A capacidade antioxidante da torta de linhaça aumenta pela biotransformação de *Rhizopus oligosporus*

The flaxseed pie antioxidant capacity increases by biotransformation of *Rhizopus oligosporus*

Anye Catharine Nora Drum
anye@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Paula Fernandes Montanher
paulamontanher@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Cristian Pedro Schu
cristianpschu@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.
Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

RESUMO

Muitos produtos industrializados contêm em suas composições antioxidantes sintéticos que atuam na preservação do alimento. A indústria procura por substitutos naturais para esses químicos. Derivado da extração do óleo vegetal da semente do linho, a torta de linhaça é um subproduto descartável, porém pode conter em sua matriz moléculas bioativas de alto valor nutritivo. O objetivo deste trabalho é implementar técnicas físicas, químicas e biológicas para o enriquecimento da torta de linhaça. Diante disso, usou-se o fungo *Rhizopus oligosporu*s como agente biológico fermentador em diferentes solventes (Água, Metanol PA, Etanol PA e Etanol 75%) e temperaturas (30,50 e 70°C).Através de três métodos analíticos quantitativos: DPPH, ABTS e fenólicos totais usando Folin Ciocalteau com padrão de Ácido Gálio. Houve alto desempenho com etanol 75% a 30°C, para o método DPPH, e para compostos fenólicos totais, na temperatura de 50°C e 70°C com solvente água. Os resultados sugeriram também que a torta fora melhorada pela ação do fungo, uma vez que no tempo de fermentação de 72 horas apresentou maior concentração de antioxidantes com 81,9 µmol equivalente a Trolox g^{-1}, pelo método DPPH, 23 % a mais que a torta de linhaça in natura e 10% pelo método de fenólicos totais.
PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes, Fermentação, Linaceae, Bioativos, sub-produto.

ABSTRACT

Many industrialized products contain synthetic antioxidants in their compositions that act in the preservation of food. The industry is looking for natural substitutes for these chemicals. Derived from the extraction of vegetable oil from flax seed, flaxseed cake is a disposable by-product, but it may contain bioactive molecules of high nutritional value in its matrix. The objective of this work is to implement physical, chemical and biological techniques to enrich flaxseed cake. Therefore, the fungus *Rhizopus oligosporu*s was used as a biological fermenting agent in different solvents (Water, Methanol PA, Ethanol PA and 75% Ethanol) and temperatures (30,50 and 70 °C). Through three quantitative analytical methods: DPPH, ABTS and total phenolics using Folin Ciocalteau with Gallium Acid pattern. There was high performance with 75% ethanol at 30 °C, for the DPPH method, and for total phenolic compounds, at a temperature of 50 °C and 70 °C with water solvent. The results suggested that the cake was improved by the action of the fungus, since in the fermentation time of 72 hours it presented a higher concentration of antioxidants with 81.9 µmol equivalent to Trolox g^{-1}, by the DPPH method, 23% more than the fresh flaxseed cake and 10% by the total phenolic method.

KEYWORDS: Flaxseed cake. Antioxidants. Biotransformation.

INTRODUÇÃO

Para auxiliar na manutenção da qualidade de produtos alimentícios encontrados no mercado, muitos fabricantes utilizam-se da adição de componentes químicos sintéticos que atuam na preservação do alimento, evitam a perda nutricional e queda da qualidade (FRANKEL,1998), como butylated hydroxyanisole (BHA) e butylated hydroxytoluene (BHT). Devido a alergias e intolerâncias, muitas pessoas procuram alternativas de produtos naturais e orgânicos, consideravelmente menos nocivos ao organismo. Nesse viés, muitas plantas contêm moléculas com efeitos anti-bacterianos, anti-virais e anti-inflamatórios, classe importante dessas são os bioativos antioxidantes naturais.

O processamento de sementes para a produção de óleos vegetais é uma das principais atividades econômicas no Brasil, sendo responsável pela geração de toneladas de resíduos agroindustriais que podem conter em sua matriz moléculas bioativas de alto valor nutritivo (WOICIECHOWSKIS,2010). Uma dessas sementes é a linhaça, rica em carotenoides, flavonoides e ácidos fenólicos. Após o processamento da matéria prima geram-se dois resultados: o produto final (o óleo) e a torta de linhaça, um subproduto descartado que por sua vez contém diversas dessas propriedades (RATZ & ARCT,2015). No presente estudo, usou-se métodos químicos e físicos para comparar a ação biológica do fungo *Rhizopus oligosporus* com os níveis de antioxidante da torta in natura .Esse gênero possui característica de serem facilmente cultivados em substrato lignocelulósico e liberarem elevadas quantidades de substâncias antioxidantes em diversas matrizes vegetais (HERNANDEZ,2017) não apresentando divergências para seu consumo.

Muitos métodos podem ser utilizados para a avalição desses antioxidantes. Neste trabalho utilizaram-se três: DPPH, ABTS e avaliação de fenólicos totais Folin-Ciocalteau usando o ácido gálio como padrão (MCDONALD,2001). Os dois primeiros são radicais livres em que são a captura das moléculas por antioxidantes, e consequente, transformação em moléculas mais estáveis, é medida pela espectrometria. Já com os compostos fenólicos, o número grupos potencialmente oxidáveis controla a cor formada. As moléculas reduzidas são azuis e as demais são amarelas. Estas últimas se decompõem vagarosamente em pH alcalino, o qual é necessário para a manutenção do fenol na forma de fenolato(ANGELO,2007).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a melhor forma de extração de compostos bioativos através da biotransformação da torta de linhaça, sendo possível um estudo futuro da viabilidade desse resíduo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a amostragem,a torta de linhaça utilizada foi fornecida pela empresa Pazze Indústria de Alimentos Ltda — produtora de óleo de linhaça localizada no município de Panambi, no Rio Grande do Sul. Utilizou-se 5 Kg do material. As amostras foram trituradas e peneiradas a 200 mesh e armazenadas no laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos.

Para a fermentação, uma cepa *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710, foi conservada em Erlenmeyer contendo meio sólido de ágar batata dextrose (PDA)..

Após o crescimento do micélio e formação dos esporos, adicionou-se água e esferas de vidro. Em seguida, realizou-se a homogeneização do conteúdo e posterior raspagem. A solução foi transferida para béqueres — anteriormente autoclavados — e efetuou-se a contagem dos esporos em câmera de Neubauer.

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sendo aplicado aproximadamente 4 g do substrato de torta de linhaça. Posteriormente, foi submetido a esterilização em autoclave por 15 minutos.

Ao meio de cultivo, foram inoculados 1 x 10^6esporos g^{-1} de substrato e adicionado a quantidade de água destilada para o ajuste da umidade. O meio de fermentação foi incubado em estufa tipo shaker à temperatura de 29 °C, durante 288 horas, sendo retiradas alíquotas de 4g de amostras a cada 24 horas.

Para o preparo dos extratos, utilizou-se os seguintes solventes: Água, Metanol PA, Etanol PA e Etanol 75%. As amostras foram pesadas e adicionou-se a elas os solventes em razão 1:10.

As amostras foram submetidas a extração em ultrassom (marca Cristofoli) em frequência e 42Hz, os extratos foram separados em 3 grupos onde cada grupo foi realizada a extração em uma temperada diferentes (30, 50 e 70°C). Cada extração foi realizada em triplicata no tempo de 15 minutos. Em seguida, foram centrifugados a 16.000 rpm por 5 min e o sobrenadante coletado.

Foram utilizados para determinação da atividade antioxidantes os métodos de DPPH (BRAND-WILLIANS et al.,1995), ABTS(Re et al., 1999), compostos fenólicos totais pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteau usando a curva padrão de ácido gálio segundo Mcdonald et al, 2001.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa Statistica® 8.0 (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2007). Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão [coeficiente de variação (%)] e o medidos utilizando análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey para os dados homogêneos, e foi considerado $p<0,05$ como critério de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Comparando-se os resultados obtidos pelas técnicas ABTS, DPPH e Compostos fenólicos, a Tabela 1 apresenta os valores de atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir da torta de linhaça in natura, em diferentes solventes e temperaturas.

Desta maneira podemos observar que não houve mudança significativa ($p>0,05$), nos extratos em metanol com diferentes temperaturas, obtendo-se um bom resultado de 18,4µmol Trolox/g não apresentando discrepância com as amostras em etanol 75% com 18,8 µmol Trolox/g— este por sua vez mostrou-se pouco alterado pela temperatura em ambas as análises.

Tabela 1 – Comparativo dos métodos utilizados medidos em µmol equivalente a Trolox por grama de matéria seca em DPPH E ABTS, e em mg equivalente a EAG por grama de matéria seca em Compostos fenólicos, da torta in natura.

Solventes	Temperaturas	DPPH	ABTS	Compostos Fenólicos
Água	30°C	14,1 ± 0,52a	8,18 ± 0,26b	1,53 ± 0,05c
	50°C	14,2 ± 0,36a	8,01 ± 1,31b	1,91 ± 0,04d
	70°C	13,2 ± 0,89 ab	9,11 ± 0,35b	1,97 ± 0,05d
Metanol	30°C	17,3 ± 0,85c	16,7 ± 0,47d	0,79 ± 0,01e
	50°C	18,4 ± 0,34cd	15,7 ± 0,42c	1,06 ± 0,01b
	70°C	18,4 ± 0,30cd	13,8 ± 0,34h	1,07 ± 0,01b
Etanol 75%	30°C	18,8 ± 1,44c	4,48 ± 0,48e	1,14 ± 0,01b
	50°C	13,8 ± 0,44a	5,76 ± 0,86f	1,62 ± 0,02c
	70°C	14,1 ± 0,30a	3,35 ± 0,42ª	1,55 ± 0,02c
Etanol PA	30°C	12,2 ± 0,23b	15,9 ± 0,36c	0,37 ± 0,01a
	50°C	13,9 ± 0,50A	15,2 ± 0,65c	0,45 ± 0,01a
	70°C	11,9 ± 0,56b	16,6 ± 0,01d	0,38 ± 0,02a

Fonte: Tabela elaborada pelo autor com dados retirados da dissertação de mestrado de Cristian Pedro Schu, Fermentação da torta de linhaça como estratégia para o enriquecimento nutricional e potencialização de atividade antioxidante.

Em análises de ABTS, o metanol também demonstrou um ótimo desempenho, com extração de 16,7 µmol Trolox g^{-1} em 30°C, porém não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) com o solvente Etanol PA a 70°C com 16,6 µmol equivalente a Trolox g^{-1}.

A linhaça é rica em substâncias conhecidas como: ácido hidrocinâmico, ácido pumárico, ácidos glicosídeos, ácidos ferulico e ligninas ligadas a substância secoisolaricirenol diclicosideo (JOHNSSON et al,2002) , que detém grande afinidade com o solvente metanoico devido ao fato de apresentar-se como um solvente prótico. Sendo assim, a matriz vegetal comporta variadas moléculas que podem ter afinidade com um solvente específico, como foi mostrado na comparação do metanol com os solventes etanoicos.

O alto desempenho da extração com etanol 75% a 30°C, para o método DPPH, pode estar ligada a presença das antocianinas, polifenóis que possuem potente atividade antioxidante com alta solubilidade em solventes hidrofílicos (NACZKA, SHAHIDI; 2004). Já em temperaturas maiores, pode haver a desnaturação desses compostos havendo perda da sua capacidade antioxidante (HARBORNE,BAXTER, MOSS;1999).

Já para o método de avaliação de compostos fenólicos totais, na temperatura de extração de 50°C e 70°C com solvente água, observou-se os maiores valores de 1,91 e 1,97 mg de EAG g^{-1}, pois a água também possui uma

afinidade em específico, com as moléculas polifenólicas encontradas na linhaça (MANNUCCI et al., 2019).

O processo fermentativo aumentou a concentração de compostos antioxidantes, de acordo com a Tabela 2. Como observado, no tempo de (72) horas, a concentração de antioxidantes chegou a 81,9 µmol a Trolox g $^{-1}$, em 70°C. Contudo,os tempos de fermentação (48, 72, 96,120) apresentaram maior concentração de antioxidante não apresentando diferença significativas entre si.

Tabela 2 – Comparativo dos métodos utilizados medidos em µmol equivalente a Trolox por grama de matéria seca em DPPH, e em mg equivalente a EAG por grama de matéria seca em Compostos fenólicos, da torta de linhaça fermentada.

Horas de fermentação	DPPH (µmol equivalente a Trolox g^{-1})	Compostos Fenólicos (mg equivalente a EAG g^{-1})
0	39,05±4,25ª	11,9 ± 0,30ª
24	43,6±1,70ª	14,1 ± 0,79bc
48	81,1±3,60 T	15,2 ± 0,44b
72	77,0±4,30ef	16,3 ± 0,88cd
96	77,0±3,4ef	17,0 ± 0,88cde
120	78,1±7,10ef	17,0 ± 1,07cde
144	71,7±4,30de	16,3 ± 0,39cd
168	71,1±2,9de	17,1 ± 1,13cde
192	67,7±6,5de	17,2 ± 0,77de
216	59,6±3,06bc	18,3 ± 0,80ef
240	64,0±6,5bc	18,5 ± 1,57ef
264	56,3± 3,06 b	19,2 ± 1,41f
288	56,1±3,8b	17,2 ± 0,74de

Fonte: Tabela elaborada pelo autor com dados retirados da dissertação de mestrado de Cristian Pedro Schu, Fermentação da torta de linhaça como estratégia para o enriquecimento nutricional e potencialização de atividade antioxidante.

Quando avaliada, a torta in natura apresentou grande potencial de compostos fenólicos, isso se deve ao fato de que durante o processo de esmagamento da semente de linhaça algumas pequenas quantidades de óleo ficam presentes na torta (OOMAH, B. D; MAZZA, G, 1998).

Como salientado anteriormente, em um processo de biotransformação, pode haver a presença de compostos antioxidantes “livres”, que estão entrelaçados na matriz vegetal. O desenvolvimento de alguns micro-organismos em processo de fermentação sólida detém a capacidade de produção de enzimas, que atuam nas quebras de substratos lignocelulósico (MARTINS, S. et al,2011). Assim, demonstrando a discrepância entre os resultados das tabelas ,

provou-se que a ação biológica do fungo *Rhizopus oligosporus* enriqueceu o conteúdo das amostras.

Nos dados demonstrados nas tabelas, podemos evidenciar que a fermentação foi um fator positivo, utilizando o solvente água em temperatura de 70°C, no tempo de fermentação de (72 horas) apresentou-se maior significância com ($p<0,05$), em maior concentração de antioxidantes com 81,9 µmol equivalente a Trolox g^{-1}.No entanto, para as técnicas de DPPH com da torta de linhaça in natura, teve sua maior concentração de antioxidantes com o solvente (Etanol 75%) eluido em água, com extração a temperatura de 30°C, apresentando apenas 18,8 µmol equivalente a Trolox g^{-1} . Desta forma o processo fermentativo apresentou 23% a mais de concentração de antioxidantes que a obtida com a extração da torta de linhaça in natura.

A ação de enzimas em conjunto à alta temperatura de 70°C e o ultrassom assistido sobre o material vegetal pode promover a liberação massiva de substâncias antioxidantes com ampla estabilidade térmica provocando a possível identificação pelo método DPPH.

Sendo assim, a intersecção dos efeitos físicos, químicos e biológicos consistiu em uma resposta positiva ao experimento, podendo ser elaborado novos métodos de extração a partir do trabalho realizado.

CONCLUSÕES

O fungo *Rhizopus oligosporus* se mostrou um agente biológicos para a transformação da biomassa, promovendo a liberação de antioxidantes a partir do consumo da matriz de fibras da planta em questão. Isso acarretou na liberação de compostos a partir da ação das enzimas liberadas pelo microrganismo.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial o campus Dois Vizinhos, pela oportunidade de ingressar na iniciação tecnológica e por toda a estrutura proporcionada. A minha orientadora Prof. Paula Fernandes Montanher, ao Mestre Cristian Pedro Schu, que foi o meu mentor durante o projeto.

REFERÊNCIAS

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** (Impr.), São Paulo, v. 66, n. 1, 2007 .

DENG, Q.; YU, X.; FANGLI, M.; XU, J.; HUANG, F.; QINADE, HUANG.; SENGH, F. Comparative analysis of the in-vitro antioxidante activity and bioactive compounds of flaxseed in China according to variety and geographical origin. **INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD PROPERTIES**, pp.15, 2018.

DULF, F. V; VODNAR, D. C; DULF, E. H; DIACONEASA, Z; SOCACIU, C. Liberation and recovery of phenolic antioxidants and lipids in chokeberry (Aronia melanocarpa) pomace by solid-state bioprocessing. **LWT - Food Science and Technology**, v.87, pp.241-249, 2018.

FRANKEL,E.. Lipid oxidation. **Dundee, UK: The Oily Press Google Scholar**.1998.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants. **ed.2 London: Taylor & Francis**; 1999.

HERNANDEZ, L. L.; RAMIREZ, C. T.; RUIZ, H. A.; ASCACIO, J. A.; GONZALEZ, M. A. A.; RODRIGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. Rhizopus oryzae – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. **International Journal of Food Microbiology**, p.1-73, 2017.

JOHNSSON, P; PEERLKAMP, N; KAMAL-ElDI, A; ANDERSSON, R. E; ANDERSSON, R; LUNDGREN, L. N; MAN, P. A. Polymeric fractions containing phenol glucosides in flaxseed. **Food Chemistry**, v.76, pp.207–212, 2002.

LÓPEZ-AALARCÓN,C.;DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**,763, 1–10, 2013.

MANNUCCI, A; CASTAGNA, A; SANTIN, M; SERRA, A; MELE, M; RANIERI, A. Quality of flaxseed oil cake under different storage conditions. **LWT - Food Science and Technology,** (2019).

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTINEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.;AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. **Biotechnology Advances**, v.29, p.365–373

MCDONALD, S; PRENZLER, P; ROBARDS, K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts**. Food Chemistry**, v.73, pp. 73-84, 2001.

NACZKA, M; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, pp.95–111, 2004.

OOMAH, B. D; MAZZA, G. Compositional changes during commercial processing of Flaxseed. **Industrial Crops and Products**, v.9, pp.29-37, 1998.

RATZ & ARCT. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Enzymatically Hydrolysed Cucurbita pepo and Linum usitatissimum Seedcakes. **Food Sci. Biotecnol**. V.24, pp.1789-1796, 2015.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F.. Óleos essenciais de uvaia (Eugenia pyriformis Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclet. Quím.**, São Paulo , v. 34, n. 3, p. 7-16, 2009 .

VODNAR, D. C; CALINOIU, L. F; DULF, F. V; STEFANESCU, B. E; CRISAN, G; OCACIU, C. Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. **Food Chemistry,** v.0, n.0 p. 131–140, 2017.

WOICIECHOWSKIS, A. C; CARVALHO, J. C; SPIER, M. R; HABU, H; YAMAGUISHI, C. T; GHIGG, V; SOCCOL, C. R. Emprego de resíduos agroindustriais em Bioprocessos alimentares. **Biotecnologia de alimentos**. Cap.6, pp.143-171,2010.12