apresentados pela Tabela 10 mostram que a FFM apresenta todos os aminoácidos, e estes se encontram em maior quantidade quando comparado ao FBM, que apresenta valores inferiores e que também apresenta ausência de três aminoácidos: cistina, isoleucina e triptofano. A afirmação de FASUYI e ALETOR (2005), é que o concentrado protéico de folhas de mandioca possui perfil completo de aminoácidos. Entretanto, deve-se lembrar que a composição dos aminoácidos varia diferentes variedades de mandioca, uma vez que a síntese proteica entra no complexo sistema da fotossíntese (GUERROUÉ et al., 1996).

A Tabela 10 revela que o aminoácido encontrado em maior quantidade em 100g de farinha de folha de mandioca é o ácido glutâmico (3,27 mg) e que o mais encontrado em 100g de farinha de bagaço de mandioca é a lisina (0,19 mg). Os aminoácidos encontrados em menor quantidade na FFM e FBM são a isoleucina (0,02 mg) e histidina (0,02), respectivamente.

A Figura 21 que apresenta os resultados obtidos na amostra D biotransformada, após o processo de fermentação pelo fungo, mostra que houve aumento na quantidade da maioria dos aminoácidos presentes, com exceção do ácido aspártico que, apresentou declínio de 23,08% em sua quantidade, como mostra a Tabela 10, este mesmo resultado foi obtido por Morales (2012). Pode-se afirmar que o decréscimo na quantidade de ácido aspártico esta relacionado às necessidades nutricionais do fungo para a produção de biomassa, onde este aminoácido foi consumido pelo *R. oligosporus* durante o processo de fermentação. Quanto aos aminoácidos cistina e isoleucina, os valores presentes na amostra permaneceram o mesmo, como mostra a Tabela 10, não houve incremento e nem decréscimo dos mesmos. Pode-se afirmar que estes aminoácidos não foram utilizados pelo fungo para a produção de biomassa.

Os aminoácidos que apresentaram maior incremento após o processo de biotransformação (amostra D) foram a histidina (aumento de 48,84%), treonina (aumento de 30,43%), glicina (aumento de 29,82) e prolina (aumento de 23,23%), aqueles que apresentaram menos incremento foram tirosina (aumento de 11,26%), valina (aumento de 13,21%), serina (aumento de 13,56%), lisina (aumento de 13,97%) e alanina (aumento de 15,7%). Estes dados apoiam a afirmação de AQUARONE et al. (2001), que o processo de fermentação é uma forma de processar os alimentos aumentando a disponibilidade de nutrientes, visando a transformação no substrato devido à atividade metabólica do micro-organismo.

Os resultados mais importantes obtidos na análise de aminoácidos são aqueles relacionados aos aminoácidos considerados essenciais: histidina, treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina e triptofano. Ressalta-se que a presença do aminoácido triptofano no alimento é de extrema importância na nutrição, pois trata-se de um aminoácido essencial e que não produzido pelo metabolismo humano, portanto, este deve ser fornecido pela alimentação.

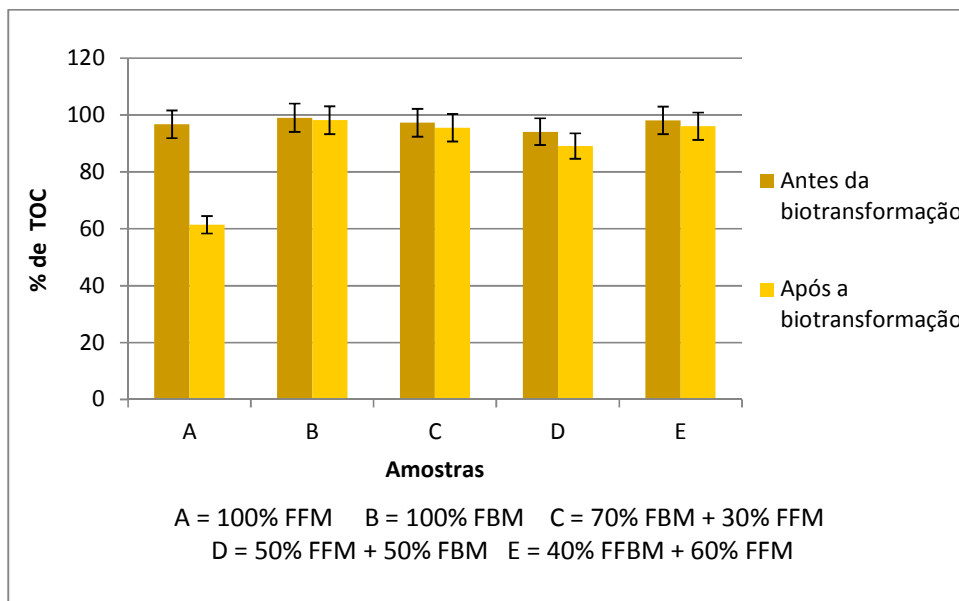
Os resultados mostraram que a folha de mandioca e a biotransformação da mesma e da mistura de folha e bagaço de mandioca possuem todos os aminoácidos essenciais, evidenciando o melhoramento destes resíduos e agregação de valor dos mesmos, que podem ser comparados, após a biotransformação, com as proteínas encontradas em alimentos de origem animal. Philippi (2008) afirma que as proteínas contidas em alimentos de origem animal, principalmente as do ovo, são consideradas padrão de referência em termos de composição de aminoácidos, por possuírem todos os aminoácidos essenciais ao organismo.

A presença dos aminoácidos essenciais na farinha de folha de mandioca crua (amostra A não fermentada) contrapõe a afirmação feita por Brasil (2006), que os alimentos de origem vegetal podem ser ricos em proteínas que, com exceção da soja, são incompletas, ou seja, não possuem todos os aminoácidos essenciais. Entretanto, os dados obtidos da combinação de folha e bagaço de mandioca, principalmente após o processo de biotransformação (amostra D), apoiam a afirmação do mesmo autor, que alega haver algumas combinações de alimentos que complementam entre si os aminoácidos ou suas quantidades, tornando a combinação de proteína de alto valor biológico.

5.1.9 Carbono orgânico total (COT)

Os valores obtidos na análise de carbono orgânico total de todas as amostras estão demonstrados na Figura 22.

Figura 22 – Experimento 1: Teor de carbono orgânico total em porcentagem de todas as amostras



De acordo com os resultados, a Figura 22 mostra que os resíduos (folha e bagaço de mandioca) apresentam grande concentração de carbono orgânico total, a maior concentração encontrada foi de 99,03% na amostra B, seguida por E (98,07%), C (97,21), A (96,70), e D (94,06%).

Verificou-se que durante o processo de biotransformação houve diminuição no teor de carbono orgânico presente, o resultado mais relevante foi o encontrado na amostra B, onde houve diminuição de 36,52% entre as amostras antes e após a fermentação ($P=0,039$). De forma geral, os resultados indicaram média de 9,30% de diminuição de carbono orgânico, após o processo de fermentação. Os resultados obtidos na análise estatística mostram que os decréscimos no carbono orgânico não apresentaram relevância nas amostras B, C, D e E.

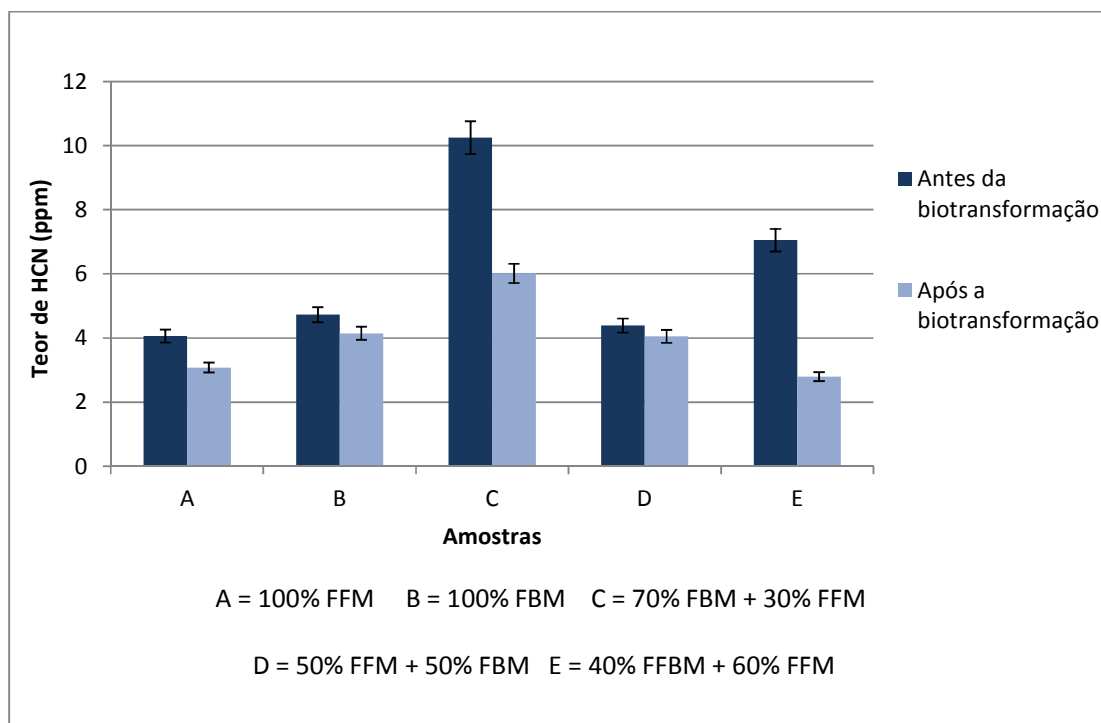
Deve-se ressaltar que neste caso, por se tratar da técnica de fermentação em estado sólido, não foi possível separar o micro-organismo do substrato, portanto os dados de carbono orgânico total obtidos das amostras teste, não se referem apenas à quantidade de matéria orgânica proveniente do substrato e sim da matéria orgânica do produto final (resíduo fermentado), justificando assim, os altos teores de COT determinados nas amostras após a biotransformação.

Os resultados também indicam que a matéria orgânica encontrada na amostra A, quando se compara o teor de COT da amostra antes e após a fermentação, foi mais consumida pelo *R. oligosporus* quando comparado as demais amostras. Pode-se dizer que, a composição da matéria orgânica presente na folha de mandioca é mais acessível ao fungo em relação ao bagaço de mandioca.

5.1.10 Ácido cianídrico (HCN)

A toxicidade das folhas frescas de mandioca, devido à presença do ácido cianídrico (HCN), pode restringir seu uso na alimentação humana. O teor de cianeto obtido nas amostras estudadas está apresentado na Figura 23.

Figura 23 – Experimento 1: Quantidade de ácido cianídrico em ppm de todas as amostras



* As análises das amostras C e E deverão merecer repetição.

Segundo Wogan e Marletta (1993), a dose letal de cianeto oscila entre 0,5 a 3,5 mg/kg de peso corpóreo. O teor de HCN obtido de cada amostra indica que as concentrações encontradas neste experimento são seguras para o consumo humano. A maior concentração de HCN encontrada entre as amostras não biotransformadas foi de 0,010 mg/Kg apresentada pela amostra C, e a menor foi de 0,004 mg/Kg apresentada pela amostra A. Podemos associar o baixo teor de HCN encontrado devido ao processo de secagem das folhas e bagaço da mandioca antes de seu uso. Segundo Gómez e Valdivieso (1985), Padmaja (1989) e Corrêa et al. (2002) há influência do processo de secagem das folhas de mandioca sobre os níveis do HCN, mostrando sua maior liberação com secagem a temperaturas mais baixas. Gómez e Valdivieso (1985) constataram em folhas de quatro cultivares secas ao sol e em estufa a 60°C perdas de cianeto que variaram de 82 a 94% e 68 a 76%, respectivamente.

Os valores obtidos no teor de HCN encontrados nas amostras teste deste experimento apontam que o processo de fermentação diminuiu a toxicidade da folha e do bagaço de mandioca, principalmente nas amostras que apresentavam a mistura de ambos. O maior decréscimo no teor de HCN ocorreu na amostra E, que apresentou diminuição de 60,28%, seguida pela amostra C (41,36%), A (24,13%), B (12,26%) e E (7,74%). Portanto, pode-se afirmar que o processo de fermentação diminuiu a quantidade de HCN presente nos resíduos, pois os resultados corroboram

com a afirmação de Cagnon et al. (2002), que as técnicas de processamento industrial diminuem a concentração do princípio tóxico, principalmente quando envolve-se processos como a maceração, embebição em água, fervura, torrefação ou fermentação das raízes de mandioca, ou ainda, a combinação desses processos.

Os processos utilizados para a produção de derivados de mandioca, podem dar origem a produtos diferenciados com relação aos teores de cianeto em dependência de alguns fatores, como: a forma como o processo ocorre, se artesanal ou mecanizado, tipo de cultivar; idade da planta, tipo de solo, entre outros. Estes conjuntos de fatores podem originar produtos com diferentes concentrações de ácido cianídrico (CHISTÉ et al., 2008).

Os resultados obtidos nesta análise possui extrema relevância em relação à utilização das folhas de mandioca como componente de multimisturas (MM) destinadas principalmente a alimentação de crianças de baixa renda. De acordo com Câmara e Madruga (2001) e Helbig et al (2008) a quantidade de folha de mandioca utilizada em MM é limitada por apresentar o ácido cianídrico componente antinutricional. A legislação brasileira permite apenas a adição de 5% de FFM, valor correspondente a 4 mg/Kg de MM.

O processo de biotransformação pelo fungo *R. oligosporus* diminui significativamente o teor de ácido cianídrico, podendo este processo ser aplicado também como pré-tratamento da farinha de folha de mandioca antes de ser adicionada a MM, elevando assim a quantidade permitida da farinha de folha de mandioca a ser adicionada, de forma a fornecer maiores quantidade e melhores qualidade de proteína disponíveis neste suplemento.

As análises estatísticas indicam que as diferenças encontradas nos valores obtidos na comparação das amostras A, B e D, não foram significantes, assim como nos valores obtidos da comparação entre a amostra antes e após a fermentação. Os únicos valores estatisticamente relevantes são àqueles obtidos nas amostras C e D, que apresentaram valores de $P < 0,05$.

5.2 EXPERIMENTO 2

As concentrações usadas no experimento 2 foram aquelas que apresentaram os resultados mais relevantes nas análises do teor de proteína bruta e valor nutricional relativo no experimento 1, as amostras utilizadas no experimento 2 foram A (100% FFM), B (100% FBM) e D (50% FFM + 50% FBM). Neste experimento, comparou-se as concentrações de NPK utilizadas em relação ao possível melhoramento do substrato para o crescimento do micro-organismo, e comparou-se

também os resultados obtidos neste experimento com àqueles obtidos das amostras testes A, B e D do experimento 1.

5.2.1 Fermentação em estado sólido e respirometria de Bartha e Pramer

No início do processo de fermentação, a fase exponencial ou logarítmica de crescimento do *R. oligosporus* ocorreu rapidamente. No entanto, quando comparada a mesma fase do experimento 1, o crescimento do micro-organismo processou-se de forma mais lenta. Diferente do experimento 1, onde a colonização do substrato ocorreu em 15 dias, neste experimento o processo de colonização e biodegradação do substrato ocorreu em 29 dias, o dobro do tempo obtido no experimento 1.

Os resultados obtidos no experimento 2 apontaram rápida colonização do substrato pelo fungo, como mostram as Figuras 24 e 25.

Figura 24 – Experimento 2: Produção diária de CO₂ devido a biodegradação das amostras testadas

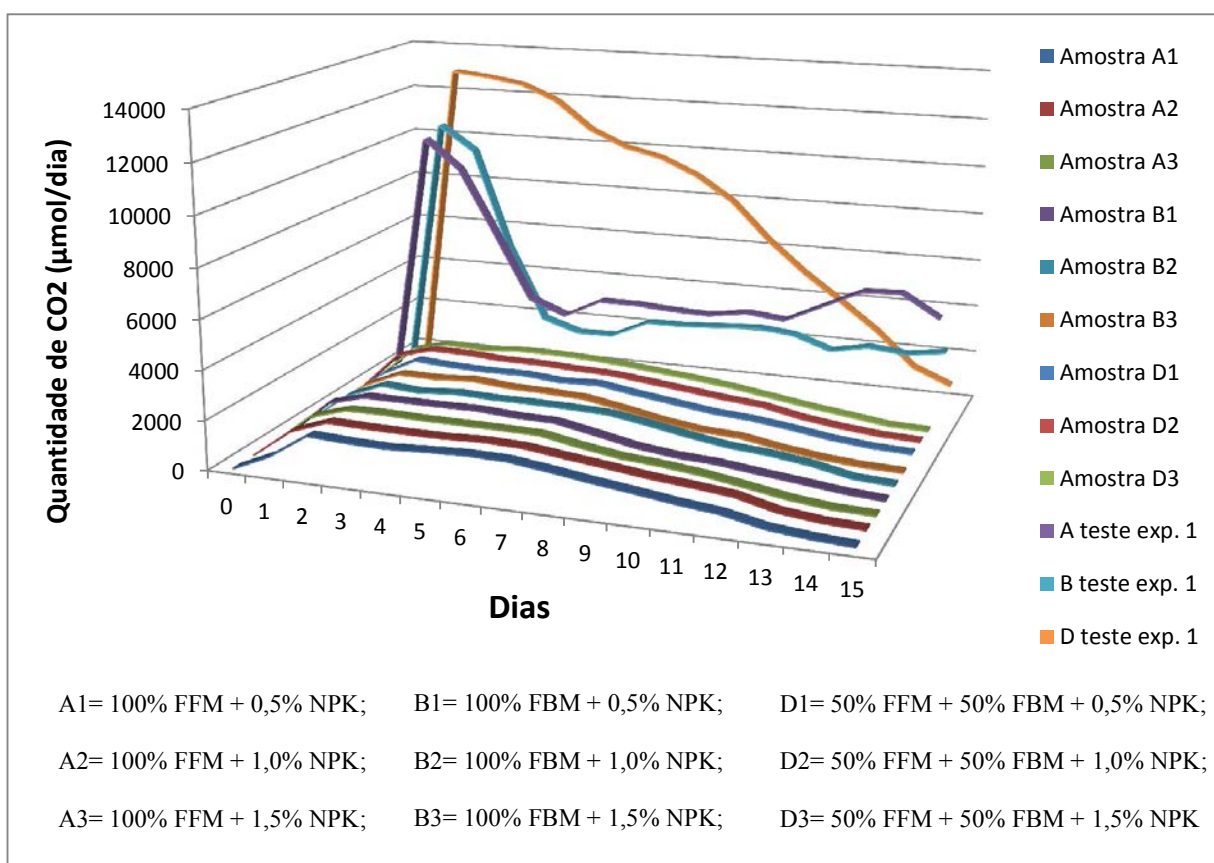
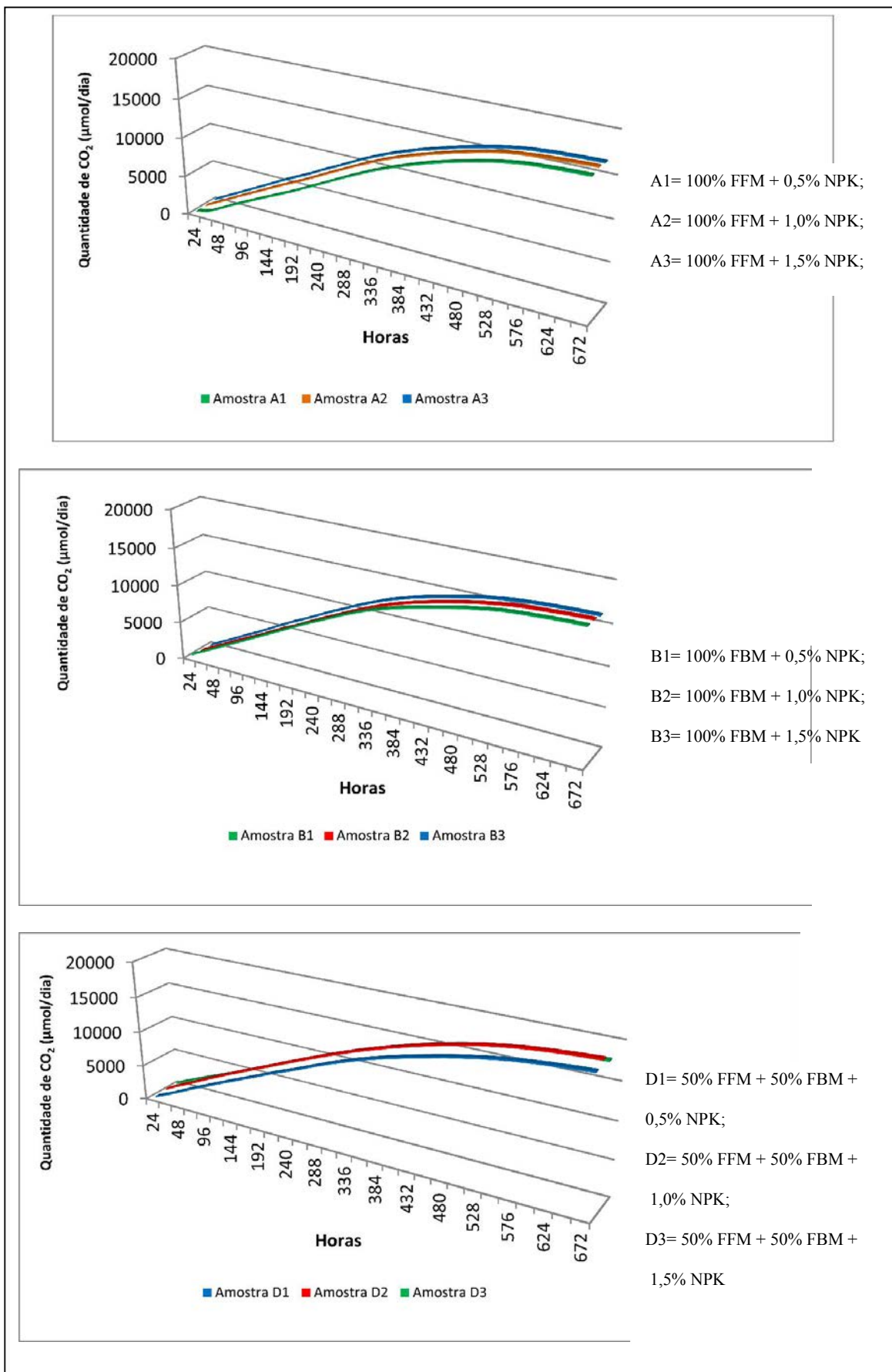


Figura 25 – Experimento 2: Produção acumulada de CO₂ da amostras estudadas.

Registra-se que a produção de CO₂ atingiu seu máximo de evolução após 48 horas de fermentação, quando todas as amostras testes apresentaram taxas de CO₂ semelhantes, destacando-se as amostras formadas por concentrações iguais de FFM e FBM. A amostra D2 atingiu maior evolução de produção de CO₂, seguida pela amostra D1, B3 e D3, porém a produção de CO₂ da amostra D1 levou maior tempo para atingir o pico máximo e também decaiu mais rapidamente a partir do décimo primeiro dia, quando comparado às amostras D2 e B3. Esse dado é importante, pois a amostra B3, é constituído de 100% de bagaço de mandioca, e mostrou-se tão eficiente quanto às demais, resultado não esperado por se tratar de um substrato pobre em proteína e lipídeo. No experimento 1, as amostras teste formadas apenas por bagaço de mandioca mostraram resultados inferiores as demais amostras, ficando a frente apenas da amostra formada por 100% folha de mandioca. Ressalta-se ainda, que as amostras teste mantiveram a produção de CO₂ até o décimo terceiro dia, com taxas próximas a de evolução máxima atingida, a partir deste período a produção de CO₂ de todas as amostras teste começaram a diminuir lentamente, até atingirem taxas abaixo de 200 µmol, no vigésimo nono dia, quando o processo de fermentação foi encerrado.

Comparando-se as curvas de crescimento obtidas nos experimento 1 e 2, nota-se que a fase exponencial ou logarítmica de evolução de CO₂ diferiu-se entre as fermentações. No experimento 1, a fase exponencial ou logarítmica se deu nas primeiras 12 horas de fermentação, enquanto que no experimento 2, esta mesma fase ocorreu nas primeiras 48 horas. Esta diferença pode ser justificada pela técnica de cultivo do micro-organismo utilizada, que no experimento 1, para manutenção do *R. oligosporus*, foi utilizado o meio SNA acrescido de 5% de mistura de FFM e FBM nas mesmas proporções, isso possibilitou a prévia adaptação do micro-organismo ao substrato, promovendo o rápido crescimento do mesmo no início do processo de fermentação. No experimento 2, utilizou-se para o cultivo do *R. oligosporus*, o meio de grão de soja colonizado como inóculo que apresenta composição diferente daquela apresentada pela folha e bagaço de mandioca, portanto, nas primeiras horas do processo de fermentação, o micro-organismo promoveu o processo de adaptação, que culminou em uma fase exponencial ou logarítmica lenta. Este dado corrobora com Leatham e Kirk (1983) que afirmam que a composição do meio onde o micro-organismo é cultivado afeta a velocidade de crescimento do micélio fúngico, produção de biomassa e biocompostos.

5.2.2 Parâmetros analisados

Os resultados obtidos das amostras em diferentes parâmetros estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11 – *Resultados obtidos em g/100g de amostras relativas aos parâmetros analisados das amostras do grupo A, B e D, suplementadas com diferentes concentrações de NPK e das amostras A, B e D teste do experimento 1.

| Amostras (g/100g) | Umidade | Cinza | Lipídeo | Fibra bruta | Proteína bruta | VNR |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A Teste Exp. 1 | ^a64,15 ±0,33 | ^a24,74±0,15 | ^a23,83±0,22 | ^a23,10±0,66 | ^a27,38±0,04 | ^a19,28±0,33 |
| A1 (0,5% NPK) | ^a 65,95±0,24 | ^a 22,94±0,12 | ^a 22,28±0,02 | ^a 23,25±0,33 | ^a 27,94±0,9 | ^a 19,88±0,31 |
| A2 (1,0% NPK) | ^a 66,84±0,08 | ^a 23,89±0,22 | ^a 24,34±0,45 | ^a 23,83±0,04 | ^a 28,63±0,16 | ^a 21,39±0,02 |
| A3 (1,5% NPK) | ^a 65,12±0,78 | ^a 24,53±0,21 | ^a 24,94±0,50 | ^a 20,31±0,16 | ^a 32,18±0,4 | ^a 20,34±0,66 |
| B Teste Exp. 1 | ^a52,54±0,45 | ^a7,53±0,07 | ^a0,28±0,04 | ^a41,13±0,9 | ^a9,88±0,02 | ^a31,33±0,04 |
| B1 (0,5% NPK) | ^a 53,28±0,74 | ^a 8,02±0,06 | ^a 0,31±0,16 | ^a 27,48±0,31 | ^a 10,52±0,50 | ^a 32,65±0,50 |
| B2 (1,0% NPK) | ^a 51,97±0,19 | ^a 6,99±0,31 | ^a 0,37±0,02 | ^a 33,21±0,66 | ^a 10,82±0,31 | ^a 33,97±0,04 |
| B3 (1,5% NPK) | ^a 53,02±0,16 | ^a 7,21±0,07 | ^a 0,42±0,31 | ^a 31,48±0,50 | ^a 12,84±0,16 | ^a 33,09±0,31 |
| D Teste Exp. 1 | ^a66,63±0,03 | ^a21,94±0,13 | ^a3,75±0,4 | ^a46,90±0,33 | ^a22,31±0,4 | ^a79,52±0,4 |
| D1 (0,5% NPK) | ^a 65,26±0,01 | ^a 20,23±0,04 | ^a 3,87±0,9 | ^a 32,73±0,31 | ^a 22,87±0,9 | ^a 80,26±0,9 |
| D2 (1,0% NPK) | ^a 64,91±0,07 | ^a 22,14±0,38 | ^a 4,02±0,04 | ^a 40,86±0,04 | ^a 23,91±0,02 | ^a 80,91±0,02 |
| D3 (1,5% NPK) | ^a 66,27±0,06 | ^a 21,85±0,45 | ^a 4,56±0,33 | ^a 38,62±0,4 | ^a 25,67±0,33 | ^a 80,45±0,66 |

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste-t (P<0,05).

*Os dados são as médias ± desvios-padrão de três repetições.

Os resultados apresentados não mostram diferenças entre às concentrações de NPK testadas, estatisticamente não houve diferenças significativas das mesmas. Para a análise estatística, considerou-se relevante os resultados contendo $P < 0,05$, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Os valores obtidos na análise estatística indicaram valor de P maior que 0,05, e o mesmo resultado foi obtido na comparação entre o experimento 1 e 2. Portanto, pode-se concluir que, estatisticamente, a adição do suplemento NPK a folha e bagaço de mandioca, não proporcionou diferença nos teores dos parâmetros estudados.

O resultado obtido na análise estatística apresenta grande importância em relação ao processo de aproveitamento destes resíduos e de sua característica bromatológica obtida após o processo de fermentação, como o teor de umidade, cinza, lipídeo, fibra bruta, nitrogênio total, e VNR. Estes resultados indicam que a folha e bagaço de mandioca são aproveitados de forma eficiente pelo fungo, e que estes resíduos fornecem nutrientes suficientes a serem metabolizados pelo *R. oligosporus*, não necessitando de adição de nenhuma fonte extra de nutrientes, este resultado é interessante, principalmente do ponto de vista econômico.

Estes dados ratificam a eficiência do processo de biotransformação empregado neste trabalho, pois quando se trata de aproveitamento de resíduo a ser aplicado de forma simples e rápida, principalmente em regiões de extrema pobreza e por indivíduos desprovidos de habilidade técnica específica, quanto menos investimentos necessários na empregabilidade do processo, mais acessível torna-se o mesmo.

Os resultados mostram que a adição do NPK no substrato apenas interfere na dinâmica de colonização do substrato pelo fungo durante o processo de fermentação. No experimento 1 o pico de produção de CO_2 se deu nos primeiros dias, enquanto no experimento 2 o mesmo se deu a partir de 5 dias de fermentação. Portanto, pode-se afirmar que a adição do NPK possivelmente gera efeitos negativos no tempo de colonização do substrato, prolongando o tempo de fermentação. Do ponto de vista econômico, é interessante a empregabilidade de processos biotecnológicos rápido e de baixo custo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mandioca, uma das culturas agrícolas de grande importância social para muitos países como Nigéria e Brasil, apresenta alto teor de carboidratos e baixo valor de proteína nas raízes, porém, as folhas de mandioca possuem proteínas de boa qualidade nutricional. Entretanto, proteínas não foram ainda exploradas sob o ponto de vista tecnológico, dada a baixa digestibilidade.

Para as indústrias de farinha de mandioca é uma oportunidade de diversificação de mercado, como fornecedoras para outros segmentos da indústria alimentícia, agregando valor a um resíduo industrial, atualmente descartado.

Esta pesquisa indica que a associação das folhas com bagaço de mandioca pode ser uma opção como alimento, principalmente após a biotransformação dos mesmos. Este trabalho mostrou que o bagaço de mandioca foi facilmente degradado pelo micro-organismo sem qualquer tratamento prévio, enquanto que as folhas apresentam alto nível de aminoácidos, e que podem ser aproveitadas quando associada ao bagaço, onde ocorre a complementação nos teores de proteína e composição de aminoácidos.

Os resultados mais importantes foram aqueles encontrados nas análises de nitrogênio total, VNR e aminoácidos totais.

- Nitrogênio total:

Diante dos valores de proteína encontrados para os coprodutos obtidos, verifica-se a possibilidade de desenvolver um alimento, rico em fibras, podendo ser recomendado para o consumo de humanos e de animais. Estudos posteriores relacionados aos processos de extração e ensaios de aplicação destas proteínas devem resultar no desenvolvimento de novos produtos baseados nesta matéria-prima. Quanto ao teor de proteína, a amostra A (apenas folha de mandioca) apresentou acréscimo de 4,88%, porém a quantidade de proteína presente na folha de mandioca já fora determinada na literatura. O melhor resultado foi obtido na amostra B (apenas bagaço de mandioca) que apresentou incremento de 7,98%. O bagaço de mandioca é rico em fibra a amido, porém seu teor de proteína é muito pequeno, os estudos feito neste trabalho apontou teor de 1,9% de proteína presente na amostra composta por somente bagaço.

- VNR:

Os resultados obtidos na digestibilidade dos resíduos aqui estudados são de extrema importância para a elaboração de novos processos biotecnológicos que objetiva o melhoramento de alimentos. O processo de biotransformação da folha e bagaço de mandioca originou um alimento com alto valor de digestibilidade, podendo as proteínas contidas nestes resíduos após a fermentação em estado sólido, serem comparadas as proteínas de origem animal, consideradas de alto valor biológico, principalmente quando estes resíduos são associados um ao outro. Valores de aproximadamente 80% de digestibilidade foram encontrados.

- Aminoácidos totais:

O conhecimento da composição de aminoácidos totais num alimento é importante para a determinação da dieta de um indivíduo, quanto mais completo em aminoácidos totais for o alimento, mais funcional será o mesmo. A associação da folha e bagaço de mandioca contribuiu para a presença deste aminoácidos, e o processo de biotransformação destes resíduos aumentou o teor dos mesmos, principalmente daqueles considerados essenciais, como a histidina (aumento de aproximadamente 49%) e triptofano (aumento de 20%).

7. REFERÊNCIAS

AQUARONE, E. et al. Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 523p.

ALMEIDA, N. G. A importância das fibras alimentares. Dieta e Saúde. Boletim Informativo da Kellogg's sobre Nutrição e Saúde. **Querétaro**, v. 7, n.1,1999.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14283 Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999.

ACHINEWHU, S. C.; BARBER, L. I.; IJEOMA, I. O. Physicochemical properties and garification (gari yield) of selected cassava cultivars in Rivers State, Nigeria. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.. 52, n. 2, p. 133-140, Jun 1998.

AGOSTINI, M. R. **Produção e utilização de farinha de mandioca comum enriquecida com adição das próprias folhas desidratadas para consumo alimentar**. 2006. 84p. (Dissertação de mestrado) Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

AIKAT, K.; BHATTACHARYYA, B. C. Optimization of some parameters of solid state fermentation of wheat bran for protease production by a local strain of *Rhizopus oryzae*. **Act Biothec**, v. 20, n. 2, pp. 149-159, 2000.

ALTIERI, M. A. Agroecologia, agricultura camponesa e soberania alimentar. **Rev. Nera**, v. 13, p. 22-32, 2010.

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

BARBOSA, M.C.S.; SOCCOL, C.R.; MARIN, B.; TODESCHINI, M.L.; TONIAL, T.; FLORES, V. **Prospect for production of *Pleurotussajor-caju* from cassava fibrous waste**. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B.K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Eds.), *Advances in Solid State Fermentation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 513-525, 1995.

BEUX, M. R.; SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; TONIAL, T.; ROUSSOS, S. **Cultivation of *Lentinus edodes* on the mixture of cassava bagasse and sugarcane bagasse**. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B.K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Eds.), *Advances in Solid State Fermentation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 499- 511, 1995.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.539-545, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRAGA, L. G. T.; RODRIGUES, F. L.; AZEVEDO, R. V.; CARVALHO, J. S. O.; RAMOS, A. P. S. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de coprodutos agroindustriais para tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 4, p. 1127-1136, out/dez, 2010.

CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. In Cd-rom. Série: Cultura de tuberosas amiláceas latinoamericanas. Vol.2 – Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas. Fundação Cargill. Ago/2002.

CALDWELL, M. J. Ascorbic acid content of Malaysian leaf vegetables. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 1, p. 313, 1972.

CÂMARA, F. S.; MADRUGA, M. S. Conteúdos do ácido cianídrico, ácido fítico, tanino, e aflatoxina, em uma preparação brasileira (Natal) de “multimistura”. **Ver. Nutr.**, v. 14, n. 1, p. 33-36, 2008.

CARTA, F. S.; SOCCOL, C. R.; MACHADO, L.; MACHADO, C. M. M. Prospect of using cassava bagasse waste for producing fumaric acid. **Journal of Scientific Research**, v. 57, n.10, p. 644-649, 1998.

CARVALHO, J. L. H. A mandioca: raiz e parte aérea na alimentação animal. Campinas: CATI, 1994. 9p.

CARVALHO, V. D.; KATO, M. S. A. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 5, n.1, p. 63-70, 1987.

CASTIGLIONI, G. L.; SILVA, F. A.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M. S. Modelagem matemática do processo de secagem da massa fibrosa de mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.9, p. 987–994, 2013. Campina Grande

CEREDA, M. P. 1994. **Caracterização de resíduos da industrialização da mandioca**. In: CEREDA, M. P. (Ed.), *Industrialização da mandioca*. Paulicéia, São Paulo.

CERQUEIRA, Y. M. Efeito da deficiência de água na anatomia foliar de cultivares de mandioca *Manihot esculenta* Crantz. Densidade estomática. **Sitientibus**, n. 10, p. 103-115, 1992.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Determinação de cianeto total nas farinhas de mandioca do grupo seca e d'água comercializadas na cidade de Belém-PA. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 2, n. 2, p. 96-102, 2008.

CHRISTEN, P.; BRAMORSKI, A.; REVAH, S.; SOCCOL, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, 71, 2000.

COONEY G. D., EMERSON R. **Thermophilic fungi**. San Francisco, London: W. H. Freeman and Company, p. 3-28, 1964.

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 sobre a atividade da linamarase. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 368-374, 2002.

COSTA, L. A. **Caracterização do resíduo da fabricação de farinha de mandioca e seu aproveitamento no desenvolvimento de alimento em barra**. 2004. 69f. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COSTA, M. R. **Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbica de lixiviado de resíduos sólidos urbanos em latossolo vermelho-escuro**. 2009. 107f. (Dissertação de mestrado) Universidade de Brasília, Brasília.

DHANANJAY, B.; PATANKAR, T. L.; TIMOTHY, O. A fractal model for de characterization of mycelia morphology. **Biotechnology and bioengineering**, v. 42, p. 571-578, 1993.

DIAS, L. T.; LEONEL, M. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 692-700, ago., 2006.

DILLY, H. D.; MATHAN, O. L'extraction des protéines de luzerne. **Ind. Alim. Agric.**, v. 10, p. 65-72, 1978.

DOUILLARD, R., MATHAN, O. Leaf protein for food use: potential of Rubisco. In HUDSON, B. J. F. **New and Developing Sources of Food Proteins**. London: Chapman & Hall, p 307-342, 1994.

EL-SHARKAWY, M. A. International research on cassava photosynthesis, productivity, eco-physiology, and responses to environmental stresses in the tropics. **Photosynthetica**, v. 44, n. 4, p. 481-512, 2006.

FASUYI, A. O. Nutrient composition and processing effects on cassava leaf (*Manihot esculenta* Crantz) antinutrients. **Journal of Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 37-42, 2005.

FASUYI, A. O.; ALETOR, V. A. Varietal composition and functional properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) leaf meal and leaf protein concentrates. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.4, p.43-49, 2005.

FELIPE, I. F.; ALVES, L. R. A.; CAMARGO, S. G. C. Panorama e perspectiva para a indústria de fécula de mandioca no Brasil. **Revista de Raízes e Amidos Tropicais**, v. 6, n. 1, p. 134-146, 2010.

FERNANDES, A. F.; PEREIRA, J.; GERMANI, R.; OIANO-NETO, J. Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum* Lineu). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, suppl. 0, p. 56-65, 2008.

FERRET, E.; SIMEON, J. H.; MOLIN, P.; JORQUERA, H. Macroscopic growth of filamentous fungi on solid substrate explained by a microscopic approach. **Biotechnology and bioengineering**, 65, p. 512-522, 1999.

FIGUEROA, A. M. C. **Viabilidade de cultivo de *Trichosporon* sp. Em manipueira**. 1987, 96p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

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

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; FURUYA, V. R. B.; BARROS, M. M.; LANNA, E. A. T. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes do farelo de canola pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 611-616, 2001.

GABAS, A. L. **Secagem de uva Itália em leito fixo**. 1998. 135f. (Dissertação de mestrado). UNICAMP-FEA, Campinas.

GÓMEZ, G.; VALDIVIESO, M. Cassava foliage: chemical composition, cyanide content and effect of drying on cyanide elimination. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 36, p. 433-441, 1985.

GUERROUÉ, J. L. L.; DOUILLARD, R.; CEREDA, M. P.; CHIARELLO, M. D. As proteínas de folhas de mandioca: aspectos fisiológicos, nutricionais e importância tecnológica. **Boletim CEPPA**, v. 14, n. 2, p. 133-148, 1996.

HELBIG, E.; BUCHWEITZ, M. R. D.; GIGANTE, D. P. Análise dos teores de ácido cianídrico e fítico em suplemento alimentar: multimisturas. **Ver. Nutr.**, v. 21, n. 3, p. 323-328, 2008.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. São Paulo. p. 1020, 2008.

IYAYI, E. A.; ADEROLU, Z. A. Enhancement of the feeding value of some agro-industrial by-products for laying hens after their solid state fermentation with *Trichoderma viride*. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 182-185, 2004.

JOHNSON, R. M.; RAYMOND, W. D. The chemical composition of some tropical food plants. **Tropical Science**, v. 7, p. 109, 1968.

KITPREECHAVANICH, V.; MANEEBOON, T.; KAYANO, Y.; SAKAI, K. Comparative Characterization of L-Lactic Acid-Producing Thermotolerant Rhizopus Fungi J. **Bioscience and Bioengineering**, v. 106, N. 6, 541–546, 2008.

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

LAURENTINO, C. L. **Transferência de calor em leitos fixos com aplicação em reatores de fermentação em estado sólido**. 2007. 105p. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual Paulista – UNESP. São José do Rio Preto.

LEATHAM, G. F.; KIRK, T. K. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 65-67, 1983.

LEONEL, M. **Uso de enzimas complementares no processo de produção de etanol a partir de farelo de mandioca**. 1998. 114p. (Tese de doutorado). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Evaluation of the biodegradation of different types of lubricant oils in liquid medium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, Curitiba, Oct., 2009.

MADRUGA, M. S.; CÂMARA, F. S. The chemical composition of multimistura as a food supplement. **Food Chemistry**, Oxford, v. 68, p. 41-44, 2000.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949-954, 2002.

MCDONALD, P.; EDWARD, R. A.; GREENHALGH, J. E. D. **Nutrición animal**. E Acríbia: Zaragoza, p. 576, 1999.

MELO, D. S.; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, suppl. 0, p. 32-37, 2008.

MELLO, G. S. L.; MORITA, D. M.; MANFREDINI, S.; RIVERA, I. M. G. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. **Engenharia Ambiental e Sanitária**, v. 12, n. 1, mar, p. 71-78, 2007.

MIYAOKA, F. M. **Avaliação do potencial dos fungos do gênero *Rhizopus spp* na produção de substâncias bioativas com ação antioxidante utilizando diferentes substratos**. 2012. 156f. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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.

MODESTI, F.; CORRÊA, A. D.; OLIVEIRA, E. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. Caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca obtido por precipitação com calor e ácido. **Ciência e Tecnologia do Alimento**, v. 27, n. 3, p. 464-469, 2007.

MORALES, E. M. **Viabilidade de obtenção de alimento funcional a base de farinha de mesocarpo de babaçu (*orbignyasp.*) e folhas de mandioca (*manihot esculenta*) mediante fermentação por *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***. 2012. 69f. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

NASSAR, N. M. A. et al. Anatomical alterations due to polyploidy in cassava, *Manihot esculenta* Crantz. **Genetic and Molecular Research**, v. 07, n. 02, p. 276-283, 2008.

NG, W. K.; WEE, L. The nutritive value of cassava leaf meal in pelleted feed for Nile tilapia. **Aquaculture**, v.83, p.45-58, 1989.

NIRENBERG, H. I. Recent advances in the taxonomy of Fusarium. **Studies in Mycology**, v. 32, p. 92-101, 1990.

OBOH, G. Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus spp* solid media fermentation Techniques. **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, 2006.

OLIVIERA, J. P. **Valor nutritivo do feno e da silagem da parte aérea da mandioca** (*Manihot esculenta* Crantz). 1984. 57p. (Tese de mestrado). Escola superior de Agricultura de Lavras. Lavras.

PADMAJA, G. Evaluation of techniques to reduce assayable tannin and cyanide in cassava leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 37, p. 712-716, 1989.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Bioconversion of biomass: a case study of ligno-cellulosics bioconversions in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, n. 4, p. 379-390, 1998.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGUE, L. P. S.; MOHAN, R. Botechnological potencial of agro-industrial residue II: Cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.81-87, 2000.

PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M.; PINTO, L. G. Q. Digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta e a energia digestível de alguns alimentos alternativos para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 26, n. 3, p. 329-337, 2004.

PHILIPPI, S. T. Pirâmide dos alimentos fundamentos básicos da nutrição. São Paulo: Manole, 2008.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; CRUZ, G. A .D. R.; MENDES, F. Q.; COSTA, N. M. B. Digestibilidade in vitro e in vivo de proteínas de alimentos: estudo comparativo. **Alim. Nutr.**, v.17, n.1, p.13-23, 2006.

RAIMBAULT, M.; REVAH, S.; PINA, F.; VILLALOBOS, P. P. Protein Enrichment of Cassava by Solid Substrate Fermentation Using Molds Isolated from Traditional Foods. **Journal of Fermentation Technology**, v. 63, n. 4, p. 395-399, 1985.

RAMOS, P. R.; PRATES, E. R.; FONTANELLI, R. S.; BARCELLOS, J. O. J.; LANGWINSKI, D.; BONELLI, I. B. Uso do bagaço de mandioca em substituição ao milho no concentrado para bovinos em crescimento. Digestibilidade: aparente consumo de nutrientes digestíveis, ganho de peso e conversão alimentar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 300-305, 2000.

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

RAVIDRAN, G.; RAVIDRAN, V. Changes in the nutritional composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves during maturity. **Food Chemistry**, v. 27, p. 299-309, 1988).

RODELLA, A. A.; SABOYA, L. V. Calibration for conductimetric determination of carbon dioxide. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 2059-2060, 1999.

ROGERS, D. J. Cassava leaf protein. **Society for Economic Botany**, v. 13, n. 26, 1959.

SCHIPPER, M. A. A. Arevision of the genus *Rhizopus* I. The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. **Studies in Mycology**, n. 25, 1984.

SILVA, A. S.; KASSAB, S. O.; GAONA, J. C. Insetos-praga, produtos e métodos de controle utilizados na cultura de mandioca em Ivinhema, Mato Grosso do Sul. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 19-23, 2012.

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumarico, biotransformação de resíduos sólidos de mandioca por *Rhizopus***

e **Basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus***. 1994. 228f. (Tese de doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SOCCOL, C. R. Biotechnological products from cassava roots by solid state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 55, p. 358-364, 1996.

SOCCOL, C. R.; STERTZ, S. C.; RAIMBAULT, M.; PINHEIRO, L. I. Biotransformation of solid waste from cassava starch production by *Rhizopus* in solid state fermentation. Optimization of the culture conditions and growth kinetics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 38. n. 4, p. 1311-1318, 1995.

SOMERVILLE, C. C., et al. Lipids. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 456-458, 2000.

SRIROTH, K.; CHOLLAKUP, R.; CHOTINEERANAT, S.; PIYACHOMKWAN, K.; OATES, C. G. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 63-69, 2000.

STERTZ, S. C. **Bioconversão da farinha de mandioca crua (*Manihot esculenta*, Crantz) por fungos do gênero *Rhizopus* em fermentação no estado sólido**. 1997, 93f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TAVANO, O. L.; SILVA JÚNIOR, S. I.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Avaliação nutricional de proteínas do grão-de-bico (*Cicera rietinum*L.) por método químico e microbiológico. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n. 1, p. 17-22, 2004.

THONGKRATOK, R.; KHEMPAKA, S.; MOLEE, W. Protein enrichment of cassava pulp using microorganisms fermentation techniques for use as an alternative animal feedstuff. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 22, p. 2859-2862, 2010.

UENO, O.; AGARIE, S. The intercellular distribution of glycine decarboxylase in leaves of cassava in relation to photosynthetic mode and leaf anatomy. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 66, n. 2, p. 268-278, 1997.

VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; LEBEAULT, J.M.; KRIEGER, N. **Cassava wastes hydrolysate an alternative carbon source for citric acid production by *Candida lipolytica***. Paper presented in Internatl. Congr. Biotech, Portugal., 1998.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J-M. Solid State Fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 2, p. 175-178, 2000.

VERAS, L. R. V.; POVINELLI, J. A vermicompostagem do lodo de lagoas de tratamento de efluentes industriais consorciada com composto de lixo urbano. **Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 3, set., p. 7, 2004.

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.

WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. Cianeto na farinha e folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1115-1118, 2004.

WOGAN, G. N.; MARLETTA, M. A. **Componentes perjudiciales o potencialmente perjudiciales de los alimentos**. In: FENNEMA, O. R. Química de los alimentos. 2. ed. Zaragoza: Acribia, p. 775-811, 1993.

ZHU, C. R.; DU, M. J.; LEI, D. N.; WAN, L. Q. A study on the inhibition of aflatoxin B₁-induced hepatocarcinogenesis by *Rhizopus delemar*. **Mater Med Pol**, 21, p. 87–91, 1989.

ZINSOU, V. et al. Leaf waxes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in relation to ecozone and resistance to Xanthomonas Blight. **Euphytica**, v. 149, n. 01, p. 189-198, 2006.