



Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica



SARAH DE OLIVEIRA VICENTE

**Propriedades da biomassa de *Pleurotus* sp.: Potencial
para o uso na formulação de novos alimentos**

Maringá
2026



Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica



SARAH DE OLIVEIRA VICENTE

**Propriedades da biomassa de *Pleurotus* sp.: Potencial
para o uso na formulação de novos alimentos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Bioquímica da
Universidade Estadual de Maringá para a
obtenção do grau de mestre em Bioquímica.

Orientadora: Cristina Giatti M. de Souza
Maringá

2026

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central Maria Grazia Zolet - UEM, Maringá - PR, Brasil)

V633p

Vicente, Sarah de Oliveira

Propriedades da biomassa de *Pleurotus* sp. : potencial para o uso na formulação de novos alimentos / Sarah de Oliveira Vicente. -- Maringá, PR, 2026.
40 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Giatti Marques de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2026.

1. *Pleurotus*. 2. Proteína alternativa. 3. Alimento funcional. 4. Micélio. 5. Bioquímica de alimentos. I. Souza, Cristina Giatti Marques de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDD 23.ed. 572.4

Rosana de Souza Costa de Oliveira - 9/1366



Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica



SARAH DE OLIVEIRA VICENTE

**Propriedades da biomassa de *Pleurotus* sp.: Potencial
para o uso na formulação de novos alimentos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Bioquímica da
Universidade Estadual de Maringá para a
obtenção do grau de mestre em
Bioquímica.

Aprovado em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Cristina Giatti Marques de Souza
Universidade Estadual de Maringá

Prof(a). Dr(a). Carolina Moser Paraíso
Universidade Estadual de Maringá

Prof(a). Dr(a). Tiago Tognolli de Almeida
Universidade Estadual de Maringá



Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica



BIOGRAFIA

Sarah de Oliveira Vicente graduou-se como bacharel em Bioquímica pela Universidade Estadual de Maringá em 2024, durante o período da graduação adquiriu experiência na área de bioquímica de microrganismos e ingressou no mestrado no programa de pós-graduação em Bioquímica, desenvolvendo seu trabalho na linha de pesquisa de Bioquímica de Alimentos, no mesmo ano.



Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me sustentado até aqui, mesmo com todas as dificuldades que enfrentei, por ter me fortalecido em meio as lutas que enfrentei, pela sabedoria adquirida nos diversos processos, por sempre mostrar seu amor e misericórdia. Ebenézer!

Agradeço aos meus pais por terem me incentivado a seguir meu sonho e não deixar eu desistir.

Agradeço aos meus amigos que estiveram ao meu lado, me apoiaram, cuidaram de mim e foram essenciais para minha saúde mental neste processo difícil.

Agradeço à minha orientadora pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos.

Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e

Alimentos. Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica pelo suporte e estrutura.

Agradeço à CAPES pelo fomento do projeto e a Universidade Estadual de Maringá pela estrutura concedida para a realização dos experimentos deste projeto.



Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica



APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá (LBM-DBQ).

De acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica esta dissertação está apresentada como um artigo experimental que após traduzido para o inglês será submetido à revista: International Journal of Food Properties.

Autores: Sarah de Oliveira Vicente, Larissa Akemi Fernandes Takayama, Jean Lopes da Silva, José Rivaldo de Souza Filho, Benício Alves de Abreu Filho, Rosane Marina Peralta, Cristina Giatti Marques de Souza.

Título: Propriedades da biomassa de *Pleurotus* sp.: Potencial para o uso na formulação de novos alimentos.

SUMÁRIO

Biografia	5
Agradecimentos	6
Apresentação	7
Resumo geral	9
General abstract	10
Artigo	12



Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica



RESUMO GERAL

Os basidiomicetos são um grupo de fungos que possuem como estrutura reprodutiva um corpo de frutificação ou basidioma, conhecido como cogumelo. Muitos são utilizados na culinária, mas na cultura asiática são usados também na medicina alternativa e, portanto, nos últimos anos têm sido alvo de estudos pela comunidade científica, que busca em seus bioativos moléculas com efeitos antioxidantes, antitumorais, antimicrobianos e antivirais além das suas propriedades nutricionais. As três espécies mais comumente cultivadas e consumidas no Brasil são: *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, e *Pleurotus ostreatus*. O gênero *Pleurotus* é o segundo principal grupo de cogumelos comestíveis cultivados no mundo, compreendendo mais de 40 espécies. Os cogumelos comestíveis deste gênero, quando comparados à maioria dos vegetais, apresentam alto teor de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais, boa proporção de ácidos graxos insaturados, fibras e alto teor proteico. Com a crescente demanda por proteína se tornando um desafio para a indústria, se faz necessário o estudo de proteínas alternativas para o consumo da população. Faz-se necessário que estas proteínas sejam obtidas de forma limpa, com redução de emissão de gases de efeito estufa, baixa pegada de carbono e que apresentem boa textura, sejam palatáveis e ricos em nutrientes para o consumidor. Desta forma o estudo das propriedades físico-químicas e citotóxicas da biomassa fúngica são importantes para a aplicabilidade dos fungos com esse interesse. O objetivo deste trabalho foi cultivar um isolado de *Pleurotus* sp. em meio semissólido, usando resíduo da agroindústria, para produção de biomassa e avaliar propriedades físico-químicas de seu micélio visando sua aplicação em alimentos. O micélio foi produzido em meio semissólido usando farelo de trigo como substrato e meio mineral. Após 14 dias de crescimento, o micélio foi removido, lavado e seco em estufa. Após ser moído, o pó fino foi usado para a realização dos testes, inclusive para a obtenção de um extrato hidroalcoólico. Os resultados obtidos neste estudo quanto a avaliação do micélio foram: o micélio apresentou $16,488 \pm 1,2$ g de peso seco/l de meio líquido de cultura $3,04 \pm 0,09$ (g/g) de intumescimento, $38 \pm 1,2$ % de solubilidade em água, $4,94 \pm 0,07$ g de capacidade de ligação a gordura, $45,77 \pm 4,0\%$ e $48,6 \pm 2,5\%$ de atividade e estabilidade emulsificante respectivamente. Quanto a composição centesimal apresentou $29,55 \pm 0,11\%$ de proteína bruta,

3,60 $\pm$ 0,32% de fibra bruta, boa capacidade prebiótica e uma leve citotoxicidade sobre células de levedura. O extrato hidroalcoólico apresentou baixa atividade antioxidante frente ao radical DPPH, 10,15 $\pm$ 0,07 μ g/ml de equivalentes de ácido gálico, 5770 ug/ml de carboidratos totais solúveis e proteínas solúveis 152,9 $\pm$ 4,2 ug/ml . De acordo com estes resultados, pode-se perceber que o micélio de *Pleurotus* sp. apresenta características promissoras para aplicação no desenvolvimento de novos produtos alimentícios.

PALAVRAS-CHAVE: proteína alternativa, alimento tecnofuncional, micélio



Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica



GENERAL ABSTRACT

Basidiomycetes are a group of fungi characterized by the presence of a fruiting body, known as a basidioma or mushroom. In addition to their culinary use, several species have been traditionally employed in Asian alternative medicine, which has stimulated growing scientific interest in their bioactive compounds with antioxidant, antitumor, antimicrobial, and antiviral properties, as well as their nutritional value. Among edible mushrooms, the genus *Pleurotus* represents the second most widely cultivated group worldwide and is recognized for its high protein content, essential amino acids, vitamins, minerals, unsaturated fatty acids, and dietary fiber. Given the increasing global demand for sustainable protein sources, alternative proteins obtained through environmentally friendly processes with low carbon footprint and high nutritional quality are required. In this context, fungal biomass represents a promising ingredient for food applications. Therefore, the objective of this study was to cultivate *Pleurotus* sp. in a semisolid medium using agro-industrial residues for biomass production and to evaluate the physicochemical, functional, and enzymatic properties of its mycelium, aiming at its application in food products. Additionally, following the principles of the circular economy, the fermentation residue was considered a potential source of bioactive compounds. The mycelial biomass exhibited a yield of $16,488 \pm 1,2$ g dry biomass/l of liquid culture medium, $4,67 \pm 0,006$ mol/mL of glucose equivalents in the hydroalcoholic extract, swelling capacity of 3.04 ± 0.09 g/g, water solubility of $38 \pm 1.2\%$, and fat-binding capacity of 4.94 ± 0.07 g. Emulsifying activity and stability were $45.77 \pm 4.0\%$ and $48.6 \pm 2.5\%$, respectively. With respect to the centesimal composition, the sample demonstrated $29.55 \pm 0.11\%$ crude protein, $3.60 \pm 0.32\%$ crude fiber, notable prebiotic capacity, and mild cytotoxicity towards yeast cells. The hydroalcoholic extract exhibited low antioxidant activity against the DPPH radical, 10.15 ± 0.07 μ g/ml gallic acid equivalents, and 5770 μ g/ml of total carbohydrates and $152,9 \pm 4,2$ μ g/ml soluble proteins. These results demonstrate that *Pleurotus* sp. mycelium exhibits favorable functional and nutritional properties, indicating strong potential for application as a sustainable food ingredient.

KEYWORDS: alternative protein, functional food, mycelium

Propriedades da biomassa de *Pleurotus* sp.: Potencial para o uso na formulação de novos alimentos.

Sarah de Oliveira Vicente ^{a*}, Larissa Akemi Fernandes Takayama ^b, Jean Lopes da Silva ^c, José Rivaldo de Souza Filho ^a, Benício Alves de Abreu Filho ^c, Rosane Marina Peralta ^a, Cristina Giatti Marques de Souza ^a.

^a *Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil;* ^b*Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil;* ^c*Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil;*

*Contato: *Sarah de Oliveira Vicente oliveira.sarah09@outlook.com, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil*

Abstract

The basidiomycetes are a group of fungi that have the reproductive structure as a fruiting body or basidioma, known as mushroom. The three most cultivated and consumed species in Brazil are: *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. The *Pleurotus* genus is the second main group of edible mushrooms cultivated in the world, covering over 40 species. This gender of edible mushrooms, compared to most vegetables, is high in protein, essential amino acids, vitamins and minerals, and has a good proportion of unsaturated fatty acids and fibers. Therefore, studying the physical-chemical, antioxidants, cytotoxic properties of mycelia or basidioma are important for the applicability of the fungi with this interest. The mycelia showed 26.5 ± 1.96 % of yield, 0.2 ± 0.04 $\mu\text{mol/ml}$ of glucose equivalents, good prebiotic capacity, 13.04 ± 0.09 (g/g) of swelling power, 38 ± 1.2 % of water solubility, 4.94 ± 0.07 g/g of fat binding capacity, $45.77 \pm 4.0\%$ and $48.6 \pm 2.5\%$ of emulsifying activity and stability respectively, $29.55 \pm 0.11\%$ of crude protein, $3.60 \pm 0.32\%$ of crude fiber. Accordingly with

these results, it can be seen that the *Pleurotus* sp. mycelia shows a good potential in food application.

KEY WORDS: alternative protein, functional food, mycelia.

1. Introdução

O Filo Basidiomycota constitui um grupo de fungos que engloba espécies comestíveis, fitopatogênicas e venenosas ^[1], ele é o segundo maior filo com 40.000 espécies e a sua diversidade de metabólitos, vias de biossíntese e mecanismos de sobrevivência confere a eles importantes usos na biotecnologia e também na indústria. Eles são muito importantes para equilibrar os ecossistemas, pois contribuem na decomposição de matéria orgânica e garantem o retorno de nutrientes para o solo, quando se associam com plantas auxiliam na absorção de nutrientes e também contribuem para realizar a manutenção do ciclo do carbono. Cogumelos são conhecidos por seu valor nutricional e medicinal e a diversidade dos seus componentes bioativos ^[2]. Os mais conhecidos são macroscópicos, com mais de 2.000 espécies comestíveis, porém apenas cerca de 25 delas são cultivadas comercialmente. As principais espécies cultivadas e consumidas são: *Agaricus bisporus*, *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*.

O gênero *Pleurotus* é o segundo principal grupo de cogumelos comestíveis cultivados no mundo, compreendendo mais de 40 espécies. Cogumelos comestíveis são produzidos em todo o território mundial e somente a produção de espécies *Pleurotus* spp. representam cerca de 27% do total de 23 espécies de cogumelos cultivados a nível mundial ^[3]. O valor nutricional dos *Pleurotus* spp. bem como a síntese de bioativos com ação antimicrobiana, antioxidante, antiviral entre outros, tem resultado na sua valorização econômica ^[4,5]. Existe uma grande variabilidade de composição nutricional na espécie, isso se deve às variáveis durante a sua produção como espécie, linhagem, substrato, maturação e armazenamento. O cogumelo de *P. ostreatus* é uma fonte importante de carboidratos e fibras, vitaminas e minerais. Por essa razão são promovidos à classe dos alimentos nutricionalmente ricos. Suas proteínas são entre 60-70% digeríveis e a quantidade de água pode chegar até 90% ^[6].

Os cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*, quando comparados à maioria dos vegetais, apresentam alto teor proteico, com proteínas de boa qualidade, aminoácidos essenciais, diversas vitaminas e minerais e alta proporção de ácidos graxos insaturados e baixas calorias. Além de seu valor nutricional, cogumelos comestíveis oferecem benefícios por seus polissacarídeos, terpenoides e outros compostos bioativos que possuem propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias, antidiabéticas, antitumorais, antitrombóticas,

hipolipidêmica, hepatoprotetora e hipotensiva ^[7, 8] As propriedades antibacterianas podem estender significativamente a vida de prateleira de substitutos cárneos processados ^[9]. Além disso, as aplicações de *Pleurotus* sp. na indústria de alimentos está ficando cada vez mais diversa, existem estudos usando-o como um agente fortificante em farinhas, substituto proteico em hambúrgueres e leites vegetais, como ingrediente prebiótico e outros.

Considerando o segundo Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, fome zero e agricultura sustentável até 2030, a produção do micélio e sua incorporação em alimentos se torna uma alternativa para a meta ser alcançada. Já existem diversos tipos de alternativas de produtos *plant-based* no mercado, mas existe uma necessidade de alimentos que sejam acessíveis, que os consumidores desejam e que sejam ricos em nutrientes e compostos bioativos. Além disso, existem um alto número de pessoas desnutridas e em insegurança alimentar, e também uma questão ambiental, pois nem sempre a produção destes produtos *plant-based* são realmente sustentáveis. O uso do micélio de *Pleurotus* sp. contribui para atenuar estes problemas e ele pode ser produzido em resíduos agroindustriais, considerando que o Brasil é um país altamente agrícola, isso além de ajudar na diminuição da poluição causada pela produção agrícola, também contribui na economia circular. O uso dos resíduos contribui para o crescimento do micélio, fornecendo carbono, nitrogênio e nutrientes, auxiliando no perfil nutricional do *Pleurotus* sp.

O micélio tem um rápido crescimento, consome menos carbono na sua produção, necessita de pouca água e não é necessário uma grande área para cultivá-lo, considerando todos os fatores apresentados, a produção e incorporação do micélio em alimentos é muito vantajosa. Além de ser um alimento rico em proteínas, minerais, fibras, vitaminas e baixo em gordura, sua produção é consideravelmente mais econômica quando comparada a outras fontes de proteína, por exemplo. Além de que diversos estudos mostraram a eficiência quando incorporado na formulação de diversos tipos de alimento, realçando sabor, textura, auxiliando na estabilidade, entre outras propriedades. A fase anamorfa constitui o crescimento micelial do fungo em ambiente controlado e é geralmente usada para propagação e manutenção do fungo, porém cogumelos são produzidos em sacos plásticos contendo o substrato colonizado e demoram longo tempo para o primeiro fluxo de produção, ao contrário de cultivos para a produção de biomassa em meios líquidos sob agitação ou mesmo estático. Uma variação do meio sólido é o meio semissólido que deixa água disponível o suficiente no cultivo de tal maneira que o fungo possa crescer em sua superfície.

Além da produção de enzimas, o fungo produz um micélio denso por cima do meio, não penetrando na parte sólida dele. Fatores como característica nutricional do substrato, bem como linhagem do fungo, luminosidade, temperatura e outros afetam o seu cultivo ^[10]. Desta forma

tanto o corpo de frutificação como o micélio de espécies de *Pleurotus* e de outros fungos têm sido estudados ^[11, 12, 13]. Embora ainda pouco consumidos no Brasil (130g/pessoa/ano) perto do consumo dos europeus (2 Kg/pessoa/ano) ou dos asiáticos (6 a 8 kg/pessoa/ano), os fungos comestíveis representam uma alternativa promissora para contribuir com as mudanças nos padrões mundiais de consumo de alimentos e o mercado de produção de cogumelos no Brasil tende a continuar crescendo ano após ano. Tanto no consumo *in natura* como na forma de suplementos ou incorporados a outros alimentos, a biomassa fúngica pode proporcionar fonte ótima de proteína, vitaminas, minerais, antioxidantes e fibras dietéticas como quitina e beta glucana ^[14, 15]. As proteínas alternativas usando o micélio já é uma realidade no mercado e segue sendo muito estudado, já que possui um sabor agradável, boa textura, é de fácil obtenção, entre outras vantagens quando comparado a obtenção de proteínas vegetais. Desta forma o estudo das propriedades físico-tecnológicas, de suas características, perfil nutricional, para avaliar este micélio como possível aditivo alimentar, são importantes para a aplicabilidade dos fungos com esse interesse.

Materiais e métodos

Fungo, manutenção e cultura

Pleurotus sp., isolado disponível no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos do DBQ/UEM. O fungo foi cultivado em meio contendo ágar extrato de malte e farelo de trigo, ambos a 2% (p/v). As placas permaneceram em estufa a 28 ± 30 °C por até 10 dias. As placas completamente colonizadas foram mantidas em geladeira e utilizadas por no máximo até 30 dias.

Obtenção da biomassa

Para obtenção de biomassa, discos de micélio (1cm Ø), obtidos de uma placa colonizada com o fungo, foram obtidos com auxílio de um tubo de ensaio e inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo meio semissólido de farelo de trigo (5g) com 80 mL de solução mineral, elaborado considerando experimentos prévios do laboratório. Frascos contendo o mesmo meio serviram de controle abiótico. Todo material utilizado foi esterilizado em autoclave. Após a incubação por 14 dias a biomassa foi retirada com uma espátula, lavada com água destilada estéril e seca a 45 °C em estufa com circulação de ar. O material restante nos frascos, foi filtrado à vácuo e o filtrado centrifugado e armazenado para análises posteriores. A biomassa seca foi pesada para analisar seu rendimento de acordo com a seguinte equação:

$$Rendimento (\%) = \frac{Biomassa\ seca(g)}{Substrato\ seco\ (g)} \times 100$$

A biomassa seca foi processada em moinho de bolas até a obtenção de um pó fino e armazenada em sacos plásticos fechados no freezer até o uso.

Caracterização do micélio

Análise Centesimal (Teor de umidade, lipídios, proteínas, cinzas, fibra bruta e carboidratos)

Todos os ensaios foram determinados de acordo com os métodos clássicos descritos na AOAC (1984) ^[16]. Os carboidratos foram determinados pela diferença entre 100% e os teores de umidade, cinzas, lipídios, proteínas e fibra bruta.

Intumescimento

O poder de intumescimento do micélio foi determinado de acordo com o método descrito por Kusumayanti et al. ^[17]: 0,1 g de micélio moído foi aquecido em 10 ml de água destilada em um banho-maria com agitação a 60 °C por 30 min, a amostra foi resfriada em água da torneira por 5 min e centrifugada a 1600 RPM por 15 minutos. O poder de intumescimento foi expresso como a razão entre o peso do sedimento úmido e o peso seco da amostra (peso úmido(g)/peso seco(g)).

Solubilidade em água

A solubilidade em água foi determinada como descrito por Kusumayanti et al. ^[17] como segue: 0,5 g de micélio em pó foi aquecido em 10 ml de destilada em banho maria a 60 °C por 30 minutos sem agitação. A amostra foi centrifugada a 1600 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi separado (5mL), seco e pesado. A porcentagem de solubilidade foi calculada pela relação entre o peso do micélio solúvel em água e o micélio seco.

Capacidade de ligação de gordura

O micélio foi testado quanto à capacidade de ligação à gordura. O teste foi realizado de acordo com Lin e Humbert ^[18] como segue: 0,2 g da amostra foi dispersa em óleo de soja (10 ml). A

mistura ficou em repouso à temperatura ambiente por 1 h e agitada em vórtex a cada 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 3000 RPM por 20 min e o sobrenadante descartado, o resíduo foi pesado. O teor de ligação da gordura foi obtido a partir da quantidade de óleo de soja ligada a 1 g de amostra seca.

Atividade e estabilidade emulsificante

A atividade e estabilidade emulsificante foi realizada de acordo com Yasumatsu et al. ^[19] com pequenas modificações. Para este teste foram preparadas duas baterias de tubos (previamente pesados): A primeira parte usou 1g de micélio + 12,5 mL de água e foi homogeneizada em vórtex por 30s, então adicionou-se 12,5 mL de óleo de soja e novamente foi feita a homogeneização por 1 minuto. Para avaliar a atividade emulsificante, a mistura foi centrifugada a 3000 RPM/10 minutos, a atividade emulsificante foi obtida pela seguinte equação:

$$Atividade (\%) = \frac{\text{peso emulsão}}{\text{peso total do tubo}} \times 100$$

Para analisar a estabilidade, a emulsão foi aquecida a 80°C/30 minutos e resfriada na torneira, centrifugada como na análise anterior e feito o cálculo de forma similar ao da equação anterior.

Aveia, fubá e goma xantana foram caracterizados pelos mesmos testes para comparação.

Ligação a corantes artificiais e naturais

O micélio seco foi usado de maneira semelhante à técnica de Maciel et al. ^[20]. Em frascos Erlenmeyer de 125 mL, uma quantidade fixa de 250 mg de biomassa foi misturada com 20 mL da solução do corante alimentício vermelho 40 (35 mg/L), do corante tartrazina com a mesma concentração, da solução de cúrcuma e de beterraba. Para obtenção das soluções coloridas dos corantes alimentícios, 3g de pó da beterraba e 1g de cúrcuma em pó foram dissolvidos em água destilada e depois filtrados. O pH das soluções foi corrigido para 6,0 com tampão McIlvaine. A mistura foi submetida a agitação a 90 rpm, no escuro, por 6 horas, a temperatura ambiente. Para analisar a adsorção dos corantes no micélio, foi feita a espectroscopia de varredura entre 400 e 600 nm e coletadas as absorbâncias das amostras. A porcentagem de ligação foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$Ligação (\%) = \frac{Abs\ controle - Abs\ amostra}{Abs\ controle} \times 100$$

Digestão simulada de proteínas

A digestão simulada foi realizada de acordo com a técnica descrita por Koehnlein et al.,^[21] com alterações. O cálculo da bioacessibilidade de proteínas foi feito seguindo a seguinte equação:

$$B(\%) = \frac{proteína\ pós-digestão}{proteína\ inicial} \times 100$$

Teste de toxicidade com levedura

Os ensaios de toxicidade com *Saccharomyces cerevisiae* foram realizados conforme a metodologia de Dolezalova & Rumlova^[22], que se baseia na inibição da viabilidade de *S. cerevisiae* em condições tóxicas. Resumidamente, 0,1 g de levedura de panificação liofilizada foi suspenso em 10 ml do micélio em pó dissolvido em água destilada. As células viáveis e não viáveis foram contadas após a adição de uma solução de azul de metileno (0,01%) em tampão fosfato pH 4,6, utilizando-se microscópio digital acoplado a câmera de alta definição.

Ensaio prébiótico

A avaliação da atividade prebiótica foi realizada de acordo com Rubel et al.^[23] com modificações. O caldo MRS foi modificado para substituir a glicose pelo micélio (13g de caseína, 13g de extrato de carne, 5,2g de extrato de levedura, 2,6g de fosfato de potássio, 6,5g de acetato de sódio, 0,26g de sulfato de magnésio, 0,065g de sulfato de manganês, 1,404ml de Tween 80 para 1,3l). 300mL do caldo foi reservado para o meio líquido e o restante foi adicionado 16g de ágar para o preparo das placas. Para o caldo com glicose, a mesma receita foi seguida e adicionou-se 26g de glicose. Para testar a propriedade prebiótica, foram feitas soluções a 1% (p/v) de inulina, FOS, glicose e do micélio. Inulina e FOS foram usados como controles. As bactérias utilizadas foram *Lactobacillus brevis* – ATCC 36 (LB) e *Bacillus Coagulans* (isolado) (BCO) da coleção do Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos da UEM. A suspensão bacteriana foi ajustada na densidade óptica de 0,3 e inoculada à 1% (v/v) em tubos contendo 3 mL dos meios e, em seguida, incubadas à 37 °C, *overnight* (24-48h) em condições de microaerofilia e microanaerofilia.

A avaliação do crescimento das bactérias foi realizada pela técnica de *drop plate* (Reed e Reed)^[24] para contar as unidades formadoras de colônias (UFC) pela expressão:

$$UFC = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{inverso da diluição}}{\text{volume semeado (mL)}}$$

Teste microbiológico

O teste microbiológico do micélio processado foi realizado usando o ágar MacConkey (Kouaho)^[25]. Para o teste com o MacConkey estriamento em placas com divisória. Foram feitas duas soluções do micélio onde o micélio autoclavado serviu de controle. As placas foram incubadas a 30°C por 24h até 48h.

Obtenção do extrato hidroalcoólico do micélio

O extrato hidroalcoólico foi obtido segundo o método proposto por de Oliveira et al.^[26] com modificações. Uma porção de 5 gramas de biomassa foi misturada a 100 mL de etanol/água (30/70, $\frac{v}{v}$). O material foi filtrado, o resíduo recolhido e o processo repetido por duas vezes consecutivas, em agitação por 120 RPM em shaker a 28°C por 1 hora em cada extração. O extrato hidroalcoólico foi filtrado e concentrado por liofilização após total evaporação do etanol. O pulverizado obtido foi conservado em congelador para análises de compostos fenólicos e atividade antioxidante. A extração foi feita em triplicata.

Caracterização do extrato hidroalcoólico do micélio

Propriedade antioxidante, compostos fenólicos e proteínas solúveis

A propriedade antioxidante do extrato hidroalcoólico do micélio (1mg/mL) foi analisada de acordo com o descrito em Carvajal et al.^[12]. As amostras adequadamente diluídas (150 µL foram misturadas com 2,850 mL da solução do radical DPPH (0,1 mM). A mistura foi deixada por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro e posteriormente foi medida a absorbância a 515 nm. Água foi usada como controle negativo no lugar do extrato e BHT (0,02%) como controle positivo. A capacidade de sequestrar o radical DPPH foi calculada usando a seguinte equação:

$$DPPH (\%) = 1 - \left(\frac{Abs amostra}{Abs controle} \right) \times 100$$

Os compostos fenólicos solúveis foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão (WANG et al.) ^[27]. Proteínas solúveis das amostras foram mensuradas pelo método de Bradford (1976) ^[28], utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Açúcares totais e redutores

Os açúcares totais foram analisados pelo método da Antrona (Trevelyan e Harrison) ^[29]. Os carboidratos redutores foram quantificados pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller) ^[30].

Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e expressos como média e desvio padrão das amostras.

5. Resultados e discussão

Rendimento

De forma geral, cultivo sólido é o mais empregado na produção de produtos de interesse industrial como enzimas e demais bioativos, por necessitar de menor energia empregada, baixa produção de água residual e maior concentração de produtos. No entanto, não há como separar a biomassa dos fungos de seu substrato. O uso de um cultivo semissólido, contendo resíduos lignocelulósicos tem capacidade de estimular a produção de metabólitos que podem ser usados posteriormente, como enzimas, que têm potencial biotecnológico em diversas aplicações. O cultivo sólido tem baixa eficiência na transferência de massa e pode ocorrer inibição do substrato pelo alto teor de açúcares do meio e a fermentação em estado semissólido resolve estes problemas aumentando a quantidade de água e melhorando a disponibilidade de nutrientes no meio, isso faz com que aumente a produtividade e eficiência, seja mais simples e diminua a poluição comparada com métodos tradicionais ^[31]. Além de que este tipo de cultivo facilita a remoção da biomassa, pois ela cresce na superfície do meio, não aderida ao substrato e economiza energia por permanecer em estado estático. O material residual, caldo fermentado e resíduo sólido, ainda podem ter destino útil.

Após secar e pesar a biomassa de *Pleurotus* sp. o rendimento calculado resultou em $16,488 \pm 1,2$ g de peso seco/l de meio líquido de cultura. Estudos mostraram que o cultivo de *Pleurotus fabelatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus florida* em fermentação submersa obtiveram os seguintes resultados após 14 dias: 8,5 g peso seco/l; 4,50 g peso seco/l; 9,00 g peso seco/l; 10,39 g peso seco/l e 11,72 g peso seco/l respectivamente ^[32], desta forma depreende-se que a escolha do método de fermentação e do substrato utilizado influencia em seu rendimento, portanto é importante analisar previamente qual método a ser utilizado para obter resultados mais condizentes com o objetivo que se deseja atingir.

Análise centesimal

A análise centesimal dos alimentos, não é realizada apenas para a rotulagem nutricional, mas também para conhecer as quantidades dos principais componentes de um alimento, como os seus teores de carboidratos lipídeos e proteínas. Os resultados da análise centesimal do micélio de *Pleurotus* sp. e de outras espécies podem ser observados na tabela 1. Os dados obtidos para o micélio cultivado em meio semissólido indicam que a produção de biomassa por esse método pode ser bastante promissora, especialmente por seu potencial de escalabilidade. Isso se deve ao

fato de as características do micélio serem muito semelhantes às dos corpos de frutificação ou da biomassa obtida por fermentação submersa de espécies de *Pleurotus*.

A umidade obtida no experimento sendo de $10,65 \pm 0,06\%$ torna perceptível a semelhança que se obtém em *P. ostreatus* cultivado em cana de açúcar triturada, como em estudos da literatura ^[33], onde foi obtido $9,57 \pm 0,50\%$, indicando um menor risco de degradação microbiana quando armazenado, pois quanto maior a umidade, maior a atividade de água, além desta propriedade influenciar na textura e estabilidade quando incorporado em alimentos. Quando analisa-se a matéria seca, o resultado obtido foi de $89,35 \pm 0,06\%$ e o *P. ostreatus* foi de $90,43\%$, estes valores variam de acordo com a secagem da matriz e sua composição, e esta propriedade tem importância na conservação dos alimentos.

Os lipídios de *Pleurotus* sp. foram de $2,53 \pm 0,29\%$ e de *P. ostreatus* foi de $2,14 \pm 0,22\%$, muito comum em micélios, pois os cogumelos, em geral, apresentam uma baixa quantidade de gordura, variando entre 2 a 8% da massa seca do basidioma ^[34], sendo considerado um alimento *low fat*, o que muitos consumidores procuram adotar em suas dietas. A proteína bruta obtida foi de $29,55 \pm 0,11\%$ e a de *P. ostreatus* foi de $14,67\%$, mostrando-se uma excelente fonte proteica, considerando que *Pleurotus* sp. foi cultivado em farelo de trigo e *P. ostreatus* foi cultivado na cana-de-açúcar triturada, o meio de cultivo pode ter tido grande influência no perfil proteico desenvolvido pelo micélio, já que o farelo de trigo é muito proteico. A diminuição na quantidade de proteína de basidiomas, em cultivos sólidos com substratos lignocelulósicos, a partir da segunda frutificação, já foi relatada por outros pesquisadores.^[35]

As cinzas foram de $6,91 \pm 0,07\%$ e de *P. ostreatus* foi de $6,10 \pm 0,07\%$, bem comum em micélios indicando a presença de minerais, que é característico da espécie. A análise de fibra bruta obtida foi de $3,60 \pm 0,32\%$ e do basidioma de *P. djamor* cultivado na palha de bananeira foi de 22,43g/100 g no primeiro fluxo e 12,69g/100 g no segundo fluxo ^[35], dados que corroboram com a literatura já que o teor de fibras nos cogumelos, em geral varia de 3 a 32% em base seca ^[40] e este dado indica que o micélio possui capacidade funcional digestiva. O teor de carboidratos obtido, 46,76%, é característico das espécies de *Pleurotus* ^[36]. Os carboidratos são encontrados em grande quantidade, podendo variar de 16 a 85% em massa seca. Para *Pleurotus* spp., geralmente encontra-se um teor médio de 65,82% em base seca ^[15]. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura quando se observa as análises centesimais de *Pleurotus* spp. A quantidade de proteína presente em seu micélio é seu aspecto mais importante, sendo a quantidade encontrada na maioria dos *Pleurotus* spp., como encontrado na literatura. Na tabela 1 é possível encontrar vários dados de composição centesimal de espécies de *Pleurotus*. O micélio apresentou resultados positivos e ensaios como análise de cor vão poder colaborar para o enriquecimento de dados acerca do micélio. Além disso, considerando que estes testes foram

feitos para servir como base para o uso do micélio em alimentos, saber seu comportamento em alimentos é necessário, então também foram investigadas as propriedades físico-tecnológicas do micélio.

Tabela 1 - Resultados da Análise centesimal do micélio de *Pleurotus* sp e comparação com outras *Pleurotus* spp.

Parâmetro (%)	<i>Pleurotus</i> sp. micélio	<i>P. pulmonarius</i> micélio	<i>P. pulmonarius</i> basidioma	<i>P. pulmonarius</i> basidioma	<i>P. ostreatus</i> basidioma
Umidade	10,65 ± 0,06	-	-	-	10,89 ± 0,02
Matéria seca	89,35 ± 0,06	-	-	-	89,1 ± 0,0
Lipídios	2,53 ± 0,29	-	-	2,62 ± 0,43	1,27 ± 0,02
Proteína	29,55 ± 0,11	32 ± 1	31 ± 1	20,03 ± 0,04	21,36 ± 0,0
Cinzas	6,91 ± 0,07	5,6 ± 0,3	5,9 ± 0,4	7,33 ± 0,13	8,97 ± 0,70
Fibra bruta	3,60 ± 0,32	7,7 ± 0,1	8,0 ± 0,1	9,00 ± 0,001	18,89 ± 0,17
Carboidratos*	46,76	-	-	-	38,82
Cultivo	Semissólido ¹	Semissólido ²	Sólido ³	Sólido ⁴	Sólido ⁵
Referência	Autores	Contato <i>et al</i> [12]	Contato <i>et al</i> [12]	Clemente <i>et al</i> [42]	Sales-Campos <i>et al</i> [37]

*calculado por diferença entre os demais parâmetros

¹em farelo de trigo

²em casca de laranja

³mistura de materiais lignocelulósicos

⁴resíduo de algodão

⁵resíduo de árvore Simaruba

Intumescimento, solubilidade em água, capacidade de ligação à gordura e atividade e estabilidade emulsificante

Os dados obtidos na análise centesimal mostram o potencial do uso do micélio em alimentos, então as análises físico-tecnológicas foram feitas para explorar ainda mais seu potencial. As

propriedades físico-químicas/tecnológicas como intumescimento, solubilidade em água, capacidade de ligação à gordura e atividade e estabilidade emulsificante são importantes na indústria de alimentos. A forma como determinado ingrediente se comporta quando incorporado em um produto pode alterar sua validade, estabilidade, além de influenciar na sua textura. Considerando isto, é importante realizar a análise das propriedades físico-químicas do micélio, para saber como ele se comportaria em um alimento e auxiliar o direcionamento na produção de um futuro produto, os resultados estão na figura 1.

A capacidade de intumescimento (g/g) do micélio foi de $13,04 \pm 0,099$, maior do que as demais matrizes testadas, essa propriedade é muito importante, pois ela é capaz de aumentar o peso do produto final (gerando economia), dar a sensação de preenchimento e maciez na boca, o que auxilia na aceitação sensorial do alimento, a incorporação do micélio pode contribuir para isso. Na literatura ^[17] foi encontrado um intumescimento de 13,80 (g/g) na farinha de mandioca a partir deste dado e os dados observados nas matrizes testadas, é possível perceber que o valor obtido na análise do micélio se assemelha ao intumescimento da mandioca.

A solubilidade em água foi estimada através da razão entre o peso do micélio solúvel em água e o peso do micélio seco (%) com resultado de $38 \pm 1,2$ % para o micélio, solubilidade superior a da aveia foi (0%), do fubá (4,80 %) e da GX (1,93 %). É possível perceber que a solubilidade em água do micélio é consideravelmente maior que as demais matrizes. Portanto seu uso em um alimento deve ser avaliado quanto ao seu comportamento para que não haja comprometimento da estabilidade do mesmo. Considerando a aplicação em um líquido, é necessário que haja uma alta solubilidade, desta forma não haverá separação de fases e o micélio apresentou um resultado interessante que merece ser mais explorado. Elevada solubilidade em água pode indicar alta atividade de água, contribuindo para maior risco de contaminação microbiana e diminuição da estabilidade dos alimentos, porém, farinhas mais solúveis apresentam facilidade de mistura, capacidade de espessamento e maior absorção de água, o que resulta em texturas mais macias e maior rendimento ^[38], além de ser importante na aparência.

A capacidade de ligação à gordura foi maior que a das demais matrizes ($4,94 \pm 0,07$ g de micélio por g de óleo). Frente ao resultado obtido, o micélio apresenta bom potencial de reter suculência em análogos de carne, dispensando a necessidade de adição diversas de gomas e gorduras na formulação. Considerando a aplicação em um alimento funcional, a proporção utilizada na formulação deve ser avaliada, mas o micélio apresentou um bom resultado, sua incorporação irá agregar tanto sabor quanto auxílio na estrutura, além de reter os lipídios incorporados. Uma análise feita em farinha de linhaça e de farinha de aveia ^[38] resultou na média de 5,61 g entre elas, esta propriedade é muito importante na formulação de alimentos pois

influencia na textura do produto, confere palatabilidade, retenção de aromas e em produtos análogos a carne faz muita diferença na aceitação, pois se ela for muito baixa, o produto ficará seco e sem sabor, em produtos líquidos, ela evita que o óleo se separe.

Houve pouca diferença entre os valores de atividade e estabilidade emulsificante do micélio, $45,77 \pm 4,0\%$ e $48,6 \pm 2,5\%$, respectivamente, embora o aquecimento pareça tornar a emulsão ligeiramente mais estável. Considerando este resultado, o micélio pode ajudar na *shelf life*, quando incorporado em um produto e também na cremosidade, que é muito importante para formular maioneses, sorvetes, cremes e molhos de salada, por exemplo. As demais matrizes não apresentaram nem atividade nem estabilidade emulsificante. A avaliação deste parâmetro é importante na indústria alimentícia uma vez que a formação de emulsão estável, que não se separa em fases, garante textura, aparência e vida útil em molhos, cremes, sorvetes e laticínios comercializados.

A proteína de ervilha também é um ingrediente que vem tomando lugar na indústria de alimentos, sua composição centesimal e propriedades físico-tecnológicas têm mostrado o grande potencial deste ingrediente na formulação de alimentos. Ela é barata, sustentável, possui alta proteína e carboidratos complexos, baixo teor de gordura, rica em fibras e nutrientes, não possui gosto residual desagradável como a soja e possui ampla aplicação. Os dados do micélio de *Pleurotus* sp. apresentou um bom potencial, considerando os dados encontrados na literatura das propriedades da vagem de ervilha ^[39], o micélio se destaca em algumas propriedades, dessa forma ele pode ser utilizado como um substituto e também em conjunto com ela em alimentos.

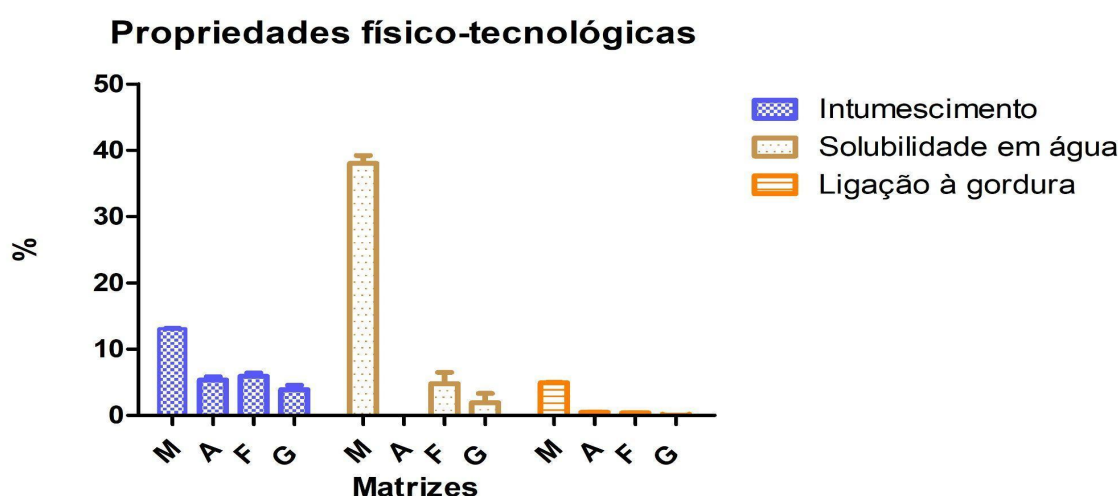


Figura 1: Propriedades físico-tecnológicas das matrizes testadas. M= micélio; A= aveia, F= fubá; G= goma xantana.

Ligação a corantes naturais e artificiais

Atualmente corantes artificiais têm sido rejeitados e o mercado de produtos *eco-friendly* tem proporcionado novas experiências funcionais e sensoriais com o uso de corantes naturais. Considerando esse aspecto, a avaliação da adsorção de corantes à matrizes alimentares fornece dados para aplicação destes compostos visando colorir sem riscos à saúde. A biomassa micelial de basidiomicetos é considerada um excelente adsorvente para uso em processos de biorremediação de águas poluídas. A possibilidade de apresentar uma biomassa colorida que possa ser usada na produção de alimentos ou substitutos coloridos de ingredientes na preparação de alimentos depende das características de adsorção do micélio e estrutura química dos corantes artificiais ou naturais. Geralmente branca ou amarelada, devido aos componentes do meio de cultura ou mesmo ao seu processamento, o micélio de *Pleurotus* sp. ligou-se aos corantes artificiais e naturais testados neste estudo.

A análise espectrofotométrica (Figura 2), mostrou que o micélio de *Pleurotus* sp. tem afinidade superior pelos pigmentos naturais da beterraba e da cúrcuma e conseguiu alta adsorção do corante Vermelho 40. Para estes, observou-se uma redução na absorbância das amostras em relação aos controles de mais de 80%. Quando observamos o corante artificial tartrazina demonstrou redução moderada (aproximadamente 40%), já o corante vermelho 40 apresentou uma adsorção de 89,2%, considerada alta como nos demais corantes. Foram desenvolvidas pesquisas para observar a capacidade de ligação de diferentes algas à eritrosina, um azocorante vermelho e os valores obtidos variaram de acordo com o tipo de alga, algumas com excelente capacidade de adsorção, mostrando sua capacidade bioassortiva ^[40]. A composição da parede celular de fungos é rica em quitina, quitosana e também glucanas, os grupos funcionais amina, hidroxila e carboxila atuam como sítios de ligação para corantes, além disso os fungos possuem uma grande versatilidade metabólica, secretam um eficiente complexo de enzimas extracelulares e por isso sua biomassa tem sido estudada como bioassorvente para tratamento de diversos efluentes, entre eles os corantes. Estudos de adsorção e bioassorção de corantes alimentícios, inclusive naturais, podem contribuir para a incorporação de uma biomassa colorida em novos alimentos, tornando-os mais atrativos visualmente e auxiliando no perfil nutricional.

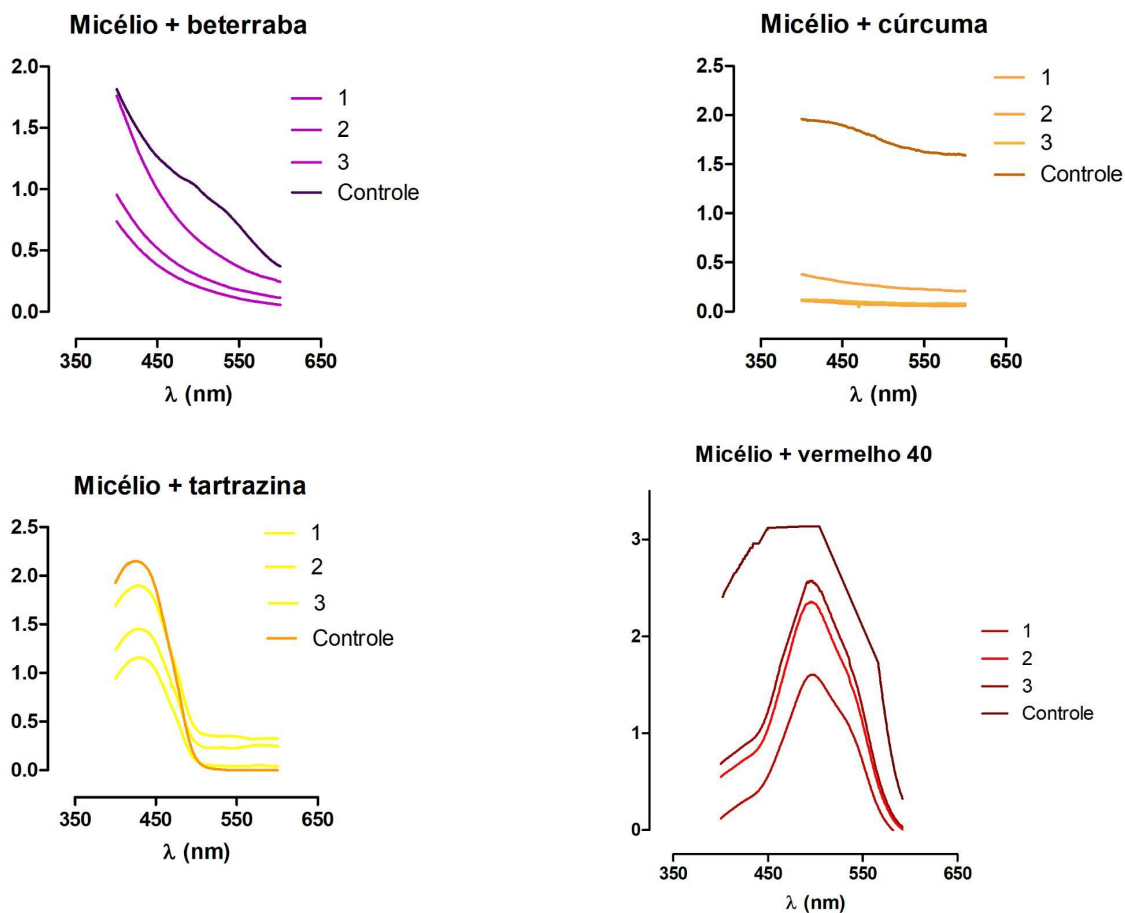


Figura 2: Análise espectrofotométrica de corantes adsorvidos pelo micélio de *Pleurotus* sp.

Teste de toxicidade celular

Para analisar a toxicidade do micélio, o teste foi realizado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os testes de toxicidade padrões normalmente são realizados com a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri*, o peixe *Brachy danio rerio*, a alga *Scenedesmus subspicatus* e os microcrustáceos *Daphnia magna* ou *Artemia salina*. Esses testes apresentam elevado custo e requerem um período de 24 a 96 horas para a obtenção dos resultados. Uma desvantagem adicional consiste na necessidade de reproduzi-los mantendo os organismos sob condições fisiológicas específicas, a fim de garantir o desenvolvimento adequado e possibilitar a obtenção de resultados satisfatórios ^[22]. O teste utilizado se baseia na habilidade do azul de metileno penetrar na membrana celular da levedura morta ou muito fraca e tingir os componentes da célula ^[41], a membrana celular das células vivas são impermeáveis ao azul de metileno e permanecem descoloridas, já as membranas das que são afetadas, se torna permeável e coram.

A análise temporal da viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* (anexo) na solução de micélio de *Pleurotus* sp. revelou uma progressão clara da toxicidade em função do tempo de exposição. O teste foi conduzido por 120 minutos, com intervalos de 15 minutos para alíquotar a amostra. Aos 30 minutos, observou-se o início da coloração das células pelo azul de metileno, sugerindo uma fase inicial de enfraquecimento celular, onde a membrana plasmática começou a perder sua impermeabilidade seletiva. Aos 60 minutos, o número de células coradas intensificou-se consideravelmente. Este intervalo coincide com o tempo de exposição padrão estabelecido para o cálculo do valor P (proporção entre células vivas e mortas), indicando uma redução significativa na viabilidade da população de leveduras. A partir dos 90 minutos, a toxicidade progrediu para o rompimento da membrana celular, evidenciando que o efeito citotóxico do agente testado (solução de micélio) evoluiu de uma alteração funcional na permeabilidade para um dano estrutural irreversível e letal.

A progressão da coloração observada corrobora o princípio do teste letal de *S. cerevisiae*, que se baseia na incapacidade de células mortas ou altamente enfraquecidas em excluir o corante azul de metileno. Enquanto as células vivas mantêm a membrana impermeável, a coloração gradual observada entre 30 e 60 minutos reflete a cinética de ação do toxicante sobre a integridade celular. O rompimento da membrana observado aos 90 minutos demonstra que a exposição prolongada supera a resistência basal da levedura, confirmando a eficácia do método em detectar substâncias que comprometem a estrutura celular.

Não foram encontrados testes de toxicidade com levedura analisando o potencial tóxico de micélios na literatura, porém há estudos que demonstraram a queda da toxicidade do extrato aquoso obtido do cogumelo cozido de *P. ostreatoroseus* em células Vero ^[6]. Testes realizados com o extrato aquoso de *P. ostreatus* não resultaram em nenhuma toxicidade em linfócitos periféricos do sangue ^[42]. As espécies de *Pleurotus* são consideradas seguras para consumo mesmo que algumas possam conter proteínas hemolíticas (ostreolisina A/ pleurotilisina B) que se consumidas em grandes quantidades podem causar problemas cardiovasculares, mas como são proteínas, são desnaturadas durante o cozimento dos cogumelos de *P. ostreatus*.

Ensaio prebiótico

Prebióticos podem ser definidos como um ingrediente alimentar não viável metabolizado seletivamente por bactérias intestinais benéficas ^[43]. Os benefícios dos prebióticos na saúde podem ser obtidos incorporando-os em produtos nutracêuticos e alimentos funcionais e visto que

os prebióticos têm importante papel biológico na saúde intestinal, foi feita a análise do potencial prebiótico do micélio de *P. ostreatoroseus*. A análise da formação de colônias foi realizada por *drop plate*. Nesta técnica foram colocadas 2 gotas de 10 uL de acordo com cada diluição (10^{-1} até 10^{-8}) feita previamente e a partir disso, foram contadas as colônias formadas em cada uma das gotas e foi feito o cálculo de UFC.

Usando FOS e inulina como os prebióticos padrão, o micélio apresentou na maioria dos ensaios, contagens de UFC/mL inferiores ao FOS e inulina. Tomando como principal exemplo, a condição BCO Anaerobiose (que simula as condições do intestino), houve bom crescimento das bactérias nos indutores testados ($1,43 \times 10^{12}$ UFC/ml da inulina, $8,11 \times 10^{11}$ UFC/ml do FOS e $1,8 \times 10^{11}$ UFC/ml do micélio), uma vez que títulos acima de 10^{12} UFC/ml são desejáveis, o micélio apresentou um resultado interessante. Portanto o micélio pode possuir capacidade de suporte ao crescimento, mas nas condições avaliadas aparenta ser menos eficiente que os prebióticos comerciais testados.

Considerando o ambiente anaeróbico e com glicose no meio, o micélio apresentou maior crescimento da bactéria BCO do que da LB (1×10^9 UFC/ml e $1,8 \times 10^{11}$ UFC/ml, respectivamente). Quando observa-se os resultados do meio de cultura com glicose, o micélio não apresentou grande desenvolvimento de crescimento comparado ao meio sem glicose. Isso pode sugerir que as bactérias testadas não têm a mesma facilidade enzimática para degradar os polissacarídeos do micélio (elas podem precisar de um tempo de adaptação maior para degradar as paredes celulares do fungo) quanto tem para fermentar o FOS ou a inulina pura.

Mediante a estes resultados, pode-se observar que o micélio apresenta um potencial moderado, ele consegue sustentar populações bacterianas em altos níveis (10^{10} e 10^{11}) provando que ele serve como fonte de carbono para o metabolismo das bactérias probióticas. Além disso, o micélio mostrou resultados constantes entre 24h e 48h, o que pode indicar uma fermentação mais lenta e gradual deste substrato. E essa característica é positiva para prebióticos, pois evita a produção súbita de gases no intestino, que causam desconforto abdominal.

Então, embora o micélio tenha apresentado uma contagem de UFC/ml inferior aos prebióticos comerciais (FOS e Inulina), ele demonstrou capacidade de manter populações bacterianas em densidades elevadas ($> 10^{10}$) caracterizando-se como um substrato fermentável com potencial de liberação lenta, o que pode mitigar efeitos colaterais comuns de probióticos de rápida fermentação.

Teste microbiológico

A ingestão de alimentos contaminados confere um grave risco à saúde dos consumidores, podendo haver vários tipos de infecções microbianas ou intoxicações causadas por toxinas produzidas por esses microrganismos ^[44]. Solução de micélio estéril e não estéril, foi semeada em meio MacConkey. O teste conduzido no ágar MacConkey, com o micélio autoclavado, nas primeiras 24h não apresentou contaminações, ao contrário do micélio não estéril que apresentou contaminação. Observações realizadas após 48h, resultaram nas mesmas condições observadas em 24 horas. A contaminação observada na semeadura do micélio não autoclavado de colônias com coloração rosa no meio ágar MacConkey nos leva a creditar a presença de enterobactérias em decorrência da manipulação durante o processo não sendo identificados microrganismos patogênicos. Com isso, visando a incorporação do micélio na formulação de alimentos, é necessário que haja uma manipulação adequada durante o processo de produção da biomassa.

Propriedade antioxidante e composição do extrato hidroalcoólico do micélio de *Pleurotus* sp.

Um antioxidante é uma substância capaz de neutralizar a ação de radicais livres. Recentemente a procura de alimentos que contenham propriedades antioxidantes tem sido intensa devido à mudança de hábitos alimentares da população mundial frente às doenças não transmissíveis. Para atenuação dos problemas causados pelos radicais livres, o emprego de antioxidantes exógenos presentes em alimentos de origem vegetal e cogumelos têm sido uma ótima opção.

A quantidade de compostos fenólicos encontrada no extrato hidroalcoólico do micélio (1 mg de extrato seco/mL) de *Pleurotus* sp. foi de $10,15 \pm 0,072$ µg/mL de equivalentes de ácido gálico (EAG) com uma atividade antioxidante sobre o radical DPPH de apenas 4%. Houveram estudos que avaliaram extratos hidroalcoólicos do micélio do isolado de *P. ostreatoroseus*, produzido em fermentação submersa, e obtiveram baixas concentrações de compostos fenólicos, porém o EC50 do extrato etanólico do micélio foi $15,62 \pm 0,13$ mg/mL de extrato sobre o DPPH ^[45], assim como há estudos que mostraram que a habilidade do extrato de micélio de *Pleurotus pulmonarius* de agir sobre o radical DPPH, na concentração de 5mg/ml foi de 67% comparada ao corpo de frutificação, com 77% a uma concentração de 1mg/mL de extrato ^[10]. Outros relatos na literatura, com a espécie de *Pleurotus citrinipileatus*, revelam menores atividades dos extratos

tanto do micélio como do basidioma deste cogumelo ^[46]. Considerando dados da literatura, outros testes de atividade antioxidante devem ser feitos para explorar melhor estas propriedades de *Pleurotus sp.*. Os compostos fenólicos, em sua grande maioria, são responsáveis pela atividade antioxidante encontradas em extratos de cogumelos, porém a atividade antioxidante sobre diferentes radicais pode apresentar ou não uma correlação positiva com os compostos fenólicos, dependendo da quantidade de fenólicos presentes no extrato, do tipo de radical testado e da presença de outros compostos.

Carboidratos totais, açúcares redutores e proteínas solúveis no extrato hidroalcoólico de *Pleurotus sp.*

Quando foi analisado os açúcares totais no extrato hidroalcoólico de *Pleurotus sp.*, o resultado obtido foi de $5170 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$, $1128,6 \text{ g/mL} \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ no teste de açúcares redutores e $152,9 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$ de proteínas solúveis. As mesmas análises foram realizadas no extrato aquoso de *P. ostreatus*, encontrou $37,11 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de carboidratos totais (usando o teste fenol-sulfúrico), $3,72 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$ de açúcares redutores e $1,24 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas solúveis ^[47]. Com isso, vemos que os dados corroboram com as características encontradas em espécies de *Pleurotus*.

Digestão simulada

Modelos de digestão que consigam mimetizar o trato gastrointestinal são importantes ferramentas para realizar estudos mais aprofundados. Deste modo, os métodos *in vitro* são amplamente empregados pelos grupos de pesquisa, devido ao menor custo, adaptabilidade, fácil manipulação, maior controle de cada etapa, rapidez e por não envolver o conselho de ética ^[48].

Considerando que o micélio de *Pleurotus sp.* tem um grande teor de proteína e sabendo da importância da proteína na alimentação, foi feita a análise de proteína do micélio após a digestão simulada para analisar sua bioacessibilidade. A proteína bruta resultante foi de $20,66 \pm 0,43 \%$ e a determinação de nitrogênio total foi de $3,31 \pm 0,07\%$, considerando o teor de proteína bruta do micélio antes da digestão, houve uma redução de 8,89%. Esta redução observada reflete uma bioacessibilidade de aproximadamente 70%, esta redução no valor absoluto mostra que a digestão simulada foi eficiente em liberar a maior parte da proteína, mas a parede celular do micélio agiu como uma barreira física e limitou a hidrólise total e a bioacessibilidade no ensaio *in vitro* e a redução de cerca de 30% na proteína disponível comprova isso. A dificuldade de

digestão é característica de matrizes fúngicas, onde a rede de quitina e β -glucanos da parede celular atua como uma barreira física, dificultando o acesso das proteases gástricas e pancreáticas às proteínas do micélio.

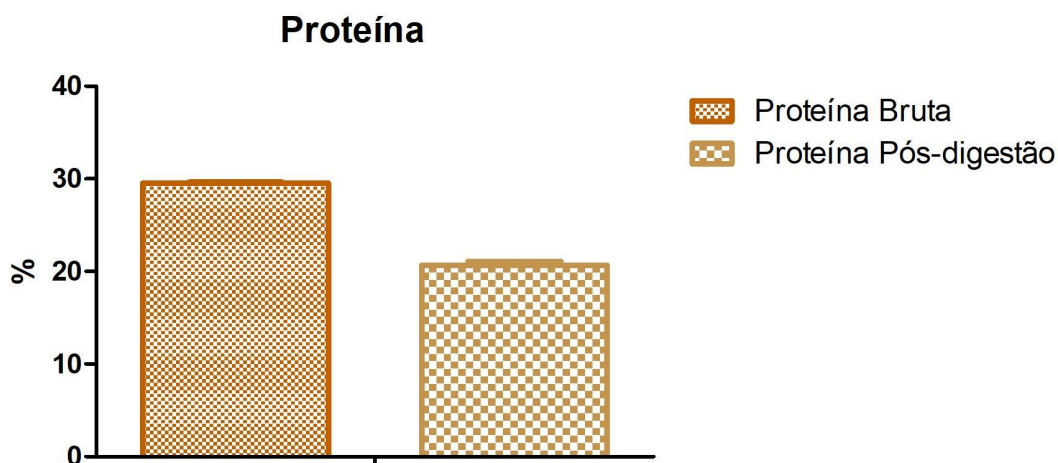


Figura 3: Bioacessibilidade da proteína

A importância da proteína nos alimentos vem se tornando foco de diversos estudos que foram e estão sendo desenvolvidos usando cogumelos como produtos cárneos análogos e também como um ingrediente para enriquecer alimentos nutricionalmente. Por conta do crescimento populacional que acompanha o aumento de consumo de carne há uma necessidade da obtenção de proteínas alternativas. Existem diversas iniciativas como a carne cultivada, mas ainda é preciso mais estudos sobre a sua viabilidade, então utilizar cogumelos para obtenção de proteína é uma alternativa mais viável, já que diversos cogumelos comestíveis tem sua caracterização já consolidada, alto teor de proteína e propriedades sensoriais já conhecidas e apreciadas. A estrutura dos corpos de frutificação cria uma textura similar a carne e existem produtos que já os utilizam como análogo cárneo como em salsichas e hambúrgueres, mas também há snacks, iogurtes e outros produtos que ao incorporar os cogumelos, confere a eles um perfil mais proteico.

Conclusão

Considerando os resultados obtidos, o *Pleurotus* sp. apresenta importantes propriedades. Ele tem propriedades biotecnológicas de interesse para a indústria e também propriedades de

interesse na indústria de alimentos. O crescimento do micélio em resíduo agroindustrial é uma estratégia eficiente, sustentável e escalonável. Embora a atividade antioxidante do extrato tenha sido baixa, outros testes precisam ser realizados para poder avaliar estas propriedades mais a fundo. Mudanças no tempo e tipo de substrato podem melhorar esse perfil. O ensaio prebiótico mostrou uma eficiência moderada, sustentando as bactérias probióticas com uma fermentação mais lenta e gradual, característica que pode ajudar no desconforto gástrico dos consumidores. O micélio de *Pleurotus* sp. mostrou capacidade biossortiva, reforçando seu potencial biotecnológico frente a corantes. As propriedades técnico-funcionais se mostram promissoras, com destaque ao intumescimento e capacidade de ligação à gordura, que interfere na palatabilidade e textura do alimento; sua atividade e estabilidade emulsificante é uma propriedade que pode auxiliar na formulação de produtos que necessitem uma melhor estabilização e fases e textura. Os resultados confirmam que o micélio possui um bom potencial de utilização na indústria de alimentos, caracterizando-se como uma boa fonte de proteína alternativa e de fibras, apresentando baixos teores de lipídios. A digestão simulada mostrou que o micélio apresenta uma bioacessibilidade de proteína alta. O micélio de *Pleurotus* sp. apresenta-se como um ingrediente versátil, seguro e nutritivo, com elevado potencial para a formulação de novos alimentos funcionais e análogos de carne, atendendo à crescente demanda global por proteínas sustentáveis e de baixo impacto ambiental.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa e pela concessão de bolsas de iniciação científica. Sarah de Oliveira Vicente agradece ao CNPQ pela bolsa de estudos através do Programa de pós-graduação em Bioquímica. Os autores agradecem a Universidade Estadual de Maringá e os laboratórios: Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos (LBM) e Laboratório de e Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos por auxiliar no desenvolvimento e realização dos experimentos.

Declaração de divulgação

Não houve conflitos de interesse entre os autores.

ORCID

S. O. Vicente: <https://orcid.org/0009-0006-9322-4901>

Referências

- [1] Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2001). *Biologia vegetal* (6ª ed.). Guanabara

Koogan.

- [2] Ng, T. B. (1998). A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *General Pharmacology: The Vascular System*, 30(1), 1–4. DOI: 10.1016/S0306-3623(97)00076-1
- [3] Raman, J., et al. (2021). Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An overview. *Mycobiology*, 49(1), 1–14. DOI: 10.1080/12298093.2020.1835142
- [4] Behera, S., & Gupta, N. (2015). Utilization of vegetable waste for biomass production of some wild edible mushroom cultures. *Tropical Plant Research*, 2(1), 5-9.
- [5] Bononi, V. L. R., Gimenes, L. J., Rojas, A. C. B. (2015) Produção de cogumelos e biotecnologia. *Simpósio Internacional de Cogumelos no Brasil*, v. 8, 96-109.
- [6] Brugnari, T., da Silva, P. H. A., Contato, A. G., Inácio, F. D., Nolli, M. M., Kato, C. G., ... & de Souza, C. G. M. (2018). Effects of cooking and in vitro digestion on antioxidant properties and cytotoxicity of the culinary-medicinal mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(3). DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025815
- [7] Kumar, K., Mehra, R., Guiné, R. P. F., Lima, M. J., Kumar, N., Kaushik, R., Ahmed, N., Yadav, A. N., & Kumar, H. (2021). Edible Mushrooms: A Comprehensive Review on Bioactive Compounds with Health Benefits and Processing Aspects. *Foods*, 10(12), 2996. DOI: 10.3390/foods10122996
- [8] Bains, A., Chawla, P., Kaur, S., Najda, A., Fogarasi, M., & Fogarasi, S. (2021). Bioactives from Mushroom: Health Attributes and Food Industry Applications. *Materials*, 14(24), 7640 DOI: 10.3390/ma14247640
- [9] Panda, J., Nath, P. C., Mishra, A. K., Rustagi, S., Nayak, D., Blundell, R., & Mohanta, Y. K. (2025). Mushroom: an emerging source for next generation meat analogues. *Frontiers in Nutrition*, 12, 1638121. DOI: 10.3389/fnut.2025.1638121
- [10] Marino, R. H. (2007). Produtividade do *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. em função dos métodos de isolamento e produção de inoculantes. *Revista de Biologia Neotropical*, 4(1), 76–77.
- [11] Contato, A. G., Inácio, F. D., de Araújo, C. A. V., Brugnari, T., Maciel, G. M., Haminiuk, C.W. I., ... & de Souza, C. G. M. (2020). Comparison between the aqueous extracts of mycelium and basidioma of the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius*: chemical composition and

antioxidant analysis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 830-837. DOI: 10.1007/s11694-019-00331-0

[12] Rousta, N., et al. (2022). Production of fungal biomass from oat flour for the use as a nutritious food source. *NFS Journal*, 29, 8–15. DOI: 10.1016/j.nfs.2022.09.001

[13] Carvajal, A. E. S., Koehnlein, E. A., Soares, A. A., Eler, G. J., Nakashima, A. T., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2012). Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) and their antioxidant properties. *LWT-Food Science and technology*, 46(2), 493-499. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.11.018

[14] Furlani, R. P. Z., & Godoy, H. T. (2007). Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1), 154–157. DOI: 10.1590/S0101-20612007000100027

[15] Junior, E. S. dos R., dos Reis, A. R. M., de Queiroz, T. C., Quichaba, M. B., & Marcela Funaki dos Reis, M. F. dos R. (2021). Composição Química, Efeito Antioxidante e Antiproliferativo Do Cogumelo Brasileiro *Pleurotus Ostreatoroseus* Singer / Chemical Composition, Antioxidant And Anti Proliferative Effect Of Brazilian Mushroom *Pleurotus Ostreatoroseus* Singer. *Brazilian Journal of Development*, 7(4), 34642–34656. DOI: 10.34117/bjdv7n4-089 14DOI: 10.1016/j.proenv.2015.01.025

[16] AOAC - Association of Official Agricultural Chemists. *Official Methods of analysis of AOAC International*. 14 th. ED. Washington D.C.: AOAC, 1984.

[17] Kusumayanti, H., Handayani, N. A., & Santosa, H. (2015). Swelling power and water solubility of cassava and sweet potatoes flour. *Procedia Environmental Sciences*, 23, 164–167.

[18] Lin, M. J. Y., & Humbert, E. S. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, 39(2), 368–370. DOI:10.1111/j.1365-2621.1974.tb02896.x

[19] Yasumatsu, K., et al. (1972). Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(5), 719–727. DOI: 10.1080/00021369.1972.10860321

[20] Maciel, G. M., de Souza, C. G. M., de Araújo, C. A. V., Bona, E., Haminiuk, C. W. I., Castoldi, R., ... & Peralta, R. M. (2013). Biosorption of herbicide picloram from aqueous solutions by live and heat-treated biomasses of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Trametes* sp. *Chemical Engineering Journal*, 215, 331-338. DOI: 10.1016/j.cej.2012.09.127

[21] Koehnlein, E. A., et al. (2016). Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: Effects of a simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(6), 614–623. DOI:10.1080/09637486.2016.1186156

- [22] Dolezalova, J., & Rumlova, L. (2014). A new biological test of water toxicity – yeast *Saccharomyces cerevisiae* conductometric test. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(3), 977–981. DOI: 10.1016/j.etap.2014.10.009
- [23] Rubel, I. A., Pérez, E. E., Genovese, D. B., & Manrique, G. D. (2014). In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. *Food Research International*, 62, 59-65. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.02.024
- [24] Reed, R. W., & Reed, G. B. (1948). "Drop plate" method of counting viable bacteria. *Canadian Journal of Research*, 26(6), 317–326. DOI: 10.1139/cjr48e-020
- [25] Kouaho, F. H., Toure, A., Gouro, A. S., Hulea, A., Gragnon, G. B., & Herman, V. (2023). Antibiotic Sensitivity of Pathogenic Bacteria Associated with Subclinical Mastitis of Dairy Cows in the Poro Region of the Ivory Coast. *European Journal of Nutrition and Food Safety*. DOI: 10.9734/EJNFS/2023/v15i121369
- [26] De Oliveira, A. L., Eler, G. J., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2010). Purinergic effects of a hydroalcoholic *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) extract on liver functions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(12), 7202-7210. DOI: 10.1021/jf100804k
- [27] Wang, L., Bei, Q., Wu, Y., Liao, W., & Wu, Z. (2017). Characterization of soluble and insoluble-bound polyphenols from *Psidium guajava* L. leaves co-fermented with *Monascus anka* and *Bacillus* sp. and their bio-activities. *Journal of Functional Foods*, 32, 149-159. DOI: 10.1016/j.jff.2017.02.029
- [28] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- [29] Trevelyan, W. E., & Harrison, J. S. (1952). Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochemical Journal*, 50(3), 298. DOI: 10.1042/bj0500298
- [30] Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030
- [31] Eldadamony, N. M., Ghoniem, A. A., Al-Askar, A. A., Attia, A. A., El-Hersh, M. S., Elattar, K. M., ... & Saber, W. I. (2024). Optimization of pullulan production by *Aureobasidium pullulans* using semi-solid-state fermentation and artificial neural networks: characterization and antibacterial activity of pullulan impregnated with Ag-TiO₂ nanocomposite. *International*

Journal of Biological Macromolecules, 269, 132109. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.132109

[32] Maziero, R., Cavazzoni, V., & Bononi, V. L. R. (1999). Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiologia*, 30(1), 77–84. DOI: 10.1590/S0001-37141999000100015

[33] Sales-Campos, C., et al. (2011). Physiochemical analysis and centesimal composition of *Pleurotus ostreatus* mushroom grown in residues from the Amazon. *Food Science and Technology*, 31(2), 456–461. DOI: 10.1590/S0101-20612011000200027

[34] Sturion, G. L., & Oetterer, M. (1995). Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.) originados de cultivos em diferentes substratos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 15(2), 189–193.

[35] Rampinelli, J. R., Silveira, M. L. L., Gern, R. M. M., Furlan, A. S., Ninow, J. L., & Wisbeck, E. (2010). Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. *Alimentos e Nutrição*, 21(2), 197-202.

[36] Bernaś, E., Jaworska, G., & Lisiewska, Z. (2006). Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 5(1), 5-20

[37] Chandra, S., Singh, S., & Kumari, D. (2015). Evaluation of functional properties of composite flours and sensorial attributes of composite flour biscuits. *Journal of food science and technology*, 52(6), 3681–3688. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1427-2>

[38] Nornberg, F. R., Vitória, P. S., Pereira, C., do Canto, N. E., Souza, M. T., Helbig, E. (2013). Capacidade de ligação com a gordura da farinha de linhaça e farinha de aveia.

[39] Kumari, T., & Deka, S. C. (2021). Potential health benefits of garden pea seeds and pods: A review. *Legume science*, 3(2), e82.

[40] Suzuki, T., Ohsugi, Y., Yoshie, Y., Shirai, T., & Hirano, T. (1996). Dietary fiber content, water-holding capacity and binding capacity of seaweeds. *Fisheries science*, 62(3), 454-461. DOI: 10.2331/fishsci.62.454

[41] Painting, K., & Kirsop, B. (1989). A quick method for estimating the percentage of viable cells in yeast population using methylene blue. DOI: 10.1007/BF01201311

[42] Abd-Alsaada, H. N., & Shafiq, S. A. (2023). Evaluation of Some the Cytotoxic Effects of Edible Mushroom Extracts *Pleurotus ostreatus*. DOI: 10.26505/djm.v25i2.1048

[43] Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best practice & research clinical*

gastroenterology, 18(2), 287-298. DOI: 10.1016/j.bpg.2003.10.008

[44] Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods*, 8(3), 92. DOI: 10.3390/foods8030092

[45] Corrêa, R. C. G., de Souza, A. H. P., Calhelha, R. C., Barros, L., Glamoclija, J., Sokovic, M., ... & Ferreira, I. C. (2015). Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer.

[46] Lee, Y. L., Huang, G. W., Liang, Z. C. & Mau, J. L. (2007). Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5), 823-833. DOI: 10.1016/j.lwt.2006.041.002

[47] Cruz-Solorio, A., Lara-Salinas, Y., Aguilar-Doroteo, L., Garín-Aguilar, M. E., & Valencia-del Toro, G. (2025). Characterization of an aqueous extract obtained from *Pleurotus ostreatus* protein concentrate by-product. *Agrociencia*, 1-12. DOI: 0.47163/agrociencia.v59i6.3119

[48] Cardoso, C., Afonso, C., Lourenço, H., Costa, S., & Nunes, M. L. (2015). Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 5-23. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.08.00

ANEXO

