

## Obtenção de antioxidantes a partir de processos fermentativos em torta de linhaça

## Obtaining antioxidants from fermentation processes in flaxseed cake

### RESUMO

Os alimentos têm sido motivo de constante investigação dada sua importância na saúde geral da população e a demanda pelos benefícios advindos de dietas enriquecidas tem crescido, a cada dia microbiologia tem se feito mais presente nessas demandas. Devido aos avanços tecnológicos a partir de processos fermentativos é possível obter muitos bioativos importantes para indústria, com matérias-primas de baixo valor comercial como a torta de linhaça. O presente estudo busca, dentro desse contexto, avaliar a capacidade de biotransformação da torta de linhaça utilizada na agroindústria, submetendo-a ao micro-organismo *Rhizopus oligosporus*, que possui a capacidade de liberar substâncias antioxidantes presentes na matriz vegetal e a partir de uma fermentação in vitro de 288 horas, retirando-se uma amostra a cada 24 horas, foi possível observar que a torta de linhaça fermentada apresenta uma concentração de compostos fenólicos relevantes. Contudo, para que este resultado seja mais expressivo e conclusivo, em pesquisa futuras uma nova cinética deve ser feita para confirmar o pico máximo de produção desses compostos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fermentação em estado sólido. Atividade antioxidante. Compostos fenólicos. Sementes de linhaça.

### ABSTRACT

Food has been the subject of constant research given its importance in the general health of the population and the demand for benefits from enriched diets has grown, with each day microbiology becoming more present in these demands. Due to technological advances from fermentation processes, it is possible to obtain many important bioactive agents for industry, with raw materials of low commercial value such as flaxseed cake. The present study seeks, within this context, to evaluate the biotransformation capacity of flaxseed cake used in agribusiness, submitting it to the microorganism *Rhizopus oligosporus*, which has the ability to release antioxidant substances present in the plant matrix and from fermentation in vitro of 288 hours, taking a sample every 24 hours, it was possible to observe that the fermented linseed cake has a concentration of relevant phenolic compounds. However, for this result to be more expressive and conclusive, in future research a new kinetics must be made to confirm the maximum production peak of these compounds.

**KEYWORDS:** Solid state fermentation. Antioxidant activity. Phenolic compounds. Flax seeds.

Ramon Barboza Miranda  
[ramonmiranda@alunos.utfpr.edu.br](mailto:ramonmiranda@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Maria Giovana Binder Pagnoncelli  
[giobinder@gmail.com](mailto:giobinder@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Fernanda Guilherme Prado  
[fernanda.gprado@outlook.com](mailto:fernanda.gprado@outlook.com)  
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 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.



## INTRODUÇÃO

Durante o metabolismo há diversas reações bioquímicas de oxirredução são responsáveis pela geração de radicais livres, que se não forem eliminados, podem causar danos celulares. Os antioxidantes são substâncias bioativas capazes de prevenir ou retardar essas reações de oxidação em cadeia, evitando prejudicar as células. Na natureza, uma grande variedade de compostos pode ser considerada antioxidantes, dentre eles os compostos fenólicos. Estes são capazes de capturar radicais livres devido à presença das hidroxilas fenólicas (ALACHAHER et al., 2018).

A torta de linhaça, gerada após o processo de extração dos óleos oriundos da semente, tem em sua composição quantidades consideráveis de proteína, lipídios, compostos fenólicos e antioxidantes, os quais estão intimamente ligados a outros constituintes da matriz (OOMAH & MAZZA; 1998, RATZ & ARCT, 2015). As tecnologias extrativas para a obtenção desses compostos desempenham um papel importante, uma vez que o podem levar a mudanças na composição das moléculas de interesse, acarretando a perda do potencial biológico. Gerando assim a necessidade da escolha do método baseada no rendimento, qualidade do produto, tempo de operação e custo (MOURA, 2013). Embora existam vários estudos na literatura sobre substâncias bioativas, não há um estudo que abrange o efeito de diferentes métodos e condições na extrativas e a influência da biotransformação da torta de linhaça devido a ação de micro-organismos.

Assim, o interesse na busca de antioxidantes efetivos em recursos naturais e estudos de técnicas de extração têm sido objeto de estudo de pesquisadores e desenvolvedores de produtos devido à crescente evidência de contribuições de compostos funcionais em uma variedade de propriedades benéficas para a saúde. Processos fermentativos têm se mostrado uma importante estratégia para aumentar biodisponibilidades dos antioxidantes no alimento (PRADO, 2020).

Nesse contexto, o presente estudo propõe avaliar a capacidade dos compostos bioativos e sua ação antioxidantes gerados a partir de um processo de biotransformação da torta de linhaça utilizando o fungo *Rhizopus oligosporus* a partir do processo de fermentação e investigar estratégias para a extração destes compostos.

## MATERIAL E MÉTODOS

A torta de linhaça utilizada para o processo fermentativo, foi doada por Christian Pedro Schu (UTFPR - Dois Vizinhos) e fornecida pela empresa (Pazze Indústria de Alimentos Ltda), produtora de óleo de linhaça, que está localizada no município de (Panambi) – RS.

Foi utilizada uma cepa de fungo do gênero *Rhizopus oligosporus*, cuja linhagem foi obtida de coleções de culturas dos bancos de cepas NRRL (Northern Regional Research Laboratory, Illinois – USA), e MUCL (Mycothèque de Université Catholique de Louvain, Bélgica) pertencente à micoteca do Laboratório do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná campus Centro Politécnico. A conservação desta cepa foi realizada em tubos inclinados contendo meio sólido de ágar batata dextrose (PDA).

A cultura repicada foi mantida em erlenmeyer a 30°C por 5 dias, e após, conservada a 4°C com repiques contínuos.

Após crescimento do micélio e formação dos esporos, adicionou-se  $\cong 13$  mL água deionizada esterilizada e tween 80 a 0,1% aos erlenmeyers para preparo da solução de esporos. Utilizou-se a câmara de Neubauer para contagem de esporos.

A torta de linhaça foi tratada termicamente sob vapor fluido a 100°C por 15 minutos. O excesso de água foi posteriormente removido e o substrato arrefecido à temperatura de inoculação de 30°C. O substrato tratado termicamente foi inoculado com  $10^7$  esporos  $g^{-1}$  de substrato seco. A fermentação foi conduzida em erlenmeyers a 30°C por 12 dias.

As amostras foram extraídas seguindo a proporção 1:25 (m/v) com água destilada. A mistura foi submetida a um triturador de alimentos. Os extratos foram centrifugados a 2268 xg por 15 minutos e os sobrenadantes transferidos para frascos estéreis e armazenados à 4°C para posterior análises. Todas as extrações foram feitas em triplicata.

A capacidade antioxidante dos extratos foi medida baseada na inibição do radical DPPH, conforme descrito por Brand-Williams et al 1995; BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & BERSET. Para a preparação do reagente foram dissolvidos 0,004 g de radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em 100 mL de metanol P. A. Para determinar o potencial de inibição, foram utilizados 250  $\mu$ L de cada concentração, adicionados a 1000  $\mu$ L do reagente de DPPH e incubados na ausência de luz durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida utilizando-se espectrofotômetro (Marca Wavelength, modelo SP-2000) à 517 nm. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras fermentadas. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Para o controle, foi utilizada a solução sem amostra, apenas com o solvente utilizado na extração (água). Soluções metanólicas de concentrações conhecidas de Trolox na faixa de 0 a 2000  $\mu$ mol  $L^{-1}$  foram usadas para calibração. Os resultados foram expressos como equivalentes em  $\mu$ mol de Trolox (ET)  $g^{-1}$ .

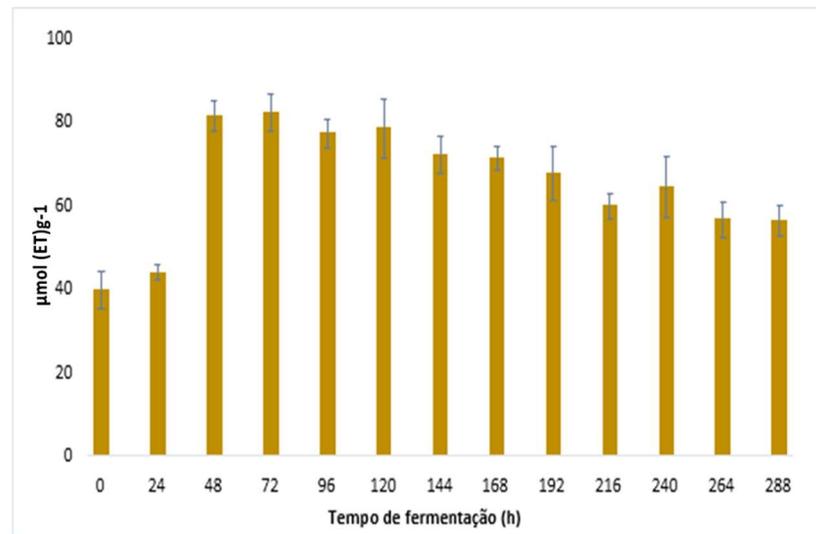
Uma solução padrão de ácido gálico foi preparada para construção da curva de calibração a partir de concentrações que variam de 5 a 50  $mg \cdot mL^{-1}$ . 0,5 mL de cada diluição a 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10 %) e mantido em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL de carbonato de potássio (4 %) e novamente mantido em repouso por 2 horas em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Marca Wavelength, modelo SP-2000) à 740 nm. Soluções metanólicas de concentrações conhecidas de ácido gálico na faixa de 0-250  $mg L^{-1}$  foram usadas para curva de calibração. Os resultados foram expressos como equivalentes em mg de ácido gálico (EAG)  $g^{-1}$ .

## RESULTADO E DISCUSSÕES

É crescente o interesse por produtos que apresentam ação antioxidante, como compostos fenólicos, uma vez que estes apresentam efeitos na proteção contra o estresse oxidativo de células (MALTA et al., 2012).

Os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), um padrão comercial com alto poder antioxidante, mostram que o maior resultado encontrado está nos tempos de 48 e 72 horas ( $81,18$  e  $81,96 \mu\text{m (ET) g}^{-1}$ , respectivamente), não apresentando uma diferença significativa ( $p>0,05$ ) (Figura 1).

Figura 1 - Potencial antioxidante ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) de extratos de torta de linhaça fermentada.

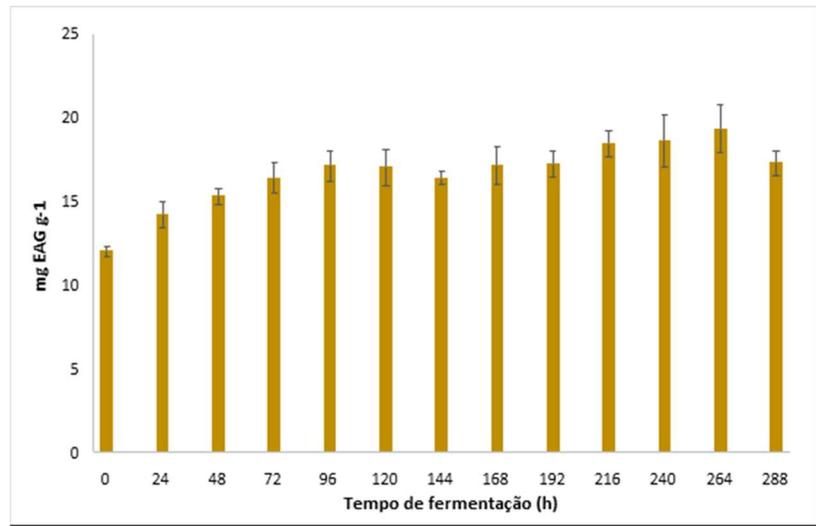


Fonte: Própria autoria, 2020

É possível observar um aumento de 1,87 vezes após o tempo de 24 horas de fermentação [ $43,67 \mu\text{m (ET) g}^{-1}$ ] para o tempo 72 horas. Após, é observado um declínio constante nos valores. Pode-se então afirmar, que o tempo de 72 horas é o pico máximo de ação antioxidante, visto que os demais tempos não diferem em 288 horas (12 dias).

Já os resultados expressos em equivalente de ácido gálico ( $\text{mg EAG g}^{-1}$ ), mostram que o melhor resultado encontrado está nos tempos de 72 e 96 horas ( $16,35$  e  $17,07 \text{ mg (EAG) g}^{-1}$ , respectivamente), não apresentando diferença significativa ( $p>0,05$ ) (Figura 2).

Figura 2 – Presença de compostos fenólicos ( $\text{mg EAG g}^{-1}$ ) de extratos de torta de linhaça em diferentes tempos de fermentação



FONTE: PRÓPRIA AUTORIA, 2020

O maior aumento expressado graficamente se após o início da fermentação sendo de 1,36 vezes após o tempo de 24 horas [4,37 mg (EAG) g<sup>-1</sup>] para o tempo 72 horas. Após, é possível observar uma flutuação pequena nos valores apresentados. Pode-se afirmar que o tempo de 264 horas é o pico máximo de ação antioxidante dessa cinética, porém visto que os tempos apresentam resultado similares e mais rápidos, o tempo de 72 horas é o mais relevante para essa análise.

### CONCLUSÃO

Este estudo foi interrompido por problemas de saúde agravados por um dos orientadores e devido a pandemia do novo coronavírus, provocando a suspensão das atividades presenciais. Pode se observar até o atual momento que essa cinética mostra que a torta de linhaça fermentada apresenta compostos fenólicos relevantes, em pesquisa futuras uma nova cinética deve ser feita para confirmar o pico máximo de produção desses compostos. Além, uma caracterização e pesquisa de outras propriedades bioativas devem ser feitas.

### AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná e à Universidade Federal do Paraná por disponibilizar em toda estrutura necessária para a realização desta pesquisa e a CNPq pelo apoio financeiro. Agradeço à prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Giovana Binder Pagnoncelli e a Doutoranda Fernanda Prado principalmente por toda a ajuda recebida.

### REFERÊNCIAS

Alachaher, F. Z.; Dali, S.; Dida, N.; Krouf, D. **Comparison of phytochemical and antioxidant properties of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum*) using different solvents.** International Food Research Journal, v.25, p. 75-82, 2018.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** LWT - Food Sci Technol 1995, 28, pp.25–30. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

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

Huang, D; Boxin, O; Prior, R. L. **The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.** J. Agric. Food Chem. v.53, pp.1841-1856, 2005.

Instituto Adolfo Lutz - IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** EPU: São Paulo, 2008. v. 1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), acesso no dia 03/07/2018. (<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/condor/pesquisa/14/10193>).

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

Mahata, M. B.; Shinya, S. A.; Masaki, E.; Yamamoto, T.; Ohnuma, T.; Brzezinski, R. C.; Mazunder, T. K. D.; Yamashita, K. D.; Narihiro, K. D.; Fukamizo, T. **Production of chitooligosaccharides from Rhizopus oligosporus NRRL2710 cells by chitosanase digestion.** Carbohydrate Research, v. 383, p.27- 33, 2014.

Malta, L. G.; Ghiraldini, F. G.; Reis, R.; Oliveira, M. V.; Silva, L. B.; Pastore, G. M. **In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals.** Food Research International, Essex, v. 49, n. 1, p. 604-611, 2012.

Moura. E. F; Rosa. M. S; Nascimento. I. C; Souza. A. M. S. **Estabilidade Física-Química e Microbiológica de Linhaça durante estocagem.** Revista UNI- RN, Natal, v.12, n.12 p.55-71, 2013.

Prado, F. G.; Miyaoka, M. F.; Pereira, G. V. M.; Soccol, C. R.; Pagnoncelli M. G. B.; Prado, M. R. M.; Bonatto, S. J. R.; Spier, M. R. **Fungal-Mediated Biotransformation of Soybean Supplemented with Different Cereal Grains into a Functional Compound with Antioxidant, Antiinflammatory and Antitumoral Activities.** Volume 11, Issue 1, 2021, 8018 – 8033. 2020.

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

Schu, C. P. **Fermentação da torta de linhaça como estratégia para o enriquecimento nutricional e potencialização de atividade antioxidante.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). **A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 76(2), 270-276.

WANG. H; WANG. J; YE. C. Q; GUO. X; CHEN. G; LI. T; WANG. Y; FU. X; LIU. H. R. **Comparison of Phytochemical Profiles and Health Benefits in Fiber and Oil Flaxseeds (Linum usitatissimum L.)** Food Chemistry, v.214, n.0, p.227-233, 2016.