

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC**

CRISTIAN PEDRO SCHU

**FERMENTAÇÃO DA TORTA DE LINHAÇA COMO ESTRATÉGIA PARA O
ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL E POTENCIALIZAÇÃO DE
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

DOIS VIZINHOS

2019

CRISTIAN PEDRO SCHU

**FERMENTAÇÃO DA TORTA DE LINHAÇA COMO ESTRATÉGIA PARA O
ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL E POTENCIALIZAÇÃO DE
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia - Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Giovana Binder Pagnoncelli

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Fernandes Montanher

DOIS VIZINHOS

2019

S383f Schu, Cristian Pedro.
Fermentação da torta de linhaça como estratégia para o enriquecimento nutricional e potencialização de atividade antioxidante. / Cristian Pedro Schu - Dois Vizinhos, 2019.
71 f.: il.



Orientadora: Prof^a Dr^a. Maria Giovana Binder Pagnoncelli.
Coorientadora: Prof^a Dr^a. Paula Fernandes Montanher.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Dois Vizinhos, 2019.
Bibliografia p. 57-66.

1. Fermentação. 2. Fenóis. 3. Linhaça. 4. Compostos bioativos. 5. Biomassa vegetal. 6. Biomoléculas. I. Pagnoncelli, Maria Giovana Binder, orient. II. Montanher, Paula Fernandes, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Dois Vizinhos. IV. Título

CDD: 660.6

Ficha catalográfica elaborada por Caroline Felema dos Santos Rocha CRB: 9/1880

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos

	Ministério da Educação UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ CÂMPUS DOIS VIZINHOS Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia	 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
---	--	---

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título de Dissertação Nº 11/2019

FERMENTAÇÃO DA TORTA DE LINHAÇA COMO ESTRATÉGIA PARA O ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL E POTENCIALIZAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Por

Cristian Pedro Schu

Esta dissertação foi apresentada às nove horas e trinta minutos do dia quatro de setembro de 2019, no Mini Auditório 2 - UTFPR-DV, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora, composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____

**Profa. Dra. Maria Giovana Binder
Pagnoncelli
(UTFPR- CT)**

**Profa. MSa. Fernanda Guilherme de
Prado
(UFPR)**

**Prof. Dr. Francisco Menino Destefanis
Vitola
(UTFPR- DV)**



Prof. Dr. Andreia Anschau (UTFPR)
Coordenadora do PPGBIOTEC
UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

Às minhas professoras orientadoras Prof^a. Dr^a. Maria Giovana Binder Pagnoncelli, e em especial a Prof^a. Dr^a. Paula Fernandes Montanher, pelos ensinamentos e por toda atenção e tempo dedicados a mim, dando todo o auxílio necessário para a conclusão deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da UTFPR-DV, pelas aulas ministradas e pelo suporte quando necessário.

À minha Esposa e minha Filha, por toda compreensão e cuidado durante o período do curso.

Agradeço também a Deus, pela Grande oportunidade de estar vivo, e poder conviver com pessoas boas, que lutam cada dia por um mundo melhor.

RESUMO

SCHU, C. P. Fermentação da torta de linhaça como estratégia para o enriquecimento nutricional e potencialização de atividade antioxidante. 74f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

A extração do óleo da semente do linho (*Linum usitatissimum*) tem despertado interesse devido às expressivas quantidades de compostos bioativos presentes na linhaça. Entretanto, após a obtenção do óleo, uma grande quantidade de resíduos é gerada, obtendo como subproduto a "torta de linhaça". Esse produto na maioria dos casos é descartado, apesar do seu grande potencial nutritivo. A partir de processos de biotransformação da matéria-prima, o presente trabalho tem como objetivo melhorar a disponibilidade dos compostos com potencial bioativo na torta de linhaça. A torta de linhaça, obtida de uma indústria localizada na região Sul do Brasil, apresentou uma quantidade considerável de lipídeos (11,97%) e proteínas (24,33%). Diferentes solventes (metanol PA, etanol PA, água, etanol 75%) e temperaturas (30, 50 e 70 graus centígrados) foram testados durante o processo de extração dos compostos fenólicos em ultrassom assistido no tempo fixo de 15 minutos. Utilizando água como solvente e em temperaturas mais elevadas foi obtido os melhores resultados, obtendo em torno de 2,00 mg de EAG g⁻¹ em base seca e uma atividade antioxidante de 13 µmol equivalente a TEAC g⁻¹. A biotransformação da torta de linhaça foi realizada através de um processo de fermentação no estado sólido, utilizando o *Rhizopus oligosporus* NRL2710. Após 288 horas de cultivo, foi observado um incremento de 10% no teor de composto fenólicos na torta de linhaça, apresentando um extrato aquoso com 19,2 mg de EAG g⁻¹ e uma atividade antioxidante de 81,1 µmol equivalente a TEAC g⁻¹.

Palavras-chave: Biotransformação; Fermentação em estado sólido; Atividade antioxidante; compostos fenólicos.

ABSTRACT

SCHU, C. P. Fermentation of flaxseed pie as a strategy for nutritional enrichment and potentiation of antioxidant activity. 74f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Federal Technological University of Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

The extraction of flax seed oil (*Linum usitatissimum*) has attracted interest due to the significant amounts of bioactive compounds present in flaxseed. However, after obtaining the oil, a large amount of waste is generated, obtaining as a byproduct the "flaxseed cake". This product in most cases is discarded despite its great nutritional potential. From the biotransformation processes of the raw material, the present work aims to improve the availability of bioactive potential compounds in flaxseed cake. Flaxseed cake, obtained from an industry located in southern Brazil, presented a considerable amount of lipids (11.97%) and proteins (24.33%). Different solvents (PA methanol, PA ethanol, water, 75% ethanol) and temperatures (30, 50 and 70 degrees centigrade) were tested during the phenolic extraction process of assisted ultrasound at a fixed time of 15 minutes. Using water as solvent and at higher temperatures the best results were obtained, obtaining around 2.00 mg EAG g⁻¹ on dry basis and an antioxidant activity of 13 μmol compared to TEAC g⁻¹. The biotransformation of flaxseed cake was performed by a solid-state fermentation process using *Rhizopus oligosporus* NRL2710. After 288 hours of cultivation, an increase of 10% in the phenolic compound content was observed in flaxseed cake, presenting an aqueous extract with 19.2 mg of GAE g⁻¹ and an antioxidant activity of 81,1 μmol compared to TEAC g⁻¹.

Keywords: Biotransformation; Solid state fermentation; Antioxidant activity; Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Compostos fitoquímicos encontrados nas plantas.....	17
Figura 02 - Mecanismo de transferência de elétrons de hidrogênio.....	19
Figura 03 - Estrutura química (secoisolaricireinol) composto químico presente na linhaça.....	28
Figura 04 - Extração de antioxidantes com diferentes solventes.....	31
Figura 05 - Processo de fermentação e extração.....	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Compostos fenólicos da torta de linhaça (mg EAG g ⁻¹) de extratos obtidos em diferentes solventes e temperaturas.....	39
Gráfico 02 - Atividade antioxidante (μmol Trolox g ⁻¹) dos extratos de torta de linhaça in natura em diferentes solventes e temperaturas pelo método de redução do radical (DPPH) e (ABTS).....	43
Gráfico 03 - Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG g ⁻¹) de torta de linhaça biotransformada extraído com solvente água.....	47
Gráfico 04 -, Atividade antioxidante (μmol Trolox g ⁻¹) dos extratos obtidos da biotransformação, extraídos com solvente água e mensurados com o método DPPH.....	51
Gráfico 05 – Teor compostos fenólicos com a melhor extração da torta de linhaça, e o melhor ponto de fermentação da linhaça biotransformada, todos os resultados expressos em mg de (EAG g ⁻¹).....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS E ANTIOXIDANTES	15
3.1.1 Ação dos compostos fenólicos.....	18
3.2 BIOTRANSFORMAÇÃO	21
3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	23
3.3.1 Microrganismos utilizados nas fermentações sólidas (FES).....	24
3.3.1.1 <i>Rhizopus</i>	25
3.3.2 Características dos substratos utilizados na (FES).....	26
3.4 LINHAÇA.....	27
3.5 AFINIDADE ENTRE SOLVENTE E ANTIOXIDANTE	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 AMOSTRAS.....	33
4.2 MICRORGANISMO	33
4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	33
4.3.1 Preparo do inóculo	33
4.3.2 Preparo do substrato.....	34
4.3.3 Processo fermentativo.....	34
4.4 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	35
4.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	35
4.5.1 Preparo dos extratos	35
4.5.2 Determinação da capacidade antioxidante utilizando o método DPPH.....	36
4.5.3 Determinação da capacidade antioxidante utilizando o método ABTS.....	36
4.5.4 Determinação de compostos fenólicos.....	37
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	38

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	38
5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS DA TORTA DE LINHAÇA.....	39
5.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA TORTA DE LINHAÇA.....	42
5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS LINHAÇA BIOTRANSFORMADA.....	46
5.5 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA LINHAÇA BIOTRANSFORMADA.....	50
5.6 COMPARAÇÃO ENTRE COMPOSTOS DA TORTA DE LINHAÇA E LINHAÇA BIOTRANSFORMADA	53
6. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO- A.....	70
ANEXO- B.....	71
ANEXO- C.....	72
ANEXO- D.....	73
ANEXO- E.....	74

1. INTRODUÇÃO

Naturalmente, as diversas reações bioquímicas de oxirredução que ocorrem durante o metabolismo, são responsáveis pela geração dos radicais livres, que se não forem eliminados, podem causar o estresse oxidativo com consequente danos celulares. As hidroxilas fenólicas, presentes nos compostos fenólicos, são capazes de capturar esses radicais livres, tornando-os um importante agente antioxidante (ALACHAHER *et al.*, 2018). A neutralização dos radicais livres ocorre através das hidroxilas, com uma reação de ressonância, desta forma consegue impedir o ataque dos radicais estabilizando o elétron emparelhado, evitando possíveis perdas devido ao ataque de moléculas essenciais como, DNA, ácidos graxos, proteínas, aminoácidos, entre outras moléculas tão necessárias para o bom funcionamento celular (HUANG *et al.*, 2005).

Biomoléculas com propriedades antioxidantes podem ser encontradas em diferentes espécies de vegetais, podendo ser utilizados caules, frutos, grãos, raízes, e outras estruturas dos vegetais para a extração desses compostos bioativos (XU *et al.*, 2017). Da mesma forma, os resíduos agroindustriais de origem vegetal podem conter em sua matriz moléculas bioativas de elevado interesse comercial (WOICIECHOWSKIS *et al.*, 2010). O processamento de sementes para a obtenção de óleos vegetais é uma das principais atividades econômicas no Brasil, sendo responsável pela geração de toneladas de resíduos agroindustriais. Entre tantas sementes utilizadas para obtenção de óleos, a semente de linhaça é amplamente explorada devido presença de elevados teores de substâncias quimicamente interessantes, como o ácido oleico, alfa-linolênico, e substâncias antioxidantes (carotenoides, tocoferóis, tocotrienóis, flavonoides, ácidos fenólicos) (RATZ, 2015; WANG *et al.*, 2016). A torta de linhaça, gerada após o processo de extração dos óleos oriundos da semente, tem em sua composição quantidades consideráveis de proteína, lipídeos, compostos fenólicos e antioxidantes, os quais estão intimamente ligados a outros constituintes da matriz (OOMAH; MAZZA., 1998; RATZ; ARCT, 2015). Desta forma, a disponibilização dos compostos de resíduos agroindustriais, é um dos maiores desafios no processamento e na biodisponibilização das biomoléculas, pois, esses subprodutos possuem grande complexidade em sua constituição química (VODMAR *et al.*, 2017; RANDEKOV. *et al.*, 2018).

A extração dos compostos antioxidantes presentes nos resíduos

agroindustriais pode ser através de processos químicos, físicos e/ou biológicos. Dentre os processos químicos está a ação dos solventes, onde as características de solvatação e afinidade dos solventes promove a quebra das ligações entre as moléculas vegetais. Nos processos físicos (ultrassom e a temperatura) são eficazes na liberação de biomoléculas intrinsecamente ligadas ao material vegetal, devido a sua ação baseada na cavitação e degradação de estruturas da matriz. Uma das formas que apresentam grande eficiência e a biodisponibilização de moléculas através da ação microbiana, acontece quando os micro-organismos produzem enzimas que apresentam a capacidade de degradar a lignina e outras estruturas vegetais, em consequência provoca a abertura de anéis fenólicos aumentando a sua biodisponibilidade substâncias adjuntas a matriz degradada (SANCHEZ, 2009; XU *et al.*, 2017; DO *et al.*, 2014. WATTANASIRITHAM *et al.*, 2016).

O micro-organismo a ser utilizado em um processo fermentativo de biodisponibilização de compostos antioxidantes de matriz vegetal, deve apresentar algumas características desejáveis, tais como: ser produtor de enzimas capazes de degradar a biomassa (substrato lignocelulósico), liberando maior quantidade de substâncias antioxidantes; e ser benéfico para o consumo humano, genericamente conhecido como GRAS (JANLSZEWSKA *et al.*, 2019; MAHATA *et al.*, 2014). Atendendo essas características, os fungos do gênero *Rhizopus* possuem a característica de serem facilmente cultivados em substrato lignocelulósico e liberarem elevadas quantidades de substâncias antioxidantes em diversas matrizes vegetais (HERNANDEZ *et al.*, 2017). Especificamente, o *Rhizopus oligosporus* é utilizado no preparo de alimentos fermentados de origem vegetal, sendo seguro para consumo.

As técnicas de fermentação no estado sólido utilizando fungos, aliadas ao aproveitamento de subprodutos agroindustriais, demonstram ser uma possibilidade de biotransformação dessas matérias-primas em produtos de elevado valor econômico e de interesse industrial. Tendo em vista essa estratégia, o presente estudo propõe utilizar a torta de linhaça como matéria-prima de baixo valor comercial na obtenção de compostos antioxidantes, a partir de um processo de biotransformação utilizando fungo *Rhizopus oligosporus* e diferentes métodos de extração de tais compostos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo realizar o enriquecimento da qualidade nutricional de um subproduto oriundo do processamento da semente de linhaça (torta de linhaça), através da biotransformação utilizando fungo *Rhizopus oligosporus*, visando o aumento dos compostos com atividades antioxidantes.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a composição centesimal da torta de linhaça bruta;
- Testar diferentes métodos físico-químicos para a extração de compostos antioxidantes da torta de linhaça;
- Fermentar a torta de linhaça utilizando o fungo *Rhizopus oligosporus* em sistema de fermentação sólida;
- Avaliar o conteúdo de fenólicos totais e da atividade antioxidante na torta de linhaça antes e depois do processo fermentativo;
- Utilizar os métodos de captura dos radicais DPPH e ABTS para a determinação da atividade antioxidante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. COMPOSTOS BIOATIVOS E ANTIOXIDANTES

Notoriamente algumas biomoléculas com ação antioxidante são produzidas por sistemas celulares e por si só tem como função proteger e impedir ou reduzir a extinção da destruição causada pelos radicais livres. Neste contexto de biomoléculas produzidas por sistema celular, os organismos vivos possuem capacidade antioxidante que são encontradas em forma de enzimas, atuam no sistema celular para proteção fisiológica do organismo celular, atuando como inibidores de radicais livres evitando a proliferação da oxidação, estas enzimas são conhecidas pelos seus respectivos nomes: superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase, entre outras (HUANG *et al*, 2005).

Os radicais livres trazem grandes problemas à saúde, principalmente se o organismo celular entra estresse oxidativo, ocorrendo um desequilíbrio entre o sistema oxidante e antioxidante, ocorrendo danos relacionados às moléculas de grande importância para o sistema biológico causando problemas no DNA, carboidratos, proteínas, lipídios, o impacto se repercute no sistema biológico, desencadeando múltiplas doenças que podem variar de simples desequilíbrio fisiológico, até doenças graves como câncer (CACHO, 2016). Quando o sistema biológico não produz quantidades necessárias para interromper o estresse oxidativo, deve haver a reposição destas substâncias antioxidantes através de outras fontes, de origem animal, micro-organismos ou vegetal.

Alimentação dos seres humanos é de grande variação, pois somos seres heterótrofos, buscamos energia nos alimentandos de outros seres vivos, esse “combustível” está presente nos vegetais. As moléculas antioxidantes podem ser obtidas através da ingestão de frutos, sementes, folhas, essas estruturas vitais contém compostos fenólicos, essas substâncias são capazes de neutralizar radicais livres, mantendo o equilíbrio entre radical livre e sistema celular (BHANJA *et al*, 2014).

Compostos bioativos são considerados as substâncias que, presentes nos organismos vivos, promovem benefícios ao metabolismo celular. Metabólitos secundários são amplamente encontrados na natureza e podem ser considerados

compostos bioativos mesmo sendo utilizados em pequenas quantidades entre as principais moléculas estão: antibióticos, substâncias alcaloides, microtoxinas, pigmentos carotenoides, fatores de crescimento de plantas e compostos fenólicos (NIGAM, 2009). Diversas substâncias podem ser consideradas bioativas, que variam desde peptídeos encontrados no leite de algumas espécies de mamíferos até substâncias encontradas em plantas, como os pigmentos carotenoides, vitamina E é um dos compostos produzidos por algumas espécies de fungos (KORHONEM; PIHLANTO, 2006; RAZAK *et al*, 2015).

Os fungos são utilizados pelo ser humano como uma fonte alimentícia e antioxidante, os fungos e bactérias são uma classe de organismos que são capazes de produzir substâncias extracelular como as glucanas, ácidos fumárico entre outras substâncias e uma variedade de enzimas, e são produtores de uma gama de biomoléculas, algumas dessas biomoléculas apresentam capacidade antioxidante e demonstraram ter inúmeros outros benefícios à saúde humana (RAZAK *et al*, 2015). Os fungos são seres vivos com inúmeros potenciais, são capazes de produzir biomoléculas com uma gama de utilidades, sendo empregado na indústria farmacêutica promovendo a síntese de antibióticos, produção de moléculas com alto potencial anti-inflamatória, já para indústria de alimentos produzindo substâncias que ajudam a aumentar a vida de prateleira dos produtos (TAVARES *et al*, 2018).

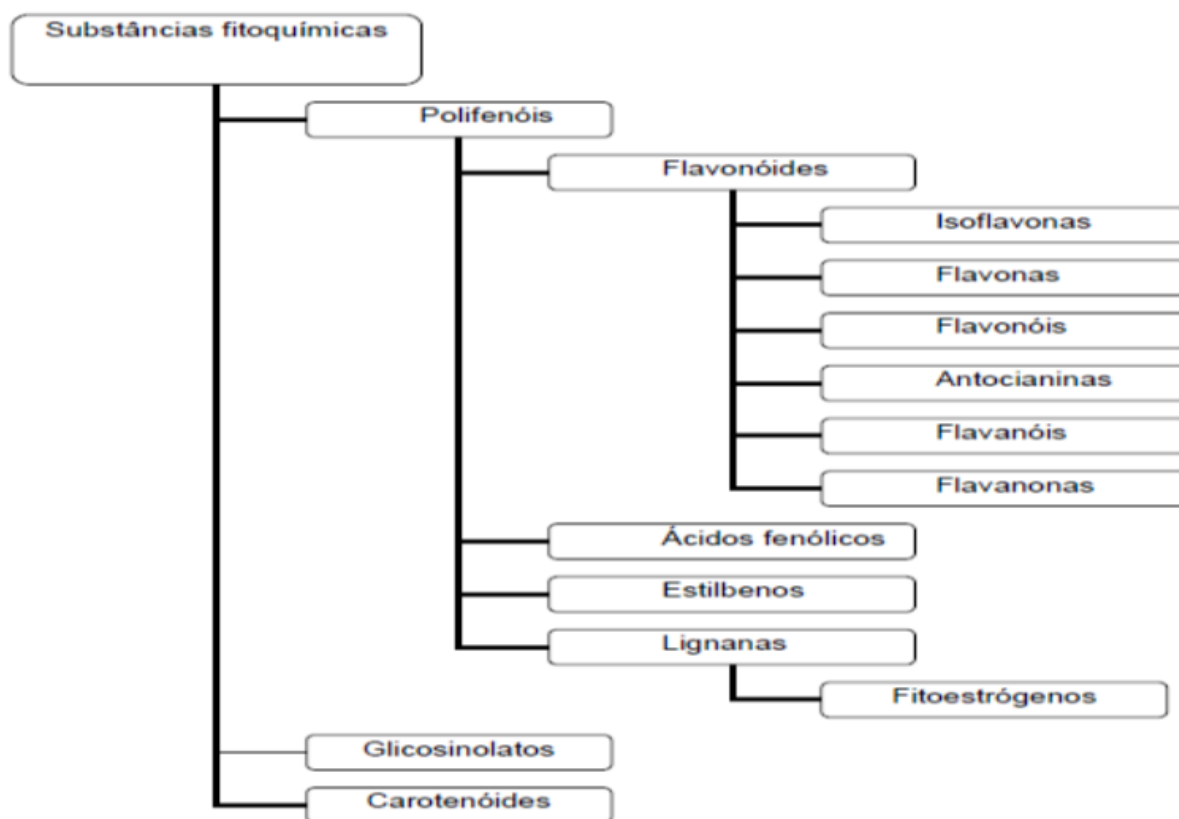
Todas essas biomoléculas produzidas por plantas ou fungos, apresentam uma grande diversidade de compostos fitoquímicos e moléculas fenólicas, essas biomoléculas são compostos naturais produzidos por vegetais e fungos, sendo relativamente produzidos em maior ou menor quantidade dependendo das condições adversas aplicadas sobre o indivíduo, condições que pode induzir a produção das moléculas, seja para defesa de patógenos ou competição de alimento no caso dos fungos, ou ação de insetos e raios ultravioletas causando lesões à planta (BLASA *et al.*, 2010; TAVARES *et al*, 2018).

Uma das principais moléculas de interesse biotecnológico encontrado em plantas, a vitamina E é utilizada para definir oito diferentes compostos, sendo eles β - α - ζ - γ - (beta, alfa, delta, gama) tocotrienóis e tocoferóis, os tocotrienóis e os tocoferóis são substâncias encontradas em uma gama de alimentos derivados de vegetais, especialmente frutas e vegetais, e em porções variadas de óleos vegetais, germe de trigo, sementes oleaginosas, sendo que os tocoferóis mais abundantes

nesses alimentos citados acima são α e γ , a vitamina E possui uma característica entre as suas moléculas, apresentando anel cromanol em sua estrutura, e se diferenciam na estrutura de acordo com o número e a localização no anel cromanol (CHUM *et al.*, 2006; MATTHAUSA *et al.*, 2003).

A vitamina E vem sendo estudada, pois desempenha variados papéis na vida dos seres vivos, através de compostos antioxidantes. Esse grupo composto pela vitamina E apresenta-se como antioxidante alimentar, em algumas pesquisas vem sendo correlacionado e associado à prevenção de doenças neurodegenerativas como: doença de Parkinson, aterosclerose, inflamações crônicas, envelhecimento precoce e câncer (MATTHAUSA *et al.*, 2003). Além da vitamina E, as plantas apresentam uma grande variedade de moléculas com atividades antioxidantes.

Figura 01 - Compostos fitoquímicos encontrados nas plantas.



Fonte: BLASA *et al* (2010)

Os compostos fenólicos ou polifenóis são um grupo de substâncias que são de grande importância para os vegetais, são metabólitos secundários que são

sintetizados pelas plantas como resultado da adaptação após a planta sofrer com condições biótico e abiótico (estresse hídrico, estresse frio, luz, infecção ou ferimentos) (BLASA *et al.*, 2010).

Os flavonoides são uma subdivisão dos polifenóis, e também apresentam potencial antioxidante, sendo assim os flavonoides fazem parte de um grande grupamento de substâncias químicas com mais de 8 mil moléculas diferentes encontrados em plantas, e podem ser subdivididos em aproximadamente cinco classes, as isoflavonas, flavonas, flavonóis, antocianinas, flavanóis a grande variedade molecular proporcionada aos flavonoides algumas características comuns, como estruturais e química, apresentando um anel aromático que comporta pelo menos um substituinte hidroxilo, que estão presentes na natureza em formato de pentose e hexose (HARBORNE *et al.*, 1999; ROBBINS, 2003).

Os compostos fenólicos são substâncias indispensáveis para o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas e, quando ingeridos, apresentam interessante atividade antioxidantes, sendo capaz de quelar íons metálicos, esses íons metálicos são substâncias capazes de acelerar a reação de oxidação (DECKER *et al.*, 2010; EMBUSCADO, 2015).

Com amplo espectro, os antioxidantes são facilmente encontrados na natureza, e apresentam grande eficiência na neutralização das substâncias radicalares, essas substâncias são encontradas no formato de tocoferóis, carotenoides, ésteres e algumas moléculas que fazem parte do grupo da vitamina E, e são catalogados como eficientes antioxidantes (FLAKELAR *et al.*, 2017).

3.1.1. Ação Dos Compostos Fenólicos

Os antioxidantes são biomoléculas que apresentam grande importância para os seres vivos, pois a sua falta pode liberar agentes oxidados, os quais causam grandes estragos nos organismos vivos.

Reações de Fenton, ou até mesmo a tão conhecida oxirredução, são duas palavras distintas, apresentam grande afinidade, pois remetem a mesma reação deletéria que ocorre em alimentos e em organismos vivos, para organismos vivos pode provocar danos celulares, que variam de simples danos ocorridos na parede celular, ou até mesmo afetar macromoléculas de grande importância nos

sistemas biológicos, como: reações deletérias no DNA, modificações de proteínas e lipídios inviabilizando os mesmos, já nos alimentos, o dano pode ter simples mudança de sabor e odor, podendo-se intensificar até um alto teor de ranço do produto, impossibilitando o consumo do mesmo (EMBUSCADO, 2015; WATTANASIRITHAM *et al.*, 2016). Juntamente com os danos causados aos organismos pelos radicais livres, em consequência os danos celulares têm grande impacto em tecidos e células, elevando a probabilidade de envelhecimento precoce e várias outras doenças como câncer, arteriosclerose, diabetes, artrite (SANJUKTA & RAI, 2016).

Os agentes oxidados ou radicais livres derivam da respiração celular, e também possui origem da alimentação, íons H_2 , O_2 , Fe^{2+} , são os principais precursores da formação dos radicais superóxido e hidroxila, revelados como os mais agressivos em sistemas biológicos, a grande reatividade do radical hidroxila necessita de poucos milissegundos para reagir com moléculas biológicas (SHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

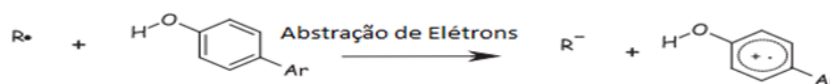
Para evitar os indesejáveis problemas, causados pelos radicais livres, existem algumas moléculas que podem ajudar a frear essa reação, através de três mecanismos distintos sendo eles: transferência de elétrons, adição a um anel aromático, ou quebra de dupla ligação, ocorrendo um produto chamado de adição, outra forma seria pela abstração de hidrogênio (SCHI *et al*, 2017).

Figura 02- Reação ocorrida entre radical e molécula de hidrogênio.

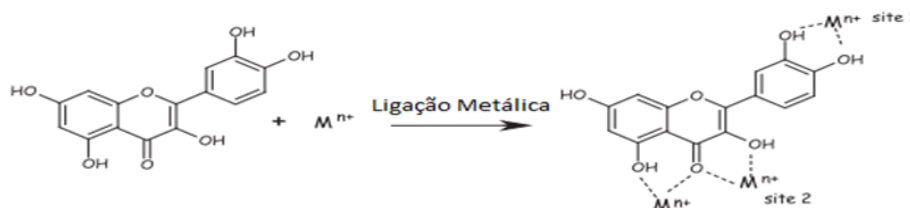
1. Transferência átomo de hidrogênio



2. Transferência simples de elétrons



3. Quelação de metais de transição



Fonte: Leopoldini *et al*, (2011).

A neutralização dos radicais livres, através do hidrogênio, é uma reação mais comum entre os antioxidantes primários, ou também chamados polifenóis. Os polifenóis possuem mecanismos de transferência de elétrons através do átomo de hidrogênio, essa reação pode ocorrer de três formas: a primeira forma é através de ruptura homolítica, que consiste na transferência de elétrons de hidrogênio, a segunda forma é com a abstração de elétrons ocorrendo uma transferência simples por doação do mesmo, e a terceira consiste em ligação metálica que ocorre ligações com metais formando anéis aromáticos (LEOPOLDINI *et al.*, 2011).

A abstração do hidrogênio pelo radical livre, ocorre devido à instabilidade da molécula radicalares, após ocorrer a doação do hidrogênio, o radical se torna uma molécula energeticamente estável, resultando em um produto inofensivo aos organismos vivos. O mecanismo utilizado pela molécula antioxidante doadora do elétron hidrogênio é através de uma reação química, onde o antioxidante entra em um estágio chamado de ressonância, tornando-se uma molécula inofensiva para os sistemas biológicos (SCHI *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2005).

Os antioxidantes naturais são capazes de sequestrar e interromper as reações radicalares e podem ser subdivididos em duas classes: os com atividade enzimática e os sem atividade, no primeiro grupo estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio, e no segundo grupo, estão as moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação (GALVÃO *et al.*, 2008).

Ação dos compostos fenólicos em interromper reações radicalares, demonstram a capacidade que alguns compostos fenólicos também tem a característica de inibição de atividade antitumoral, essa capacidade pode ser atribuída a alguns fenóis em específico como: flavonoides, taninos, ácido glucurônico (IBRAHIM *et al.*, 2019).

Esses compostos fenólicos têm efeitos positivos contra a atividade antitumoral e cancerígena, em comparação com outros tratamentos como a quimioterapia, as plantas medicinais são uma das principais fontes de compostos fenólicos, e tem como tendência com os altos índices de câncer na população mundial de seres humanos (Wu *et al.*, 2002).

Os estratos de plantas contêm muitos componentes como um composto antioxidante como, polifenol, flavonoides, taninos, ácidos urônicos e muitos

componentes voláteis. Os compostos fenólicos têm fortes caracteres e vários antioxidantes com capacidade de remoção de radicais, que apresentam capacidade de quelação de Fe^{+2} e eliminação de O_2 , isso ocorre devido grupos hidroxila presentes nos compostos fenólicos, que podem doar átomos de hidrogênio (IBRAHIM *et al.*, 2019).

A biotransformação também possui a capacidade de produzir moléculas com capacidade antitumoral, isso ocorre durante o processo fermentativo, onde micro-organismo produz substâncias poli sacarídeas ou compostos que apresentam influências que inibem processo carcinogênico, e são liberados no substrato ou produzidos no seu próprio corpo celular (LIU *et al.*, 2019).

3.2. BIOTRANSFORMAÇÕES

As substâncias fitoquímicas produzidas por plantas, nos remetem a uma das matérias-primas mais abundantes do planeta terra a biomassa, essa matriz é uma das que apresentam baixíssimo custo de produção, tem como forte característica ser amplamente renovável (ZHANG, 2008).

Desta forma, a biomassa é utilizada pelo homem a milênios, uma fonte de alimento para outras atividades ligadas ao consumo e industrialização (WOICIECHOWSKIS *et al.*, 2010). Com o crescimento e a evolução da indústria em âmbito mundial, o maior desafio para os próximos anos será a destinação correta de resíduos, ou o reaproveitamento transformando resíduos em subprodutos (RADENKOVSKIS *et al.*, 2018).

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais traz novas perspectivas para as agroindústrias, que podem aproveitar o grande potencial de biotransformação de seus resíduos, que apresentam grande disponibilidade nutricional para aplicação de métodos biotecnológicos, esses resíduos são conhecidos como cascas, farelos, sementes, peelins, todos esses subprodutos apresentam quantidades mensuráveis de antioxidantes e fibras dietéticas com grande utilização nas indústrias (NIGAM & PANDEY, 2009).

Os subprodutos agroindustriais possuem diferentes afinidades, pois seus compostos estão adjuntos a uma matriz celular, tendo em sua constituição compostos biológicos e antioxidantes, desta forma apresentam grande

homogeneidade molecular, tendo afinidades lipofílicas ou hidrofílicas, com inovação e pesquisas aplicadas a subprodutos, pode-se descobrir uma gama de macromoléculas, que poderão apresentar grande valor científico e econômico (RADENKOVS *et al*, 2018; WOICIECHOWSKIS *et al.*, 2010).

Na atualidade, a grande preocupação da humanidade é o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis e ecologicamente correta, nessa busca está a produção consciente, produção que está concentrada na minimização de impactos, uma das maiores preocupações da indústria e a redução dos resíduos, são produtos não amiláceos e amiláceos, que buscam ser degradados para melhorar a qualidade ambiental (RANDEKOVS *et al*, 2018).

A fermentação é um dos métodos mais eficientes no quesito degradação de subprodutos, e com o aprimoramento de pesquisas, vêm sendo utilizada no processo de obtenção de compostos antioxidantes, nesse processo é utilizado diferentes tipos de enzimas com capacidade de degradar carboidratos, sendo elas celulase, G–glucosidases, xilanases, pectinanaeses, xilosidases, amilases, quando essas moléculas entram em ação, ocorre a degradação do substrato e conseqüentemente a liberação de fenólicos que estão ligados na forma solúvel, e presentes na matriz fermentada (BHANJA *et al.*, 2009).

A degradação de compostos lignocelulolíticas através de processo fermentativo visando a liberação de substâncias fenólicas ocorre através da ação de enzimas, mas uma enzima em específica teve maior êxito a enzima 'B-glicosídase, produzida por micro-organismos fúngicos, teve a finalidade de degradar carboidratos e ligações glicosídicas entre compostos fenólicos, apresentando um melhoramento químico da matriz (VATTEM & SHETTY *et al.*, 2003).

Durante a fermentação da matriz pode haver a produção ou a liberação de moléculas antioxidantes, pois a liberação das moléculas que estão aderidas a parede celular de plantas e subprodutos ocorre através da ação de enzimas, como citado anteriormente, mas durante processos fermentativos os micro-organismos podem produzir diversos tipos de moléculas(LUNA *et al.*, 2018).

Durante a fermentação os compostos orgânicos são divididos em moléculas menores, através de ação de enzimas produzidas pelo micro-organismo, essas enzimas exercem diversas funções fisiológicas, além de produzir várias substâncias durante a (FES) podendo variar de ácidos até antioxidantes

(SANJUKTA; RAI, 2016).

A obtenção dos antioxidantes pode ser produzida através de fontes sintéticas ou obtidos de fontes naturais, ligados a biomassa vegetal ou durante processos fermentativos. No entanto, o que diferem os antioxidantes das demais biomoléculas, são suas características químicas e o seu modo de ação no processo de oxirredução de moléculas (BHANJA *et al.*, 2009).

3.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A fermentação de frutos, grãos, e outros alimentos, é utilizada desde tempos antigos que datam antes de Cristo, essa fermentação tinha como ideia básica a preservação de materiais alimentares perecíveis, especialmente onde havia escassez de tais alimentos devido a variações meteorológicas (SANJUKTA; RAI, 2016). A utilização da fermentação em estado sólido (FES) tem relatos de 2500 anos A.C., onde o povo chinês já se alimentava de alimentos fermentados, entre eles o “koji”, que consiste em uma massa umidificada de cereal cozido e fermentado pelo micro-organismo *Aspergillus oryzae*. Alimentos fermentados faz parte da cultura milenar chinesa e atualmente vem sendo difundida para outros povos. O processo fermentativo vem sendo aperfeiçoado através de mecanismos de controle de processo e de uso de micro-organismos selecionados (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A preservação dos alimentos durante a fermentação em estado sólido, acontece devido ao desenvolvimento microbiano, com a proliferação de micro-organismos que se instalam na superfície ou interior do substrato, dependendo de suas características celulares, a degradação e superficial devido as limitadas características de crescimento de leveduras e bactérias, já a característica dos fungos filamentosos é de suas células se adentrarem ao substrato, provocando uma liberação intra-substrado, essa liberação intra-substrado torna-se uma variável determinante para crescimento celular, devido à ausência de água livre, desta forma o substrato deve possuir umidade suficiente, para auxiliar o desenvolvimento e metabolismo microbiano (VARZAKAS, 1998; NOUT & KIERS, 2005).

A FES define-se através da acumulação de biomassa, proporcionando um “ambiente” ideal para micro-organismos, desta forma ocorre grande produção de enzimas e compostos biológicos, esses compostos são capazes de melhorar a

composição química e nutricional de substratos, podendo ser manipulada e aplicada em produção de substâncias com finalidade econômica (RAZAK *et al.*, 2015). A sua utilização tem aumentado interesse nas áreas científicas e tecnológicas, devido a sua grande eficiência para produção de biomoléculas como enzimas, compostos fenólicos, e principalmente por ser eficiente na fermentação de resíduos agroindústrias, como os oriundos do processamento de cereais (HENANDEZ *et al.*, 2017).

Uma possibilidade muito promissora é a produção de ácidos orgânicos por FES usando substratos de baixo custo que são utilizados como suportes alternativos (SOCCOL *et al.*, 2006).

A utilização de resíduos agroindustriais aplicados em processo de fermentação sólida e micro-organismo com potencial de produzir biomoléculas, agrega valor à subprodutos que teriam destinos incertos (BHANJA *et al.*, 2014).

3.3.1. Microrganismos utilizados nas fermentações sólidas (FES)

Os fungos filamentosos e alguns tipos de bactérias com formato de bacilos, possuem melhor desenvolvimento em processos fermentativos envolvendo a devido aos baixos níveis de água no substrato e suas hifas se adentrarem facilmente ao meio de cultura, desta forma alguns micro-organismos se destacam neste tipo de fermentação sendo eles: *Rizophus*, *Penicilium*, *Aspergillus*, *Fuzarium*, *Giberela*, Bactérias Lácticas, entre outros organismos capazes de se desenvolver na FES (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A classe de micro-organismos fúngicos, constituem um grupo de micro-organismos que possuem características adequadas para fermentação semissólida, pois esses micro-organismos fúngicos necessitam apenas de 40% a 60% de água, desta forma os teores de umidade são fator limitante para o crescimento de bactérias ou micro-organismos indesejáveis (SINGHANIA *et al.*, 2009).

A grande flexibilidade adaptativa dos fungos filamentosos nos processos fermentativos é devido a produção enzimática, estas substâncias são conhecidas como amilase, pectinase, xilanasas, celulasas, quitinasas, lipases, proteases, essas moléculas têm sua ação diretamente ligada a degradação de substratos lignocelulósico, esse sistema enzimático pode ser subdividido em sistema

enzimático e sistema hidro lítico: o sistema hidro lítico produz enzimas chamadas hidrolases que possuem a função de degradação de polissacarídeos. O sistema enzimático é considerado um sistema lignolítico oxidativo com função de degradar lignina e celulose (SANCHEZ, 2009; MARTINS *et al.*, 2011).

Para produzir biomoléculas desejadas a escolha do micro-organismo é essencial, observar características fisiológicas exigência nutricional entre outros, desta forma a FES irá ter grande probabilidade de sucesso. Segundo Cortez *et al* (2017) a literatura fornece diversas pesquisas de otimização do meio de cultura e de condições essenciais, pois todo micro-organismo tem suas particularidades de inoculação, como temperatura e PH.

3.3.1.1. *Rhizopus*

O fungo *Rhizopus* é classificado pelo gênero: *Rhizopus sp.*, pertencente ao filo; zigomicota, pertencente a classe dos zigomicets, ordem: Musculares, família: mucolococeae. O *Rhizopus* é comumente encontrado em vegetais em decomposição, sementes, frutas e solo (HAGEL *et al.*, 2015). A cerca de 1.000 espécies de fungos do filo zigomicota, são uma divisão primitiva dentro das linhagens fúngicas, geralmente possuem características de reprodução sexuada ocorrendo através de formação de esporângios, e suas hifas possuem características de não serem septadas (BATTAGLIA *et al*, 2011).

Tem como sua principal característica de ser fungo filamentoso, é uma espécie de micro-organismos com grande capacidade produtora de produtos bioquímicos, pois suas hifas têm como característica, a facilidade de invadir o meio de cultura com grande eficiência, facilitando a capacidade de adaptação, em vários meios de cultura (HERNANDEZ *et al.*, 2017).

Alguns pesquisadores no ano de 1958 efetuaram pesquisas com o fungo *Rizhopus sp*, com finalidade de produção de ácido fumárico, a produção desta substância ocorreu em processo fermentativo com estado anaeróbico (RHODES *et al.*, 1958).

Além das vantagens de fácil adaptação á diferentes substratos o *Rhizopus sp.* também apresenta a característica de ser facilmente manipulado, um indivíduo destacou-se por possuir boas características, sendo ele chamado de

Rhizopus oryzae, foi identificado por ser um micro-organismo não patogênico aos seres humanos, podendo ser utilizado como aditivo alimentar ou farmacêuticos, desta forma algumas cepas de *Rhizopus sp.* são identificados como seguro, se tornando conhecidos como micro-organismos GRAS (MAHATA *et al.*, 2014).

O gênero *Rhizopus sp.* é um grande produtor de biomoléculas catalogadas são as enzimas (Tanasses, glucoamilases, celulasas) ou até mesmo a produção de ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido fumárico) (RAZAK *et al.*, 2015).

Uma característica interessante adicional de alguns fungos do gênero *Rhizopus* é a produção de alimentos que são tradicionais para população oriental como Temphe Tempeh, além de alimentos fermentados o *Rhizopus* tem grande potencial para produção de outras biomoléculas, aplicando diferentes processo biotecnológico, os fungos filamentosos em condições favoráveis podem produzir numerosos tipos de bioprodutos de interesse biotecnológico como: enzimas, ácidos orgânicos, compostos aromáticos e corantes (HERNANDEZ *et al.*, 2017). Desta forma *Rhizopus* demonstrava possuir boa capacidade fermentativa, segundo Malgorzata *et al* (2015) fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Rhizopus* possui aumento de várias substâncias benéficas, como produção de antioxidantes.

Da mesma forma, Vong (2018) relatou em seus estudos que um indivíduo do gênero *Rhizopus*, mais especificamente da cepa *Oligosporus*, melhorou a capacidade nutricional de *Okara* ocorrido em um processo de fermentação sólida, que apresentou 176% mais fibras dietéticas disponíveis solúvel, 16% menos ácido fítico, aumentou 197% a biodisponibilidade de ácidos fenólicos, da mesma forma houve um aumento significativo de 254% a mais que o normal de aminoácidos livres, as isoflavonas ou mais popularmente conhecidas moléculas antioxidantes chegaram a 179%, demonstrando a grande eficiência deste fungo que provocou a liberação de substâncias de grande valia científica e econômica utilizando a técnica de fermentação sólida.

3.3.2. Características dos substratos utilizados em (FES)

A fermentação de estado sólido (FES) é um processo ecológico, em quais micro-organismos crescem dentro de substratos sólidos contendo ausência, ou com quantidades pouco relevantes de água livre no meio de cultura (SINGHANIA

et al., 2009).

De certa forma os substratos utilizados na FES possuem suas particularidades, devido a algumas dificuldades a monitorar o processo em tempo real, tornando-se um ser um processo complexo, incluindo uma combinação de fenômenos químicos, biológicos, onde ocorre a interação do meio de cultura com o micro-organismo desejado, para o desenvolvimento de alimentos, e outros subprodutos oriundos da FES, a produção de enzimas, biodegradação de resíduos sólidos, reciclagem de subprodutos agrícolas, é de súbita necessidade que o desenvolvimento de sistemas sejam confiáveis, e passam ser avaliados com rigor, desta forma ira chegar a um alto desempenho (LI *et al.*, 2015).Uma das principais características do FES é a utilização de substratos sólidos como suporte ao crescimento celular, para algumas aplicações, esses apoios sólidos também são as únicas fontes de carbono e nitrogênio disponíveis para sustentar o crescimento microbiano, estes apoios podem ser de natureza artificial ou de origem biológica (RAMOS-SANCHEZ *et al.*, 2015).

Celulose, hemicelulose e lignina derivadas da biomassa vegetal, tendo finalidade de produção de compostos orgânicos através da FES, a produção de compostos antioxidantes, utilizando micro-organismos de alto potencial de produção em sistema FES, o *Rhizopus Oligusporos* demonstra ótimas características produtoras de biomoléculas (MALGORZATA *et al.*, 2015).

As matérias-primas utilizadas como substrato, os suportes devem ser econômicos e devem estar disponíveis em grandes quantidades. A disponibilidade de umidade, aeração, oxigênio e temperatura precisam ser consideradas em uma FES, o meio deve conter o mínimo de substâncias necessárias para a sobrevivência do micro-organismo, portanto os parâmetros de fermentação devem ser simples e fáceis de otimizar, a FES podendo ser facilmente aplicados em resíduos agrícolas renováveis tornando substratos ideal (SOCCOL *et al.*, 2006

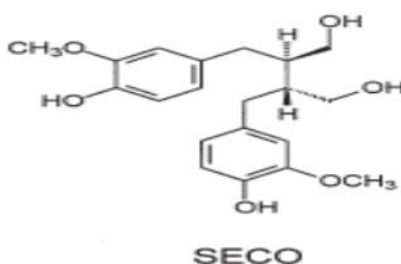
3.4. LINHAÇA

Linhaça é a semente do linho (*Linum usitatissimum* L.), uma planta da família das Lináceas, as sementes são pequenas e tem formato oval (MOURA *et al.*, 2013). A espécie possui característica de ser auto-polinizadora e originou-se no

Oriente Médio ou em regiões da Índia (CHOUDHARY *et al.*, 2017). Esta planta o *Linum* ou popularmente chamado de linhaça, tem sido utilizada a século XIX para fabricação de papel, sendo uma das culturas mais antigas já cultivadas pelo homem. Atualmente, a partir da linhaça é obtido o óleo de linhaça, é muito utilizado devido a sua grande fonte de ácido alfa-linolênico (SILVA *et al.*, 2016).

A linhaça é uma fonte rica de substâncias bioativas e com ótimas características nutritivas, possui bom perfil fitoquímico que pode ser encontrado nas sementes e em suas fibras vegetais. Estes compostos fitoquímicos foram identificados por Wang *et al* (2016) sendo ácido caféico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico, que estão notoriamente estão ligadas as atividades antioxidantes. O óleo presente na linhaça possui um alto teor de ácido alfa-linolênico, aproximadamente 59%, as lignanas, polifenólicas, secoisolariciresinol (SECO) (HOSSEINIAM *et al.*, 2006). A SECO é uma substância encontrada em estruturas chamadas lignanas, que fazem parte do grupo dos polifenóis, possui uma estrutura que apresenta grande potencial antioxidante (WANG *et al*, 2016; FIGUEIREDO *et al*, 2016). A SECO por conter grande potencial antioxidante levou a alguns pesquisadores a utiliza-lo como adjuvante em óleo de canola, para manter a estabilidade do mesmo evitando possíveis ataques de radicais livres (HOSSEINIAM *et al*, 2006).

Figura 03 – Estrutura química (SECO)



Fonte: (HOSSEINIAM; *et al*, 2006).

A linhaça por apresentar compostos bioativos em sua essência, tem sido introduzida na alimentação animal ou humana, devido a sua grande importância nutricional (STANK *et al.*, 2017). Em estudo realizado com aproximadamente 32 variedades de linhaça, de diferentes localidades da China, pesquisadores descobriram vários compostos bioativos que estão presentes na constituição do

óleo de linhaça, estes compostos variam de lignanas até ácido Alfa-linolênico, mas houve quantidades consideráveis de ácido fenólicos totais que tiveram concentração máxima de 109,93 mg/100g, demonstrando que a *Linum usitatissimum* possui grandes quantidades de compostos fenólicos em sua constituição biológica (DENG *et al.*, 2017).

O Canadá planta cerca de 400.000 a 800.000 de hectares de linhaça, é uma das cultivares mais plantadas no país também é o maior produtor mundial da cultivar linhaça, mas não só o Canadá é produtor de linhaça, países europeus como Alemanha, Rússia, França, também possuem uma alta produtividade de sementes de linho (FLAX COUNCIL OF CANADÁ., 2018).

No Brasil a principal finalidade da linhaça é a indústria, sendo que 100% da produção de linhaça provém do estado do Rio Grande do Sul, na qual os componentes da semente, são extraídos o óleo da semente, após extração são utilizados em tintas, vernizes, corantes, linóleos e biodiesel (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Segundo o relatório de 2015 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a média de produção no Rio Grande do Sul foi estimada de 900 kg há⁻¹.

O grão pode ser consumido inteiro ou moído, também pode ser utilizado na preparação de produtos de panificação, produtos cárneos e sobremesas (STANK *et al.*, 2017). Segundo Oomah & Mazza (1998) para a extração do óleo da linhaça as sementes são aquecidas a uma temperatura de 60°C durante 20 minutos, logo após as sementes são prensadas e ocorre a liberação de 60 a 70% do óleo. Após a extração do óleo obtém-se a torta de linhaça (subproduto), que pode ser utilizado na alimentação humana ou animal, como fonte alternativa de proteína e energia (NDOU *et al.*, 2018).

A grande preocupação com o meio ambiente, órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza, o resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois, além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia (PELIZER *et al.*, 2007).

Desta maneira para evitar danos ao meio ambiente estudos devem ser realizados para descobrir possíveis potenciais ou substâncias químicas de interesse industrial para esse possível resíduo.

A linhaça apresenta grande potencial de substâncias de interesse tecnológico, pois as substâncias que constituem sua matriz vegetal, apresentam notáveis capacidade antioxidante devido aos polifenóis encontrados nesta matriz celular (DENG *et al.*, 2018).

Segundo Mannucci *et al* (2019) a torta de linhaça gerada durante o processo de extração do óleo, concentra compostos polifenóis na torta de linhaça causando o enriquecimento da matriz vegetal.

Os principais compostos fenólicos encontrados na torta de linhaça in natura são: ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido gentísico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido siríngeo, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido cafeico, ácido clorogênico, herbacetin, kaempfero (TERPENC *et al.*, 2012).

Após o processo de extração do óleo, a o subproduto torta de linhaça, pode ser um material subutilizado para fornecer excelente fonte de matéria prima com potenciais e aplicações, pois possui ingredientes alimentares com uma vasta capacidade funcional e antioxidante (SHAHIDI, 2000; STODOLAK *et al.*, 2016).

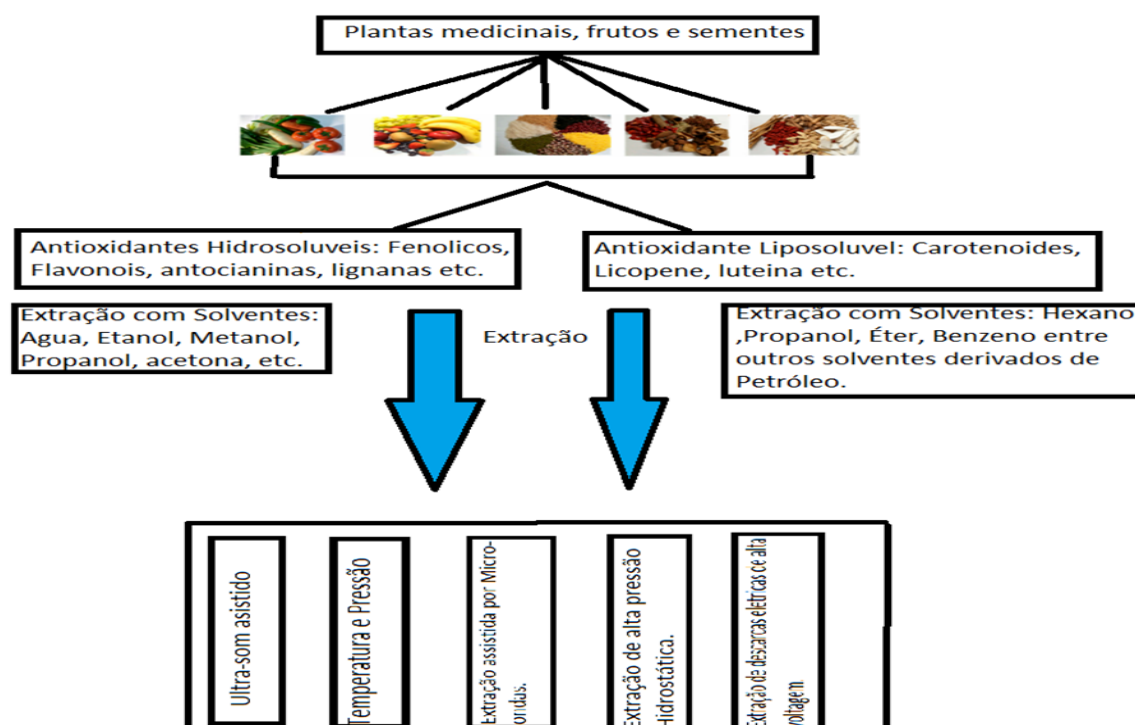
3.5. AFINIDADE ENTRE ANTIOXIDANTES E SOLVENTES

A afinidade dos solventes durante uma extração, é algo indispensável para experimentos de grande relevância científica. Segundo Embuscado (2015) o uso de diferentes solventes, pode trazer diferentes respostas analíticas, desta forma a extração torna-se uma variável de grande interesse tecnológico, pois as plantas também apresentam biomoléculas diferenciadas, algumas plantas de mesma espécie possuem diferenças entre si, sendo causadas por fatores como: diferentes genótipos, tipo de colheita, clima, cultivo, e localização geográfica diferenciada.

Desta forma, devemos observar as características físico-químicas e biológicas da matriz que será utilizada durante pesquisa científica ou processo industrial, pois analisar diferentes métodos de extração pode otimizar a obtenção de moléculas, a otimização dos processos está ligado a aplicação de fatores químicos e físicos durante o processo de extração, os fatores químicos que possuem maior relevância são PH, polaridade e concentração do solvente. A seleção de solventes é de suma importância pois deve ser baseada na natureza química dos compostos

antioxidantes a serem extraídos, já para os fatores físicos a serem aplicados durante a extração podem aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis através de diferentes como variação de temperatura, tempo de extração, e ultrassom (XU *et al.*, 2017).

Figura 04- Extração de antioxidantes com diferentes solventes



Fonte: (Xu *et al.*, 2017).

Os mecanismos mostrados acima apresentam suas particularidades para processos de extração de antioxidantes, sendo necessária otimização dos processos para alcançar o auge da extração. Durante procedimentos de extração de antioxidantes a aplicação de diferentes solventes que tenham características hidrofílicas e hidrofóbicas, são de grande valia pois suas diferentes afinidades podem extrair maior ou menor quantidade de compostos antioxidantes (CAI *et al.*, 2004).

As características químicas dos antioxidantes podem apresentar diferentes polaridades, sendo ou não solúvel a um respectivo solvente em determinadas situação a possibilidade de mistura de solventes com características específicas podem aumentar o espectro de extração de antioxidantes da matriz vegetal utilizada (DO *et al.*, 2014).

A ação dos solventes está intimamente ligada a solvatação de compostos antioxidantes presentes na matriz vegetal, ocorrendo interações entre os solventes e os sítios polares de hidrogênio que ligam os antioxidantes a matriz, alguns solventes hidrofílicos mais especificamente a água, tem a capacidade de ser doadora de prótons podendo agir na otimização promovendo a maior liberação de moléculas antioxidantes, já a solvatação ocorrida pelos álcoois tendo como exemplo o álcool etílico e metílico e devido à presença do radical etílico e metílico presentes na molécula dos respectivos solventes (BOEING *et al.*, 2014).

Além da ação dos solventes sobre a matriz outras técnicas se destacam no quesito extração de biomoléculas, o ultrassom possui uma característica de extração através de cavitação, este procedimento produz ondas de refração que induzem a produção de bolhas de cavitação dentro do fluido. Essas bolhas crescem ao decorrer do tempo até atingir o augi um ponto crítico onde as bolhas de cavitação entram em colapso liberando uma grande quantidade de energia liberando temperaturas extremas (XU *et al.*, 2017).

As ondas produzidas pelo ultrassom além de apresentarem temperaturas extremas têm o seu modo de ação baseado nas forças físicas mecânicas e químicas, essas forças são produzidas pelo colapso causado pelas bolhas de cavitação resultando na ruptura das células e tecidos permitindo a liberação de compostos extraíveis, desta forma facilitando a penetração do solvente e facilitando a extração das biomoléculas presentes na matriz (VINATORU *et al.*, 2017).

Durante o processo de extração de biomoléculas de uma matriz vegetal são várias as técnicas a serem utilizadas, mas a temperatura pode ser um fator determinante durante a extração, pode trazer a otimização do processo de extração de biomoléculas (DO *et al.*, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

A torta de linhaça utilizada para o processo fermentativo, foi doada pela empresa (Pazze Indústria de Alimentos Ltda), produtora de óleo de linhaça, que está localizada no município de (Panambi) – RS.

Um total de 5 Kg do material, um único lote foi processado e armazenado nas dependências do laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos. O material foi triturado em moinho de facas, peneirado em peneira de 60 mesh, homogeneizado e posteriormente embalado e mantido em local arejado, em porções de 0,5 kg.

4.2. MICRORGANISMO

Foi utilizado uma cepa *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710, cuja linhagem foi obtida de coleções de cultura dos bancos de cepas NRRL (Northern Regional Research Laboratory), U.S. Department of Agriculture, Illinois - USA. A conservação desta cepa foi realizada em tubos inclinados contendo meio sólido de ágar batata dextrose (PDA). As culturas repicadas serão cultivadas a 30°C por 5 dias, e após, conservadas a 4°C com repiques contínuos a cada três meses.

4.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.3.1. Preparo do inóculo

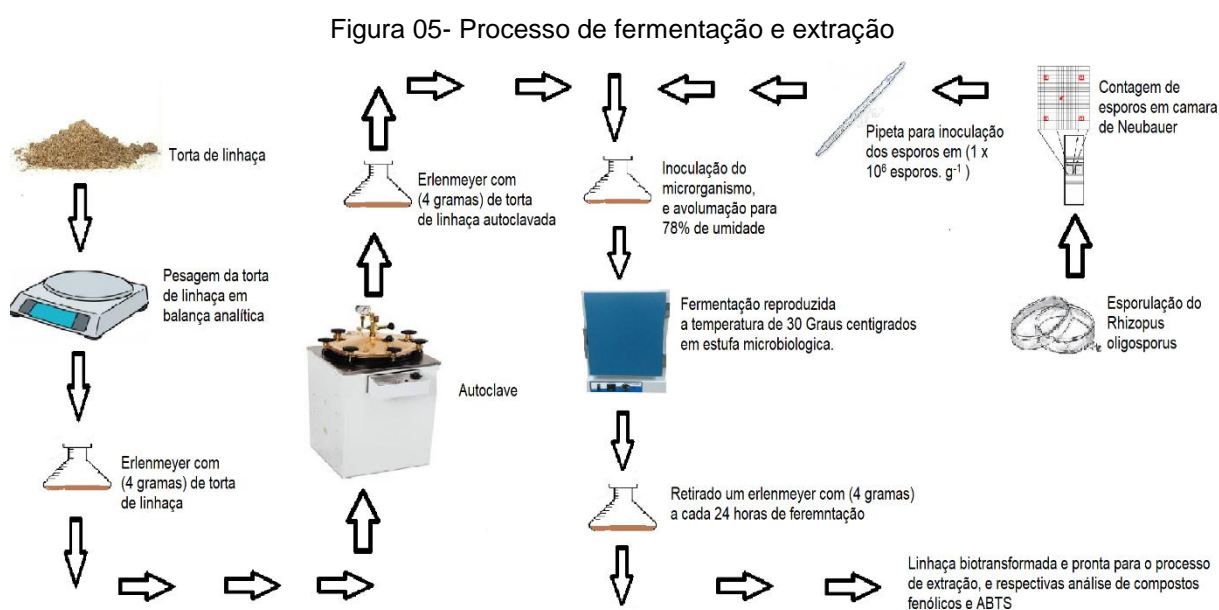
O micro-organismo foi inoculado em Erlenmeyer contendo meio de cultura ágar batata dextrose (PDA) e mantido em estufa bacteriológica a 30 °C por 5 dias. Após crescimento do micélio e formação dos esporos, foram adicionados à água e as esferas de vidro aos Erlenmeyer. Após a raspagem dos esporos, a suspensão foi transferida para frascos estéreis e realizada as contagens dos esporos em câmara de Neubauer, em microscópio óptico. Todos os materiais utilizados durante este processo foram devidamente esterilizados em autoclave.

4.3.2. Preparo do substrato

A torta de linhaça foi previamente hidratada, o material foi umidificado com diferentes volumes de água potável. Após 12 horas foram avaliados os materiais e as quantidades de água necessária para obter a hidratação completa do substrato.

4.3.3. Processo fermentativo

A fermentação no estado sólido foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sendo aplicado aproximadamente 4 g do substrato de torta de linhaça, logo após foi submetido a esterilização em calor úmido por 15 minutos a 121°C. Ao meio de cultivo, foram inoculados com 1×10^6 esporos g^{-1} de substrato, sendo introduzido a quantidade de água que foi destilada deionizada e esterilizada em autoclave, aplicando a quantidade necessária de água para o ajuste da umidade com proporção de 78%, ao ajuste da umidade foi efetuado após a autoclavagem da torta de linhaça. O meio de fermentação foi incubado em estufa bacteriológica com temperatura controlada em 29 °C, durante 288 horas, sendo retiradas alíquotas de 4 gramas de amostras a cada 24 horas, o respectivo processo de extração da linhaça biotransformada, ocorreu com a temperatura de (70 °C) em ultrassom assistido, utilizando o solvente água.



4.4. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O substrato foi caracterizado quanto os seguintes parâmetros físico-químicos: umidade, resíduo mineral fixo, lipídeos, proteínas e fibra bruta. A umidade das amostras foi determinada em triplicata pelo método gravimétrico, no qual 5 g de cada amostra foi submetida a secagem em estufa com circulação de ar a 105 °C até massa constante. O resíduo mineral fixo foi determinado gravimetricamente após incineração das amostras em forno mufla a 550 °C. A determinação de lipídeos totais foi realizada pelo método Soxhlet, sendo que o teor de lipídeos foi obtido pela relação da massa da fração lipídica seca com a massa inicial da amostra. O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl, o qual consiste na determinação do teor de nitrogênio total e posterior conversão para proteínas por fator de correção (6,25). Para a determinação de fibra bruta, as amostras foram submetidas a digestão ácida e alcalina, e após filtragem em cadinho de Gocch. As frações de fibra bruta foram determinadas por gravimetria. Sendo que as respectivas análises foram calculadas sobre base seca g^{-1} (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.5. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1. Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados utilizando os seguintes solventes: Água, Metanol PA, Etanol PA e Etanol 75% (sendo eluído em água destilada e deionizada), a razão de massa solvente foram respectivos de 1:10. Após a pesagem das amostras e adição do solvente, as amostras foram submetidas a extração em ultrassom (Cristofoli) em frequência de 42 Hz, sendo aplicadas diferentes temperaturas de (30, 50, 70 °C) durante o tempo fixado a 15 min, em sequência as amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado para posterior análise, todas as extração forma realizadas em triplicata.

4.5.2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO O RADICAL DPPH

A capacidade antioxidante das amostras foi realizada pelo método DPPH descrito por (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). As soluções de extrato de torta de linhaça (25 μL) foram adicionadas a 2 mL de uma solução de metanol de DPPH ($6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Após mistura e repouso à temperatura ambiente e protegido da luz durante 30 minutos, a absorbância das soluções resultantes foi medida à 517 nm. Soluções metanólicas de concentrações conhecidas de Trolox na faixa de 0-2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram usadas para calibração. Os resultados foram expressos como equivalentes em μmol de Trolox (ET) g^{-1} de amostra seca utilizando a curva de calibração.

4.5.3. Atividade antioxidante pelo método de ABTS

A atividade antioxidante determinada pelo método ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi realizada segundo a metodologia proposta por Re et al., 1999. O radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 μL da solução de persulfato de potássio. Sendo mantida a mistura no escuro à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, foi diluído 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter uma absorbância de $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ a 734 nm. Solução padrão de Trolox 2 mM, foi dissolvida em 25 mg de Trolox em álcool etílico e completada com o volume de 50 mL em um balão volumétrico com álcool etílico, foi homogeneizado e transferido para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado.

O mesmo procedimento reacional foi utilizado para a construção da curva de calibração, a partir da solução padrão de Trolox (2.000 μM), foi preparado e transferido para balões volumétricos de 10 mL, variando a concentração de 100 μM a 1.500 μM .

Determinação da curva-padrão, em ambiente escuro, foi transferido uma alíquota de 30 μL de cada solução de Trolox (100 μM , 500 μM , 1.000 μM , 1.500 μM e 2.000 μM) para tubos de ensaio, sendo homogeneizado com 3,0 mL da solução do radical ABTS, homogeneizar em agitador de tubos, e realizar a leitura em (734 nm) após 6 minutos da mistura e utilizar álcool etílico como branco para calibrar o

espectrofotômetro.

Os resultados foram expressos como equivalentes em μmol de Trolox (ET) g^{-1} de amostra seca utilizando a curva de calibração.

4.5.4. Determinação de compostos fenólicos

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como padrão (MCDONALD *et al.*, 2001).

O conteúdo de fenólicos totais da torta de lihaça foi analisado usando reagente de Folin-Ciocalteu. Soluções de extrato de resíduos de linhaça (250 μL) foram adicionadas a 250 μL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada, 1:1 v/v), 500 μL de solução saturada de carbonato de sódio e quatro mL de água destilada. Após 25 minutos de repouso e protegido da luz, a mistura foi centrifugada durante 10 min a 3000 rpm e a absorbância foi lida em um espectrofotômetro à 725 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} de amostra seca.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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 \pm desvio padrão [coeficiente de variação (%)] e os mesmos foram analisados 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.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O subproduto de torta de linhaça apresentou consideráveis quantidades de lipídeos, proteínas, conteúdo mineral e umidade. A Tabela 01 estão representados os valores encontrados na torta de linhaça e os descritos por outros autores, caracterização Química e Bromatológica da torta de linhaça *in natura* não fermentada e autoclavada, os resultados do presente trabalho em base seca g⁻¹.

Tabela 1 - Resultados da caracterização da torta de linhaça

Composição química	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
Nesse trabalho	11,94%	24,33%	5,73%	5,36%
Gutierrez et al (2010)	15,00%	25,00%	4,00%	4,00%
Teh et at., (2014)	18,80%	35,36%	5,37%	6,89%
Stodolok et al., (2016).	12,68%	28,51%	6,26%	-

Fonte: Próprio autor

Foram verificados teores de 24,33% de proteínas, valor próximo ao descrito por Stodolak *et al.* (2016) com bolos de linhaça (torta de linhaça) apresentou (28%). Teh et al., (2014) verificou em amostras da linhaça pós extração do óleo que os teores ficaram entre 35,36 ± 1,18 de proteína.

Da mesma forma, os valores encontrados em relação a resíduo mineral e umidade estão de acordo com dados da literatura. O teor de resíduos mineral obtido foi de 5,73%, enquanto que, os valores obtidos por Teh *et al.* (2014) foram próximos (4,92%). Em relação à lipídeos, foram encontrados valores com grande aproximação aos relatados por (MILLER *et al.*, 2011). Uma das características mais notórias da torta de linhaça são seus altos valores de lipídios e proteína, que podem ser comparados com outros subprodutos resilientes da extração de óleo como a torta *in natura* de canola e cânhamo chegando a valores correspondentes a 37,75% e 33,45% de proteína, e lipídios chegando a valores de 14,02% para a torta *in natura* de Cânhamo e 17,96% para canola (TEH *et al.*, 2014).

Podem ocorrer algumas diferenças na avaliação físico-química do subproduto da torta de linhaça, mas sem grandes significâncias, pois o processo

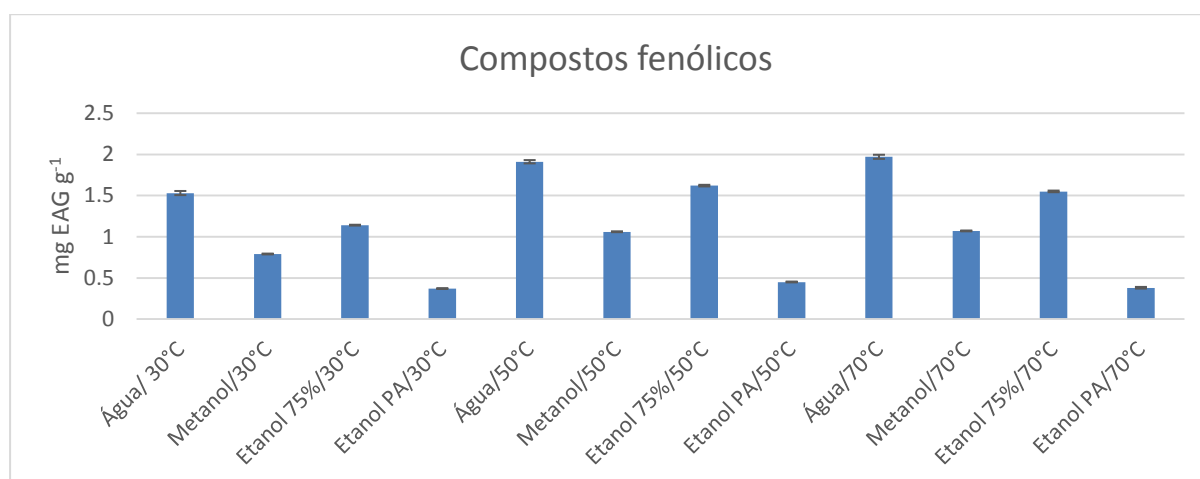
industrial da extração do óleo da linhaça são processos comumente utilizados por todas indústrias. Apenas alguns fatores específicos como quantidade de calor e solvente podem modificar os terrores físico-químicos encontrados no subproduto da linhaça após esmagamento e retirada do óleo, outro fator de grande relevância para a composição química da linhaça é causada pela variação ocasionada durante o plantio, época de colheita, locais de crescimento, genética da planta, ambiente (OOMAH & MAZZA, 1998).

5.2.COMPOSTOS FENÓLICOS DA TORTA DE LINHAÇA IN NATURA

Após a extração do óleo de linhaça grandes quantidades de compostos permanecem no resíduo, inclusive material lipídico. Os compostos fenólicos naturalmente estão presentes nas sementes de linhaça e grande parte deles, responsáveis por atividades antioxidantes. Segundo Deng *et al* (2018) a atividade antioxidante está correlacionada com os compostos fenólicos, que estão presentes na matriz vegetal da torta de linhaça.

A determinação de compostos fenólicos nessa matriz e investigação de seu potencial antioxidante tem despertado interesse.

Gráfico 01- Compostos fenólicos (mg EAG g⁻¹) da torta de linhaça obtidos em diferentes solventes e temperaturas.



Fonte: Própria autoria

Com base nos resultados plotados no gráfico 01 e no anexo C podemos observar que o teor de fenólicos totais teve sua resposta com maior significância em temperatura de 70°C, com a respectivo solvente água, apresentando teor de

compostos fenólicos de 1,98. Apresentando significativos resultados, o solvente água em temperatura de extração em 50°C obteve 1,91 (mg EAG g⁻¹), sendo que não há diferença significativa ($p > .05$) entre a extração com temperatura (50°C, 70°C) sendo os mesmos extratos como maior extração de compostos fenólicos obtidos com a torta de linhaça in-natura.

As temperaturas mais elevadas de 50°C e 70°C, foram as temperaturas que obtiveram maior êxito durante o processo de extração de compostos fenólicos. O solvente água obteve a maior capacidade de extração e maior afinidade com os compostos fenólicos da torta de linhaça in-natura, mas não tão eficiente o etanol PA demonstrou ser o mais ineficiente durante o processo de extração, apresentando ser o solvente de menor significância ($p > .05$), entre todos os solventes em temperatura de 50°C e 70°C, se compararmos os valores obtidos com o solvente água e o solvente metanol podemos observar uma enorme diferença chegando a 80,5% de diferença de concentração de compostos fenólicos, obtidos a mais pelo solvente água em temperaturas mais altas.

A temperatura também foi um fator determinante na extração de compostos fenólicos da *Baccharis dracunculifolia* havendo um aumento significativo de 50%, apresentando a variação de temperatura de 40 para 80°C, as altas temperaturas causam a degradação das ligações entre os compostos e a matriz vegetal, promovendo a liberação das moléculas fenólicas (CASAGRANDE *et al.*, 2018).

Um dos principais fatores, que influenciam durante o processo de disponibilização de moléculas, é a aplicação de métodos químicos, afinidade do solvente com as moléculas a serem extraídas, são um dos quesitos mais importantes durante o processo de extração, mas a extração com solvente pode ser otimizada, por outros métodos químicos como: variação da temperatura e utilização de ultrassom. Segundo alguns autores a aplicação dessas técnicas, não devem exceder as características das moléculas que constituem a respectiva matriz, em casos mais graves pode ocorrer perdas significativas de compostos fenólicos e antioxidantes, provocado a destruição ou inviabilização de moléculas em potencial (REINOSO *et al.*, 2012; FERNANDEZ-AGULLO *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2017; CORDEIRO *et al.*, 2013).

Mostrando ter uma afinidade em específico, com os solventes hidrofílicos, e com os compostos fenólicos da torta de linhaça. As moléculas a

serem extraídas possuem algumas afinidades a solventes, essa afinidade geralmente está ligada a polaridade do solvente, e as características químicas das moléculas a serem extraídas (BEKHIT *et al.*, 2018).

Nas análises de compostos fenólicos, as moléculas presentes na torta de linhaça apresentaram uma maior afinidade em específico aos solventes hidrofílicos.

A água tem grande capacidade de absorção a compostos fenólicos, as moléculas fenólicas presentes na torta de linhaça, também apresenta uma grande afinidade a solventes hidrofílicos (MANNUCCI *et al.*, 2019).

Para Boeing *et al* (2014) os solventes hidrofílicos, apresentaram grande capacidade de absorção de compostos fenólicos presentes na amora preta, essa maior concentração de compostos fenólicos, está relacionado com o solvente água, que apresenta algumas qualidades específicas ligadas a solvatação dos compostos fenólicos, essas interações estão intimamente ligadas às ligações de hidrogênio, essas ligações causam uma maior afinidade, devido a sua doação de elétrons entre os sítios polares encontrados nos polifenóis.

Durante um processo de extração, não a nenhum procedimento capaz de extrair todas as biomoléculas, mas sim extrair as que tiverem maior afinidade com o procedimento.

Devido ao grande grupo de compostos fenólicos encontrados em vegetais, não há procedimento uniforme que possa remover completamente todos compostos, presentes em uma matriz vegetal, em uma planta existe vários tipos de compostos fenólicos, cada molécula possui suas particularidade e afinidades (NACZAK & SHAHIDI, 2004).

Segundo Do *et al* (2014) os antioxidantes são um grande grupo de moléculas, são produzidos por fungos e vegetais, devido seus diferentes tipos e formatos possuem características químicas variáveis com diferentes polaridades.

Os compostos fenólicos obtidos de plantas, são substâncias que apresentam uma vasta utilização farmacológica, que vão de atividade antioxidante até substâncias antitumorais.

Os extratos de plantas, sementes, frutos entre outras partes vegetais, possuem grande concentração de substâncias fenólicas, essas substâncias fenólicas são mais precisamente polifenóis, que são subclasses das substâncias fotoquímicas encontradas em plantas, os flavonoides, taninos, ácidos irônicos e

muitos outros compostos voláteis, esses compostos apresentam uma fantástica atividade antitumoral, sendo capazes de inibir e ou combater tumores, tornando-se uma das mais novas expectativas no controle contra o câncer (WU *et al.*, 2002; IBRAHIM *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos contêm várias características de serem potentes antioxidantes, contêm qualidades de remoção de radicais em Fe^{+2} e eliminação de O_2 , isso ocorre devido grupos hidroxila presentes nos compostos fenólicos, que podem doar átomos de hidrogênio (IBRAHIM *et al.*, 2019).

Apesar da atividade antioxidante presentes nos extratos de torta de linhaça, grande parte da atividade antioxidante derivam dos compostos fenólicos, mas alguns compostos fenólicos não apresentam atividade antioxidante, pois o reagente folin ciocauteau identifica o compostos fenólicos através da coloração, e a reação de ABTS e DPPH reagem com qualquer molécula que apresente atividade antioxidante (STODOLAK *et al.*, 2016; ROBBINS., 2003; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

5.3. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA TORTA DE LINHAÇA IN NATURA

A linhaça contém em sua constituição natural, grandes quantidades de compostos antioxidantes que estão ligados a matriz vegetal ou de outras moléculas polifenólicas, como o secoisolariciresinol, essa capacidade antioxidante também pode variar de acordo com a pressão química e biológica sofrida pela planta, ou também pode ser concentrada durante o processo de extração do óleo (DENG *et al.*, 2018; OOMAHA; MAZZA, 1998).

As análises de capacidade antioxidante estão expressas através das técnicas de DPPH e ABTS.

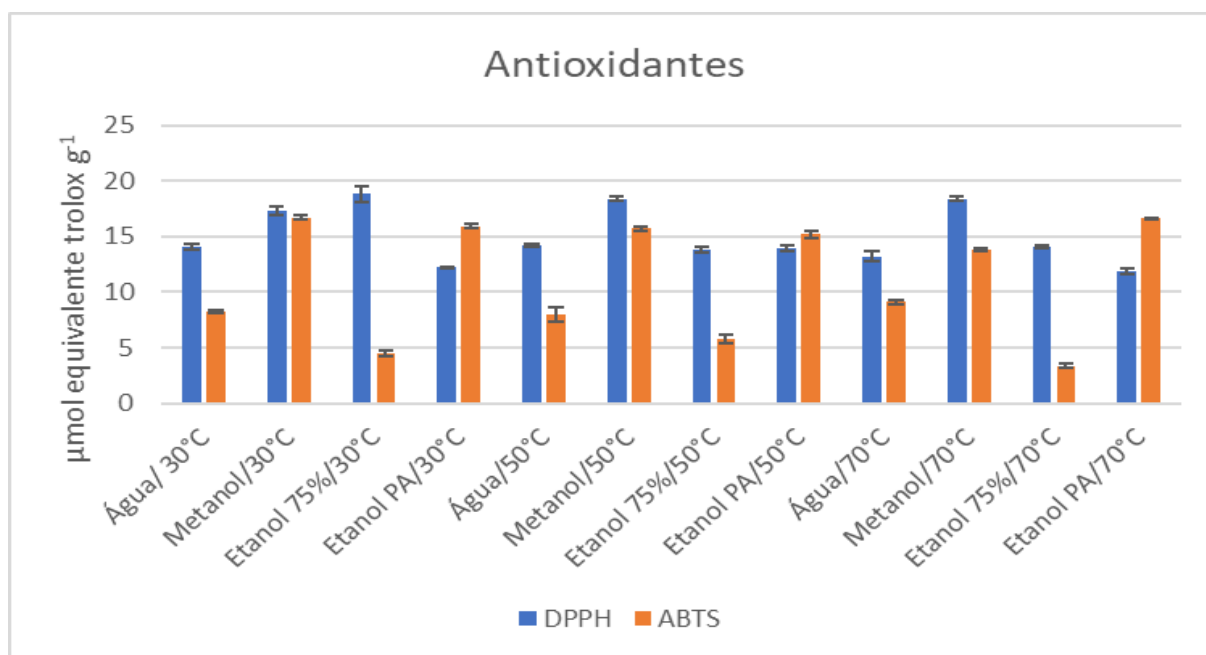
Apesar das duas técnicas de DPPH e ABTS apresentarem grande semelhança, a técnica de ABTS também pode se ligar a algumas enzimas, desta forma é recomendado efetuar mais de uma técnica de antioxidante, pois cada antioxidante pode ter uma afinidade em específico para cada técnica (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; DULF *et al.*, 2018).

A análise realizada com DPPH baseia-se nas respostas obtidas através de ondas luminosas, sendo refletidas para sensores eletrônicos, a molécula de DPPH é um radical em potencial, que apresentam cor roxa em seu estado “normal”,

mas torna-se incolor, quando em potencial de eliminação do radical DPPH entra em reação com os extratos analisados (BRAND-WILLIAMS *et al.*,1995).

No gráfico 02 estão apresentados os valores de atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir da torta de linhaça. Os extratos foram obtidos utilizando diferentes solventes e em diferentes temperaturas.

Gráfico 02 - Atividade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) dos extratos de torta de linhaça in natura obtidos em diferentes solventes e temperaturas.



Fonte: Própria autoria

Nos respectivos dados demonstrados no gráfico 02 e no anexo A e B, podemos evidenciar que a temperatura não foi um fator significativo ($p > .05$) para as análises realizadas com o solvente metanol para o método DPPH.

O solvente metanol apresentou ser um dos solventes com a melhor extração de compostos antioxidantes para o método DPPH. Ambos os extratos obtidos com metanol a 70°C e 50°C apresentaram valores de 18,4 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, não apresentando diferença estatística entre eles e em comparação ao extrato obtido com etanol 75%, que apresentou 18,8 μmol equivalente a Trolox g^{-1} .

As análises de DPPH e ABTS possuem grande semelhança, apresentam capacidade de redução para biomoléculas disponíveis, apresentando perda de cores conforme a reação com o analito podendo desta forma serem mensuradas em espectrofotometria (BLASA *et al.*, 2010; ROBBINS., 2003; BRAND-WILLIAMS *et*

al.,1995).

As análises de ABTS também mostraram que o metanol é um ótimo solvente para extração de compostos antioxidantes da torta de linhaça, e apresentou extração de 16,7 μmol equivalente a Trolox g^{-1} de compostos antioxidantes, com temperatura de extração de 30°C, não apresentou diferença estatística ($p > .05$) o solvente o Etanol PA a 70°C mostrou ser muito eficiente com 16,6 μmol equivalente a Trolox g^{-1} .

Alguns fatores podem causar grande influência durante processo de extração, promovendo melhorias ou percas de substâncias, más os fatores que apresentam maior significância durante um processo de extração são, os tipos de solventes, tempo de extração (FERNANDEZ-AGULLÓ *et al.*, 2015).

A interferência da temperatura é um cofator de grande importância, pois se aplicado em excesso pode causar perca ou até mesmo degradação de alguns compostos antioxidantes, a temperatura pode ser um fator determinante, promovendo liberação de compostos fenólicos e antioxidantes (GULLON *et al.*, 2017; CASAGRANDE *et al.*, 2018).

Além da temperatura, o solvente metanol possui características capazes de extrair várias moléculas com capacidade antioxidante, as principais moléculas e as mais conhecidas são: ácido ferulico, ácido siríngico, ácido caféico, ácido protocatecúico, ácido vanílinico, ácido gálico e ácido p-cumárico (ZHAO *et al.*, 2006). Essas informações citadas acima corroboram com as pesquisas realizadas por Johnsson *et al* (2002) revela que a linhaça é rica em substâncias conhecidas como: ácido hidrocínâmico, ácido p-cumárico, ácidos glicosídeos, ácidos ferulico, Lignanas ligadas a substância secoisolaricirenoil diclicosideo.

Apesar do metanol ser um ótimo extrator de compostos antioxidantes, é uma substância considerada nociva para a saúde humana e animal, é considerado um solvente de classe de risco 2, onde seu consumo pode provocar de pequenas alergias até danos graves a saúde sendo um causador em potencial de câncer (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010).

Mesmo que o metanol seja um ótimo solvente extrator, faz com que a indústria farmacêutica utilize outros tipos de solventes, com capacidades de extração similar. O etanol 75% em temperatura de 30°C para o método DPPH apresentou 18,8 e o etanol PA a 70 °C, em método ABTS com 16,6. O etanol é um solvente considerado ambientalmente seguro e com baixa capacidade toxicológica,

podem ser utilizados na fabricação de cosméticos e alimentos, sendo seguros para consumo humano (EFSA, 2011; OTERO-PARIJO *et al.*, 2015).

Portanto, as diferenças ocorridas entre processo de extração, pode ser devido a diferença na seletividade do solvente, para certos grupos fenólicos com diferentes potenciais de atividades antioxidante. A grande variação de matriz vegetal, contém diferentes antioxidantes com diferentes afinidades, sendo assim o processo de obtenção de compostos é específico para cada molécula (GULLON *et al.*, 2017).

Os solventes orgânicos, como o etanol eluido com água ou até mesmo com outros solventes orgânicos, podem aumentar o espectro de extração, capturando maiores quantidades de moléculas das respectivas matrizes vegetais (REINOZO *et al.*, 2012).

Uma das características marcantes do etanol é sua afinidade aos polifenóis em específico as antocianinas que estão presentes nas folhas flores e frutos de várias plantas (OTERO-PARIJO *et al.*, 2015). A possível extração com etanol 75% a 30°C, para o método DPPH ocorrido no presente estudo, pode estar ligada a extração das antocianinas. As antocianinas são polifenóis que possuem potente atividade antioxidante, e são facilmente extraídas por solventes hidrofílicos como etanol (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Segundo Harborne & Grayer (1998) alguns polifenóis como as antocianinas possuem uma baixa estabilidade em altas temperaturas, esse fator pode ser determinante, pois as temperaturas excessivas, podem causar degradação de compostos, provocando a perda de suas funções antioxidantes, essas características químicas são perdidas em temperaturas superiores a 30°C.

Segundo Liyana-Pathirano & Shahidi (2005) a temperatura pode facilitar a extração de alguns compostos, mas sua aplicação deve ser controlada pois temperaturas excessivas podem provocar a degradação de alguns polifenóis que possuem pouca estabilidade em altas temperaturas como os flavonoides. Alguns compostos antioxidantes possuem uma característica de conter uma maior estabilidade química que chega até temperaturas de 80°C (CASAGRANDE *et al.*, 2018). Alguns compostos antioxidantes encontrados na matriz vegetal da linhaça possuem uma característica de maior estabilidade, a molécula secoisolariciresinol são lignanas encontradas no estado de glicosídicos, mas mesmo assim possui uma grande atividade antioxidante (HOSSEINIAN *et al.*, 2006).

A afinidade das moléculas antioxidantes presentes na torta de linhaça, mostrou ser um fator predominante na extração de antioxidantes para torta de linhaça in natura, os solventes orgânicos com características hidrossolúveis promoveram um fator positivo para as análises realizadas neste estudo.

Deng *et al* (2018) em análises do material vegetativo da linhaça, conseguiu correlacionar os métodos de ABTS, com as substâncias encontradas na linhaça como: ácido p-cumárico, secoisolariciresinol. No processo de industrialização do óleo de linhaça, o resíduo gerado durante esse processo a torta de linhaça, passa por alguns processos, onde acontece uma concentração de polifenóis e substâncias antioxidantes (MANNUCCI *et al.*, 2019).

O processo de fermentação sólida, podem promover o crescimento do micro-organismo selecionado, conseqüentemente produzindo enzimas e moléculas antioxidantes, promovendo a digestibilidade de moléculas de composição vegetal, tornando matriz vegetal quimicamente interessante e nutricionalmente melhorada (MALGORZATA *et al.*, 2015; VONG *et al.*, 2018; RAZAK *et al.*, 2015).

O fungo *Rhizopus* possui uma característica de ser um bom produtor de enzimas e biomoléculas, também apresenta uma característica de ser um micro-organismo GRAS, seguro para alimentação de animais e seres humanos (NIGAN 2009). O fungo é um micro-organismo seguro e a água também não apresenta toxicidade e além de ser um solvente de baixo custo, e contém uma afinidade em específico com os compostos fenólicos e antioxidantes derivados dos ácidos hidrocínâmicos presentes na linhaça, essa característica é derivada da solvatação dos compostos fenólicos, a água provoca interações que estão intimamente ligadas as moléculas de hidrogênio que o solvente possui, essas ligações causam uma maior afinidade devido a sua doação de elétrons entre os sítios polares encontrados nos compostos presentes na linhaça (DENG *et al.*, 2018; BOEING *et al.*, 2014).

5.4. COMPOSTOS FENÓLICOS LINHAÇA BIOTRANSFORMADA

A degradação de compostos lignocelulíticos através de processo fermentativo visando a liberação de substâncias fenólicas ocorre através da ação de enzimas, mas uma enzima em específica teve maior êxito a enzima 'B-glicosídase, produzida por micro-organismos fúngicos, teve a finalidade de degradar carboidratos e ligações glicosídicas entre compostos fenólicos, apresentando um

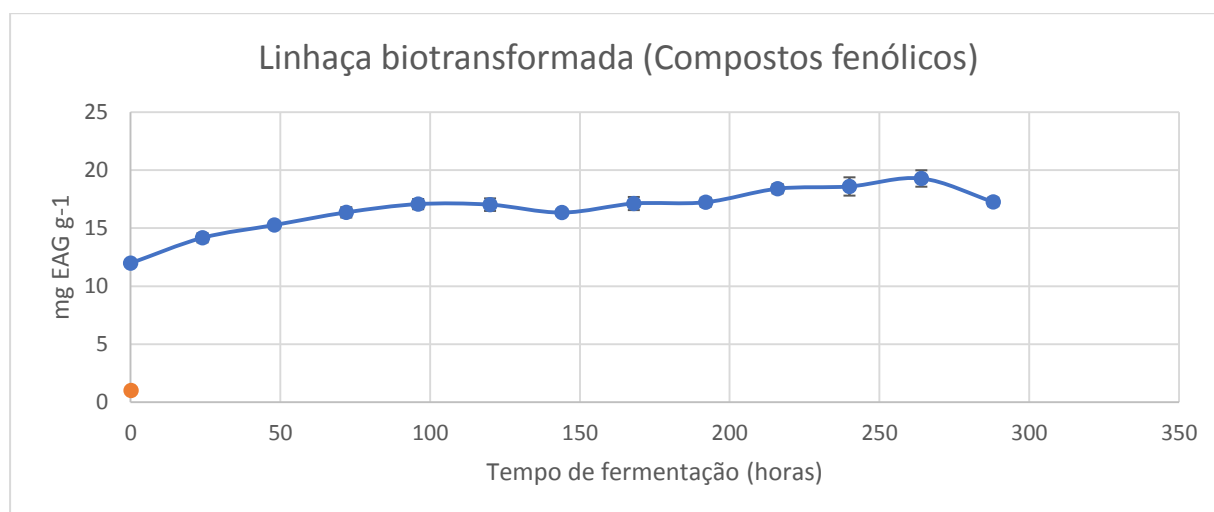
melhoramento químico da matriz (VATTEM & SHETTY *et al.*, 2003).

Ação de micro-organismo na matriz vegetal pode promover a melhora nutricional e organoléptica, através da produção de biomoléculas capazes de romper ligações de ésteres entre a matriz e as substâncias fenólicas (NIGAM *et al.*, 2009).

Alguns compostos fenólicos encontrados em matrizes vegetais, como taninos e outras substâncias, não reagem com os radicais presentes nas técnicas de antioxidantes, desta forma o método de compostos fenólicos possui maior sensibilidade em quantificar possíveis compostos extraídos durante o processo de extração (ZHAO *et al.*, 2006).

No gráfico 03 abaixo estão expressos os valores encontrados no referente estudo da torta de linhaça biotransformada, onde o teor de compostos fenólicos foi expresso através da técnica de Folin ciocauteau expressos mg de EAG g^{-1} .

Gráfico 03- teor de fenólicos totais (mg EAG g^{-1}) de torta de linhaça biotransformada extraída com o solvente água.



Fonte: Própria autoria

Para o processo de biotransformação da torta de linhaça, as análises de compostos fenólicos feitas com o respectivo tempo de fermentação em temperatura de 70°C que podem ser observadas no gráfico 03 e no anexo D, o respectivos tempo de fermentação seguiram a cinética da fermentação, com tempo total de fermentação de (288) horas, apresentando a concentração máxima de compostos fenólicos de 19,2 mg EAG g^{-1} , alcançados no período de fermentação de (264

horas), sem apresentar diferença estatística os tempos de fermentação de (216, 240, 264) não apresentaram diferença estática entre si e se caracterizaram por ser o período de maior liberação de compostos fenólicos durante o processo fermentativo.

Alguns compostos fenólicos possuem uma maior estabilidade, podendo ser liberados a temperaturas que podem variar de 40 a 80°C, as altas temperaturas tem a passível característica de degradar ligações químicas entre estruturas ou substâncias presentes na matriz vegetal, podendo atuar como um fator positivo para liberação de compostos fenólicos (DO *et al.*, 2013; CASAGRANDE *et al.*, 2018).

Além da temperatura, outro fator que possa ter influenciado na liberação dos compostos fenólicos, foi a utilização do solvente durante a extração dos respectivos compostos, a água apresenta grande capacidade de absorção, sendo um solvente que apresenta grande estabilidade química em altas temperaturas, e possui uma considerável interação com as moléculas polifenólicas encontradas na torta de linhaça (MANNUCCI *et al.*, 2019; BOEING *et al.*, 2014).

Um dos possíveis efeitos observados no gráfico 03 e nos resultados do ANEXO D, nota-se uma leve elevação dos compostos fenólicos durante o tempo de fermentação variando do tempo 0, até o respectivo período de 288 horas, onde iniciou-se um declínio de compostos fenólicos.

O crescimento microbiano em um processo de fermentação sólida se estabelece em possíveis três fases, adaptação onde o micro-organismo está em processo de “reconhecimento” da matriz e em possível processo de ativação de genes, a segunda fase e conhecida como a fase exponencial é a fase de produção enzimática onde o micro-organismo já se estabeleceu, está fase também e conhecida como estagio de liberação de substâncias bioativas encontradas na matriz, que está em processo de degradação, a terceira e última fase é conhecida como fase estacionária, acontecendo a possível limitação do substrato e concentrando a presença de compostos inibidores, e ocorre a produção de metabolitos secundários ou moléculas bioativas produzidas pelo micro-organismo (BASTOS, 2015; NIGAM & PANDEY *et al.*, 2009; SOCOOL *et al.*, 2006).

Segundo Bastos (2015) as altas temperaturas causam danos as enzimas produzidas pelo micro-organismo, os efeitos provocados pelas temperaturas acima de 40°C podem ir de uma simples desnaturação até a dissociação dos grupos funcionais envolvidos nas reações enzimáticas, e ainda assim promovendo o aumento da disponibilidade de oxigênio no substrato. O oxigênio reativo O² é um

dos agentes radicalares com maior capacidade de oxirredução, sendo considerado como uma das moléculas mais agressivos e necessita de poucos milissegundos para reagir com moléculas biológicas (SHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

Entretanto, a possível degradação das enzimas, provocaram a liberação de moléculas de oxigênio reativo, ocasionando a neutralização do radical, por moléculas fenólicas com potencial antioxidante. Colaborando com as informações citadas acima muitos compostos fenólicos encontrados na torta de linhaça apresentam capacidade antioxidante como: ácido p-cumárico ácido o-cumárico ácido ferulico entre outros (STODOLAK *et al.*, 2016; TERPENIC *et al.*, 2012). Outra possível justificativa para a queda brusca dos compostos fenólicos ocorrida nas primeiras horas de fermentação já discutidos anteriormente é a possível degradação dos compostos liberados da matriz vegetal ou produzidos pelo micro-organismo apresentem uma estabilidade térmica menor. Já para Correia *et al* (2004) o baixo teor de fenólicos medidos em estágios iniciais da fermentação pode estar atribuído a dominação de várias formas quimicamente ligadas à matriz vegetal.

O tempo de fermentação e a disponibilidade de nutrientes e algo de suma importância durante um processo fermentativo, desta forma o fungo *Rhizopus oligosporus* quando encontra ambiente ideal para seu crescimento, passa a produzir inúmeras biomoléculas capazes de degradar substâncias, como as encontradas no substrato da torta de linhaça, podendo aumentar a concentração de compostos fenólicos.

A produção de enzimática está intimamente correlacionado a liberação das biomoléculas, e ao desenvolvimento microbiano, onde as enzimas promovem a degradação do material vegetal, promovendo a liberação de compostos de baixo peso moléculas que irá servir de “combustível” para potencializar o crescimento microbiano, em consequência a essa reação ocasionando maior quantidade de moléculas fenólicas e antioxidantes livres no presente inóculo (MARTINS *et al.*, 2011; SOCCOOL *et al.*, 2006).

O processo de fermentação em estado solido, é um dos métodos de processamento de matrizes vegetais, que possui a capacidade de melhorar significativamente as propriedades nutricionais e organolépticas, promovendo o enriquecimento em moléculas antioxidantes e fenólicas (MARTINS *et al.*, 2011).

Durante o processo fermentativo com o fungo *Rhizopus oligosporus*, produz enzimas capazes de quebrar eficientemente as moléculas, que formam a

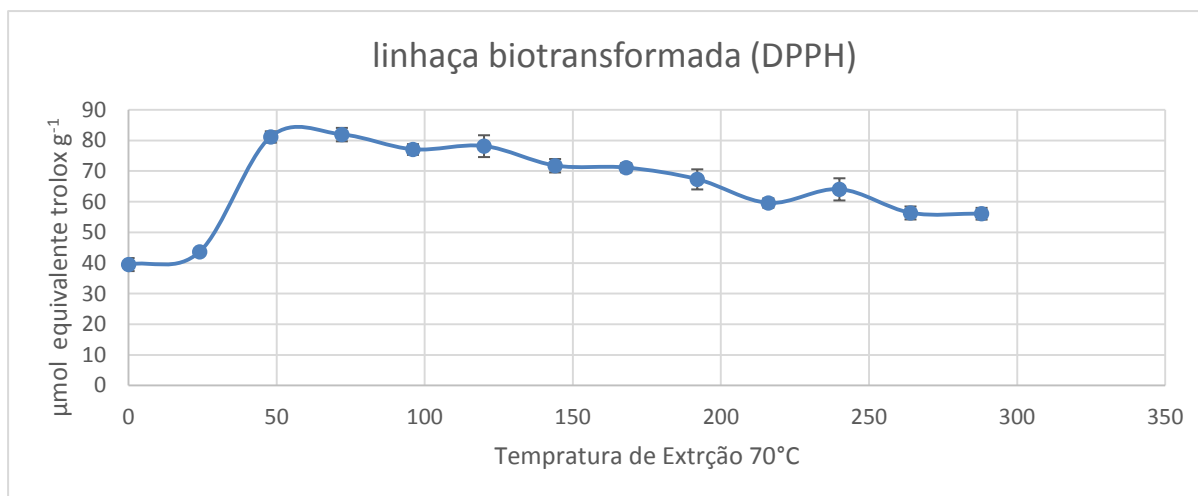
parede celular da planta, hidrolisando as ligações de éster que ligam os compostos fenólicos a parede celular da planta, tornando os compostos fenólicos, são substâncias livres que podem ser carregadas pelos solventes (DULF *et al.*, 2018).

O processo de fermentação tem a capacidade de degradação de da parede celular de matrizes vegetais, tornando os compostos fenólicos livres e os concentrado durante o processo de extração, os compostos fenólicos possuem várias qualidades que podem ser utilizados nas indústrias de alimentos como agentes antioxidantes, mas apresentam capacidades que vão além da indústria alimentícia, tendo capacidade de ação em células tumorais, sendo utilizado como agentes fitoterápicos, apresentado inúmeros benefícios a saúde (DULF *et al.*, 2018; IBRAHIM *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019).

5.5. POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA TORTA DE LINHAÇA BIOTRANSFORMADA

Os parâmetros de extração, tempo de fermentação, compostos antioxidantes obtidos durante a respectiva análise, verificação da influência do solvente, variação de temperatura de extração em ultrassom assistido, sendo aplicados em resíduos de torta de linhaça fermentada utilizando o método DPPH. Os ácidos fenólicos são substâncias com grande capacidade antioxidante, esses ácidos podem ser subdivididos em dois sub grupos ácidos hidroxibenzóico e ácidos hidrocínâmicos, a linhaça em sua constituição vegetal contém consideráveis proporções de ácidos hidrocínâmicos, pois esse ácido contém uma afinidade específica a solventes hidrofílicos que através da sua polaridade sua facilitada extração e quantificação pelos respectivos métodos de quantificação antioxidante e fenólica (DENG *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2011).

Gráfico 04- atividade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) dos extratos de torta de linhaça biotransformada, extraídos com solvente água e mensurados pelo método DPPH.



Fonte: Própria autoria

Nos respectivos dados demonstrados na gráfico 04 e no anexo E, o processo fermentativo teve a capacidade de aumentar a concentração de compostos antioxidantes, durante o tempo de fermentação o período analisado com maior concentração de antioxidante foi o tempo de (72) horas, com concentração de antioxidantes chegando a $81,9 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, em temperatura de extração de 70°C , os tempos de fermentação (48, 72, 96,120) apresentaram maior concentração de antioxidante, e não apresentaram diferenças significativas entre si.

A obtenção de compostos antioxidantes também pode ser correlacionada com o crescimento do fungo, pois alguns fatores de desenvolvimento obedecem a uma certa cinética igualitária para os processos fermentativos quando não há influências negativas no desenvolvimento (DULF *et al.*, 2018).

As técnicas de obtenção de compostos antioxidantes através de processo fermentativo são de grande valia pois os micro-organismos possuem a capacidade de melhorar nutricionalmente uma matriz vegetal, degradando algumas moléculas de alto peso molecular, liberando e produzindo quantidades de antioxidantes que podem ser mensuradas pelo método de DPPH, que consiste na técnica de captura de antioxidantes disponíveis na solução analisada pelo radical (GULLÓN *et al.*, 2017; SOCCOL *et al.*, 2006).

Durante a fase exponencial de crescimento, os micro-organismos concentram-se no consumo de material do meio e liberação de enzimas, o fungo *Rhizopus* possui capacidades notáveis de degradação de substrato através do

sistema enzimático, sendo capaz de produzir quantidades significativas de enzimas especialmente as β glucosidases, que são capazes de hidrolisar ligações β -glicosídicas, promovendo a liberação de grandes quantidades de moléculas com capacidade antioxidante (DULF *et al.*, 2018).

Segundo Deng *et al* (2018) a análise de compostos antioxidantes está amplamente correlacionada com as lignanas presentes na linhaça. Então à possibilidade de ter ocorrido a degradação enzimática do substrato, havendo uma disponibilização dos compostos antioxidantes (SANJUKA *et al.*, 2016).

Além da ação enzimática existe a produção de substâncias antioxidantes pelo próprio micro-organismo, essa possível produção geralmente ocorre na fase estacionária do processo fermentativo.

Alguns compostos com grande potencial antioxidante também podem ser liberados durante a fermentação em estado sólido, mais especificamente na fase exponencial onde a grande presença do inoculo fúngico, que está disseminado no meio de cultura, dependendo dos métodos de extração, o mesmo poderá provocar a análise das células do inoculo, causando a liberação de moléculas conhecidas como compostos aromáticos, aminoácidos e peptídeos (DULF *et al.*, 2018). Nas pesquisas de Vong *et al* (2018) constatou que a presença de aminoácidos oriundos do fungo, onde a temperatura de 70°C e o ultrassom, causaram o rompimento das células do micro-organismo ocorrendo a o aumento de compostos antioxidantes presentes na análise.

A maior elevação dos compostos antioxidante durante o processo fermentativo na foi fase lag e log da fermentação apresentando concentração de 81,9 micro mol equivalente a Trolox.

As enzimas são substâncias produzidas por micro-organismos fúngicos, com o intuito de promover a quebra massiva de compostos, que formam a parede celular das células vegetais, conseqüentemente as enzimas promovem a liberação de fenólicos livres que estavam ligados a parede celular que foi hidrolisada (DULF *et al.*, 2018).

Os ácidos hidrocínâmico representaram como os principais antioxidantes obtidos através de uma fermentação solida com o *Rhizopus* realizada como pômaseas, sendo que essas substâncias foram concentrando-se durante o período de fermentação (DULF *et al.*, 2018).

5.6.COMPARAÇÃO ENTRE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA TORTA DE LINHAÇA E LINHAÇA BIOTRANSFORMADA

Durante o processo de extração dos compostos antioxidantes da torta de linhaça utilizando ultrassom, solvente e variações de temperatura, apenas os compostos fenólicos livres presentes na torta de linhaça foram extraídos, esses fenólicos livres podem ser correlacionados com os resíduos de óleo presentes no subproduto. Já que durante o processo de esmagamento da semente de linhaça algumas pequenas quantidades de óleo ficam presentes na torta de linhaça (OOMAH; MAZZA, 1998). Durante o processo fermentativo, a ação enzimática pode ter sido capaz de liberar grandes quantidades de compostos antioxidantes, e também pode haver a possibilidade de o fungo ter se apropriado das substâncias nutritivas do substrato e ter produzido compostos com atividade antioxidante.

Em um processo de biotransformação, pode haver a presença de compostos antioxidantes “livres”, que estão presentes no substrato vegetal, o desenvolvimento de alguns micro-organismos em processo de fermentação sólida, contém a capacidade de produção de enzimas, que atuam nas quebras de compostos fenólicos com capacidade antioxidante.

A ação conjunta de técnicas durante o processos de extração pode envolver vários fatores como: temperatura que age na degradação de algumas fibras vegetais, nas ondas de cavitação produzidas pelo ultrassom, com ação do micro-organismo através da produção de enzimas, a ação do solvente que apresenta uma afinidade as moléculas do material a ser extraído, todos esses processos agindo em uma ação conjunta pode provocar uma súbita liberação de compostos antioxidantes melhorando as qualidades químicas e organolépticas do substrato (YU *et al.*, 2018; DULF *et al.*, 2018; MARTINZ *et al.*, 2011).

A grande flexibilidade adaptativa dos fungos filamentosos nos processos fermentativo é devido a produção enzimática, estas substâncias são conhecidas como amilase, pectinase, xilanases, celulasas, quitinases, lipases, proteases, essas moléculas tem sua ação diretamente ligada a degradação de substratos lignocelulósico, promovendo a liberação de compostos antioxidantes, pois alguns desses compostos, não estão disponíveis para serem carregados pelos solventes, estão entrelaçados com a matriz vegetal (SANCHEZ, 2009; NIGAM 2009).

A biotransformação tem uma capacidade enorme de melhorar

nutricionalmente matrizes vegetais, com a ação do micro-organismo que atua na liberação e na maior disponibilização dos compostos antioxidantes com o decorrer do processo fermentativo.

Nos respectivos dados demonstrados no anexo D, e no respectivo anexo A, podemos evidenciar que a fermentação foi um fator positivo na busca de maior concentração de antioxidantes extraídos da torta de linhaça, utilizando o solvente água em temperatura de 70°C, no tempo de fermentação de (72 horas) foi que um dos tempos de fermentação apresentou maior significância com ($p < 0,5$), com maior concentração de antioxidantes com 81,9 μmol equivalente a Trolox g^{-1} , mas 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 maior concentração de antioxidante de 23% maior que a concentração obtida com a extração da torta de linhaça in natura.

A presença de compostos hidrossolúveis em um processo de extração de matriz vegetal com solvente hidrofílicos, nos traz a perspectiva de extração de moléculas antioxidantes como flavonoides, antocianinas e ligninas (Xu *et al.*, 2017).

Os flavonoides lignanas compostos hidrocínâmico são moléculas antioxidantes com grande presença na torta de linhaça, e possuem respectiva afinidade a solventes orgânicos e com características hidrossolúveis (MANNUCCI *et al.*, 2019).

Os possíveis antioxidantes capturados pelos métodos DPPH e ABTS, na torta *in natura*, podem estar relacionados as antocianinas ou possíveis antioxidantes com maior disponibilidade no material.

As antocianinas são substâncias com grande presença na linhaça, concede a função de proteção ao tecido vegetal contra raios ultravioletas, e tem a característica de proteger contra possível produção de radicais livres (HARBORNE, 1975).

A ação de enzimas adjuntas com a alta temperatura de 70°C adjunto com ação de ultrassom assistido sobre o material vegetal da torta de linhaça pode ter havido a liberação massiva de substâncias antioxidantes com ampla estabilidade térmica provocando a possível identificação pelo método DPPH.

Muitos dos antioxidantes presentes em sementes oleaginosas estão

ligadas em conjugações com moléculas de açúcar e precisam da ação da temperatura ou enzimática para que ocorra a disponibilização destes compostos (TERPENIC *et al.*, 2012; XU *et al* 2017; DULF *et al.*, 2018).

Desta forma, as lignanas aparecem como uma das substâncias polifenólicas com maior concentração nas sementes de linhaça, mas se apresentam-se complexadas em grandes moléculas, com a possível ação enzimática possa ter ocorrido possível degradação em moléculas menores produzindo um possível aumento nas qualidades antioxidantes do material fermentado (DULF *et al.*, 2018; CORBIN *et al.*, 2015). O crescimento do micro-organismo e a liberação de enzimas está amplamente correlacionado com os açúcares disponíveis na linhaça, em sua constituição natural a semente de linhaça tem uma gama de açúcares passíveis de serem utilizados durante o processo fermentativo xilose, arabinose, galactose, glicose (DULF *et al.*, 2018).

Durante o processo fermentativo uma das principais moléculas responsáveis pela concentração dos antioxidantes são o acúmulo ou a produção dos flavonóis (ESTODOLAK *et al.*, 2016).

A linhaça tem grande produção de compostos hidrocínâmico e flavonoides, juntando ao processo fermentativo, ação das ondas de cavitação do ultrassom, juntamente com a grande afinidade das moléculas antioxidantes ao solvente água, com a possível capacidade de produção do fungo *Rhizopus* aos compostos derivados do ácidos hidrocínâmicos, com o decorrer do processo fermentativo a grande concentração deste ácido, pode ter alterado os níveis de antioxidantes ocorridos durante o processo fermentativo (MANNUCCI *et al.*, 2019; DULF *et al.*, 2019; CORBIN *et al.*, 2015).

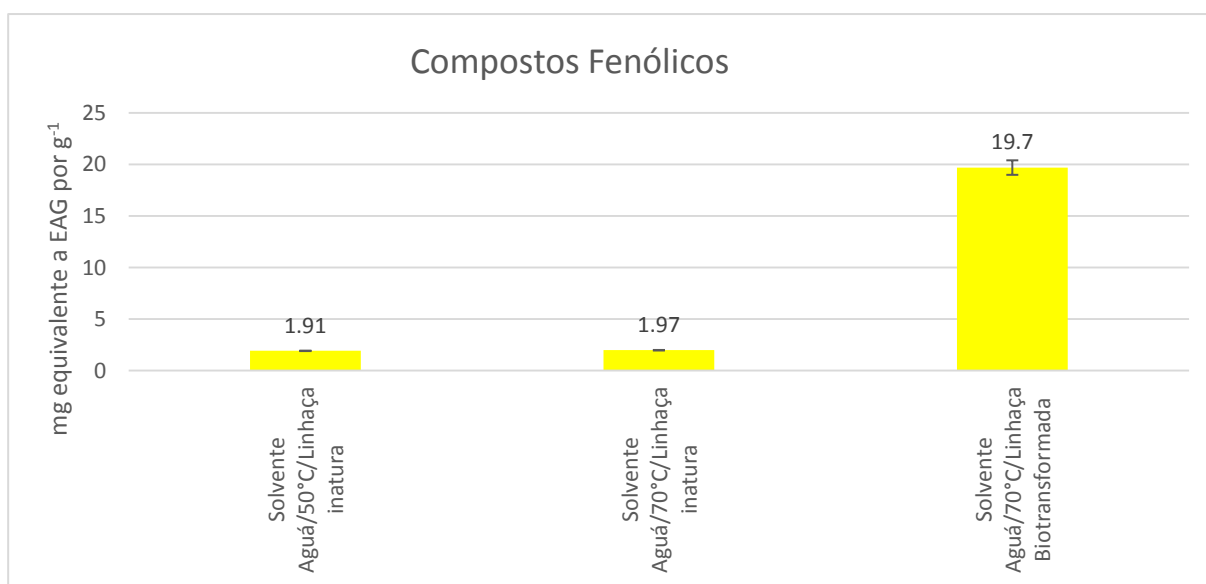
Alguns autores em suas pesquisas relatam uma possível relação entre os compostos fenólicos e a técnica antioxidante DPPH, relatando que o possível aumento dos antioxidantes tem correlação com a disponibilidade das moléculas encontradas na técnica de compostos fenólicos, pois grande quantidade de compostos antioxidantes são moléculas fenólicas (DENG *et al.*, 2018).

O processo de fermentação em estado sólido é um dos métodos de processamento capazes de melhorar significativamente as propriedades nutricionais de substratos. Os fungos do gênero *Rhizopus* são micro-organismos com bom desenvolvimento em fermentação sólida, que atuam aumentando disponibilidade de compostos fenólicos e produzindo substâncias antioxidantes (RAZAK *et al*, 2015).

A possível variação entre os métodos de antioxidantes e diferentes resultados obtidos durante a análise de composto fenólicos, pode ser referente ao processo de prensagem da semente, gerando duas matrizes o óleo e a torta de linhaça, essa prensagem pode concentrar substâncias fenólicas na torta de linhaça, e a possível variação de plantas oriundas de diferentes locais, tiveram diferentes estresses bióticos e abióticos causado pelo ambiente de origem (MANNUCCI *et al.*, 2019; OOMAH & MAZZA, 1998; DENG *et al.*, 2018). Os compostos encontrados na torta de linhaça são compostos fenólicos de grande maioria hidrocínâmico, a grande parte desses compostos fenólicos apresentam também grandes qualidades antioxidantes (STODOLAK *et al.*, 2016; BLASA *et al.*, 2010; ROBINS, 2003).

Os compostos fenólicos são substâncias encontradas em plantas, e também pode ser produzida em processo fermentativo, a grande maioria destes compostos possui atividade antioxidante. A torta de linhaça, em sua estrutura vegetal possui uma gama dessas substâncias, que podem estar aderidas as fibras vegetais, desta forma o processo de biotransformação geralmente possui a capacidade de disponibilização desses compostos. No gráfico 5 abaixo estão expressos os valores encontrados no referente estudo da torta de linhaça fermentada e *in natura*, onde as análises de compostos fenólicos, foram expressos através da técnica de Folin ciocauteau expressos em mg de EAG g⁻¹.

Gráfico 05 - compostos fenólicos (mg EAG g⁻¹) com a melhor extração da torta de linhaça, e o melhor ponto de fermentação da linhaça biotransformada.



Fonte: Própria autoria

Nos respectivos dados demonstrados no gráfico 5 e no anexo C, e no referente anexo D, podemos evidenciar a maior concentração de compostos fenólicos nos extratos da torta de linhaça fermentada, com o temperatura de extração de 70°C tendo seu valor de 19,2 mg de EAG g⁻¹, já para a torta de linhaça in natura com temperatura de extração de 50°C e 70°C com solvente água, os maiores valores foram de 1,91 e 1,97 mg de EAG g⁻¹. Desta forma, mais uma vez podemos observar que além da superioridade em concentração de antioxidantes também temos uma grande superioridade na concentração de compostos fenólicos tendo uma diferença ficando entre 10%.

Os solventes orgânicos podem extrair grandes quantidades de compostos fenólicos, a água além de ser um solvente orgânico apresenta capacidade de absorção de substâncias fenólicas hidrossolúveis, compartilha de características químicas ligadas a solvatação, além de alguns compostos fenólicos apresentarem grande afinidade as moléculas de hidrogênio devido a doação de elétrons ocorrida durante o processo de extração (BOEING *et al.*, 2014; BETHIT *et al.*, 2018).

A água também possui uma afinidade em específico, as moléculas polifenólicas encontradas na linhaça (MANNUCCI *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos obtidos durante o presente processo de biotransformação, mostraram ser 10% mais concentrados, que os compostos obtidos na extração da torta de linhaça, onde processo fermentativo obteve êxito na melhoria das condições nutricionais e organolépticas da torta de linhaça.

O presente aumento nos compostos fenólicos, ocorridos durante ao processo fermentativos, podem ter correlação com o processo enzimático produzido pelo fungo, pois as enzimas tem a capacidade de degradar as paredes celulares da torta de linhaça, ocasionando a hidrolise entre as ligações de ésteres que ligam a parede celular com os compostos fenólicos, ocasionando uma maior disponibilidade (DULF *et al.*, 2018). Alguns compostos fenólicos podem ser produzidos durante a fermentação pelo micro-organismo promovendo a elevação da concentração dos ácidos fenólicos (NIGAN 2009).

6. CONCLUSÕES

A partir da extração em diferentes temperaturas de 30, 50 e 70°C, em ultrassom assistido e com diferentes solventes, os compostos antioxidantes e fenólicos da torta de linhaça apresentaram uma afinidade em específico aos solventes hidrofílicos e tiveram maior significância ($p < 0,5$), etanol 75%, água e metanol. A torta de linhaça biotransformada apresentou uma maior quantidade de compostos fenólicos sendo que a diferença foi em torno de 10%, e para a concentração de antioxidantes a torta de linhaça biotransformada obteve 23% mais concentrada que a torta de linhaça in natura em temperatura de extração de 70°C com os extratos aquosos. Para uma melhor estimativa de compostos, em possíveis trabalhos futuros, a possível identificação das classes fenólicas extraídas durante a fermentação sólida, e testes como atividade antitumoral, para uma futura aplicação animais ou humanos, já que o presente objetivo proposto pelo respectivo estudo foi alcançado, fazendo a melhoria nutricional do subproduto torta de linhaça.

REFERÊNCIAS

AYERZA, R.; COATES, W. Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. **Tropical Science**, v. 44, n. 3, p. 131–135, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ts.154>>. Acesso em: 08 de agosto. 2019

AOAC-Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 18th ed. Washington: AOAC, 2007.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório de Atividades 2010/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2011. 68 p.

ALVES DA CUNHA, M. A; ASBORNOS, S. L; QUEIROZ, S. V. A; SANCHEZ, W. N; BARBOSA, D. A. M; DEKKER, R. F. H. structure and biological functions of D-glucans and their application in: *atta-urralman*. **Studies in natural products chemistry Elsevier**, v.53 n.9, p.309-337 2017.

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.

BEKHIT, A. E. A; SHAVANDI, A; JODJAJA, T; BIRCHA, J; TEHC, S; ISAM. A; AHMED, M; AI-JUHAIMI, F. Y; SAEEDI, P; BEKHIT, A. A. Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.13, p.129–152, 2018.

BATTAGLIA, E.; BENOIT, I.; BRINK, J. V. D.; WIEBENGA, A.; VRIES, P. M. R. P. Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. **BMC Genomics**,v12, n.38 p.10-12, 2011.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentação de Bioprocessos**. 2ed São Carlos: Edufscar, 2015. 162.

BOEING, J. S; BARIZÃO, E. O; SILVA, B. C; MONTANHER, P. F; ALMEIDA, V. C; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v.1, n.1, p.1-9, 2014,

BENZIE, I. F. F; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v.239, pp.70–76, 1996.

BLANDÒN, L. M; NOSEDA, M. D; ISLAN, G. A; CASTRO, G. R; PEREIRA, G. V. M; THOMAZ-SOCCOL, V; SOCCOL, C. R. Optimization of culture conditions for kefir production in whey: The structural and biocidal properties of the resulting polysaccharide. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber**, pp.1-8, 2018.

BLASA, M.; GENNARI, L.; ANGELINO, D.; NINFALI, P. Fruit and Vegetable Antioxidants in Health. In: WATSON, T.R.; PREEDY, V.R. **Bioactive Foods in Promoting Health**, p.37-58, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-wissenschaft & technologies**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BHANJA, T. D.; KUHAD, R. C. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. **Biotechnology Reports**, v.4, p.120-127, 2014.

BIERA, M. C. J; MEDEEIROSA, A. B. P; KIMPED, N. D; SOCCOL, C. R. PAPER Evaluation of antioxidant activity of the fermented product from the biotransformation of R-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe* sp.. **Biotechnology Research & Innovation**. 2019.

BHANJA, T.; KUMARI, A.; BANERJEE, R. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. **Bioresource Technology**, v.100, p. 2861-2866, 2009.

OTERO-PAREJA, M. J; CASAS, L; FERNÁNDEZ-PONCE, M. T; MANTELL, C; OSSA, E. J. M. L. Green Extraction of Antioxidants from Different Varieties of Red Grape Pomace. **Molecules**, v.20, pp.9686-9702, 2015.

CALEGARI, G. C.; SANTOS, V. A. Q.; TEIXEIRA, S. D.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CUNHA, M. A. A. Sulfonation of (1→6)-β-D-Glucan (*Lasiodiplodan*) and Its Antioxidant and Antimicrobial Potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5, p.850-863, 2017.

CORBIN, C; FIDEL, T; LECLERC, E. A; BARAKZOY, E; SAGOT, N; FALGUIÉRES, A; RENOARD, S; BLONDEAU, J. P; FERROUD, C; DOUSSOT, J; LAINÉ, E; HANO, C. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.26, pp.176–185, 2015.

CORTEZ, D. V.; CASTROA, H. F.; ANDRADEB, G. S. S. POTENCIAL CATALÍTICO DE LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO. **Quim. Nova**, v.40, n.1, p.85-96, 2017.

CHOUDHARY. S. B; SHARMA. H. K; KUMAR. A. A; MARUTHI. R. T; MITRA. J; KARMAKAR. P. G. SSR and morphological trait based population structure analysis of 130 diverse flax (*Linum usitatissimum* L.) accessions. **Comptes Rendus Biologies**, v.10, n.12, p. 11, 2017.

CHUN, J; LEEB, J; YE, L. L; EXLER, J; EITENMILLER, R. R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 19, pp.196–204, 2006.

CACHO. J. I; CAMPILLO. N; VIÑAS. P; CÓRDOBA. M. H. Determination of synthetic

phenolic antioxidants in edible oils using microvial insert large volume injection gas-chromatography. **Food Chemistry. Espanha**, v.20, n.0, p. 249-254, 2016.

CASAGRANDE, M; ZANELAA, J; Américo Wagner JÚNIORB, A. W; BUSSOB, C; WOUKD, J; IURCKEVICZA, G; MONTANHER, P. F; YAMASHITAC, F; MALFATTID, C. R. M. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops & Products**. v.125, pp.207–219, 2018.

CORDEIRO, A. M. T. M; MEDEIROS, M. L; SANTOS, N. A; SOLEDADE, L. E. B; PONTES, F. B. L; SOUZA, A. L; QUEIROZ, N; SOUZA, A. G. (*Rosmarinus officinalis* L.) extract Thermal study and evaluation of the antioxidant effect on vegetable oils. **J Therm Anal Calorim**. v.113, pp.889–895, 2013.

CAI, Y; LUOB, Q; SUNC, M; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**. v.74, pp.2157–2184, 2004.

CORREIA, R. T. P; MCCUE, P; MAGALHÃES, M. M. A; MACEDO, G. R; SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v.39, pp.2167–2172, 2004.

DO, Q. D; ANGKAWIJAYA, A. E; TRAN-NGUYEN, P. L; HUYNH, L. H; SOETAREDJO, F. E; ISMADJI, S; JU, Y. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. **Science direct**, 2014.

DENG, Q.; YU, X.; FANGLI, M.; XU, J.; HUANG, F.; QINADE, HUANG.; SENGH, F. Comparative analysis of the in-vitro antioxidant 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.

DECKER, E. A; ELIAS, R. J; CLEMENTS, J. M. D. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Woodhead Publishing Series in Food Science, **Technology and Nutrition**. v.9, pp. 516, 2010.

EFSA. Scientific Opinion on the evaluation of the substances currently on the list in the annex to Commission Directive 96/3/EC as acceptable previous cargoes for edible fats and oils – Part II of III. **EFSA Journal** 2012;10(5):2703. doi:10.2903/j.efsa.2012.2703.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **journal of functional foods. Science Direct**. 2015.

FLAX CONCIL OF CANADA, 2018: encontrado em (<https://flaxcouncil.ca/http>) [acesso](#) em:03. Nov.2018.

FLAKELAR, C. L.; PRENZLER, P. D.; LUCKETT, D. J.; HOWITT, J. A.; DORAN, G. A rapid method for the simultaneous quantification of the major tocopherols, carotenoids, free and esterified sterols in canola (*Brassica napus*) oil using normal phase liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.214, p.147-155, 2017.

FAN, L; SOCCOL, A. T; PANDEY, A; SOCCOL, C. R. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. **Swiss Society of Food Science and Technology**, v. 40, pp30–35, 2007.

FIGUEIREDO, M. S; MAIA, L. A; GUARDA, D. S; LISBOA, P. C; MOURA, E. G. Flaxseed secoisolariciresinol diglucoside (SDG) during lactation improves bone metabolism in offspring at adulthood. **Journal of Functional Foods**. v.29, pp.161–171, 2016.

FERNÁNDEZ-AGULLÓ, A; FREIRE, M. S; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J. Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. **Industrial Crops and Products**. v.64, pp.105–113, 2015.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M.; RÚA, J. ARRIAGA, D.; DEL VALLE, P.; GARCIA-ARMESTO, M. R. In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. **Food Control**, v.30, p.393-399, 2013.

GUTIÉRREZ, C; RUBILAR, M; JARA, C; VERDUGO, M; SINEIRO, J; SHENE, C. FLAXSEED AND FLAXSEED CAKE AS A SOURCE OF COMPOUNDS FOR FOOD INDUSTRY. **J. Soil Sci. Plant Nutr.** v.10, pp. 454 – 463, 2010.

GRUN, I. U.; ADHIKARI, K.; LI, C.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J.; LAKDAS, L. Changes in the Profile of Genistein, Daidzein, and Their Conjugates during Thermal Processing of Tofu. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2839-2843, 2001.

GULLÓN, B; GULLÓN, P; LÚ-CHAU, T. A; MOREIRA, M. T; LEMA, J. M; EIBES, B. Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. **Industrial Crops & Products**, v.108, pp.649–659, 2017.

GALVÃO, E. L.; SILVA, D. C. F.; OLIVEIRA, J. S.; MOREIRA, V. B.; SOUSA, E. M. B. D. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.28, p.551-557, 2008.

HUANG, D.; BOXIN; WOODILL, M. H.; FLANAGAN; J. A.; DEEMER, E. K. Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated β -Cyclodextrin as the Solubility

Enhancer. **J. Agric. Food Chem**, v .50, p.1815-1821, 2005.

HOSSEINIANA. F. S; MUIRB. A. S; WESTCOTTB. N. D; KROLA. E. S. Antioxidant Capacity of Flaxseed Lignans in Two Model Systems. **Agriculture and Agri-Food Canada**. V. 83, n.10 p.835-839, 2006.

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

HUANG, D.; BOXIN; WOODILL, M. H.; FLANAGAN; J. A.; DEEMER, E. K. Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated β -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. **J. Agric. Food Chem**. v .50, p.1815-1821, 2002.

HAGEL, S. A. B. N.; EWALD, C. C.; DOENST, T. D.; SACHSE, S. E.; ROEDEL, J. E.; PLETZ, M. W. Ventriculitis due to infection with *Rhizopus arrhizus*. **Medical Mycology Case Reports**, v.10, p.18–20, 2015.

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

HARBORNE, B. J. Anthocyanin Inheritance in Petals of Flax, *Linum usitatissimum*. *Phytochemistry*, v.14, pp. 2491-2494. 1975.

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.

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>).

IBRAHIM, A. Y; EI-NEWARYA, S. A; IBRAHIM, G. E. Antioxidant, cytotoxicity and anti-tumor activity of *Cordia dichotoma* fruits accompanied with its volatile and sugar composition. **Annals of Agricultural Sciences**, v.64, pp.29–37, 2019.

JOHANSSON, P; PEERLKAMP, N; KAMAL-EIDI, 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.

LIYANA-PATHIRANA, C & SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.93, pp.47–56, 2005.

LIU, X. C; ZHU, Z. Y; LIU, Y. Y; SUN, H. Q. Comparisons of the anti-tumor activity of polysaccharides from fermented mycelia and cultivated fruiting bodies of *Cordyceps militaris* in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.130, pp.307–314, 2019.

LEOPOLDINI, M; RUSSO, N; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, 2011.

LUNA, W. N. S.; SANTOS, V. A. Q.; TEIXEIRA, S. D.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CUNHA, M. A. A. O-Acetylated (1→6)-β-D-Glucan (Lasiodiplodan): Chemical Derivatization, Characterization and Antioxidant Activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.6, p.320-332, 2018.

LANIGAN, R. S.; YAMARIK, T. A. Final Report on the Safety Assessment of BHT. **International Journal of Toxicology**, v. 21, p. 19-94, 2002.

LI, T.; TU, C.; RUI, X.; GAO, Y.; WEI-LI.; WANG, K.; XIAO, Y.; DONG, M. Study of Water Dynamics in the Soaking, Steaming, and Solid-State Fermentation of Glutinous Rice by LF-NMR: A Novel Monitoring Approach. **J. Agric. Food Chem**, v.63, p.3261–3270, 2015.

MANTOVANI, D.; CARDOSO, L.; CORAZZA, M. L.; ZANIN, G. M.; TAZINAFO, N.; COSTA, S. C. Presença de isoflavonas glicosídicas em resíduo industrial e sua bioconversão enzimática para transformação em compostos isoflavonas agliconas. **Revista brasileira de tecnologia agroindustrial**, v. 5, p. 606-617, 2011.

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).

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.

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

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.

MILLER, A; FOSMER, B; RUSH, T; MC-MULLIN, D; BEACOM, P. Industrial Production of Lactic Acid. Cargill Incorporated, **Biotechnology Development Center**, Minneapolis, MN, USA, 2011.

MALGORZATA, W.; HONKE, J.; KONRAD, P. M. Effect of solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus* on bioactive compounds and antioxidant capacity of raw and roasted buckwheat groats. **Food Sci**, v.27, p.424-432, 2015.

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,

2011.

MAHATA, M. B; SHINYA, S; MASAKI, E; YAMAMOTO, T; OHNUMA, T; BRZEZINSKI, R; MAZUMDER, T. K; YAMASHITA, K; NARIHIRO, K; FUKAMIZO, T. Production of chitooligosaccharides from *Rhizopus oligosporus* NRRL2710 cells by chitosanase digestion. **Carbohydrate Research** v.383, p. 27–33, 2014.

MATTHAUSA, B; VOSMANNA, K; PHAMB, L. Q; AITZETMULLERA, K. FA and Tocopherol Composition of Vietnamese Oilseeds. **JAOCs**, v. 80, n.10, 2003.

MALGORZATA, W.; JOANNA, H.; KONRAD, P. M. Effect of solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus* on bioactive compounds and antioxidant capacity of raw and roasted buckwheat groats. **Food Sci**, v.27, p.424-432, 2015.

NIGAM, P. S. Production of bioactive secondary metabolites. **Biotecnology for agroindustrial residues utilization**, p.129-145, 2009.

NIGAM, P. S; PANDEY, A. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Springer Science+Business Media. Book, pp. 457, 2009. NOUT, M. J. R. and KIERS, J. L. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.789-805, 2005.

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

NDOU, S. P.; KIARIE, M. C.; WALSH, M. C.; NYACHOTI, C. M.; Nutritive value of flaxseed meal fed to growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, p.1-27,2018.

OLIVEIRA. M. R; SANTOS. R. F; ROSA. H. A; WERNER. O; VIEIRA. M. D; DELAI. J. M. Fertilização da cultura de linhaça *Linum usitatissimum*. **Revista Brasileira de Energias Renováveis. Cascavel PR**, v. 1, p. 22-32, 2012.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, p.1153–1169, 2000.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS COMO PERSPECTIVA DE REDUÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL. **J. Technol. Manag. Innov**, v.2, p.118-127, 2007.

RHODES, T. A.; MIOYER, A. J.; SMITH, M. L.; SINAH.; KELLEY. Production of Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus*. **Fermentation Laboratory, Northern Utilization Research and Development Division**, v.7, p.74-80, 1958.

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.

RAZAK, D. L. A.; RASHID, N. Y. A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S. A.; KAHAR, A. A.; LONG, K. Cosmeceutical potentials and bioactive compounds 5 of rice bran fermented with single and mix culture 6 of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. pp. 8, 2015.

RADENKOV, V.; JUHNEVICA-RADENKOVA, K.; GÓRNAS, P.; SEGLINA, D. Non-waste technology through the enzymatic hydrolysis of agro-industrial by-products. **Trends in Food Science & Technology**. 2018.

RAMOS-SANCHEZ, L. B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; CARIDAD, M.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. **Bioprocess Biotech**, v.5, p.3-9, 2015.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Science**. v.2, pp.152–159, 1997.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Food: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* v. 51, pp.2866–2887, 2003.

REINOSO, B. D.; COUTO, D.; MOURE, A.; FERNANDES, E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Optimization of antioxidants – Extraction from *Castanea sativa* leaves. **Chemical Engineering Journal**. v. 203, pp.101–109, 2012.

RE, R.; PELLEGRINE, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. RICE-EVANS, C. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, pp.1231–1237, 1999.

SANCHEZ, C. lignocellulosic residues; degradation and bioconversion by fung. **Biotechnol ADV**, p.185-94, 2009.

SANJUKA, S.; RAI, A. K. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v.50, p. 1-10, 2016.

SCHNEIDER, C. D. & OLIVEIRA, A. R. de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, V. 10, p.314-318, 2004.

SHI, M.; WEI, X.; XU, E.; CHEN, B.; ZHAO, D.; CUI, S.; ZHOU, T. Carboxymethylated degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*: Preparation and in vitro antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.2015, p.76-83, 2017.

SOCOL, C. R.; VENDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. New perspectives of citric acid production and applications. **Food Technology and Biotechnology**. V.44, pp.141-149, 2006.

STARZYNSKA-JANISZEWSKAA, A.; STODOLAKA, B.; GÓMEZ- CARAVACAB, A.

M; MICKOWSKAC, B; MARTIN-GARCIAB, B; BYCZYNSKIA, L. Mould starter selection for extended solid-state fermentation of quinoa. **LWT- Food Science and technology**. 2019.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v.27, p.185-194, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia industrial. Editora Edgard BIÜCHER Ltda, 1a edição, v.2, 2001.

SINGHANIAA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.13-18, 2009.

SILVA, F. G. D.; HERNANDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; NETTO, F. M.; MIRALES, B. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, p.1-7, 2016.

SHAHIDI, F. Antioxidant factors in plant foods and selected oilseeds. **BioFactors**. v.13, pp.179–185, 2000.

STODOLAK, B. E; STARZYNSKA-JANISZEWSKA, A; WYWROCKA-GURGUL, A; WIKIERA, A. SOLID-STATE FERMENTED FLAXSEED OIL CAKE OF IMPROVED ANTIOXIDANT CAPACITY AS POTENTIAL FOOD ADDITIVE. **Journal of Food Processing and Preservation**. 2016.

STANCK, L. T.; BECKER, D.; BOSCO, L. C. Crescimento e produtividade de linhaça. *Agrometeoros*, **Passo Fundo**, v.25, n.1, p.249-256, 2017.

TAVARES, D. G; BARBOSA, B. V. L; FERREIRA, R. L; DUARTE, W. F; CARDOSO, P. G. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigmentproducing fungi isolated from Brazilian caves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2018.

TERPINC, P; CEH, B; UIRIHA, N. P; H ABRAMOVIC, H. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. **Industrial Crops and Products**. v.39, pp. 210– 217, 2012.

TEH, S. S; BEKHIT, A. E; CARNE, A; BIRCH, J. Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates. **Food Measure**. p.104, 2014.

VONG, W. C.; HUA, X. Y.; LIU, S. Q. Solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Yarrowia lipolytica* improved nutritional and flavour properties of okara. **Food Science and Technology**, v.90, p.316-322, 2018.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. **Process Biochemistry**, v. 39, p.367-379, 2003.

VODNAR, D. C; CALINOIU, L. F; DULF, F. V; STEFANESCU, B. E; CRISAN, G; SOCACIU, 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.

VARZAKAS, T. Rhizopus oligosporus mycelial penetration and enzyme diffusion in soya bean tempe. **Process Biochemist**, v. 33, N. 7, p. 741-747, 1998.

VINATORU, M; MASON, T. J; CALLNESCU, L. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. **Trends in Analytical Chemistry**. v.97, pp.159-178, 2017.

VADIVEL, V; BRINDHA, P. Antioxidant property of solvent extract and acid/alkali hydrolysates from rice hulls. **Food Bioscience** v.11, pp.85–91, 2015.

XU, P. D; L, Y; MENG, X; ZHOU, Y; ZHENG, J; ZHANG, J.J. Natural antioxidants in foods na medicinal plants extraction, assessment and resources. *Int. J. Mol. Sci.*v. 96, 2017.

WU, A. W; WAN, P; HANKIN, P; TSENG, C. C; YU, M. C; PIKE, M. C. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian – Americans. **Carcinogenesis**, v.23, n.9, pp.1491-1496, 2002.

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.

WATTANASIRITHAM, L.; THEERAKULKAIT, C.; WICKRAMASEKARA, S.; MAIER, C. S.; STEVENS, J. F. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. **Food Chemistry**, v.192, p.156-162, 2016.

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.

KIM, B.; WOO, S.; KIM, M.; KWON, S. W.; LEE, J.; SUNG, S. H.; KOH, H. J. Identification and quantification of flavonoids in yellow grain mutant of rice (*Oryza sativa* L.). **Food Chemistry**, v.241, p.154-162, 2017.

KORHONEN, H. & PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v.16, p. 945-960, 2006.

ZHANG, J.J; LI, Y; ZHOU, T; XU, D. P; ZHANG, P; LI-SHA; LI, H. B. Bioactivities and Health Benefits of Mushrooms Mainly from China. **Molecules**. v. 21, pp. 938, 2016.

ZHAO, H; DONG, J; LU, J; CHEN, J; LI, Y; SHAN, L; LIN, Y; FAN, W; GU, G. Effects of Extraction Solvent Mixtures on Antioxidant Activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum vulgare*

L.). **J. Agric. Food Chem.** v.54, pp.7277-7286, 2006.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v.35, pp.367–375, 2008.

ANEXO A- Estão expressos os valores encontrados na torta de linhaça, onde as análises de capacidade antioxidante, estão expressos através das técnicas de DPPH.

Tabela 01- Resultados obtidos nos métodos de DPPH.

DPPH	
Água/30°C	14,1 ± 0,52 ^a
Água/50°C	14,2 ± 0,36 ^a
Água/70°C	13,2 ± 0,89 ^{ab}
Metanol/30°C	17,3 ± 0,85 ^c
Metanol/50°C	18,4 ± 0,34 ^{cd}
Metanol/70°C	18,4 ± 0,30 ^{cd}
Etanol 75%/30°C	18,8 ± 1,44 ^c
Etanol 75%/50°C	13,8 ± 0,44 ^a
Etanol 75%/70°C	14,1 ± 0,30 ^a
Etanol PA/30°C	12,2 ± 0,23 ^b
Etanol PA/50°C	13,9 ± 0,50 ^A
Etanol PA/70°C	11,9 ± 0,56 ^b

solvente/°C temperatura (30, 50, 70 graus centígrados); as letras subscritas sobre os valores, representam a significância de cada um, não apresentando diferenças significativas entre eles ($p < 0,5$) (^{A-B}), ou sendo significativo ($p < 0,5$) (^A) aos valores inferiores; os solventes utilizados no processo de extração foram (Água, Etanol PA, Metanol PA, Etanol 75%) com a análises (DPPH) estão plotados na tabela acima em valores correspondentes a (μmol equivalente a Trolox por grama de matéria seca).

ANEXO B- Estão expressos os valores encontrados na torta de linhaça in natura, onde as análises de capacidade antioxidante, estão expressos através das técnicas de ABTS.

Tabela 02- Resultados obtidos nos métodos de ABTS.

ABTS	
Água/30°C	8,18 ± 0,26 ^b
Água/50°C	8,01 ± 1,31 ^b
Água/70°C	9,11 ± 0,35 ^b
Metanol/30°C	16,7 ± 0,47 ^d
Metanol/50°C	15,7 ± 0,42 ^c
Metanol/70°C	13,8 ± 0,34 ^h
Etanol 75%/30°C	4,48 ± 0,48 ^e
Etanol 75%/50°C	5,76 ± 0,86 ^f
Etanol 75%/70°C	3,35 ± 0,42 ^a
Etanol PA/30°C	15,9 ± 0,36 ^c
Etanol PA/50°C	15,2 ± 0,65 ^c
Etanol PA/70°C	16,6 ± 0,01 ^d

solvente/°C temperatura (30, 50, 70 graus centígrados); as letras subscritas sobre os valores, representam a significância de cada um, não apresentando diferenças significativas entre eles ($p < 0,5$) (^{A-B}), ou sendo significativo ($p < 0,5$) (^A) aos valores inferiores; os solventes utilizados no processo de extração foram (Água, Etanol PA, Metanol PA, Etanol 75%) com a análises (ABTS) estão plotados na tabela acima em valores correspondentes a (μmol equivalente a Trolox por grama de matéria seca).

ANEXO C- Estão expressos os valores encontrados na torta de linhaça in natura, onde as análises de capacidade antioxidante, estão expressos através das técnicas de compostos Fenólicos.

Tabela 04- Apresenta resultados obtidos nos métodos de compostos fenólicos

Compostos fenólicos	
Água/30°C	1,53 ± 0,05 ^c
Água/50°C	1,91 ± 0,04 ^d
Água/70°C	1,97 ± 0,05 ^d
Metanol/30°C	0,79 ± 0,01 ^e
Metanol/50°C	1,06 ± 0,01 ^b
Metanol/70°C	1,07 ± 0,01 ^b
Etanol 75%/30°C	1,14 ± 0,01 ^b
Etanol 75%/50°C	1,62 ± 0,02 ^c
Etanol 75%/70°C	1,55 ± 0,02 ^c
Etanol PA/30°C	0,37 ± 0,01 ^a
Etanol PA/50°C	0,45 ± 0,01 ^a
Etanol PA/70°C	0,38 ± 0,02 ^a

Os resultados de (Fenólicos) está correspondente a quantidade de compostos fenólicos, sendo expresso em (mg equivalente a EAG por grama de matéria seca).

Anexo D- estão expressos os valores encontrados no referente estudo da torta de linhaça fermentada, onde as análises de capacidade antioxidante, estão expressos através da técnica de compostos fenólicos.

Tabela 05- Apresenta resultados obtidos nos métodos de compostos fenólicos

Compostos fenólicos	
Horas de ferment	mg equivalente a EAG g ⁻¹
0	11,9 ± 0,30 ^a
24	14,1 ± 0,79 ^{bc}
48	15,2 ± 0,44 ^b
72	16,3 ± 0,88 ^{cd}
96	17,0 ± 0,88 ^{cde}
120	17,0 ± 1,07 ^{cde}
144	16,3 ± 0,39 ^{cd}
168	17,1 ± 1,13 ^{cde}
192	17,2 ± 0,77 ^{de}
216	18,3 ± 0,80 ^{ef}
240	18,5 ± 1,57 ^{ef}
264	19,2 ± 1,41 ^f
288	17,2 ± 0,74 ^{de}

A extração foi conduzida em ultrassom em temperatura de (70°C) durante o tempo de 15 minutos com solvente água, a fermentação foi prosseguida uma retirada a cada 24 horas de fermentação; as letras subscritas sobre os valores, representam a significância de cada um, não apresentando diferenças significativas entre eles ($p < 0,5$) (^{A-B}), ou sendo significativo ($p < 0,5$) (^A) aos valores inferiores; o solvente utilizado durante o processo de extração foi a (Água); a análises de (Fenólicos) estão sendo expresso em (mg equivalente a EAG por grama de matéria seca).

Anexo E- estão expressos os valores encontrados no referente estudo da torta de linhaça fermentada, onde as análises de capacidade antioxidante, estão expressos através da técnica de composto fenólicos.

Tabela 05- Apresenta resultados obtidos nos Métodos de compostos fenólicos.

DPPH	
Horas de ferment	μmol equivalente a Trolox g^{-1}
0	$39,5 \pm 4,25^a$
24	$43,6 \pm 1,70^a$
48	$81,1 \pm 3,60^f$
72	$77,0 \pm 4,30^{ef}$
96	$77,0 \pm 3,4^{ef}$
120	$78,1 \pm 7,10^{ef}$
144	$71,7 \pm 4,30^{de}$
168	$71,1 \pm 2,9^{de}$
192	$67,7 \pm 6,5^{de}$
216	$59,6 \pm 3,06^{bc}$
240	$64,0 \pm 6,5^{bc}$
264	$56,3 \pm 3,06^b$
288	$56,1 \pm 3,8^b$

A extração foi conduzida em ultrassom em temperatura de (70°C) durante o tempo de 15 minutos com solvente água, a fermentação foi prosseguida uma retirada a cada 24 horas de fermentação; as letras subscritas sobre os valores, representam a significância de cada um, não apresentando diferenças significativas entre eles ($p < 0,5$) (^{A-B}), ou sendo significativo ($p < 0,5$) (^A) aos valores inferiores; o solvente utilizado durante o processo de extração foi a (Água); a análises de (DPPH) está em valores correspondentes (μmol equivalente a Trolox por grama de matéria seca).