



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

**CULTIVO DE *Rhizopus oryzae* EM FARELO DE ARROZ INTEGRAL E SEUS
IMPACTOS NA FRAÇÃO LIPÍDICA**

KELLY CRISTINA MASSAROLO

PROF^a. DR^a. LEONOR ALMEIDA DE SOUZA SOARES

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

**CULTIVO DE *Rhizopus oryzae* EM FARELO DE ARROZ INTEGRAL E SEUS
IMPACTOS NA FRAÇÃO LIPÍDICA**

KELLY CRISTINA MASSAROLO

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de mestre em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

PROF^a. Dr^a. LEONOR ALMEIDA DE SOUZA SOARES

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

Ficha catalográfica

M414c Massarolo, Kelly Cristina.
Cultivo de *Rhizopus oryzae* em farelo de arroz integral e seus impactos na fração lipídica / Kelly Cristina Massarolo. – 2016.
103 f.

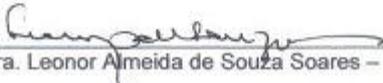
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.
Orientadora: Dr^a. Leonor Almeida de Souza Soares.

1. Beneficiamento de arroz 2. *Rhizopus oryzae* 3. Ácidos Graxos
4. Fósforo 5. Fungo I. Soares, Leonor Almeida de Souza II. Título.

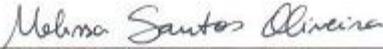
CDU 664.782

APROVAÇÃO

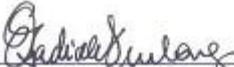
Dissertação defendida por Kelly Cristina Massarolo e aprovada em 4 de março de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Leonor Almeida de Souza Soares – FURG



Profa. Dra. Melissa O. dos Santos – IFFarroupilha



Profa. Dra. Eliana Badiale Furong – FURG



Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG

Aos meus pais **Cleocir** e **Claudete**.

Ao meu amigo, companheiro e marido **Thiago**.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a muitas pessoas que cruzaram minha vida na escola, na faculdade e na vida profissional e aqui deixo um forte abraço a todos que estiveram presentes nessa caminhada.

Aos meus pais **Cleocir** e **Claudete**, e minhas irmãs **Caroline** e **Luana** por todo o amor, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida, vocês são o motivo pelo qual enfrento todos os desafios. Amo vocês!

Ao meu namorado/marido/amigo **Thiago**, pelas infinitas coisas que fez e faz para me ajudar... pelo amor, amizade, companheirismo e acreditar nos meus sonhos... por encarar sempre comigo todas as mudanças e obstáculos. O teu apoio foi fundamental... você é muito importante em minha vida!

À professora **Leonor**, uma das melhores pessoas que já conheci, teu coração é lindo e admirável... obrigada por me dar a oportunidade, orientar e pelos ensinamentos técnicos e de vida. Admiro-te muito e espero poder contar contigo para sempre!

À professora **Eliana** pelo acolhimento e dedicação em ensinar... admiro a sua paixão pelo ensino. Obrigada por TUDO que fez e fazes para o meu desenvolvimento pessoal e profissional!

À amiga **Anelise**, uma pessoa maravilhosa que me adotou desde o primeiro dia com muito carinho e me fez acreditar que era capaz, você foi muito importante nestes dois anos... À **Adri**, coração gigante que sempre me ajudou... À **Lidi**, companheira e conselheira... Adorei fazer parte da equipe das Nonozetes!!!

À **Taiana**, amiga dedicada que me ensinou TUDO com muita calma e didática, te admiro pessoal e profissionalmente, esse trabalho também é teu! À **Sabrina**, uma amiga muito especial que esteve ao meu lado desde o dia da seleção e em todos os outros momentos e que posso contar sempre... À **Larine**, uma pessoa generosa que sempre estava disposta a ajudar e sem perceber me ajudou muito com suas dicas.... À **Renata**, que se fez presente por e-mail esclarecendo todas as minhas dúvidas... Adoro vocês!

Àos colegas do laboratório **Annie**, **Náthali**, **Ana**, **Pri**, **Nara**, **Milena**, **Bibiana**, **Karen**, **Carmen**, **Elisa** pelo incentivo e por sempre tornarem o ambiente de trabalho muito agradável.

Raquel, Rosana, Carol, Andressa, Armando, Larissa, que sempre estiveram dispostos a ajudar, obrigada pelo apoio e pelas risadas.

Às minhas ajudantes amadas **Carol Graça, Sarah, Carol Collazzo e Larissa**, foram muito importantes em todas as etapas no trabalho, sem vocês seria bem mais difícil.

À **Maristela e Jaque**, por sempre ajudarem nos momentos em que precisei. À professora **Susana**, uma pessoa que admiro, obrigada pelas dicas no exame de qualificação. À **Islanda** e sua equipe, por estarem sempre dispostos para o que fosse preciso.

À **Silvia, Michele, Aline, Sibeles, Paola, Douglas, Lenon, Gabi, Cléber, Lili e Fati**, colegas da pós....sempre vou lembrar de vocês com carinho.

Gostaria de agradecer a **banca** pela disponibilidade de avaliar este trabalho.

Ao Professor **Fábio Andrei Duarte** (UFSM), por realizar as análises de fósforo total.

À **FURG** e a **CAPES** por proporcionarem o desenvolvimento de meus estudos.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
CAPÍTULO I	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
CAPÍTULO II	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)	19
3.1.1 Condições que afetam o cultivo em estado sólido	20
3.2 MICRO-ORGANISMOS NO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO.....	21
3.3 FARELO DE ARROZ.....	22
3.3.1 Fósforo (P)	23
3.3.2 Lipídios	25
3.3.2.1 Fosfolipídios	27
3.3.3 γ-orizanol	28
3.4 ANTIOXIDANTES	31
3.4.1 Método do radical DPPH	32
3.4.2 Método do ABTS	33
3.4.3 Método do sistema β-caroteno/ácido linoleico	34
3.4.4 Estabilidade oxidativa	34
CAPÍTULO III	36
ARTIGO 1. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO POR <i>Rhizopus oryzae</i> EM FARELO DE ARROZ: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E FOSFOLIPÍDIOS	37
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 MATERIAL.....	39
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ INTEGRAL (FAI).....	39
2.3 CULTIVO DE <i>Rhizopus oryzae</i>	39
2.4 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA DA BIOMASSA	40
2.4.1 Determinação de lipídios	40
2.4.2 Determinação de fosfolipídios	41
2.4.3 Perfil dos ácidos graxos	41
2.5 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO ORGÂNICO, INORGÂNICO E TOTAL	42
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 CARACTERIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DO FAI	43
3.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO FAI	45
3.3 FRAÇÃO LIPÍDICA	45
3.3.1 Fosfolipídios	46
3.3.2 Perfil ácidos graxos	47
3.4 FÓSFORO TOTAL, ORGÂNICO E INORGÂNICO	50
4 CONCLUSÃO	51

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ARTIGO 2. EXTRAÇÃO DE γ-ORIZANOL DO FARELO DE ARROZ: EFEITO DO TAMANHO DE PARTÍCULA	55
RESUMO	56
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 MATERIAL	57
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ INTEGRAL (FAI)	57
2.3 EXTRAÇÃO DE γ -ORIZANOL	58
2.3.1 Perfil dos componentes majoritários do γ-orizanol.....	58
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	59
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1 γ -ORIZANOL	60
3.1.1 Perfil dos componentes majoritários	61
3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	64
4 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ARTIGO 3. CULTIVO DE <i>Rhizopus oryzae</i> EM FARELO DE ARROZ E SEU EFEITO NO CONTEÚDO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO γ-ORIZANOL..	69
RESUMO	70
1 INTRODUÇÃO.....	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1 MATERIAL	71
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ INTEGRAL (FAI)	71
2.3 CULTIVO DE <i>Rhizopus oryzae</i>	72
2.4 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS	72
2.5 EXTRAÇÃO DE γ -ORIZANOL	73
2.5.1 Caracterização do γ-orizanol	73
2.5.1.1 Perfil de ácidos graxos	73
2.5.1.2 Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol.....	74
2.6 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES	74
2.6.1 Captura do radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	75
2.6.2 Captura do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	75
2.6.3 Atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico	76
2.6.4 Determinação da estabilidade oxidativa	76
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1 γ -ORIZANOL	77
3.1.1 Caracterização do γ-orizanol.....	79
3.1.1.1 Perfil dos ácidos graxos.....	79
3.1.1.2 Perfil dos componentes majoritários	80
3.2 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES	82
3.2.1 DPPH e ABTS.....	82
3.2.2 Auto-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico	84
3.2.3 Determinação da estabilidade oxidativa	85
4 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CAPÍTULO IV.....	93
5 CONCLUSÃO.....	94

CAPÍTULO V	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO POR *Rhizopus oryzae* EM FARELO DE ARROZ: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E FOSFOLIPÍDIOS

Tabela 1 - Distribuição dos tamanhos de partículas no farelo de arroz	43
Tabela 2 - Fosfolipídios na biomassa durante o cultivo	47
Tabela 3 - Perfil dos ácidos graxos em cada tempo de cultivo	48

EXTRAÇÃO DE γ -ORIZANOL DO FARELO DE ARROZ: EFEITO DO TAMANHO DE PARTÍCULA

Tabela 1 - Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanól nos diferentes tamanhos de partículas	63
Tabela 2 - Percentual de inibição específica (% inibição/ $\mu\text{g}_{\text{orizanól}}$) do radical livre DPPH no período de 0 a 180 min	64
Tabela 3 - CI_{50} dos extratos de γ -orizanól das diferentes frações granulométricas	65

CULTIVO DE *Rhizopus oryzae* EM FARELO DE ARROZ E SEU EFEITO NO CONTEÚDO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO γ -ORIZANOL

Tabela 1 - Perfil dos ácidos graxos dos extratos do γ -orizanól das biomassas	80
Tabela 2 - Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanól durante o cultivo	82
Tabela 3 - Efeito do cultivo nas atividades antioxidantes dos extratos de γ -orizanól.....	83
Tabela 4 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e probabilidade (p) da regressão linear entre ácidos graxos insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados e atividades antioxidantes avaliadas pelo DPPH e ABTS	84

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Estrutura do ácido fítico	24
Figura 2 - Estrutura química dos quatro componentes majoritários do γ -orizanol (em pontilhado a estrutura derivada do ácido ferúlico)	29
Figura 3 - Estabilização do radical livre DPPH	32
Figura 4 - Estabilização do radical ABTS por um antioxidante	33

CAPÍTULO III

CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO POR *Rhizopus oryzae* EM FARELO DE ARROZ: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E FOSFOLIPÍDIOS

Figura 1 - Conteúdo de lipídios em diferentes tamanhos de partículas	44
Figura 2 - Conteúdo lipídico na biomassa durante o cultivo	46
Figura 3 - Fósforo total, inorgânico e orgânico durante o cultivo	50

EXTRAÇÃO DE γ -ORIZANOL DO FARELO DE ARROZ: EFEITO DO TAMANHO DE PARTÍCULA

Figura 1 - Rendimento de γ -orizanol nas diferentes frações granulométricas	60
Figura 2 - Cromatograma do γ -orizanol padrão e dos extratos dos diferentes tamanhos de partículas	62

CULTIVO DE *Rhizopus oryzae* EM FARELO DE ARROZ E SEU EFEITO NO CONTEÚDO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO γ -ORIZANOL

Figura 1 - Concentração de γ -orizanol e de lipídios durante cultivo em estado sólido ...	78
Figura 2 - Cromatograma do γ -orizanol padrão (A) e dos extratos da biomassa (B)	81
Figura 3 - Cinética de inibição de oxidação dos extratos de γ -orizanol (25 μ g/mL) obtidos das biomassas e do antioxidante BHA (200 μ g/mL) pelo método de β -caroteno/ácido	85
Figura 4 - Índice de peróxidos (A), valor de p-anisidina (B) e valor TOTOX (C) de azeite de oliva com e sem adição do antioxidante γ -orizanol (20 μ g/mL) durante oxidação acelerada por luz UV	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - 2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
AGs – Ácidos graxos
ANOVA - Análise de variância
AOAC - Association of Official Analytical Chemists
ATP – Adenosina trifosfato
BDA - Ágar Batata-Dextrose
BHA - Butil-hidroxianisol
BHT - Butil-hidroxitolueno
CES – Cultivo em estado sólido
CG-DIC – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
CI₅₀ - Quantidade necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta
CSm – Cultivo submerso
DHA - Docosa-hexaenóico
D.P – Desvio padrão
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPPH-H - 2,2- difenilpicril-hidrazina
EPA - Eicosapentaenóico
FAI – Farelo de arroz integral
GPLs – Glicerofosfolípidios
HPLC-UV – *High-performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
IP - Índice de peróxidos
MFA= Ácido graxo monoinsaturado
n.d. = Não detectado
p – Nível de significância
P – Fósforo
PLs – Fosfolípidios
P/S = Relação dos ácidos graxos poli-insaturados e saturados
PUFA= Ácido graxo poli-insaturado
r - Coeficiente de correlação de Pearson
SFA= Ácido graxo saturado
SPLS – Esfíngofosfolípidios
TAH - Transferência de átomos de hidrogênio
TBHQ - Terc-butilhidroquinona
TE - Transferência de elétrons
TEAC - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox
TOTOX - Valor de oxidação total
UVA – Radiação ultravioleta comprimento de onda entre 315 e 400 nm
VA - Valor *p*-anisidina

CAPÍTULO I

Cultivo de *Rhizopus oryzae* em farelo de arroz integral e seus impactos na fração lipídica

RESUMO

Cultivo em estado sólido é uma das formas de aumentar a disponibilidade dos nutrientes em coprodutos da agroindústria, devido às alterações resultantes da atividade metabólica dos micro-organismos no substrato. O objetivo do trabalho foi avaliar o impacto do cultivo de *Rhizopus oryzae* na fração lipídica do farelo de arroz integral. Foram estudados o rendimento de extração de lipídios e γ -orizanol em farelo com diferentes granulometrias e os efeitos do cultivo sobre o conteúdo lipídico e seu perfil de ácidos graxos e fósforos, e conteúdo de fosfolipídios, bem como na concentração e características do γ -orizanol. O farelo foi fornecido por uma indústria de arroz da região Sul, e sua granulometria padronizada para ser utilizado como substrato para o cultivo com o fungo *Rhizopus oryzae* CCT 7560. Os esporos do fungo foram propagados em Ágar Batata Dextrose e incubados a 30 °C, durante 7 dias. O cultivo foi realizado em biorreatores de bandejas, nos quais o substrato foi colocado e posteriormente adicionada suspensão de esporos na concentração inicial de $4,0 \times 10^6$ esporos/g no meio e solução nutriente. A umidade do meio foi ajustada para 50% e os biorreatores armazenados em câmara de cultivo a 30 °C por 120 h. As amostras foram coletadas no início do cultivo e a cada 12 h. Para avaliar as alterações na fração lipídica foram determinados o conteúdo de lipídios, fosfolipídios e perfil dos ácidos graxos, além das três formas de fósforos na biomassa. Também foi determinada a concentração de γ -orizanol e os extratos caracterizados em relação aos seus componentes majoritários, identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta (CLAE-UV) e seus ácidos graxos por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CCG-DIC). A capacidade antioxidante do γ -orizanol foi verificada pelo consumo do radical livre DPPH $^{\bullet}$, capacidade de captura do radical ABTS $^{\bullet+}$, inibição da reação de auto-oxidação do β -caroteno e estabilidade oxidativa. As partículas menores que 0,39 mm apresentaram maior teor de lipídios, que aumentou 13,3% com o cultivo, especialmente os ácidos graxos essenciais. O cultivo também promoveu maior disponibilidade de fósforo. Partículas com granulometria de 0,39 mm propiciaram maior rendimento de γ -orizanol (1,54 mg/g) e o extrato das partículas de tamanho entre 0,73 e 1,67 mm apresentou maior potencial antioxidante, demonstrado por uma inibição específica do radical DPPH de 6,7% e quantidade necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH (CI₅₀) de 6,63 μ g/mL. Com o cultivo a concentração do γ -orizanol aumentou em 51,5% em 48 h, com aumento dos ácidos graxos poli-insaturados em 5,7%. A presença dos componentes majoritários do γ -orizanol nos extratos foi confirmada. O extrato de γ -orizanol obtido da biomassa fúngica de 72 h demonstrou a maior inibição do radical DPPH (59,0%), o de 96 h inibiu em 90,5% a oxidação em sistema de emulsão β -caroteno/ácido linoleico e reduziu em 30% os indicadores químicos de oxidação no azeite de oliva. Os resultados mostraram que o cultivo pode ser aplicado para melhorar a extração e funcionalidade dos compostos bioativos presentes na fração lipídica do farelo de arroz.

Palavras-chave: Ácidos Graxos. Fósforo. Fungo. γ -orizanol.

Rhizopus oryzae cultivation in rice bran and its impact on lipid fraction**ABSTRACT**

Solid state cultivation is one way to increase the availability of nutrients in agro-industrial co-products, due changes resulting from the metabolic activity of microorganisms in the substrate. The objective of this study was to evaluate the *Rhizopus oryzae* cultivation in rice bran and its impact on lipid fraction. The extraction yield of lipids and γ -oryzanol were studied in different particle sizes of bran and the effects of cultivation on lipid content and its fatty acid and phosphorus profile, and content of phospholipids, as well as the concentration and characteristics of the γ -oryzanol. Rice bran was provided by a rice industry of South region, and its standard particle size for use as a substrate for the cultivation of the fungus *Rhizopus oryzae* CCT 7560. The fungus spores were propagated on potato dextrose agar and incubated at 30 °C for 7 days. The cultivation was realized in tray bioreactors, in which the substrate was placed and subsequently added spore suspension in initial concentration of 4.0×10^6 spores/g in the medium and nutrient solution. The medium humidity was adjusted to 50% and the bioreactors were placed in cultivation chamber at 30 °C for 120 h. The samples were collected in the beginning of the cultivation and each 12 h. To evaluate changes in the lipid fraction were determined the content of lipids, phospholipids and fatty acids profile, besides the three phosphorus forms in the biomass. It was also determined the γ -oryzanol concentration and the extracts characterized in relation of their major components, identified by High Performance Liquid Chromatography UV Detector (HPLC-UV) and their fatty acids by Gas Chromatography Flame Ionization Detector (GC-FID). The antioxidant capacity of the γ -oryzanol were verified by consumption of free radical DPPH[•], capability of capture ABTS^{•+} radical, inhibition of the reaction of auto-oxidation of β -carotene and oxidative stability. The particles smaller than 0.39 mm showed higher content of lipids, that increase 13.3% with the cultivation, specially essentials fatty acids. The cultivation also provided more availability of phosphorus. Particles with a diameter of 0.39 mm propitiated higher yield of γ -oryzanol (1.54 mg/g) and the extract of particle size between 0.73 and 1.67 mm showed a higher antioxidant activity, demonstrated by a specific inhibition of DPPH radical of 6.7% and amount required to reduce in 50% the initial concentration of DPPH (IC₅₀) of 6.63 μ g/mL. With the cultivation the γ -oryzanol concentration increased in 51.5% in 48 h, with polyunsaturated fatty acids increased in 5.7%. The presence of major components of γ -oryzanol in the extracts was confirmed. The γ -oryzanol extract obtained of fungal biomass of 72 h demonstrated the highest inhibition of DPPH radical (59.0%), and the extract of 96 h inhibited in 90.5% the oxidation in emulsion system β -carotene/linoleic acid and reduced in 30% chemical oxidation indicators in olive oil. The results showed that the cultivation can be applied to improve the extraction and functionality of bioactive compounds present in lipid fraction of rice bran.

Keywords: Fatty acids. Phosphorus. Fungus. γ -oryzanol.

1 INTRODUÇÃO

O interesse no desenvolvimento de bioprocessos para produção ou extração de compostos bioativos de fontes naturais tem aumentado, devido ao potencial de aplicação destes compostos na indústria de alimentos e a minimização das perdas com o descarte de porções com propriedades tecnológicas pouco usuais. Neste contexto, o uso de processos de cultivo, que implicam no emprego de micro-organismos para obter transformações resultantes da atividade metabólica deles, tem recebido atenção porque é possível converter resíduos agroindustriais de baixo custo, em uma grande variedade de compostos bioativos valiosos (SCHMIDT et al., 2014).

Entre as fontes originárias de resíduos/coprodutos da agroindústria encontra-se o arroz, o qual é um alimento muito popular no Brasil. A produção anual de arroz no país em 2015 foi de 12,2 milhões de toneladas, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor, responsável por 68,5 % da mesma (IBGE, 2015). Como coproduto resultante do beneficiamento deste cereal tem-se o farelo, que representa entre 8% e 10% da massa do grão em casca, o que resulta em média 1,1 milhões de toneladas de farelo/ano.

Farelo de arroz contém de 11 a 13% de proteína bruta, aproximadamente 11,5% de fibras, e mais de 20% do seu peso em óleo. Além disso, constitui uma fonte valiosa de componentes bioativos (BUTSAT; SIRIAMORNPNUN, 2010), entre os quais estão: o γ -orizanol, que é caracterizado por um amplo espectro de efeitos benéficos para a saúde, atribuídos principalmente a sua significativa capacidade antioxidante (LEMUS et al., 2014); os fosfolipídios, uma importante classe de lipídios, que pode ter tanto valor nutricional quanto funcional (LIU et al., 2013); e compostos de fósforo, sendo o ácido fítico um dos principais constituintes dos fosfatos orgânicos formados para a armazenagem de fósforo nas sementes de plantas, com o papel de antioxidante natural (CANAN et al., 2012).

A maior parte dos compostos antioxidantes em plantas se encontra ligada de forma covalente com um polímero insolúvel (NIWA; MIYACHI, 1986). Portanto, é necessário um tratamento eficaz para libertação deles (WANYO; MEESO; SIRIAMORNPNUN, 2014). O cultivo, em estado sólido, tem sido utilizado como uma forma para disponibilizar maior teor de compostos funcionais a partir de resíduos agroindustriais (SCHMIDT et al., 2014), dada as condições moderadas que protegem os danos nas estruturas químicas.

O cultivo de material lignocelulósico de arroz com *Rhizopus oryzae* é uma alternativa interessante, pois este micro-organismo não promove a formação de compostos

tóxicos e sua eficiência para o potencial funcional foi demonstrada, com destaque para o perfil dos ácidos fenólicos (SCHMIDT et al., 2014). O ácido ferúlico é um dos constituintes do γ -orizanol, portanto seu aumento sugere a disponibilização de γ -orizanol. Oliveira et al. (2011) demonstraram também a alteração no perfil de ácidos graxos do farelo de arroz pela ação do *Rhizopus oryzae*, aumento do teor de fosfolipídios e a redução do ácido fítico.

Portanto, é interessante estudar o efeito do cultivo deste micro-organismo nas características da fração lipídica da biomassa, pois esta pode ser uma inovação para a produção de compostos bioativos para serem aplicados na indústria de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar o impacto do cultivo do farelo de arroz com *Rhizopus oryzae* na disponibilidade de componentes funcionais da fração lipídica.

2.2 ESPECÍFICOS

- Descrever a ação do micro-organismo no perfil de ácidos graxos, fósforos e fosfolipídios do farelo de arroz;
- Estabelecer a granulometria do farelo de arroz que propicia maior rendimento de extração de γ -orizanol;
- Determinar o potencial antioxidante da fração lipídica da biomassa fúngica.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)

As técnicas de cultivo de micro-organismos são comumente classificadas quanto ao modo de cultivo, ou seja, cultivo submerso (CSm) ou cultivo em estado sólido (CES) (PELIZER; DE CARVALHO; DE OLIVEIRA MORAES, 2015). CSm é baseado no cultivo de micro-organismos em meio líquido contendo nutrientes, e CES é definido como um processo no qual os micro-organismos crescem em materiais sólidos na ausência ou quase ausência de água livre, pois o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do micro-organismo (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

O interesse em processos de CES se deve ao fato deste oferecer várias vantagens sobre o CSm, tais como, utilização de resíduos agroindustriais como substratos, baixo volume de água, menor tamanho do fermentador, agitação reduzida e menores custos de esterilização (MARTINS et al., 2011).

O desempenho do organismo em CES depende das propriedades físicas dos sólidos, incluindo a sua natureza amorfa ou cristalina, a área de acesso, a porosidade e, principalmente, o seu tamanho de partícula (MEMBRILLO et al., 2008). Os substratos com partículas pequenas proporcionam uma área de contato maior entre os mesmos e o fungo, favorecendo o seu crescimento, no entanto partículas pequenas são mais susceptíveis à compactação e à formação de aglomerados, o que resulta na diminuição da transferência de oxigênio, afetando a respiração e o desenvolvimento dos fungos (MEMBRILLO et al., 2011).

Processo de cultivo pode ser uma forma de aumentar a disponibilidade de nutrientes em matérias-primas e resíduos da agroindústria. Elevadas quantidades desses materiais, incluindo sementes, cascas, bagaços, farelos são gerados na forma de resíduos ou coprodutos, e são pouco valorizados, resultando no interesse destes materiais como matérias-primas renováveis abundantemente disponíveis e baratas para a produção de compostos de valor agregado (MARTINS et al., 2011). Neste sentido, o farelo de arroz tem sido estudado como substrato para os processos de CES, a fim de aumentar a disponibilidade dos nutrientes através de alterações resultantes da atividade metabólica dos micro-organismos que resultem em compostos de interesse, tais como enzimas, antioxidantes, biossurfactantes, ácidos orgânicos e ácidos graxos poli-insaturados (JANG; YANG, 2008; KUPSKI et al., 2014; SILVEIRA; BADIÁLE-FURLONG, 2007).

Segundo Schmidell et al. (2001) para os cultivos são utilizados biorreatores, nos quais ocorrem reações químicas catalisadas por células vivas (animais ou vegetais), micro-organismos ou enzimas produzidas a partir de células vivas, que visam transformações de substratos em produtos de maior valor agregado. Os biorreatores podem ser divididos em dois grandes grupos: os biorreatores de fase aquosa contínua, utilizados em processos submersos; e os biorreatores de fase não aquosa, próprios para CES. Dentre os biorreatores utilizados para estado sólido estão os com aeração superficial e sem agitação, que são os reatores de bandejas, que podem ser dispostos em salas climatizadas e ventiladas, estufas de bancada ou bandejas individuais. As bandejas podem ser construídas em madeira, bambu, aço ou materiais poliméricos, tendo o fundo perfurado, ou não. Os reatores de bandeja com fundo perfurado possibilitam maior contato do substrato com a fase gasosa. O conceito de aeração superficial define a passagem do fluxo gasoso pela superfície do substrato sólido e não através dele, como é o caso da aeração forçada.

3.1.1 Condições que afetam o cultivo em estado sólido

As variáveis do processo, incluindo o pré-tratamento e tamanho das partículas do substrato, ingredientes do meio, a suplementação do meio de crescimento, a esterilização do meio de CES, teor de umidade, atividade de água (aw), densidade do inóculo, temperatura, pH, agitação e aeração, tem um efeito significativo sobre a eficiência dos processos CES (NEE'NIGAM, 2009). Os substratos utilizados para CES usualmente contêm um teor de água oscilante entre 30% e 85% e os valores menores podem induzir a esporulação do micro-organismo e diminuir a acessibilidade do substrato, enquanto que níveis maiores podem provocar diminuição da porosidade da matriz sólida, resultando em fraca difusão de oxigênio aumentando o risco de contaminações bacterianas (PEREZ-GUERRA et al., 2003).

Grandes quantidades de calor são liberadas durante o CES, a atividade de água é um fator importante para ser controlado, pois é diretamente proporcional à atividade metabólica do micro-organismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação de esporos, crescimento e formação de produtos (PEREZ-GUERRA et al., 2003).

Devido à dificuldade de monitorar o pH durante todo o CES, este não é normalmente um parâmetro controlado e é ajustado no início do CES. O pH pode variar

ligeiramente durante o curso do CES e esta variação está relacionada com a atividade metabólica dos fungos (KHAN; FAKHRU'L-RAZI; ALAM, 2007). Para reduzir o efeito de uma variação brusca do pH, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções tampão durante a etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001).

A aeração desempenha diferentes funções: provisão de O₂ para o crescimento aeróbio e metabolismo; regulação da umidade; regulação da temperatura; eliminação de vapor d'água, CO₂ e alguns metabólitos voláteis (MACIEL et al., 2009). Existem diferentes maneiras para se obter uma movimentação do ar por entre o substrato, permitindo assim uma melhor transferência de oxigênio, quer seja: a) pela utilização do material poroso medianamente granulado ou fibroso; b) pelo uso de pequena espessura da camada de substrato; c) pela utilização de bandejas perfuradas ou reatores com fundo de tela de arame; d) pela agitação do substrato; e) pela introdução de ar forçado estéril dentro do reator (DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001).

3.2 MICRO-ORGANISMOS NO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

Uma variedade de micro-organismos, incluindo fungos, leveduras e bactérias podem ser utilizadas em processos de CES (MARTINS et al., 2011). As culturas de fungos e leveduras têm sido consideradas como as mais adequadas para os processos de cultivo em estado sólido, pois os fungos e leveduras são viáveis em atividade de água inferior a 0,5.

A escolha do micro-organismo deve ser aparentemente relacionada com a escolha do substrato e do produto pretendido (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Os fungos filamentosos são os principais micro-organismos cultivados em meio sólido. Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais para o crescimento deles, pois suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, que propiciam a colonização de matrizes sólidas porosas (PUTZKE; PUTZKE, 2004). Além disso, são amplamente distribuídos e normalmente crescem sobre/dentro de materiais sólidos, tais como plantas, grãos e animais. Estes organismos produzem eficientemente vários grupos de enzimas, para degradar materiais sólidos e utilizar os nutrientes para a sobrevivência (ITO et al., 2011). Os fungos filamentosos têm um grande potencial para produzir compostos bioativos por CES, e, portanto, estes micro-organismos são mais comumente utilizados para este fim (NEE'NIGAM; PANDEY, 2009).

Os fungos do gênero *Rhizopus* são especialmente adequados para CES uma vez que produzem proteínas altamente digestíveis e nenhuma substância tóxica (OLIVEIRA et al., 2010). Os micro-organismos classificados como zigomicetas, da ordem Mucorales pertencentes a este gênero são considerados os mais morfológicamente previsíveis dentro do reino. Formam micélio cenocítico, apresentam rizóides para fixação ao substrato e reprodução assexuada e sexuada. Na reprodução assexuada há formação de esporângios (estruturas constituintes dos esporos) e quando estes estão maduros liberam os esporos que germinam e formam novas hifas. Na reprodução sexuada ocorre aproximação de duas hifas de indivíduos diferentes, as extremidades das mesmas se fundem originando um zigoto de parede espessa e resistente, denominado zigospóro. O zigospóro, passado o período de dormência, sofre meiose e germina originando um novo micélio (PITT; HOCKING, 1997).

Eles apresentam um metabolismo complexo e podem produzir uma variedade de enzimas exocelulares que lhes permitem utilizar uma ampla variedade de nutrientes. Várias espécies de *Rhizopus* são usadas para a produção de alimentos e de bebidas fermentadas, particularmente no Sudeste Asiático. Além de outras aplicações industriais para produção de enzimas, incluindo as pectinases, amilases, celulasas, proteases, e fitases, e metabolitos, tais como etanol, ácido láctico e fumárico (LENNARTSSON; TAHERZADEH, 2014).

3.3 FARELO DE ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, constituindo o principal alimento para mais da metade da população mundial. Segundo IBGE (2015) a estimativa de produção para a safra nacional de 2015, em uma área plantada de 2.290.877 ha, 2,8% inferior em relação a 2014, é de 12.261.607 toneladas e o rendimento médio esperado de 5.391 Kg/ha, estão maiores, respectivamente, em 0,9% e 4,2%, quando comparados aos dados da safra anterior. A região Sul é responsável por 78,7% da produção nacional, sendo o Rio Grande do Sul, maior produtor, com 68,5% da produção nacional do cereal, o qual aguarda uma produção de 8.396.348 toneladas, numa área a ser colhida de 1.122.046 ha e rendimento médio esperado de 7.483 kg/ha.

O arroz é uma importante fonte de energia com propriedades funcionais versáteis. Há uma necessidade dos grãos serem submetidos ao processamento antes de consumidos como alimento. Processamento de arroz envolve várias etapas como a limpeza, descasque, clareamento, polimentos e classificação. Estes processos produzem casca, arroz

branqueado e farelo (GUL et al., 2015). O arroz branco é o principal produto de arroz consumido no mundo, e sua produção envolve acúmulo de grandes quantidades de subprodutos no processo de moagem. Cada 100 kg de arroz em casca geram cerca de 5 a 10 kg de farelo, o qual tem utilização convencional para alimentação animal e extração de óleo (BURLANDO; CORNARA, 2014).

O arroz descascado, integral, é submetido ao polimento, onde os grãos de arroz são lixados por brunidores, máquinas compostas por pedras abrasivas que giram em caixas revestidas de chapas perfuradas, e retiram o pericarpo, o tegumento, a camada de aleurona e o gérmen (embrião) e estes formam o farelo de arroz, restando o endosperma (grão de arroz polido) (LUKKAKULA; LIMA; WALKER, 2004).

O farelo de arroz contém minerais como ferro, fósforo e magnésio, entre 11% e 13% de proteína bruta, cerca de 11,5% de fibras (SILVA; SANCHES; AMANTE, 2006) e contém uma grande quantidade de nutrientes essenciais tais como minerais, vitaminas, fibras, aminoácidos e antioxidantes (YOUNAS et al., 2011). Além disso, o farelo de arroz integral contém 18-22% de óleo, incluindo uma matriz de fitoquímicos bioativos, tais como orizanol, fitoesteróis, tocotrienóis, ácido fítico e o ácido ferúlico. No entanto, a composição do farelo varia com o tipo de arroz, as condições climáticas e os métodos de processamento de arroz (GUL et al., 2015).

A ideia que associava coprodutos ou subprodutos agroindustriais à produção de ração animal vem gradativamente sendo substituída, à medida que a comunidade científica se interessa por estes produtos, como nutrientes de baixo custo para a composição de meios de cultivo em pesquisas biotecnológicas para a produção de produtos de alto valor agregado (RAJAGOPALAN; HE; YANG, 2016).

3.3.1 Fósforo (P)

O fósforo é um elemento essencial para as plantas e animais. O fósforo participa da formação de compostos ricos em energia para reações celulares na forma de ATP (Adenosina trifosfato), forma ossos e dentes, entre outras funções (DE OLIVEIRA BRAGA; MENDONÇA, 2011). Em plantas, o P é encontrado em sementes, frutos e folhas como fósforo inorgânico (ortofosfato) ou formas orgânicas, incluindo fosfatos de inositol, fosfolipídios e ácidos nucleicos (SCHACHTMAN; REID; AYLING, 1998). É utilizado na indústria de fertilizantes e, devido ao pico de produção global de fósforo previsto para ocorrer

em 2030, tem-se buscado novas tecnologias para a reciclagem de fósforo dos resíduos, aonde se inclui o farelo de arroz como uma potencial fonte de fósforo (WATANABE et al., 2015).

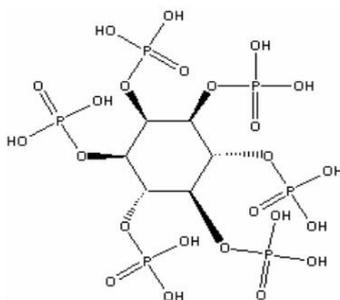
O fósforo na forma inorgânica é classificado como fosfato e pode apresentar-se como PO_4^{-3} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , sendo estes facilmente extraíveis e prontamente disponíveis para o metabolismo biológico sem necessidade de conversões às formas mais simples (McDOWELL et al., 2004).

O fósforo está presente no citoplasma em forma de fosfato inorgânico, o qual, junto ao ácido carbônico, constitui o mais importante sistema tampão na célula vegetal. Fosfato inorgânico está prontamente disponível para as plantas e animais, enquanto que as formas orgânicas precisam ser mineralizadas antes da absorção, no trato intestinal para animais, e nas raízes das plantas.

Em cereais e seus derivados, a diferenciação das frações orgânicas e inorgânicas é importante para estudos de nutrição para avaliar a biodisponibilidade de fósforo, o que depende da sua forma química (ROCHA; ROCHA, 2013).

No farelo de arroz, o P é um dos principais minerais presentes e se apresenta em formas inorgânicas e orgânicas de compostos de fósforo, sendo o ácido fítico (fitato) particularmente conhecido por ser um dos principais constituintes dos fosfatos orgânicos em farelo de arroz. Segundo Erdman (1979) a estrutura do ácido fítico pode ser caracterizada como apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura do ácido fítico



Fonte: ERDMAN (1979)

O ácido fítico contém em sua estrutura seis fosfatos ligados a um inositol, os quais podem ser liberados do inositol e formar os fósforos inorgânicos. Ele serve como um composto de armazenagem de fósforo em sementes de plantas, bem como um antioxidante natural devido à sua propriedade quelante em ferro e zinco, e também à sua capacidade para

diminuir as atividades catalíticas de muitos metais de transição divalentes (CANAN, 2012). Cerca de 80% do ácido fítico no arroz está concentrado no pericarpo e aleurona, como o farelo de arroz é constituído de pericarpo, aleurona e germe apresenta elevado teor de ácido fítico, próximo de 6,02% (CANAN et al., 2011).

As fitases formam um grupo de enzimas que catalisam a liberação sequencial de fósforo oriundo da molécula de ácido fítico, retirando os grupamentos ortofosfatos do anel inositol do ácido fítico para produzir fósforo inorgânico (Pi) (DEBNATH et al., 2005).

O farelo de arroz tem de 5,1% a 8,6% de fitato na sua composição, embora a maioria dos demais cereais possua entre 1% e 2% de fitato. A utilização do P dos alimentos de origem vegetal pelos animais monogástricos está diretamente relacionada com o conteúdo de fitato, já que o P não é utilizado por esses animais, devido à ausência da enzima fitase no seu trato digestivo (CONTE et al., 2002).

Os métodos relatados para a extração de fosfatos inorgânicos incluem diferentes ácidos fortes diluídos e para a determinação de fósforo total, é necessário proceder à degradação da matéria orgânica, seguida da libertação de fósforo em forma de ortofosfato (DANIELS; ZHU; ALEXANDRATOS, 2013; MATTIAZZO-PREZOTTO; DA GLÓRIA, 1990). As análises químicas para determinação de fosfatos são mais abrangentes e englobam métodos volumétricos, gravimétricos, colorimétricos e cromatografia de íons, sendo os mais utilizados os espectrofotométricos UV-Visível (PARDO; RAURET; LOPEZ-SANCHEZ, 2004), por serem práticos, simples, precisos e baixo custo.

3.3.2 Lipídios

Os lipídios no arroz são classificados de acordo com sua estrutura química em acilgliceróis, ácidos graxos livres, ésteres de cera, fosfolipídios, glicolipídios e insaponificáveis (como γ -orizanol, tocoferóis / tocotrienóis e esqualeno). Lipídios estão concentrados principalmente no farelo de arroz (19,4-25,5%) (LIU et al., 2013).

Entre 90% e 96% dos lipídios componentes do óleo de farelo bruto de arroz são materiais saponificáveis (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e ceras) e 3% a 5% são insaponificáveis (esteróis, tocoferóis, tocotrienóis, álcoois triterpênicos). Dentre os ácidos graxos do farelo de arroz, aproximadamente 47% são monoinsaturados, 33% poli-insaturados e 20% saturados (GUL et al., 2015), destacando-se o palmítico (21% a 26%), linoléico (31% a 33%) e oléico (37% a 42%), e, devido ao seu alto

conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, é considerado um óleo saudável (LEMOS; SOUZA-SOARES, 2000).

Óleo de farelo de arroz não é somente nutritivo, mas também especial por conter níveis elevados de componentes funcionais, como orizanol, vitaminas lipossolúveis, esteróis e outros nutrientes (LIANG et al., 2014).

Há uma tendência, nas áreas de nutrição e bioquímica, de agrupar os ácidos graxos insaturados em famílias conhecidas como ômega (ω). Nessa classificação, os ácidos linolênico, linoléico e oléico são enquadrados, respectivamente, nas categorias ω -3, ω -6 e ω -9. O ácido oléico destaca-se como um dos ácidos graxos mais amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado praticamente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal. Sob o ponto de vista nutricional, os ácidos linoléico e linolênico são considerados “ácidos graxos essenciais” e como não podem ser sintetizados pelo organismo humano devem ser ingeridos através da dieta (PESTANA; MENDONÇA; ZAMBIAZI, 2008).

OLIVEIRA et al. (2011) avaliaram o perfil lipídico do farelo de arroz integral cultivado em intervalos de 24 h e os resultados mostraram que os lipídios totais diminuíram de 20,4% para 11,2% no intervalo entre 0 h e 120 h de cultivo, sendo os ácidos oléico, palmítico e linoléico predominantes, ocorrendo redução dos ácidos graxos saturados (20%) e aumento dos ácidos graxos insaturados (5%).

Os métodos descritos para determinar os lipídios de biomassa são semelhantes aos empregados para outras matrizes e consistem em sua extração empregando solventes orgânicos e sua conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos, derivados voláteis, que podem ser analisados por cromatografia gasosa (DA SILVEIRA; OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2010). Os métodos de extração com solventes orgânicos podem empregar calor, a exemplo como extrator de Soxhlet, ou a frio, como é o caso dos métodos de Folch, Lees e Stanley (1957) e do método Bligh e Dyer (1959).

A extração de lipídios é uma determinação importante em estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais dos mais diversos tipos de alimentos e, portanto, deve ser realizada com qualidade. Os procedimentos clássicos idealizados por Soxhlet em 1879, com refluxo de solvente por muitas horas, devem ser evitados, uma vez que favorecem as reações de peroxidação e de hidrólise, podendo comprometer resultados analíticos posteriores, como a quantificação de certos componentes lipídicos (BRUM; ARRUDA, 2009).

O método com o extrator de Soxhlet é recomendado oficialmente para determinação de lipídios em amostras de sólidos, no entanto OLIVEIRA (2009) utilizou

apenas para estabelecer o rendimento de extração, o método não foi adotado para caracterizar perfil lipídico, porque as altas temperaturas de extração poderiam favorecer alterações de configuração dos ácidos graxos, dificultando a distinção entre o efeito do cultivo e o método de extração. Além disso, o método de Folch foi desenvolvido para extrair os lipídios a partir de amostras com elevado teor de umidade, tais como a biomassa fúngicas e tem a vantagem de ser um processo a frio, o que preserva a composição original dos ácidos graxos.

3.3.2.1 Fosfolipídios

Fosfolipídios (PLs) são lipídios anfifílicos constituídos por fosfato ligado a diglicerídeo, encontrados em membranas celulares vegetais e animal, e são extremamente importantes para todos os organismos celulares. PLs na dieta tem efeitos benéficos sobre uma série de doenças e condições humanas, tais como doença cardíaca coronariana, câncer ou inflamação (KULLENBERG et al., 2012). Estes compostos também são importantes para a qualidade e estabilidade de óleos vegetais, embora boa parte deles seja retirada durante a produção dos óleos comestíveis (NZAI; PROCTOR, 1998).

Vários PLs são agentes emulsificantes (composto que promove a dispersão coloidal de um líquido em outro) e agentes surfactantes (composto que reduz a tensão superficial de uma solução, como detergentes). Os fosfolipídios exercem essas funções, pois são moléculas anfifílicas e apesar das diferenças estruturais, todos os fosfolipídios são constituídos de “caudas” apolares alifáticas de ácidos graxos e “cabeças” polares que contém fosfato e outros grupos carregados ou polares (MOTTA, 2006).

PLs naturais podem ser classificados em duas categorias principais, glicerofosfolipídios (GPLs, por exemplo, fosfatidilcolina ou lecitina na gema de ovo) e esfingofosfolipídios (SPLS, por exemplo, esfingomiéline, no cérebro e tecido neural). Até o momento, apenas foram identificados GPLs nos grãos de arroz. GPLs consistem em ácidos graxos esterificados a um esqueleto de glicerol, um grupo fosfato e um álcool (YOSHIDA et al., 2011).

As propriedades de anfifílico e altamente ativo em superfícies dos PLs, pode influenciar significativamente as propriedades físicas das emulsões e espumas, tecnologicamente importantes. Além disso, são capazes de formar estruturas supramoleculares de automontagem, um componente-chave na nanociência para a separação de fases imiscíveis, vital para dispersões de alimentos e formulações cosméticas. Por possuir propriedades nutricionais e terapêuticas, sinergia entre tecnologia e fisiologia, há interesse em fosfolipídios

para a formulação de alimentos funcionais (PATINO et al., 2007).

Eles constituem uma das classes de lipídio em arroz, compreendendo até 10% do conteúdo total dele no grão. Embora PLs sejam apenas um nutriente em quantidades menores em comparação com amido e proteínas, eles possuem tanto valor nutricional e funcional (LIU et al., 2013).

Estudos enfatizando os teores de fosfolipídios durante cultivo em estado sólido de matrizes oleaginosas são poucos frequentes, o único encontrado foi realizado por Oliveira et al. (2011) que registrou aumento nos teores de fosfolipídios em farelo de arroz empregado como substrato para *Rhizopus oryzae*.

3.3.3 γ -orizanol

No farelo de arroz é encontrado o γ -orizanol, uma mistura de ésteres do ácido ferúlico com esteróis ou álcoois triterpênicos de plantas (SIRIPAIOJ; KAEWCHADA; JAREE, 2014), trata-se, portanto de um composto derivado do ácido ferúlico, que é derivado do ácido hidroxicinâmico (ANGELO; JORGE, 2007).

O γ -orizanol exerce uma variedade de efeitos biológicos (SON et al., 2011) ligados sempre a sua atividade antioxidante (NYSTROM et al., 2005; WINKLER-MOSER et al., 2012), que previne principalmente a inibição de oxidação lipídica (JULIANO et al., 2005; LERMA-GARCIA et al., 2009). Além disso, esta mistura de compostos tem-se mostrado promissora no desenvolvimento de alimentos funcionais e aplicação industrial para estabilizar óleos e gorduras (LERMA-GARCIA et al., 2009).

O γ -orizanol foi primeiramente encontrado no óleo de farelo de arroz em 1954. Como foi isolado do óleo obtido a partir do arroz (*Oryza Sativa*) e continha um grupo hidroxila em sua estrutura, foi convenientemente chamado de orizanol. Três anos após a identificação do orizanol, usando diferentes métodos de extração, foi verificado que γ -orizanol não era um composto único e sim um composto constituído por três ésteres de ácido ferúlico e de álcoois triterpênicos. Logo após, foi identificado o cicloartenil ferulato e em 1958 o 2,4-metileno cicloartenil ferulato e finalmente identificaram que o terceiro era uma mistura dos outros dois (LEMUS et al., 2014). Desde então vários estudos foram realizados e pelo menos 25 componentes de γ -orizanol foram separados e caracterizados, sendo que cinco deles representam cerca de 95% do conteúdo total de γ -orizanol, incluindo 2,4-metileno cicloartenil trans ferulato (34%-44%), cicloartenil trans ferulato (19%-26%),

campesteril trans ferulato (15%-23%), β -sitosteril trans ferulato (7%-17%), e estigmasteril trans ferulato (1%-7%) (GOUFO; TRINDADE, 2014). As estruturas moleculares dos quatro maiores componentes do γ -orizanol estão representadas na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química dos quatro componentes majoritários do γ -orizanol (em pontilhado a estrutura derivada do ácido ferúlico)

Estrutura Molecular	R	Nome do composto
		24-Methylen-cycloartanylferulate
		Cycloartenylferulate
		β -Sitosterylferulate
		Campesterylferulate

Fonte: LERMA-GARCIA et al. (2009)

O óleo de farelo de arroz bruto contém de 1% à 2% de γ -orizanol (BITENCOURT et al., 2016) e é considerado com potencial antioxidante devido à habilidade de doação do hidrogênio do grupo fenólico do ácido ferúlico (NYSTROM et al., 2005). Ácido ferúlico esterificado com esteróis de plantas, como é o caso do γ -orizanol, aumenta o potencial antioxidante promovendo acesso molecular a componentes hidrofóbicos que são mais susceptíveis à destruição celular oxidativa, pois o potencial antioxidante aumenta com a extensão da hidroxilação dos anéis aromáticos (GRAF, 1992).

O γ -orizanol é solúvel em solventes orgânicos, sendo o hexano o preferencial para a extração de γ -orizanol a partir de farelo de arroz. No entanto, todos os componentes de γ -orizanol contém um grupo álcool na porção de ácido ferúlico, o que dá origem a uma percentagem relativamente elevada de polaridade, o que o torna também solúvel em solventes mais polares, tais como isopropanol e acetato de etila. A polaridade do solvente de extração pode afetar significativamente a extração de γ -orizanol a partir de farelo de arroz. Outro fator que interfere na eficiência da extração é a saponificação, a qual é importante para solubilizar lipídios interferentes e separar a fração de maior interesse. No entanto, é necessário controle da alcalinidade do processo para evitar que a ligação éster entre o ácido ferúlico e os

componentes de triterpênicos seja clivada, resultando em decomposição do γ -orizanol com diminuição no rendimento de extração (DIACK; SASKA, 1994).

Heidtmann-Bemvenuti, Nora e Badiale-Furlong (2012) estudaram cinco métodos de extração de γ -orizanol em farelo de arroz e otimizaram o melhor método, no qual foi obtido um elevado conteúdo de γ -orizanol (13,98 mg/g de amostra) utilizando as seguintes condições de extração: 40 °C, 40 min e 75 mL de hexano:isopropanol (1:3).

Extração de lipídios com fluido supercrítico vem sendo estudada como uma alternativa à extração com solvente orgânico e tem se demonstrado como ideal para extração (TOMITA et al., 2014). Xu e Godber (2000) compararam solventes orgânicos com dióxido de carbono (SC-CO₂) supercrítico para extração de lipídios e γ -orizanol a partir de farelo de arroz. Dentre os solventes testados, a mistura de 50:50 n-hexano:isopropanol à 60 °C durante 45-60 min foi o melhor resultado para rendimento de γ -orizanol (1,68 mg/g de farelo de arroz). Sem saponificação prévia, o rendimento do γ -orizanol foi aproximadamente duas vezes maior do que com saponificação. No entanto, utilizando SC-CO₂ o rendimento de γ -orizanol foi aproximadamente quatro vezes superior ao maior rendimento obtido por extração com solventes orgânicos líquidos (5,39 mg/g de farelo de arroz). Extração supercrítica com dióxido de carbono não é tóxica e nem inflamável, e sua operação é simples, quando comparados com os solventes de extração tradicionais, portanto a extração com dióxido de carbono supercrítico é ideal para indústria de alimentos e farmacêutica.

O γ -orizanol apresenta uma solubilidade de aproximadamente 10% em clorofórmio e 20% em metil-etil-cetona, no entanto é praticamente insolúvel em água. (CALHEIROS, 2007).

Para determinação do γ -orizanol são mais utilizadas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria ultravioleta (UV) (LERMA-GARCIA et al., 2009). O método de CLAE é preciso e eficiente, porém requer alto custo da análise, enquanto a espectrofotometria é simples, prática e barata, mas nem sempre os resultados obtidos são confiáveis, pois pode sofrer interferência da matriz, levando a resultados equivocados, em geral, por superestimação (BUCCI et al., 2003).

3.4 ANTIOXIDANTES

Antioxidante pode ser definido como uma família heterogênea de moléculas que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, atrasa significativamente ou evita a oxidação. O termo "substrato oxidável" inclui quase tudo encontrado em alimentos e em tecidos vivos, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (HALLIWELL et al., 1995).

Os antioxidantes são responsáveis pela inibição e redução de radicais livres nas células (LIOCHEV, 2013) e para isso são necessárias algumas características para ser considerado um bom antioxidante, como possuir substituintes doadores de hidrogênio ou elétrons ao radical, em função de seu potencial de redução; ter a capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura e a de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e ter acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília (MANACH et al., 2004).

Frutas, vegetais e seus subprodutos ou resíduos, gerados durante o processamento dos mesmos na indústria, são fontes de antioxidantes naturais. Os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria brasileira alimentícia são o BHA (butil-hidroxianisol), BHT (butil-hidroxitolueno) e TBHQ (terc-butilhidroquinona), no entanto apesar de serem efetivos e estáveis, tem despertado preocupação devido aos possíveis danos a saúde (CHANDRA et al., 2014).

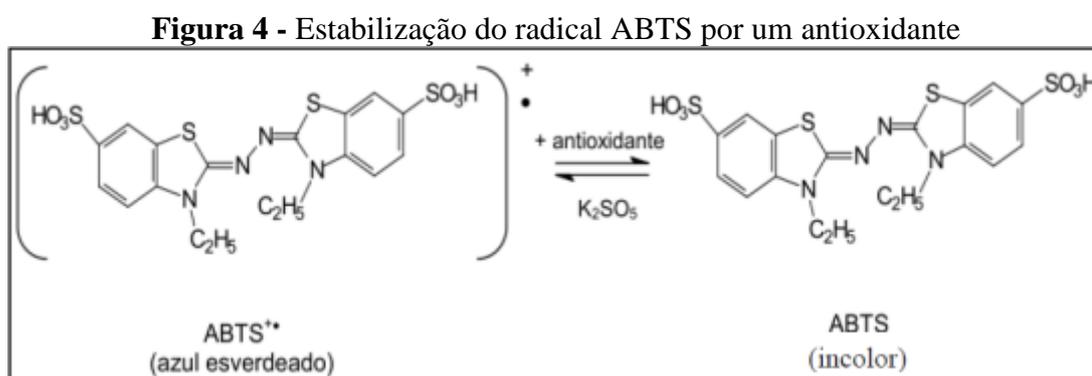
Desta forma, há interesse em se encontrar novos antioxidantes que sejam seguros e provenientes de fontes naturais, reduzindo assim componentes sintéticos nos alimentos por meio da associação ou até mesmo a sua substituição. Portanto, coproduto como o farelo de arroz vem sendo explorado como fonte alternativa para antioxidantes naturais (SCHMITH et al., 2014; SUKHONTHARA; KAEWKA; THEERAKULKAIT, 2016).

Os ensaios de avaliação de capacidade antioxidante *in vitro* são classificados de acordo com as reações envolvidas. Primeiro estão os que se baseiam em transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e depois baseados em reações de transferência de elétrons (TE). Ensaios baseados em TAH geralmente empregam um esquema de reação competitiva, em que o antioxidante e o substrato competem pelos radicais peroxil que são gerados termicamente por meio da decomposição de azo-compostos. Os ensaios baseados em TE medem a capacidade do antioxidante de reduzir o oxidante, que muda de cor quando reduzido. A intensidade da mudança de cor está correlacionada com as concentrações de antioxidantes na amostra (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010).

radicais, sendo este um mecanismo provável da proteção antioxidante (VILLAÑO et al., 2007). Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micromols de equivalentes de um padrão utilizado ou ainda como CI_{50} (quantidade de um antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH) (BROINIZI et al., 2007).

3.4.2 Método do ABTS

A captura do radical (2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline- 6-sulfonic acid) diammonium salt) (ABTS) é um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante *in vitro*, a qual pode ser gerada através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com este método, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, além disso, é um dos métodos antioxidantes mais rápidos e que oferece resultados reprodutíveis (KUSKOSKI et al., 2004).



Fonte: MOON; SHIBAMATO (2009)

Esse método baseia-se na geração do $ABTS^{\bullet+}$, que apresenta cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do $ABTS^{\bullet+}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional (Figura 4). Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do $ABTS^{\bullet+}$ é determinada em função de um padrão antioxidante comercial análogo a vitamina E (Trolox). O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (SUCUPIRA et al., 2012).

3.4.3 Método do sistema β -caroteno/ácido linoleico

O método da autooxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoleico foi desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Esse método é amplamente utilizado principalmente por não recorrer a altas temperaturas, permitindo a determinação do poder antioxidante de compostos termossensíveis.

O método é baseado em um ensaio espectrofotométrico, em meio emulsionado, que avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, causada pela luz, calor e oxigênio (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). A perda de coloração da solução, passando da cor amarela intensa para amarelo claro, é lida em comprimento de onda de 470 nm. Esta descoloração é ocasionada pela oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (estruturas radicais formadas pela oxidação do ácido linoleico, que atuam sobre as duplas ligações do β -caroteno, levando à perda de seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento característico da solução). Quando antioxidantes estão presentes no sistema, protegem o ácido linoleico, postergando a formação destes radicais. Pode-se realizar comparação dos resultados com padrões sintéticos, como BHA, BHT e trolox, ou naturais, como ácido gálico ou quercetina (ALVES et al., 2010).

Este método, apesar dos inconvenientes como interferência de substâncias oxidantes ou redutoras do ensaio, é amplamente usado, pois uma vez que não necessita de elevadas temperaturas durante sua execução, permite a determinação do poder antioxidante em produtos termossensíveis (AMIN; NORAZAIDAH; HAINIDA, 2006).

3.4.4 Estabilidade oxidativa

Experimentos avaliando a atividade antioxidante em óleos e gorduras têm sido realizados por diversos pesquisadores. A maioria dos artigos publicados avalia extratos naturais em óleos comestíveis, com o objetivo de avaliar o potencial antioxidante, submetendo o óleo a processos acelerados de oxidação (ANGELO; JORGE, 2008; RIBEIRO et al., 2014).

Os métodos acelerados de determinação da estabilidade oxidativa surgiram a partir de uma tentativa de prever a vida útil de óleos e gorduras, pois o acompanhamento das alterações ocorridas nestes produtos, nas condições de armazenamento, é lento e pode

consumir grande quantidade de reagentes. A determinação da eficácia de um antioxidante corresponde à medida do prolongamento do período de indução, ou seja, quanto tempo a mais o lipídio será resistente à oxidação devido à presença do antioxidante, correspondendo ao fator de proteção do antioxidante ao óleo.

Para acelerar a oxidação, os testes incluem elevação de temperatura, adição de metais, aumento da pressão de oxigênio, estocagem sob luz e agitação (ANTONIASSI, 2001). Dentre estes testes, pode-se utilizar a fotoxidação acelerada com radiação ultravioleta, pois a mesma afeta de modo significativo à estabilidade dos alimentos fotossensíveis iniciando e acelerando as reações de degradação fotoquímica (TOLENTINO, 2008).

Para avaliar a estabilidade oxidativa é necessário monitorar as alterações ocorridas na amostra mediante determinação dos produtos primários de oxidação (os peróxidos) que podem ser dados pelo índice de peróxidos e os produtos secundários de oxidação (aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos, polímeros) determinados pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico, índice de p-anisidina e teste de Kreis ou índice de ranço (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

CAPÍTULO III

ARTIGO 1. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO POR *Rhizopus oryzae* EM FARELO DE
ARROZ: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E FOSFOLIPÍDIOS

RESUMO

As alterações na fração lipídica decorrente do cultivo de *Rhizopus oryzae* em estado sólido no substrato farelo de arroz integral foram avaliadas a partir da determinação do conteúdo de lipídios, fosfolipídios e perfil dos ácidos graxos, além das três formas de fósforos na biomassa. Os resultados mostraram que o conteúdo de lipídios aumentou no início do cultivo, alcançando conteúdo 17,3% maior em relação ao controle (0 h) em 60 h de cultivo. Esta mesma biomassa apresentou aumento de 29% no conteúdo de fosfolipídios após 12 h de cultivo, seguida de redução. Na amostra controle (0 h) prevaleceram os ácidos linolelaídico, oleico e palmítico, com redução do oleico (15,5%) e aumento do linolelaídico (11,9%) em 84 h. Neste mesmo intervalo os ácidos graxos essenciais ($\omega 6$ e $\omega 3$) aumentaram em 13,3%. O fósforo inorgânico aumentou a partir de 12 h de cultivo e atingiu conteúdo maior que o orgânico com 36 h. Portanto, o cultivo em estado sólido de *Rhizopus oryzae* sobre o farelo de arroz pode ser aplicado para a alteração do perfil dos ácidos graxos essenciais e fosfolipídios.

Palavras-chave: Biomassa. Cromatografia gasosa. Fósforo inorgânico. Fração lipídica.

1 INTRODUÇÃO

O farelo de arroz é um coproduto obtido a partir das operações de beneficiamento de arroz, proveniente das camadas de revestimento do grão, germe e quantidades menores de endosperma quebrado, que perfazem juntos 10% do total do grão (POULARI et al., 2009).

No farelo de arroz estão concentrados os lipídios, entre 19,4% e 25,5% (LIU, et al., 2013), sendo que dele se obtém o óleo que é considerado um dos mais valiosos e saudáveis por conter vitaminas do complexo B, vitaminas E (α -tocoferol e tocotrienol), vitamina K, γ -orizanol e ácidos graxos (KHOEI; CHEKIN, 2016; LEMOS; SOUZA-SOARES, 2000).

O farelo de arroz também é empregado como substrato para cultivo de fungos filamentosos, os quais podem promover a disponibilização de nutrientes ou produção de compostos de interesse para indústrias alimentícias, farmacêutica, entre outras (MARTINS et al., 2011; POULARI et al., 2010). Dentre os produtos comerciais obtidos por cultivo fúngico em farelo de arroz destacam-se o ácido láctico (WATANABE et al., 2013); biomassa proteica (OSHOMA; IKENEBOMEH, 2005); enzimas proteolíticas (ALI; VIDHALE, 2013), celulolíticas (KUPSKI et al., 2015) e amilolíticas (GROVER; MANINDER; SARAO, 2013).

Oliveira et al. (2011) e Schimidt et al. (2014) empregaram farelo de arroz como substrato para *Rhizopus oryzae*, de onde destacaram e verificaram alterações na disponibilidade de lipídios, fosfolipídios, e ácidos fenólicos. Porém, estes autores não exploraram a variação no perfil da fração lipídica, o que é um aspecto determinante para a

indicação de aplicabilidade do processo de cultivo visando à obtenção de insumos de interesse industrial.

Para preencher esta lacuna, este trabalho avaliou o impacto do cultivo de *Rhizopus oryzae* no perfil lipídico do farelo de arroz integral, bem como no conteúdo de fosfolipídios e as formas de fósforo na biomassa fúngica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O farelo de arroz integral (FAI) foi obtido de indústria beneficiadora de arroz do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As cepas de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foram adquiridas do Banco de Culturas da Fundação Tropical André Tosello, Campinas, Brasil. O padrão de ésteres metílicos (Supelco® 37 Component FAME Mix) foi adquirido da Sigma Aldrich, USA e o Fosfato de Potássio Monobásico P.A. ACS Anidro (grau de pureza > 99%) da Vetec Química, Brasil.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ INTEGRAL (FAI)

O perfil granulométrico do FAI foi verificado em peneiras com aberturas de 1,67; 0,73; 0,50 e 0,39 mm, tomando-se 100 g de amostra como quantidade inicial. A composição proximal foi determinada segundo a AOAC (2000), especificamente a umidade (n° 934.01), cinzas (n° 900.02), proteínas (n° 955.04C; fator de conversão 5,75), lipídios (n° 920.85) e fibras bruta (n° 962.09). Os percentuais de carboidratos foram estimados por diferença.

2.3 CULTIVO DE *Rhizopus oryzae*

As cepas de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foram mantidas em meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) a 4 °C, os esporos foram propagados em meio BDA e incubados durante 7 dias a 30 °C até esporulação, para posterior utilização no cultivo.

A suspensão de esporos para o cultivo foi obtida a partir da adição de emulsão aquosa de Tween 80 (0,2%) na cultura do fungo e liberação dos esporos por raspagem com alça Drigalski. A concentração dos esporos foi estimada por enumeração em câmara de Neubauer.

A geração de biomassa foi baseada no método descrito por Oliveira et al. (2010), onde o FAI foi utilizado como substrato. O FAI foi distribuído em uma camada de 2 cm de espessura em reatores de bandeja ($12,5 \times 12,5 \times 5 \text{ cm}^3$) e esterilizado. A massa de farelo (100g) foi utilizada como base para a estimativa da quantidade de solução nutriente, água estéril e solução de esporos que foram adicionadas. A solução nutriente (2 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de MgSO_4 e 1,8 g/L de NH_2CONH_2 em HCl 0,4 N) foi adicionada na proporção de 45 mL de solução para 100 g de substrato e a suspensão de esporos na concentração inicial de 4×10^6 esporos/g de farelo. A umidade do meio foi ajustada para aproximadamente 50% com adição de água estéril. Os reatores foram cobertos com gaze estéril, para permitir a aeração e evitar contaminação, e mantidos em câmara de cultivo a 30 °C durante 120 h. A amostra controle (0 h) consistiu no FAI esterilizado, adicionado de solução nutriente e solução de esporos e armazenado imediatamente a -18 °C, as demais amostras de biomassa foram retiradas em intervalos de 12 h até completar 120 h de cultivo e mantidas a -18 °C para posteriores determinações.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA DA BIOMASSA

As biomassas fúngicas coletadas ao longo do cultivo foram submetidas à extração de lipídios segundo o método de Folch, Lees e Stanley (1957) seguindo-se a determinação de fosfolipídios e o perfil de ácidos graxos.

2.4.1 Determinação de lipídios

A extração de lipídios foi realizada segundo o método de Folch, Lees e Stanley (1957) com adaptações, onde foi adicionado 1 mL de KCl 0,88% em 1 g da amostra e homogeneizado, após foi agitada em banho ultrassônico por 5 min com 10 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1) e centrifugada por 15 min. O sobrenadante foi separado e o processo de extração por agitação foi repetido mais 2 vezes. Os sobrenadantes foram filtrados, e transferidos para um funil de separação. Foram adicionados 20 mL de KCl 0,88% seguido por agitação manual. A fase inferior foi coletada e homogeneizada com 10 mL da solução de clorofórmio:metanol (2:1) por duas vezes. A fase orgânica separada foi filtrada em sulfato de sódio anidro e submetida à evaporação do solvente. O resíduo foi pesado para quantificar o conteúdo de lipídios.

2.4.2 Determinação de fosfolipídios

A determinação de fosfolipídios foi realizada conforme Esteves, Gonçalves e Barrera-Arellano (1995) com adaptações, aos lipídios extraídos (aproximadamente 0,1 g) foram adicionados 0,40 g de MgO e estes foram secos em estufa a 110 °C até absorção da amostra pelo MgO. Após, o conteúdo foi incinerado em bico de Bunsen, seguindo para mufla a 800 °C até peso constante. As cinzas foram diluídas em 40 mL de água destilada e 20 mL de ácido sulfúrico 1 M, após a mistura foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e aferido volume com água destilada (solução analítica). Para a determinação de fósfolípido, foram transferidas alíquotas das soluções analíticas para balões volumétricos de 100 mL, conforme a diluição necessária da amostra (volumes de alíquotas utilizados: 15, 20, 30, 35 e 40 mL), adicionado 20 mL da solução de molibdato e completado volume do balão com água destilada. Para o branco, em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 20 mL da solução de molibdato, 0,40g de MgO, 20 mL de ácido sulfúrico 1 M e completado volume com água destilada. A mistura e o branco foram aquecidas a 90 °C por 30 min e resfriadas para posterior quantificação colorimétrica do fósforo (fosfolípido), a qual foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda 800 nm. A curva padrão de fósforo (PO₄) (0,1 a 1,25 µg/mL) foi usada para estimativa da concentração dos fosfolipídios.

2.4.3 Perfil dos ácidos graxos

Na fração lipídica extraída das biomassas e do controle também foi verificada a composição dos ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os lipídios foram esterificados pelo método adaptado de Metcalfe, Schimtz e Pelke (1966). A esterificação consistiu na saponificação com KOH 0,5 M em metanol e a reação de esterificação com metanol foi catalisada pelo trifluoreto de boro. O solvente foi evaporado e a amostra solubilizada em diclorometano para análise por cromatografia gasosa.

Para separar e quantificar a mistura de ácidos graxos esterificados, foi empregado Cromatógrafo a gás (Shimadzu 2010 Plus), equipado com injetor split/splitless, coluna capilar RTX[®]-1 (30 m x 0,25 mmID x 0,25 µm) e detector de ionização de chama (FID). O gás de arraste foi hélio em uma vazão de 1,25 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 260 °C, sendo o volume injetado de 1 µL. As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 50 °C, elevando-se para 200 °C em uma taxa de 6 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 4 min. Na segunda rampa de

temperatura a taxa de aumento foi de 2 °C/min até 240 °C, permanecendo por 10 min. A comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos foi usada para identificação do perfil de ácidos graxos das amostras e quantificados pela normatização das áreas.

2.5 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO ORGÂNICO, INORGÂNICO E TOTAL

Para a determinação de fósforo total foram pesadas 300 mg de amostra das biomassas e estas foram digeridas em forno de micro-ondas (Multiwave 3000, Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, Graz, Austria) em frascos de PTFQ (HF-100) contendo 6 mL de HNO₃ concentrado. A programação de temperatura foi realizada com potência de 1400 W, rampa de 10 min, temperatura de 210 °C por 20 min de permanência e no segundo passo os mesmos parâmetros por mais 20 min.

Após a digestão, as amostras foram diluídas em HNO₃ 5%, para posterior quantificação por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), utilizando vista axial de observação do equipamento (modelo Optima 4300 DV, Perkin Elmer, Shelton, USA). A introdução das amostras no espectrômetro foi realizada empregando um nebulizador GemCone e uma câmara de nebulização ciclônica. As condições de operação do equipamento foram: potência 1400 W; vazão do gás principal 15 L/min; vazão gás auxiliar 0,2 L/min; vazão nebulizador de gás 0,7 L/min e comprimento de onda 214,9 nm. O plasma foi formado a partir de argônio (White Martins, São Paulo, Brazil), com pureza de 99,9%.

A extração do fósforo inorgânico (forma livre) foi realizada em 1 g de biomassa, adicionados 50 mL de ácido clorídrico 1 M e agitação orbital a 220 rpm por 3 h. Após, foi centrifugada e filtrada a solução para balão de 50 mL e ao final completado volume do balão com água destilada. Para quantificação do fósforo, foram transferidas alíquotas do extrato (1, 2 ou 13 mL) para um erlenmeyer, adicionada uma gota de fenolftaleína e titulado com NaOH 3 M até cor levemente rosa. O extrato alcalino foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL, adicionado 5 mL do reativo vanadato molibdato e completado volume do balão com água destilada. O branco foi preparado substituindo as alíquotas do extrato por água destilada. As soluções foram homogeneizadas, aguardados 10 min para completo desenvolvimento da cor, leitura em espectrofotômetro comprimento de onda de 420 nm e para quantificação foi utilizada uma curva padrão de fósforo (0 a 30 µg/mL). O fósforo orgânico foi determinado

pela diferença do fósforo total e inorgânico.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar as significâncias dos efeitos das variáveis dependentes (lipídios, fosfolipídios, fósforos e ácidos graxos) no decorrer do cultivo (variável independente) foi empregada a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de diferenças de médias Tukey, utilizando o Software *Statistica* 6.0. Diferenças com um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foram consideradas significativas e todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DO FAI

O FAI obtido da indústria apresentou 46,1% das partículas com tamanhos menores que 0,39 mm (Tabela 1) e 14,4% de grãos inteiros, quebrados e cascas de arroz, sendo estes tamanhos de partículas maiores que 0,73 mm.

Tabela 1 – Distribuição do tamanho das partículas no farelo de arroz

Tamanho das partículas	Média (g)*	Descrição	Rendimento (%)
Maiores que 1,67 mm	0,59 \pm 0,06	Grãos e casca de arroz inteiros	0,6
Entre 1,67 e 0,73 mm	13,67 \pm 0,71	Grãos e casca de arroz quebrados	13,8
Entre 0,73 e 0,50 mm	13,22 \pm 2,00	Casca de arroz fina e farelo	13,3
Entre 0,50 e 0,39 mm	26,06 \pm 11,53	Farelo	26,2
Menores que 0,39 mm	45,68 \pm 13,57	Farelo	46,1

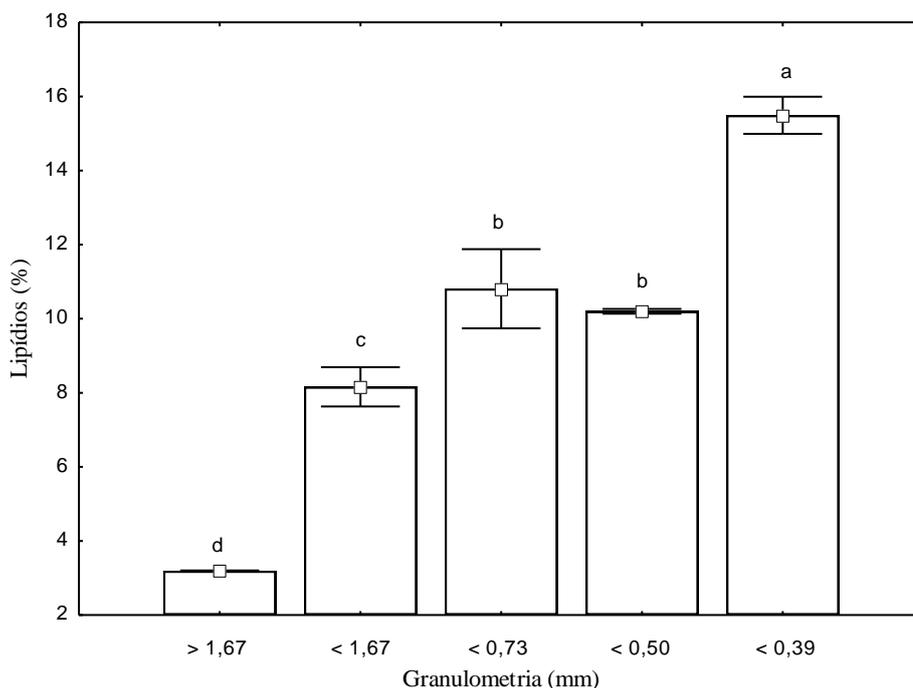
*Valores expressos como médias \pm D.P (n=3). D.P = Desvio padrão.

A amostra de farelo de arroz fornecida pela indústria apresentou somente 85,6% de farelo de arroz, e o restante da amostra analisada apresentou casca e grãos de arroz. Isso pode ocasionar baixo rendimento de extração se a amostra for utilizada para extrações de

compostos de interesse que estão concentrados no farelo e não nas cascas e grãos, como é o caso dos lipídios (MARCHEZANLL; DE AVILALL, 2008). Isso sugere que seria interessante rever o processo de separação do farelo durante o beneficiamento de arroz para tornar o coproduto mais uniforme e adequado para diferentes técnicas de valoração dele.

Em cada tamanho de partícula foram determinados os conteúdos de lipídios (Figura 1).

Figura 1 - Conteúdo de lipídios em diferentes tamanhos de partículas



As partículas maiores do farelo de arroz apresentaram os menores conteúdos lipídicos e nas partículas menores que 0,39 mm maior conteúdo de lipídios, sendo o menor conteúdo verificado nas partículas maiores que 1,67 mm.

Para o cultivo, foi padronizado o farelo de arroz contendo 40% dos tamanhos de partículas menores que 0,39 mm, 25% de partículas com tamanho entre 0,50 e 0,39mm, 25% partículas com tamanho entre 0,73 e 0,50 mm e 10% partículas com tamanho entre 1,67 e 0,73 mm. Os tamanhos das partículas utilizados para o cultivo foram definidos levando em consideração o conteúdo lipídico e estudos que demonstraram que partículas de dimensões maiores resultam em um efeito positivo sobre a produção de biomassa e substratos com partículas menores proporcionam uma área de contato maior entre o fungo e o substrato, favorecendo o seu crescimento, no entanto somente partículas pequenas podem causar à

compactação e a formação de aglomerados, o que resulta na diminuição de transferência de oxigênio, afetando a respiração e o desenvolvimento dos fungos (MEMBRILLO et al., 2011; SCHMIDT; BADIALE-FURLONG, 2012). Em vista destas informações, a utilização de diferentes porções granulométricas pode propiciar um maior crescimento de *Rhizopus oryzae* em farelo de arroz integral. Fato importante quando se pretende explorar o processo de cultivo para produção de insumos ou compostos com valor funcional.

3.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO FAI

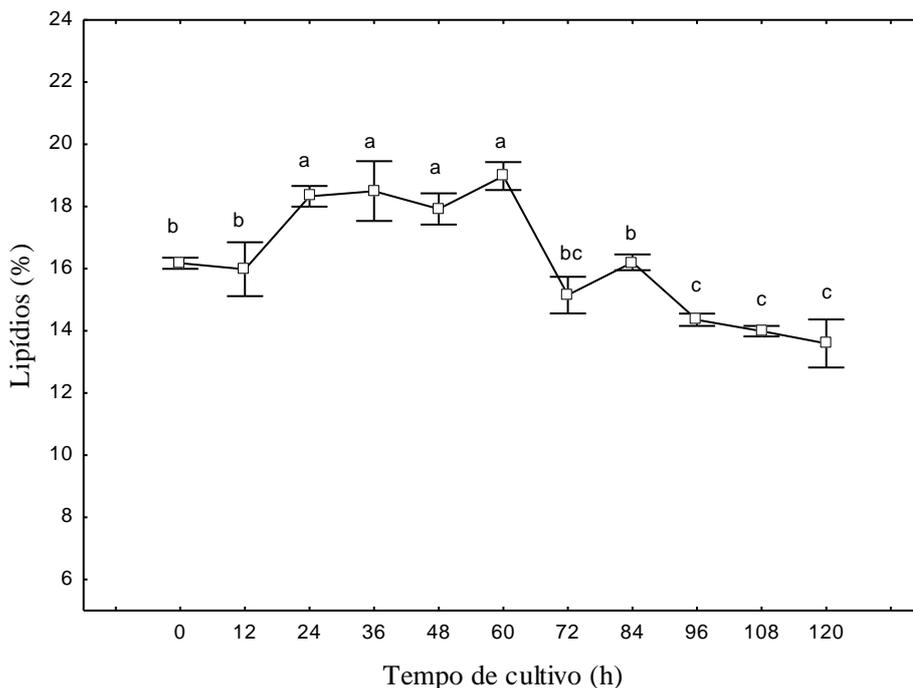
Com a granulometria padronizada, foram determinados os macrocomponentes umidade $11,2\% \pm 0,29$, cinzas $10,0\% \pm 0,52$, fibras $6,5\% \pm 4,11$, lipídios $17,9\% \pm 5,75$, proteínas $13,0\% \pm 4,29$ e carboidratos $41,3\% \pm 3,01$. O conteúdo de umidade e cinzas são semelhantes aos encontrados por Oliveira et al. (2010). No entanto, o conteúdo de fibras, lipídios e proteínas foram menores, isso se deve ao fato de que o farelo de arroz é um coproduto agroindustrial e, portanto sua composição química depende de fatores associados à variedade e aos aspectos agrônômicos, como tipo de solo, clima, qualidade da matéria-prima utilizada, bem como o processo de beneficiamento, fazendo-se sempre necessário experimentos envolvendo farelo de várias procedências para aprofundamento do conhecimento das condições que afetam o crescimento fúngico.

Com esta composição o farelo resultante pode ser empregado como substrato para cultivo de *Rhizopus oryzae*, pois os macronutrientes são suficientes para a geração de biomassa fúngica após a complementação com micronutrientes minerais.

3.3 FRAÇÃO LIPÍDICA

Os fungos sintetizam lipídios para atender suas funções básicas e formação de membranas celulares, embora algumas espécies possam acumular lipídios gerando biomassa com até 20% deles (CHEIRSILP; KITCHA, 2015; DEY et al., 2011; LIN et al., 2010; RATLEDGE; WYNN, 2002).

O conteúdo total de lipídios na biomassa foi avaliado no decorrer do cultivo fúngico (Figura 2), verificando-se que ocorreu aumento nos níveis de lipídios extraíveis pela mistura de clorofórmio:metanol, com maior conteúdo (19,0 %) em 60 h de cultivo, que representou um aumento de 17,3% em relação ao conteúdo lipídico do tempo zero.

Figura 2 - Conteúdo lipídico na biomassa durante o cultivo

O aumento lipídico, nos substratos cultivados, pode ocorrer através de uma via direta de conversão da biomassa lignocelulósica, por um conjunto de enzimas celulolíticas, em açúcares e conseqüentemente lipídios podem ser desenvolvidos (CHEIRSILP; KITCHA, 2015).

3.3.1 Fosfolipídios

Devido às suas propriedades nutricionais e tecnológicas os fosfolipídios foram determinados ao longo da formação da biomassa nos intervalos do experimento (Tabela 2).

Nas primeiras 12 h de cultivo houve aumento significativo de 29% de fosfolipídios, e este foi reduzindo a partir de 24 h chegando ao final do intervalo de cultivo com 0,13 mg/g biomassa (45,8% de redução em relação ao controle).

A redução dos fosfolipídios na biomassa após 96 h acompanhou o comportamento verificado na determinação do teor de lipídios totais (Figura 2) bem como ocorreu um aumento dos teores de fósforo inorgânico (Figura 3) que pode ser fosfato proveniente dos fosfolipídios.

Tabela 2 - Fosfolipídios na biomassa durante o cultivo

Tempo de cultivo (h)	Fosfolipídios (mg/g biomassa)	Fosfolipídios (mg/g lipídios)
0	0,24 ± 0,01 ^{bc}	1,49 ± 0,08 ^{bcd}
12	0,31 ± 0,03 ^a	1,97 ± 0,05 ^a
24	0,20 ± 0,01 ^{cd}	1,09 ± 0,02 ^{ef}
36	0,22 ± 0,01 ^{bcd}	1,17 ± 0,07 ^{ef}
48	0,22 ± 0,02 ^{bcd}	1,20 ± 0,06 ^f
60	0,21 ± 0,01 ^{bcd}	1,11 ± 0,06 ^{ef}
72	0,26 ± 0,02 ^{ab}	1,72 ± 0,07 ^b
84	0,24 ± 0,02 ^{bc}	1,50 ± 0,12 ^{bc}
96	0,19 ± 0,01 ^{cd}	1,31 ± 0,07 ^{cdf}
108	0,18 ± 0,00 ^{de}	1,26 ± 0,01 ^{df}
120	0,13 ± 0,00 ^e	0,94 ± 0,05 ^e

Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

Valores expressos em base seca e como médias ± D.P (n = 3). D.P = Desvio padrão

Obtenção de fosfolipídios é interessante para indústria, pois por serem anfifílicos e altamente ativos em superfícies, podem influenciar significativamente nas propriedades físicas das emulsões e espumas, além de formar estruturas supramoleculares de automontagem, um componente-chave na nanociência para a separação de fases imiscíveis, vital para dispersões de alimentos e formulações cosméticas (PATINO et al., 2007).

3.3.2 Perfil ácidos graxos

Dos 37 ácidos graxos (AGs) analisados nos lipídios da biomassa (Tabela 3), na amostra controle (0 h) os principais AGs encontrados foram: 40,2% de linolelaídico (C18:2n6t), 33,6% oleico (C18:1n9c) e 20,2% de palmítico (C16:0).

O percentual de ácido palmítico não foi alterado durante o intervalo de cultivo estudado. No entanto, o ácido oleico reduziu em 15,5% e o linolelaídico aumentou em 11,9% no intervalo de 84 h. Silveira, Oliveira e Badiale-Furlong (2010) observaram que após 72 h de fermentação dos farelos de arroz e trigo com o mesmo micro-organismo, ocorria um aumento nos teores dos ácidos palmítico e linoleico.

Tabela 3 – Perfil dos ácidos graxos em cada tempo de cultivo

Ácidos graxos	Tempo de cultivo (h)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
14:0	0,3±0,0 ^a	0,3±0,0 ^a	0,2±0,0 ^b	0,2±0,0 ^{bc}	0,1±0,0 ^c	0,1±0,0 ^c	0,1±0,0 ^c	0,1±0,0 ^c	0,1±0,0 ^c	0,1±0,0 ^c	0,1±0,0 ^c
16:0	20,2±0,5 ^a	20,3±0,5 ^a	21,2±1,2 ^a	20,1±0,3 ^a	20,6±0,2 ^a	23,0±4,8 ^a	19,3±0,7 ^a	18,4±0,3 ^a	19,5±0,3 ^a	19,3±1,1 ^a	19,2±0,3 ^a
16:1	0,1±0,0 ^{ab}	0,1±0,0 ^{ab}	0,1±0,0 ^{bc}	0,1±0,0 ^{cd}	0,1±0,0 ^{cd}	0,1±0,0 ^{cd}	0,1±0,0 ^d	0,1±0,0 ^d	0,1±0,0 ^{cd}	0,2±0,0 ^a	0,1±0,0 ^{cd}
18:0	0,1±0,0 ^c	0,1±0,0 ^c	0,5±0,0 ^b	0,7±0,0 ^{ab}	0,7±0,0 ^{ab}	0,8±0,0 ^a	0,7±0,0 ^{ab}	0,5±0,0 ^b	0,8±0,1 ^{ab}	0,7±0,1 ^{ab}	0,7±0,0 ^{ab}
18:1n9c	33,6±0,1 ^a	32,8±0,1 ^a	31,5±0,1 ^b	30,7±0,1 ^{bcd}	30,0±0,4 ^{cde}	29,9±0,2 ^{de}	29,5±0,3 ^e	28,4±0,1 ^f	31,1±0,7 ^{bc}	29,7±0,1 ^{de}	29,8±0,3 ^{de}
18:1n9t	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	0,3±0,1 ^a	0,1±0,0 ^b	0,2±0,0 ^{ab}	0,2±0,0 ^{ab}	0,2±0,0 ^{ab}	0,2±0,0 ^b	0,1±0,0 ^b	0,1±0,0 ^b
18:2n6c	0,7±0,0 ^a	0,6±0,0 ^{ab}	0,4±0,0 ^b	n.d. ^d	n.d. ^d	0,1±0,0 ^c	n.d. ^d	n.d. ^d	n.d. ^d	n.d. ^d	n.d. ^d
18:2n6t	40,2±0,2 ^e	40,3±0,2 ^{de}	40,8±0,8 ^{de}	41,8±0,6 ^{cde}	42,0±0,2 ^{cde}	44,0±0,8 ^{ab}	43,0±0,0 ^{bc}	45,0±0,5 ^a	42,2±0,8 ^{bcd}	43,6±0,8 ^{abc}	43,3±0,2 ^{abc}
18:3n6	0,6±0,0 ^a	0,6±0,0 ^a	0,5±0,0 ^a	0,5±0,1 ^a	0,4±0,0 ^a	0,5±0,1 ^a	0,6±0,0 ^a	0,5±0,1 ^a	0,5±0,0 ^a	0,5±0,1 ^a	0,5±0,1 ^a
18:3n3	1,8±0,0 ^e	1,8±0,0 ^e	2,2±0,1 ^{cd}	2,3±0,0 ^{bc}	2,2±0,0 ^{cd}	2,5±0,1 ^b	2,4±0,0 ^{bc}	2,8±0,1 ^a	2,1±0,0 ^d	2,2±0,1 ^{cd}	2,1±0,0 ^d
20:3n6	n.d. ^c	n.d. ^c	<0,1±0,0 ^b	n.d. ^c	<0,1±0,0 ^{ab}	<0,1±0,0 ^{ab}	<0,1±0,0 ^{ab}	0,1±0,0 ^a	<0,1±0,0 ^{ab}	<0,1±0,0 ^{ab}	<0,1±0,0 ^{ab}
20:3n3	0,5±0,0 ^b	0,5±0,0 ^b	0,4±0,0 ^b	0,6±0,0 ^{ab}	0,6±0,0 ^{ab}	0,7±0,1 ^a	0,6±0,0 ^a	0,7±0,0 ^a	0,6±0,0 ^{ab}	0,6±0,0 ^{ab}	0,6±0,0 ^{ab}
20:4n6	0,9±0,2 ^a	0,9±0,2 ^a	0,7±0,1 ^a	0,9±0,0 ^a	0,9±0,0 ^a	1,0±0,2 ^a	0,9±0,0 ^a	1,0±0,0 ^a	0,8±0,0 ^a	0,9±0,1 ^a	0,9±0,0 ^a
20:5n3	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d. ^b	0,5±0,1 ^a	0,4±0,1 ^a	0,5±0,1 ^a	0,3±0,1 ^a	0,3±0,1 ^a	0,3±0,0 ^a	0,6±0,2 ^a
23:0	0,4±0,0 ^b	0,4±0,0 ^b	0,4±0,1 ^{ab}	0,6±0,0 ^{ab}	0,5±0,0 ^{ab}	0,6±0,1 ^{ab}	0,6±0,0 ^a	0,6±0,0 ^a	0,5±0,0 ^{ab}	0,6±0,1 ^{ab}	0,6±0,0 ^a
24:0	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d. ^b	<0,1±0,0 ^a	0,1±0,0 ^a	0,1±0,0 ^a	<0,1±0,0 ^a	0,1±0,0 ^a	0,1±0,0 ^a	0,1±0,0 ^a
24:1n9	0,7±0,1 ^b	0,7±0,1 ^b	0,8±0,2 ^{ab}	1,2±0,2 ^{ab}	1,2±0,0 ^{ab}	1,2±0,3 ^{ab}	1,4±0,0 ^a	1,2±0,0 ^{ab}	1,2±0,1 ^{ab}	1,3±0,3 ^{ab}	1,3±0,1 ^{ab}
SFA	21,0±0,1 ^{ab}	21,0±0,2 ^{ab}	22,4±0,3 ^{ab}	21,6±0,3 ^{ab}	22,0±0,3 ^{ab}	24,5±0,3 ^{ab}	20,8±0,2 ^b	19,7±0,1 ^b	21,0±0,2 ^{ab}	20,7±0,4 ^{ab}	20,6±0,2 ^{ab}
MFA	34,5±0,1 ^a	33,7±0,2 ^{ab}	32,4±0,2 ^{bc}	32,3±0,2 ^{cd}	31,4±0,4 ^{cd}	31,3±0,5 ^{cd}	31,1±0,3 ^d	29,9±0,1 ^e	32,5±0,8 ^{bc}	31,3±0,2 ^{cd}	31,3±0,2 ^{cd}
PUFA	44,6±0,3 ^d	44,6±0,2 ^d	45,2±1,0 ^d	46,1±0,5 ^{cd}	46,6±0,4 ^{cd}	49,3±1,2 ^{ab}	48,1±0,1 ^{bc}	50,4±0,6 ^a	46,5±0,7 ^{cd}	48,2±1,0 ^{abc}	48,1±0,1 ^{abc}
PUFA/SFA	2,1±0,1 ^{ab}	2,1±0,1 ^{ab}	2,0±0,2 ^b	2,1±0,1 ^{ab}	2,1±0,0 ^{ab}	2,1±0,4 ^{ab}	2,3±0,1 ^{ab}	2,6±0,1 ^a	2,2±0,0 ^{ab}	2,3±0,2 ^{ab}	2,3±0,0 ^{ab}
w6	42,3±0,3 ^d	42,3±0,1 ^d	42,5±0,9 ^{cd}	43,2±0,5 ^{bcd}	43,3±0,3 ^{bcd}	45,6±0,9 ^a	44,5±0,1 ^{abc}	46,6±0,5 ^a	43,5±0,8 ^{bcd}	45,1±0,9 ^{ab}	44,8±0,2 ^{ab}
w3	2,2±0,1 ^f	2,2±0,1 ^f	2,6±0,1 ^{ef}	2,9±0,1 ^{de}	3,2±0,2 ^{bcd}	3,7±0,3 ^{ab}	3,5±0,1 ^{abc}	3,8±0,1 ^a	3,0±0,1 ^{cde}	3,1±0,1 ^{cde}	3,3±0,2 ^{abcd}
w6/w3	18,9±0,4 ^a	18,9±0,5 ^a	16,1±0,3 ^b	14,8±0,5 ^{bc}	13,5±0,8 ^{cde}	12,5±0,7 ^{de}	12,7±0,3 ^{de}	12,3±0,3 ^e	14,4±0,8 ^{bcd}	14,4±0,2 ^{bcd}	13,6±0,8 ^{cde}

Valores expressos como médias ± D.P. Os valores em cada linha com a mesma letra sobrescrita não são diferentes significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), onde cada ácido graxo foi comparado em diferentes tempos de cultivo. D.P = desvio padrão, n.d. = não detectado, SFA= ácido graxo saturado, MFA= ácido graxo monoinsaturado, PUFA= ácido graxo poli-insaturado.

No estudo de Oliveira et al. (2011), os AGs predominantes foram os mesmos identificados neste estudo, no entanto não foi observada alteração no conteúdo dos ácidos oleico (C18:1) e palmítico (C16:0) durante o biocultivo. Os autores verificaram também um aumento de 10% do ácido linoleico (C18:2), sem diferenciar o ácido linoleico do linolelaídico, os quais são diferentes pela isomeria cis e trans, embora os AGs naturais apresentem predominantemente isomeria cis, alguns AGs insaturados de vegetais e micro-organismos podem apresentar isomeria trans. Alguns AGs poli-insaturados podem ser mistos, isto é, apresentar isômeros cis e trans na mesma molécula (DE SOUZA; MATSUSHITA; VISENTAINER, 2012).

Um aspecto interessante na alteração do perfil de AG foi à redução dos AGs saturados em 6,2% e aumento de 13% dos poli-insaturados em 84 h. Fato que se torna interessante para recomendação do emprego de fermentação prévia na elaboração de formulações alimentícias, pois os AGs poli-insaturados tendem a abaixar o nível sanguíneo de colesterol, enquanto que os saturados a elevar (SCHERR et al., 2014).

A relação de poli-insaturados/saturados aumentou de 2,1 para 2,6, reforçando a importância da fermentação para melhorar o aporte nutricional de AG, pois conforme o Departamento de Saúde da Inglaterra relações maiores que 0,45 são recomendadas para prevenir doenças cardiovasculares.

Outro indicador importante para benefício da saúde é a razão de $\omega 6/\omega 3$ (recomendado de 4:1 a 10:1). Com o processo de cultivo esse indicador diminuiu em 34,9% chegando ao valor da razão de 12,3, estando ainda acima do recomendando. Essa redução na razão de $\omega 6/\omega 3$ se deve ao aumento dos ácidos alfa-linolênico (C:18:3n3) em 55,6%, eicosatrienóico (C:20:3n3) em 40% e a produção do eicosapentaenóico (EPA) (C:20:5n3), o qual só foi identificado a partir de 48 h.

A elevada produção do alfa-linolênico também é importante, pois o mesmo é precursor na biossíntese do EPA e docosa-hexaenóico (DHA), os quais são necessários para a formação de membranas biológicas, a retina, a córtex cerebral, tecido nervoso, testículos e plaquetas sanguíneas, portanto estes AGs são indispensáveis para o equilíbrio metabólico (DE SOUZA; MATSUSHITA; VISENTAINER, 2012).

Para Oliveira et al. (2011) as alterações no perfil do AGs estão relacionadas com *Rhizopus oryzae* em resposta às condições de fermentação, pois o farelo de arroz integral contém seus lipídios e estes atuam induzindo o metabolismo fúngico durante a produção de biomassa. As células microbianas geralmente expressam alterações fisiológicas em resposta às alterações no ambiente, isso foi mostrado por Oda et al. (2003) quando dois grupos de 15

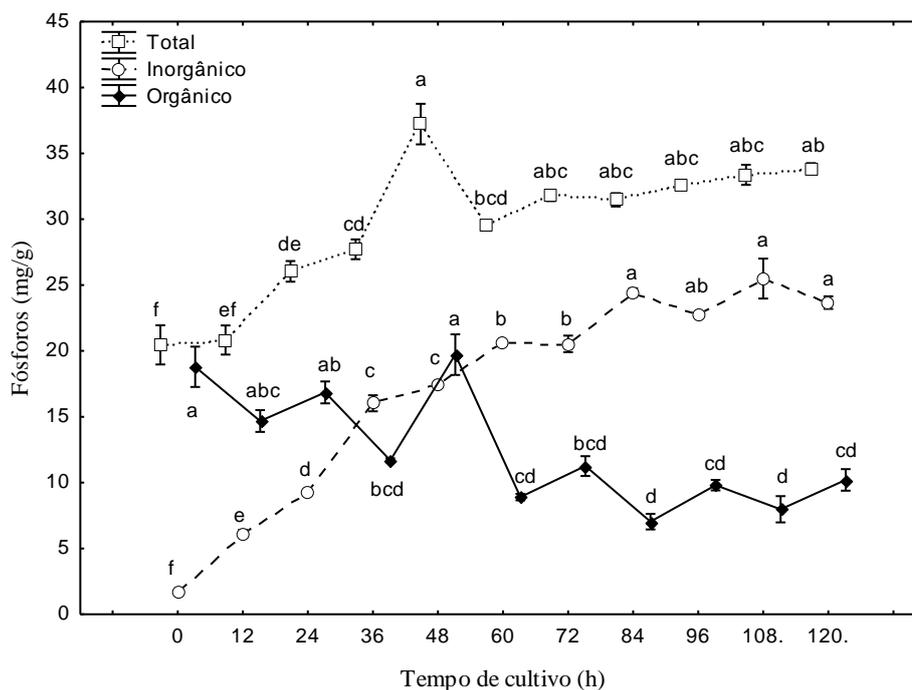
estirpes de *Rhizopus oryzae* foram cultivadas em um meio líquido para analisar os produtos metabólicos e foi verificado aumento de AG insaturados promovido pela adição de carbonato de cálcio para neutralizar o ácido produzido.

3.4 FÓSFORO TOTAL, ORGÂNICO E INORGÂNICO

Além do fósforo total na fração lipídica (fosfolipídios) também foi avaliado o fósforo total e inorgânico (livre) durante o tempo do biocultivo (Figura 3).

O farelo de arroz contém naturalmente formas inorgânicas e orgânicas de compostos de fósforos, e o ácido fítico (fitato) que é particularmente conhecido por ser um dos principais constituintes dos fosfatos orgânicos em farelo de arroz, que fica demonstrado pelo conteúdo de fósforo orgânico (indisponível) no tempo 0 h (controle) 18,8 mg/g (Figura 3), correspondendo com 92% do fósforo total presente no farelo de arroz.

Figura 3 - Fósforo total, inorgânico e orgânico durante o cultivo



Em cereais e seus derivados, o aumento do fósforo inorgânico é importante para melhorar a biodisponibilidade do fósforo para animais monogástricos (CONTE et al., 2002). A partir de 12 h de cultivo a biomassa apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$), e em 36 h de cultivo os teores de fósforo inorgânico foram maiores que o fósforo

orgânico. No entanto, em 48 h de cultivo houve aumento de fósforo total, que pode ter sido decorrente de erro de análise, o qual impactou no fósforo orgânico, por ser estimado pela diferença entre o fósforo total e o inorgânico. Ao final do cultivo o fósforo inorgânico representou 70% do fósforo total. Neste estudo, o fungo *Rhizopus oryzae* mostrou-se promissor para aumentar o teor de fósforo disponível, provavelmente devido à produção da enzima fitase que atua hidrolisando os fitatos presentes no farelo e liberando o fósforo (BOHN; MEYER; RASMUSSEN, 2008).

Oliveira et al. (2010) em estudo de cultivo de farelo de arroz com o fungo *Rhizopus oryzae*, verificou que o conteúdo de ácido fítico após 24 h de cultivo reduzia significativamente (55% a 66%) em relação ao início da fermentação, devido a produção da enzima fitase pelo meio.

4 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o processo de cultivo em estado sólido promoveu aumento de 17,3% nos lipídios totais em 60 h de cultivo, 29% nos fosfolipídios nas primeiras 12 h que foram reduzindo com a continuidade do cultivo. Em 84 h de cultivo os AGs saturados reduziram em 6,2% e os insaturados aumentaram em 13%. O fósforo orgânico diminuiu em 45,7% e o inorgânico aumentou de 8% para 70% ao final do cultivo. Portanto, o cultivo do *Rhizopus oryzae* pode ser aplicado para alteração do perfil de lipídios e fosfolipídios nas suas primeiras horas de formação da biomassa fúngica, com destaque para aumento dos ácidos graxos essenciais e da disponibilidade de fósforo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S.S.; VIDHALE, N. N. Protease Production by *Fusarium oxysporum* in Solid-State Fermentation Using Rice Bran. **American Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 3, p. 45-47, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.
- BOHN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 3, p. 165-191, 2008.
- CHEIRSILP, B.; KITCHA, S. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 73-80, 2015.

- CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; FIGUEIRADO, A. V. D.; VITTI, D.; SILVA FILHO, J. C. D. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz em frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 547-552, 2002.
- DE SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos: Estrutura, Classificação, Nutrição e Saúde. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, v. 2, n. 2, p. 102-107, 2012.
- DEY, P.; BANERJEE, J.; MAITI, M. K. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates – *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5815-5823, 2011.
- ESTEVES, W.; GONÇALVES, L. A. G.; BARRERA-ARELLANO, D. Metodologia padrão alemã para análise de gorduras e outros lipídios. Campinas: UNICAMP/FEA/Laboratório de Óleos e Gorduras, 1995.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- GROVER, A.; MANINDER, A.; SARAO, L. K. Production of fungal amylase and cellulase enzymes via solid state fermentation using *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*. **International Journal of Advancements in Research & Technology**, v. 2, n. 8, p. 108-124, 2013.
- KHOEI, M.; CHEKIN, F. The ultrasound-assisted aqueous extraction of rice bran oil. **Food Chemistry**, v. 194, p. 503-507, 2016.
- KUPSKI, L.; CARVALHO SILVELLO, M. A.; FONTES, M. R. V.; LIMA, T. S.; TREICHEL, H.; BADIALE FURLONG, E. *R. oryzae* Cellulases: A New Approach to Degrading Lignocellulosic Material. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 129-138, 2015.
- LEMOES, M. R. B.; SOUZA-SOARES, L. A. Rice and its byproducts in southern Brazil. **Vetor-Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 10, p. 21-36, 2000.
- LIN, H.; CHEN, W.; DING, H. T.; CHEN, X. J.; ZHOU, Q. F.; ZHAO, Y. H. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7556-7562, 2010.
- LIU, L.; WATERS, D. L. E.; ROSE, T. J.; BAO, J.; KING, G. J. Phospholipids in rice: significance in grain quality and health benefits: a review. **Food chemistry**, v. 139, n. 1, p. 1133-1145, 2013.
- MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p.365-373, 2011.

MARCHEZANLL, M. W. E.; DE AVILALL, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1581-1586, 2011.

METCALFE, L. D.; SCHIMTZ, A. A.; PELKE, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.

ODA, Y.; YAJIMA, Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 371-375, 2003.

OLIVEIRA, M. D. S.; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTA–Journal of Food**, v. 8, n. 3, p. 229-236, 2010.

OLIVEIRA, M.; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8335-8338, 2011.

OSHOMA, C. E.; IKENEBOMEH, M. J. Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran. **Pakistan Journal of nutrition**, v. 4, n. 1, p. 32-36, 2005.

PATINO, J. M. R.; CARO, A. L.; NIÑO, M. R. R.; MACKIE, A. R.; GUNNING, A. P.; MORRIS, V. J. Some implications of nanoscience in food dispersion formulations containing phospholipids as emulsifiers. **Food chemistry**, v. 102, n. 2, p. 532-541, 2007.

POULARI, O.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Simultaneous rice bran oil stabilization and extraction using sub-critical water medium. **Journal of Food Engineering**, v. 160, n. 1, p. 259-266, 2009.

POULARI, O.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 1, p. 259-266, 2010.

RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 51, p. 1-52, 2002.

SCHERR, C.; GAGLIARDI, A. C. M.; MINAME, M. H.; SANTOS, R. D. Fatty Acid and Cholesterol Concentrations in Usually Consumed Fish in Brazil. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 104, n. 2, p. 152-158, 2015.

SCHMIDT, C. G.; BADIALE-FURLONG, E. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 36-41, 2012.

SCHMIDT, C. G.; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; FURLONG, E. B. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rhizopus oryzae*. **Food chemistry**, v. 146, p. 371-377, 2014.

SILVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Lipid content and fatty acid profile of defatted rice bran and wheat bran submitted to solid state fermentation by *Aspergillus oryzae*. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (Brazil)**, v. 28, n. 1, p. 133-140, 2010.

WATANABE, M.; MAKINO, M.; KAKU, N.; KOYAMA, M.; NAKAMURA, K.; SASANO, K. Fermentative L-(+)-lactic acid production from non-sterilized rice washing drainage containing rice bran by a newly isolated lactic acid bacteria without any additions of nutrients. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 115, n. 4, p. 449-452, 2013.

ARTIGO 2. EXTRAÇÃO DE γ -ORIZANOL DO FARELO DE ARROZ: EFEITO DO
TAMANHO DE PARTÍCULA

RESUMO

A redução do tamanho da amostra pode facilitar a extração de compostos fitoquímicos. Neste trabalho foi avaliado o efeito do tamanho das partículas do farelo de arroz integral no rendimento de extração do composto γ -orizanol e suas características. A extração do γ -orizanol foi realizada com solventes hexano e isopropanol e quantificação por método espectrofotométrico. Os extratos de γ -orizanol foram caracterizados em relação aos seus componentes majoritários em CLAE-UV e a capacidade antioxidante verificada pelo consumo do radical livre DPPH[•]. O rendimento do γ -orizanol variou de 0,10 a 1,54 mg/g de farelo, sendo o maior rendimento obtido em partículas menores que 0,39 mm. A presença dos componentes majoritários do γ -orizanol (cicloartenil ferulato, 2,4-metileno cicloartenil ferulato, campesteril ferulato, β -sitosteril ferulato) nos extratos foi confirmada e verificada diferenças nos perfis destes componentes em função dos diferentes tamanhos de partícula. O extrato de γ -orizanol obtido das partículas com tamanhos entre 0,73 e 1,67 mm demonstrou maior inibição específica do radical DPPH (6,7%) e CI_{50} de 6,63 μ g/mL. Quando o tamanho da partícula é reduzido, a superfície de acesso para o solvente de extração é aumentada resultando na maior extração de γ -orizanol, no entanto o extrato das partículas maiores foi mais eficiente como antioxidante.

Palavras-chave: Antioxidante. CLAE-UV. Fitoquímico. Inibição. Rendimento de extração.

1 INTRODUÇÃO

A grande quantidade de coprodutos, gerados nas agroindústrias, despertam o interesse em explorá-los para a obtenção de fitoquímicos e antioxidantes, sendo de extrema importância a utilização dos coprodutos das agroindústrias de forma eficiente, para agregar valor a estes, e diminuir o impacto ambiental. O interesse por alimentos naturais tem demandado pesquisas para identificação de antioxidantes naturais com foco em sua extração.

Na cadeia produtiva do arroz (*Oryza sativa*), um dos cereais mais produzidos e consumidos pela população mundial, encontra-se uma quantidade elevada de coprodutos. Cada 100 kg de arroz em casca geram cerca de 5 a 10 kg de farelo, o qual tem utilização convencional para alimentação animal e extração de óleo (BURLANDO; CORNARA, 2014).

No entanto, o farelo de arroz é uma fonte rica em óleo, que devido à sua fração insaponificável com antioxidantes como γ -orizanol, confere ao óleo de arroz uma maior resistência à oxidação e à deterioração. O γ -orizanol, um exemplo de composto natural e antioxidante, que pode ser extraído do farelo de arroz, é uma mistura de ésteres do ácido ferúlico e exerce funções na redução do colesterol (CICERO; GADDI, 2001), sendo anticancerígeno (YASUKAWA et al., 1998), anti-inflamatório (ISLAM et al., 2008), antidiabético (SON et al., 2011) e antioxidante (WINKLER-MOSER et al., 2012).

O potencial antioxidante do γ -orizanol é devido à habilidade de doação do hidrogênio do grupo fenólico do ácido ferúlico (NYSTROM et al., 2005). Ácido ferúlico esterificado com esteróis de plantas, como é o caso do γ -orizanol, aumenta o potencial antioxidante promovendo acesso molecular a componentes hidrofóbicos, pois o potencial antioxidante aumenta com a extensão da hidroxilação dos anéis aromáticos (GRAF, 1992).

A eficiência dos processos de extração sólido/líquido é afetada por parâmetros críticos de processamento, tais como a temperatura, natureza do solvente, a estrutura de matriz sólida (principalmente tamanho de partícula) e tempo de extração (FRANCO et al., 2007).

Os antioxidantes são responsáveis pela inibição e redução de radicais livres nas células (LIOCHEV, 2013), e para isso são necessárias algumas características para ser considerado um bom antioxidante, como possuir substituintes doadores de hidrogênio ou elétrons ao radical, em função de seu potencial de redução; ter a capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura e a de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e ter acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília (MANACH et al., 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o rendimento de extração do γ -orizanol nos diferentes tamanhos de partículas do farelo de arroz integral e caracterizar os extratos em relação ao perfil dos componentes majoritários e suas propriedades antioxidantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O farelo de arroz integral (FAI) foi obtido de indústria de processamento de arroz na região Sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

O padrão de 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) foi adquirido da Sigma Aldrich, USA e o padrão de γ -orizanol da Wako Chemicals, USA (pureza >98%).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ INTEGRAL (FAI)

Para obtenção dos diferentes tamanhos de partículas do farelo de arroz, o mesmo foi classificado em peneiras com tamanhos de aberturas 0,73 mm, 0,50 mm, 0,39 mm e

menores que 0,39 mm, respectivamente. Uma peneira com abertura de 1,67 mm foi acoplada acima das demais peneiras para reter partículas maiores que 1,67 mm.

2.3 EXTRAÇÃO DE γ -ORIZANOL

A extração do γ -orizanol foi realizada, em farelo de arroz nas diferentes frações granulométricas, a partir de 10 g da amostra e adição de 50 mL de água destilada, seguido da adição de 2 g de ácido ascórbico. A mistura foi agitada em vortex e incubada em banho maria a 40 °C por 40 min. A seguir, foram adicionados 75 mL da mistura dos solventes hexano e isopropanol na proporção 1:3 e agitado em vortex por 30 s, centrifugado por 15 min a 3200 \times g. Após, foram separadas as camadas orgânicas em um funil de separação. Os precipitados foram re-extraídos com mais 10 mL da mistura dos solventes hexano e isopropanol na proporção 1:3 e o processo, a partir da agitação em vortex, foi repetido (HEIDTMANN-BEMVENUTI; NORA; BADIALE-FURLONG, 2012). As fases orgânicas foram combinadas e transferidas para secagem em cápsulas de porcelana em estufa a 60 °C, e o extrato contendo o γ -orizanol pesado, para avaliar a sua massa.

Para quantificação do γ -orizanol, foi realizada diluição do extrato em isopropanol e leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 326 nm (LILITCHAN et al., 2008), empregando curva de calibração com concentrações padrão de γ -orizanol entre 3 e 20 μ g/mL.

2.3.1 Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol

A confirmação dos componentes majoritários do γ -orizanol foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) utilizando-se o padrão do γ -orizanol (30 μ g/mL) e os extratos do farelo de arroz (30 μ g/mL), diluídos em isopropanol, nas mesmas condições de Paucar-Menacho et al. (2007). A eluição dos componentes da mistura foi realizada com acetonitrila:metanol:isopropanol 50:45:5 (v/v/v) com fluxo de 1,0 mL/min, usando como fase estacionária a coluna C18 (10 μ m) 250 x 4,6 mm e a detecção foi realizada em comprimento de onda de 315 nm. Os quatro picos majoritários correspondem, respectivamente, ao cicloartenil ferulato, 2,4-metileno cicloartenil ferulato, campesteril ferulato e β -sitosteril ferulato.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante dos extratos de γ -orizanol obtidos do farelo de arroz em diferentes tamanhos de partículas (3 frações granulométricas) foram verificadas pelos métodos de captura do radical livre DPPH \cdot , no qual o consumo do radical livre DPPH \cdot pelos extratos de γ -orizanol foi determinado a partir do decréscimo da unidade de absorvância. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 515 nm. Aos tubos contendo 3,0 mL da solução metanólica de DPPH ($5,2 \cdot 10^{-5}$ mol/L) foram adicionados 0,5 mL de metanol (controle) e 0,5 mL dos antioxidantes: extratos de γ -orizanol (5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$) e padrão de γ -orizanol (5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$), para obter as concentrações utilizadas os extratos e o padrão foram diluídos em isopropanol. A mistura reativa permaneceu em temperatura ambiente, sem a incidência de luz e a mudança de cor violeta para amarela foi medida após 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 min de reação (HERRERO et al., 2005). A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição específica (IE) (% inibição/ $\mu\text{g}_{\text{orizanol}}$) e foi calculada conforme Equação 2, através da razão entre o percentual de inibição de oxidação do radical (I) calculado pela Equação 1 e a concentração do γ -orizanol.

$$I = [(Abs_{DPPH} - Abs_{Ext}) / Abs_{DPPH}] * 100 \quad (1)$$

Em que Abs_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH (controle) e Abs_{Ext} é a absorvância da solução de DPPH com os extratos de γ -orizanol.

$$IE = I / \text{Concentração do } \gamma\text{-orizanol} \quad (2)$$

Os valores de CI_{50} , definida como a concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH \cdot para os extratos de γ -orizanol, foram calculados a partir da equação da reta. Para determinar a equação da reta (Equação 3) as absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos foram plotadas no eixo Y e diluição dos extratos de γ -orizanol ($\mu\text{g/mL}$) no eixo X.

$$y = -ax + b \quad (3)$$

Onde y é a absorvância inicial do controle dividido por 2, e x é a CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

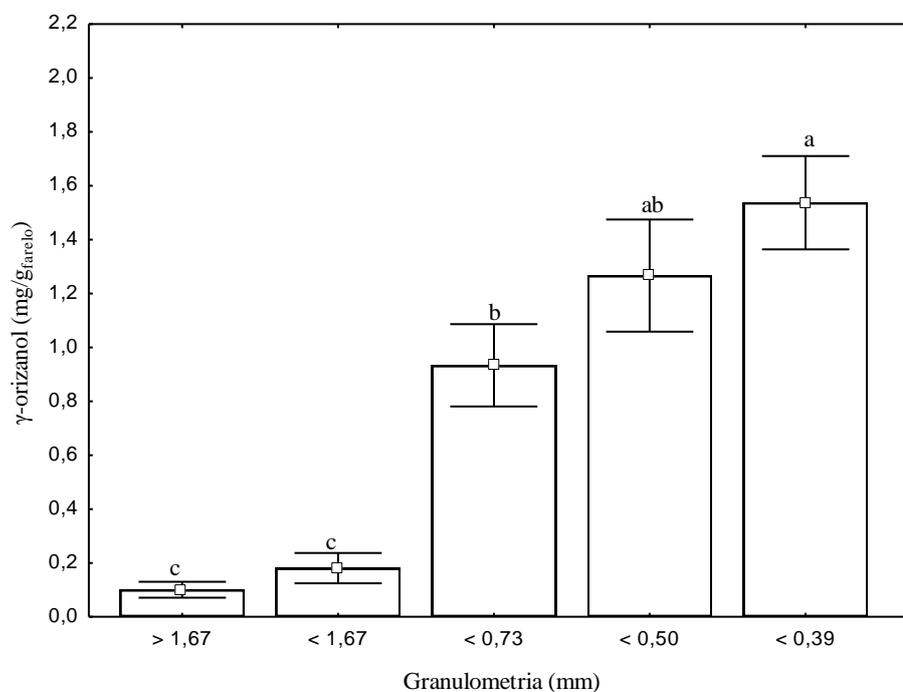
Para avaliar as significâncias das diferenças das variáveis dependentes (γ -orizanol, componentes majoritários do γ -orizanol e atividades antioxidantes) promovidas pelas diferentes granulometrias do farelo de arroz e tempo de reação (variáveis independentes) foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de diferenças de médias Tukey, utilizando o Software *Statistica* 6.0. Diferenças com um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foram consideradas significativas, e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 γ -ORIZANOL

O rendimento de γ -orizanol do farelo de arroz nas diferentes granulometrias variou de 0,10 a 1,54 mg/g de farelo (Figura 1).

Figura 1 - Rendimento de γ -orizanol nas diferentes frações granulométricas



O maior rendimento na extração do γ -orizanol foi obtido na fração do farelo de arroz contendo partículas com granulometria inferior a 0,39 mm e nas frações com partículas de tamanho entre 0,73 e 1,67 mm obtiveram-se as menores quantidades. O aumento do rendimento de γ -orizanol com a diminuição da granulometria está de acordo com Pinelo et al. (2007) e Wanyo, Meeso e Siriamornpun (2014), os quais mostraram que ao reduzir o tamanho da amostra pode-se aumentar a extração de certos compostos bioativos. O rendimento de $1,54 \text{ mg}_{\text{orizanol}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ verificado na fração granulometria inferior a 0,39 mm foi semelhante ao rendimento obtido no estudo de Xu e Godber (2000), no qual foi avaliada a eficiência de extração de γ -orizanol a partir de farelo de arroz e o melhor resultado para rendimento foi de $1,68 \text{ mg}_{\text{orizanol}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ e concentração de $11,8 \text{ mg}_{\text{orizanol}}/\text{g}_{\text{extrato}}$.

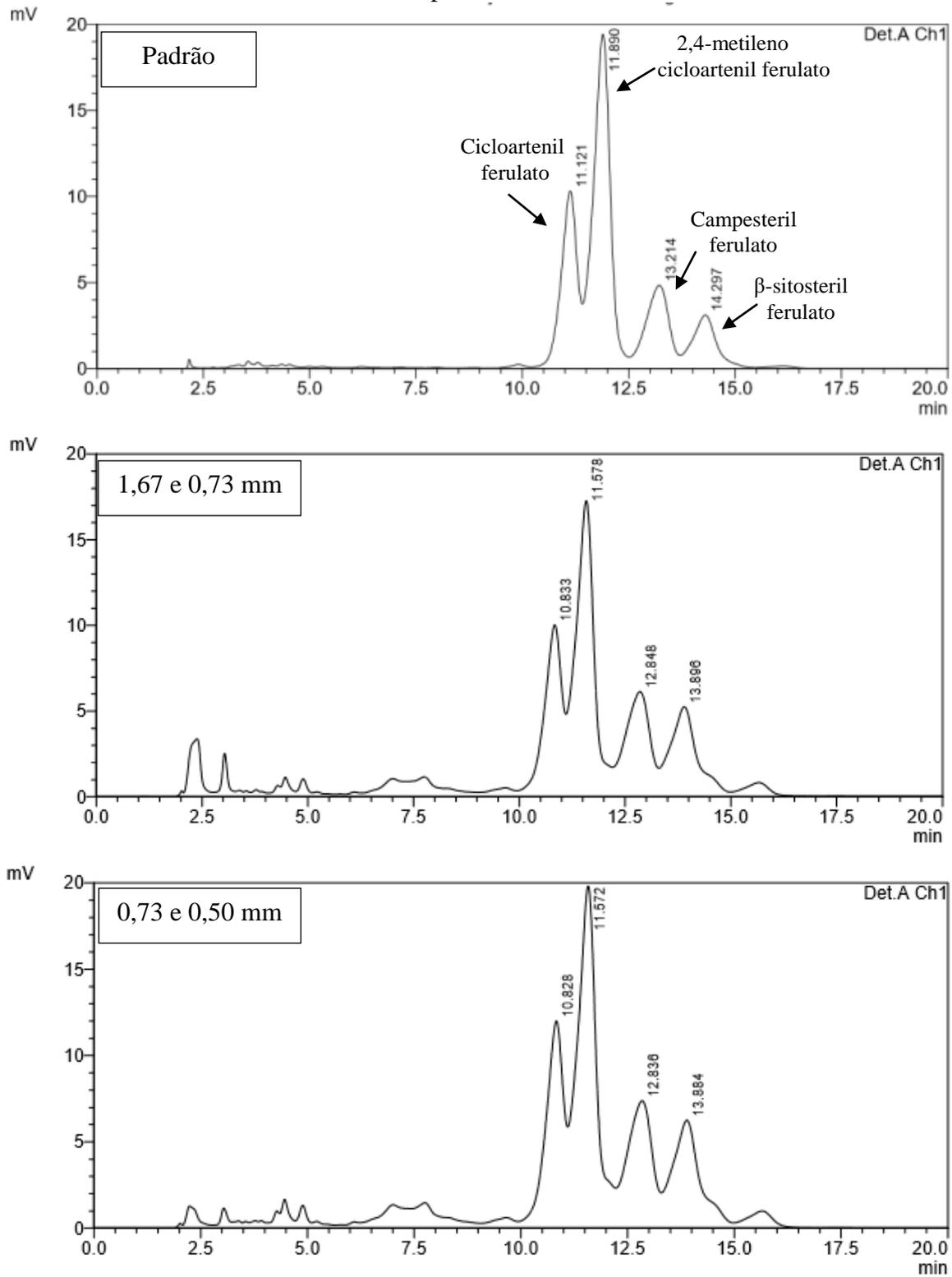
O aumento do rendimento de extração do γ -orizanol com a diminuição da granulometria da partícula pode estar associado ao fato de que a superfície de acesso é aumentada e, conseqüentemente, o acesso do solvente de extração também, resultando na maior extração de γ -orizanol. A difusão da superfície do sólido é relatada como sendo uma das principais etapas limitantes na extração sólido/líquido (VANDENBURG et al., 1997), sendo que a resistência à difusão intrapartícula é geralmente menor para partículas menores, devido o seu caminho de difusão ser mais curto. Portanto, esses fatores contribuíram para melhor eficiência de extração do γ -orizanol nas frações de partículas menores.

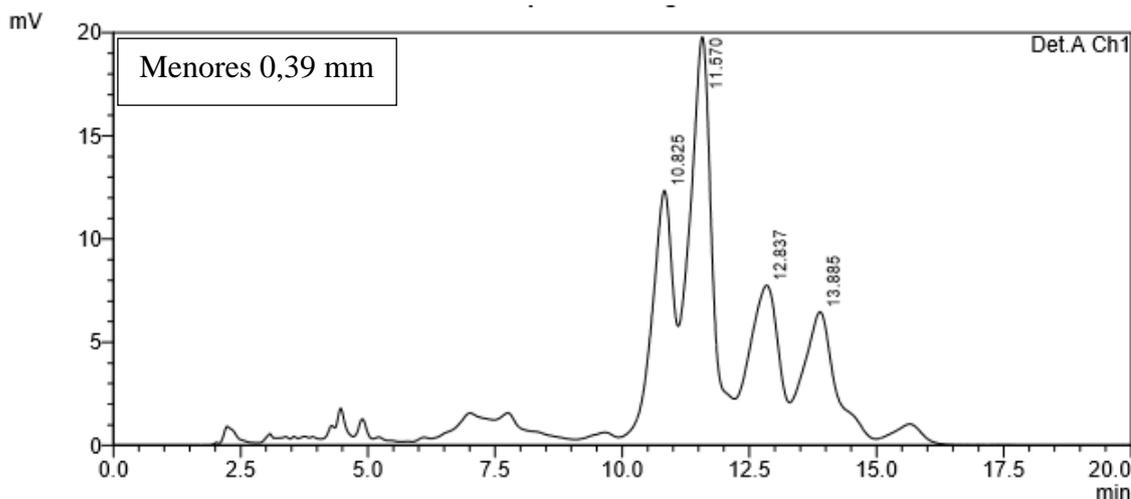
3.1.1 Perfil dos componentes majoritários

Os componentes majoritários do γ -orizanol foram avaliados nos diferentes tamanhos de partículas e pode-se verificar que estão presentes nos extratos de todas as amostras com os mesmos tempos de retenção do padrão (Figura 2).

Os quatro picos majoritários correspondem, respectivamente, ao cicloartenil ferulato, 2,4-metileno cicloartenil ferulato, campesteril ferulato e β -sitosteril ferulato. O composto 2,4-metileno cicloartenil ferulato foi predominante nas amostras, e segundo Goufo e Trindade (2014) o composto 2,4-metileno cicloartenil ferulato representa de 34% a 44% da composição do γ -orizanol, seguido do cicloartenil ferulato (19%-26%), campesteril ferulato (15%-23%), β -sitosteril ferulato (7%-17%), e estigmasteril ferulato (1%-7%).

Figura 2 - Cromatograma do γ -orizanol padrão e dos extratos dos diferentes tamanhos de partículas





Além da confirmação da presença dos componentes majoritários nos extratos de γ -orizanol, também foi avaliado o perfil destes componentes (Tabela 1) nas amostras obtidas nas diferentes frações granulométricas do farelo de arroz.

Tabela 1 - Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol nas frações granulométricas do farelo de arroz

Tamanhos de partículas (mm)	Cicloartenil ferulato (%)	2,4-metileno cicloartenil ferulato (%)	Campesteril ferulato (%)	β -sitosteril ferulato (%)
Entre 1,67 e 0,73	$19,8 \pm 0,2^c$	$44,5 \pm 0,4^a$	$19,6 \pm 0,2^b$	$16,2 \pm 0,5^a$
Entre 0,73 e 0,50	$20,3 \pm 0,1^b$	$43,0 \pm 0,6^b$	$19,8 \pm 0,2^b$	$16,9 \pm 1,0^a$
Menores de 0,39	$20,8 \pm 0,0^a$	$42,3 \pm 0,2^b$	$21,0 \pm 0,1^a$	$15,9 \pm 0,2^a$

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Dos 4 componentes majoritários do γ -orizanol avaliados nos extratos, o 2,4-metileno cicloartenil ferulato apresentou-se em maior quantidade (42,3% à 44,5%), seguido do campesteril ferulato (19,6% à 21,0%), cicloartenil ferulato (19,8% à 20,8%) e β -sitosteril ferulato (15,9% à 16,2%). Os compostos do γ -orizanol, cicloartenil ferulato, 2,4-metileno cicloartenil ferulato e campesteril ferulato, apresentaram diferença significativa nas diferentes frações granulométricas. Nas partículas com tamanho entre 1,67 mm e 0,73 mm o composto 2,4-metileno cicloartenil ferulato foi encontrado em um percentual de 5,2% maior que à fração de partículas menores que 0,39 mm, e os compostos cicloartenil ferulato e

campesteril ferulato 5,1% e 7,1%, estavam respectivamente, menores em relação à fração de partículas menores que 0,39 mm.

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), de coloração púrpura, pelo antioxidante. O DPPH[•] é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela (HERRERO et al., 2005). Esse método apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e, conseqüentemente, os processos oxidativos ocorrem na fração lipídica (LIMA, 2008). As concentrações dos extratos e padrões para determinação da atividade antioxidante foram baseadas na literatura e em testes prévios, nos quais foi avaliada a capacidade de atuação do antioxidante em concentrações crescentes.

Os resultados de inibição do radical livre DPPH estão apresentados (Tabela 2) como percentual de inibição específica, pois foram utilizadas concentrações diferentes do γ -orizanol, sendo da fração com partículas de tamanho entre 1,67 e 0,73 mm 5 $\mu\text{g/mL}$ e as demais 25 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2 – Percentual de inibição específica (% inibição/ $\mu\text{g}_{\text{orizanol}}$) do radical livre DPPH no período de 0 a 180 min

Tamanho de partícula (mm)	Tempo (min)								
	0	15	30	45	60	90	120	150	180
Entre 1,67 e 0,73	6,7 ^a	5,5 ^a	6,7 ^a	6,6 ^a	6,4 ^a	6,3 ^a	6,1 ^a	6,1 ^a	6,0 ^a
Entre 0,73 e 0,50	2,0 ^a	2,0 ^a	2,0 ^a	2,1 ^a	2,0 ^a	2,0 ^a	2,0 ^a	2,0 ^a	2,0 ^a
Menores 0,39	0,9 ^a	0,9 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	0,9 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a
Padrão	0,3 ^b	0,4 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a	0,2 ^c	0,3 ^b	0,3 ^{bc}	0,3 ^{bc}	0,3 ^{bc}

Os valores estão demonstrados como média (n=3). Letras sobrescritas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p>0,05$)

Todos os extratos do γ -orizanol apresentaram uma capacidade de sequestrar o radical DPPH[•] maior que o padrão de γ -orizanol. O extrato bruto foi mais eficaz do que o padrão como antioxidante, pois nele estão presentes outras formas químicas que atuam sinergicamente na captura do radical livre. As pesquisas estão focadas na identificação de

compostos com atividade antioxidante provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, para serem empregados como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e para limitar o uso dos antioxidantes e agentes conservadores sintéticos (HEMEDA; KLEIN, 1990; OLIVEIRA et al., 2007).

Os extratos de γ -orizanol provenientes das menores frações granulométricas do farelo de arroz apresentaram as menores atividades antioxidantes específicas (entre 0,9% e 2,0%), pois por proporcionar uma área de superfície maior as suas paredes celulares sofreram maior dano estrutural durante o brunimento (JENG et al., 2013), promovendo a oxidação de compostos fenólicos.

A quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CI_{50}) é uma informação importante para posterior aplicação do antioxidante e está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – CI_{50} dos extratos de γ -orizanol das diferentes frações granulométricas

Frações granulométricas	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Entre 1,67 e 0,73	6,63
Entre 0,73 e 0,50	21,69
Menores 0,39	36,63
Padrão	79,67

CI_{50} = concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH*

A CI_{50} do extrato da fração com partículas de tamanho entre 1,67 e 0,73 mm (6,63 $\mu\text{g/mL}$) foi 5,5 vezes menor em relação à fração com partículas menores que 0,39 mm (36,63 $\mu\text{g/mL}$). O valor de CI_{50} do extrato da fração com partículas de tamanho entre 1,67 e 0,73 mm (6,63 $\mu\text{g/mL}$) foi inferior ao encontrado no estudo de Heidtmann-Bemvenuti (2014), aonde o CI_{50} foi de 29 $\mu\text{g/mL}$, empregando o extrato obtido da fração granulométrica inferior que 0,73 mm do farelo de arroz.

O excelente resultado antioxidante apresentado pelo extrato obtido das partículas de maior granulometria pode estar relacionado ao fato do composto antioxidante não ter sido submetido a condições drásticas de brunimento e aumento consequente de temperatura. Também a presença de casca de arroz nessa fração, a qual possui um mecanismo antioxidante de defesa próprio para proteger o grão de arroz do estresse oxidativo (RAMARATHNAM et al., 1988).

Alguns estudos demonstram que a atividade antioxidante do γ -orizanol é influenciada pela sua composição, assim a maior atividade do extrato da fração com partículas de tamanho entre 1,67 e 0,73 mm pode ser atribuída ao perfil dos componentes majoritários, pois o componente 2,4-metileno cicloartenil ferulato apresentou-se em quantidade cerca de 5% maior nessa fração. Xu, Hua e Godber (2001) avaliaram o poder dos componentes do γ -orizanol sobre a oxidação do colesterol, encontrando maior efetividade de inibição para o 2,4-metileno cicloartenil ferulato quando comparado ao cicloartenil ferulato e campesteril ferulato. No estudo de Yagi e Ohishi (1979) a oxidação do ácido linoléico sob irradiação UV foi mais efetivamente inibida pelo 2,4-metileno cicloartenil ferulato e campestril ferulato do que pelo cicloartenil ferulato.

4 CONCLUSÃO

A separação granulométrica das frações do farelo de arroz promoveu aumento no rendimento e alteração no perfil do γ -orizanol. Fração granulométrica inferior que 0,39 mm propiciou maior rendimento de extração do γ -orizanol (1,54 mg/g) e alterações no perfil dos componentes majoritários. O extrato obtido da fração com partículas de tamanho entre 1,67 e 0,73 mm continha 2,4-metileno cicloartenil ferulato em 5,2% maior em relação ao extrato da fração granulométrica inferior que 0,39 mm. Este também foi o mais eficiente na atividade antioxidante, com uma inibição específica estimada para inibição do radical DPPH de 6,7% e um CI_{50} de 6,63 μ g/mL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURLANDO, B.; CORNARA, L. Therapeutic properties of rice constituents and derivatives (*Oryza sativa* L.): A review update. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 1, p. 82-98, 2014.
- CICERO, A. F. G.; GADDI, A. Rice Bran Oil and γ -oryzanol in the Treatment of Hyperlipoproteinaemias and Other. **Month**, v. 15, n. 4, p. 277-289, 2001.
- FRANCO, D.; PINELO, M.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J. Processing of *Rosa rubiginosa*: Extraction of oil and antioxidant substances. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 18, p. 3506-3512, 2007.
- GOUFO, P.; TRINDADE, H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 75-104, 2014.

GRAF, E. Antioxidant Potential of ferulic acid. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 13, p. 345-448, 1992.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; NORA, N. S.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of gamma-oryzanol from rice bran. *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 36, n. 6, p. 665-673, 2012.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. **Inibição de linhagens do complexo *Fusarium graminearum* por compostos naturais e sintéticos**. 2014. 177 f. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p.184-185, 1990.

HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.; SEÑORÁNS, F.J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p.417-423, 2005.

ISLAM, M. S.; MURATA, T.; FUJISAWA, M.; NAGASAKA, R.; USHIO, H.; BARI, A. M.; OZAKI, H. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 4, p. 812-824, 2008.

JENG, T. L.; LAI, C. C.; KAO, J. L.; WU, M. T.; SUNG, J. M. Particle size and temperature effects on antioxidant by-product isolated from leaf gum extract of *Mesona procumbens* Hemsl. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 1, p. 10-15, 2013.

LILITCHAN, S.; TANGPRAWAT, C.; ARYUSUK, K.; KRISNANGKURA, S.; CHOKMOH, S.; KRISNANGKURA, K. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran. **Food Chemistry**, v.106, n.2, p.752-759, 2008.

LIMA A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*caryocar brasiliense*, camb.)**. 2008. 181 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

NYSTROM, L.; MAKINEN, M.; LAMPI, A. M.; PIIRONEN, V. Antioxidant activity of steryl ferulate extracts from rye and wheat bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2503-2510, 2005.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALEFURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 267-275, 2007.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; SILVA, L. H.; SOUZA, S. A. A.; GONÇALVES, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ -oryzanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 45-53, 2007.

PINELO, M.; RUIZ-RODRIGUEZ, A.; SINEIRO, J.; SENORANS, F. J.; REGLERO, G.; NUNEZ, M. J. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: A comparative study. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 1-2, p. 199-205, 2007.

RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; NAMIKI, M.; KAWAKISHI, S. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 1. Isolation, fractionation, and partial characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 732-737, 1988.

SON, M. J.; RICO, C. W.; NAM, S. H.; KANG, M. Y. Effect of Oryzanol and Ferulic Acid on the Glucose Metabolism of Mice Fed with a High-Fat Diet. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. H7-H10, 2011.

VANDENBURG, H.; CLIFFORD, A.; BARTLE, K.; GARDEN, L.; DEAN, J.; COSTLEY, C. Analytical extraction of additives from polymers. **Analyst**, v. 122, n. 9, p. 101R-116R, 1997.

WANYO, P.; MEESO, N.; SIRIAMORNPNUN, S. Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk. **Food Chemistry**, v. 157, p. 457-463, 2014.

WINKLER-MOSER, J. K.; RENNICK, K. A.; PALMQUIST, D. A.; BERHOW, M. A.; VAUGHN, S. F. Comparison of the impact of γ -oryzanol and corn steryl ferulates on the polymerization of soybean oil during frying. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 243-252, 2012.

XU, Z.; GODBER, S. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 5, p. 547-551, 2000.

XU, Z.; HUA, N.; GODBER, J. S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2, 2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 2077-2081, 2001.

YAGI, K.; OHISHI, N. Action of ferulic acid and its derivatives as antioxidants. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 25, n. 2, p. 127-130, 1979.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KIMURA, Y.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 10, p. 1072-1076, 1998.

ARTIGO 3. CULTIVO DE *Rhizopus oryzae* EM FARELO DE ARROZ E SEU EFEITO NO
CONTEÚDO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO γ -ORIZANOL

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do cultivo em estado sólido com *Rhizopus oryzae* em farelo de arroz integral no conteúdo do γ -orizanol e sua atividade antioxidante. O γ -orizanol foi extraído com solventes orgânicos e seus extratos caracterizados em relação aos seus ácidos graxos, os quais foram identificados em CG-DIC e seus componentes majoritários em CLAE-UV. A capacidade antioxidante dos extratos foi verificada pelo consumo do radical livre DPPH[•], capacidade de captura do radical ABTS^{•+}, inibição da reação de auto-oxidação do β -caroteno e redução de oxidação em sistema lipídico. Com o processo de cultivo a concentração do γ -orizanol aumentou em 51,5% em 48 h de cultivo (20,52 mg/g), com aumento dos ácidos graxos poli-insaturados em 5,7%. A presença dos componentes majoritários do γ -orizanol (cicloartenil ferulato, 2,4-metileno cicloartenil ferulato, campesteril ferulato, β -sitosteril ferulato) nos extratos foi confirmada bem como a alteração no perfil destes componentes. O extrato de γ -orizanol obtido da biomassa fúngica de 72 h demonstrou a maior inibição do radical DPPH (59,0%), e o extrato de 96 h inibiu em 90,5% a oxidação em sistema de emulsão β -caroteno/ácido linoleico e reduziu em 30% os indicadores químicos de oxidação no azeite de oliva. Com isso, o processo de cultivo propicia, além do aumento no conteúdo de γ -orizanol, melhorias nas propriedades funcionais do farelo, podendo ser aplicado na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Biomassa. Cultivo em estado sólido. Oxidação. 2,4-metileno cicloartenil ferulato.

1 INTRODUÇÃO

A procura dos consumidores por alimentos naturais tem limitado a utilização de métodos tradicionais para controlar a degradação oxidativa a partir de radicais livres, tais como antioxidantes sintéticos (MOO-HUCHIN et al., 2015), demandando pesquisas para identificação de novos antioxidantes que sejam seguros e provenientes de fontes naturais, reduzindo assim componentes sintéticos nos alimentos por meio da associação ou até mesmo a sua substituição (SCHMITH et al., 2014; SUKHONTHARA; KAEWKA; THEERAKULKAIT, 2016).

Dentre os compostos fenólicos estão os ácidos fenólicos, que podem se apresentar da forma livre ou ligada (SOARES, 2002). Um exemplo desse composto presente no farelo de arroz é o γ -orizanol, uma mistura de ésteres do ácido ferúlico com esteróis ou álcoois triterpênicos de plantas (SIRIPAIOJ; KAEWCHADA; JAREE, 2014), o qual exerce uma variedade de efeitos biológicos (ISLAM et al., 2008; SON et al., 2011). Além disso, esta mistura de compostos mostrou-se promissora para o desenvolvimento de alimentos funcionais e para estabilizar óleos e gorduras (LERMA-GARCIA et al., 2009).

No entanto, a maioria dos compostos fenólicos com atividade antioxidante em plantas se encontram ligados de forma covalente a um polímero insolúvel (NIWA; MIYACHI, 1986), sendo necessário um tratamento eficaz para liberar esses compostos. Dentre estes tratamentos podem ser usados, processos físicos (WANYO; MESSO; SIRIAMORNUN, 2014) ou biológicos, sendo o cultivo em estado sólido amplamente utilizado como forma de disponibilizar compostos funcionais (SCHMIDT et al., 2014), empregando principalmente fungos filamentosos não toxigênicos, especialmente os do gênero *Rhizopus*, por produzirem proteínas altamente digeríveis e nenhuma substância tóxica (OLIVEIRA et al., 2010).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do cultivo em estado sólido do *Rhizopus oryzae* em farelo de arroz integral sobre a disponibilidade de γ -orizanol e seu perfil em componentes majoritários e ácidos graxos, bem como suas propriedades antioxidantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O farelo de arroz integral (FAI) foi obtido de indústria beneficiadora de arroz situada no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. As cepas de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foram adquiridas do Banco de Culturas da Fundação Tropical André Tosello, Campinas, Brasil. O padrão de ésteres metílicos (Supelco® 37 Component FAME Mix) foi adquirido da Sigma Aldrich, USA e o padrão de γ -orizanol foi obtido da Wako Chemicals, USA (pureza > 98%).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ INTEGRAL (FAI)

A padronização da granulometria das partículas do farelo de arroz para utilização no cultivo foi realizada conforme trabalho anterior (Dados não publicados). A composição proximal foi determinada segundo a AOAC (2000): umidade (n° 934.01), cinzas (n° 900.02), proteínas (n° 955.04C; fator de conversão 5,75), lipídios (n° 920.85) e fibra bruta (n° 962.09). Os percentuais de carboidratos foram estimados por diferença.

2.3 CULTIVO DE *Rhizopus oryzae*

As cepas de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foram mantidas em meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) a 4 °C e os esporos foram propagados em uma emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %), e novamente inoculados em meio BDA durante 7 dias a 30 °C até a esporulação, para posterior utilização no cultivo.

A suspensão de esporos para o cultivo foi obtida a partir da adição de emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %) na cultura do fungo e liberação dos esporos por raspagem com alça Drigalski. A concentração dos esporos foi estimada por enumeração em câmara de Neubauer.

O FAI foi utilizado como substrato, cuja granulometria foi padronizada em partículas menores que 0,39 mm - 40%; 0,50 e 0,73 mm - 25% cada e 1,67mm - 10%, após distribuído em uma camada de 2 cm de espessura em reatores de bandeja ($12,5 \times 12,5 \times 5 \text{ cm}^3$) e esterilizado. A massa de 100 g de farelo foi utilizada como base para o cálculo da quantidade de solução nutriente, água estéril e solução de esporos que foram adicionados. A solução nutriente (2 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de MgSO_4 e 1,8 g/L de NH_2CONH_2 em HCl 0,4 N) foi adicionada na proporção de 45 mL de solução para 100 g de substrato, e a suspensão de esporos na concentração inicial de 4×10^6 esporos/g de farelo. A umidade do meio foi ajustada para aproximadamente 50% com adição de água estéril. Os reatores foram cobertos com gaze estéril, para permitir a aeração, e mantidos em câmara de cultivo a 30 °C durante 120 h. Para o ponto controle (tempo 0 h), o FAI foi esterilizado e recebeu adição das soluções nutriente e de esporos e armazenado imediatamente a -18 °C. As demais amostras de biomassa foram retiradas em intervalos de 24 h até completar 120 h de cultivo e mantidas a -18 °C para posteriores extrações (OLIVEIRA et al., 2010).

2.4 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS

As biomassas fúngicas coletadas ao longo do cultivo e antes do início do processo de cultivo foram submetidas à extração de lipídios segundo o método de Folch, Lees e Stanley (1957) com adaptações, onde foi adicionado 1 mL de KCl 0,88% em 1 g da amostra e homogeneizado, após foi agitada em banho ultrassônico por 5 min com 10 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1) e centrifugada por 15 min. O sobrenadante foi separado e o processo de extração foi repetido mais 2 vezes. Os sobrenadantes foram filtrados, e

transferidos para um funil de separação. Foram adicionados 20 mL de KCl 0,88% seguido por agitação manual. A fase inferior foi coletada e homogeneizada com 10 mL da solução de clorofórmio:metanol (2:1) por duas vezes. A fase orgânica separada foi filtrada em sulfato de sódio anidro e submetida à evaporação do solvente. O resíduo foi pesado para quantificar o conteúdo de lipídios.

2.5 EXTRAÇÃO DE γ -ORIZANOL

A extração do γ -orizanol foi realizada nas biomassas em todos os tempos de cultivo (0, 24, 48, 72, 96 e 120 h), a partir da amostra (10 g), suspensa em água destilada (50 mL) seguido da adição de ácido ascórbico (2 g). A mistura foi então agitada em vortex e incubada em banho maria a 40 °C por 40 min. Foram adicionados solventes hexano e isopropanol na proporção 1:3 (75 mL) e agitado em vortex por 30 s, centrifugado por 15 min a 3200 \times g. Após, foram separadas as camadas orgânicas em um funil de separação. Os precipitados foram re-extraídos com os solventes hexano e isopropanol na proporção 1:3 (10 mL) e o processo a partir da agitação em vortex foi repetido (HEIDTMANN-BEMVENUTI; NORA; BADIALE-FURLONG, 2012). As fases orgânicas foram combinadas e transferidas para secagem em cápsulas de porcelana em estufa a 60 °C e o extrato contendo o γ -orizanol pesado para quantificar o seu conteúdo e posteriormente calcular a concentração de γ -orizanol.

Para quantificação γ -orizanol, foi realizada diluição do extrato em isopropanol e leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 326 nm (LILITCHAN et al., 2008), empregando curva de calibração com concentrações padrão de γ -orizanol entre 3 e 20 μ g/mL, o qual foi diluído em isopropanol.

2.5.1 Caracterização do γ -orizanol

2.5.1.1 Perfil de ácidos graxos

Os extratos de γ -orizanol obtidos das biomassas e controle (0 h) foram caracterizados em relação à composição dos ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os extratos de γ -orizanol foram esterificados pelo método adaptado de Metcalfe, Schimtz e Pelke (1966), com adição de KOH 0,5 M em metanol nos extratos e catalisados pela solução de

trifluoreto de boro diluída em metanol, e logo, o solvente evaporado. As amostras foram solubilizadas em diclorometano para injeção no cromatógrafo.

Para separar e quantificar a mistura de ácidos graxos esterificados, foi empregado Cromatógrafo a gás (Shimadzu 2010 Plus), equipado com injetor split/splitless, coluna capilar RTX[®]-1 (30 m x 0,25 mmID x 0,25 μ m) e detector por ionização de chama (DIC). O gás de arraste foi hélio em uma vazão de 1,25 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 260 °C, sendo o volume injetado de 1 μ L. As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 50 °C, elevando-se para 200 °C, em uma taxa de 6 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 4 min. Na segunda rampa de temperatura a taxa de aumento foi de 2 °C/min até 240 °C, permanecendo por 10 min. A comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos foi usada para identificação do perfil de ácidos graxos das amostras e quantificados pela normalização das áreas.

2.5.1.2 Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol

A confirmação dos componentes majoritários nos extratos do γ -orizanol foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) utilizando-se o padrão do γ -orizanol (30 μ g/mL) e os extratos de γ -orizanol das biomassas (30 μ g/mL) nas mesmas condições de Paucar-Menacho et al. (2007). A eluição dos componentes da mistura foi realizada com acetonitrila:metanol:isopropanol 50:45:5 (v/v/v) com fluxo de 1,0 mL/min, usando como fase estacionária a coluna C18 (10 μ m) 250 x 4,6 mm e a detecção foi realizada em comprimento de onda de 315 nm. Os quatro picos majoritários correspondem, respectivamente, ao cicloartenil ferulato, 2,4-metileno cicloartenil ferulato, campesteril ferulato e β -sitosteril ferulato.

2.6 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

As capacidades antioxidantes dos extratos de γ -orizanol obtidos das biomassas em diferentes tempos de cultivo (0, 24, 48, 72, 96 e 120 h) foram verificadas pelos métodos de captura do radical livre DPPH[•], captura do radical livre ABTS^{•+}, sistema β -caroteno/ácido linoleico e determinação da estabilidade oxidativa. Para obter as concentrações do γ -orizanol utilizadas nos ensaios antioxidantes os extratos e padrão foram diluídos em isopropanol.

2.6.1 Captura do radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

O consumo do radical livre DPPH[•] pelos extratos de γ -orizanol foi determinado a partir do decréscimo da unidade de absorvância. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 515 nm. Aos tubos contendo 3,0 mL da solução metanólica de DPPH ($5,2 \cdot 10^{-5}$ mol/L) foram adicionados 0,5 mL de metanol (controle) e 0,5 mL dos antioxidantes: extratos de γ -orizanol (5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$) e padrão de γ -orizanol (5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$). A mistura reativa permaneceu em temperatura ambiente, sem a incidência de luz e a mudança de cor violeta para amarela foi medida após 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 min de reação (HERRERO et al., 2005). A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical (I) e calculado pela Equação 1:

$$I = [(Abs_{DPPH} - Abs_{Ext}) / Abs_{DPPH}] * 100 \quad (1)$$

Onde Abs_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH (controle) e Abs_{Ext} é a absorvância da amostra em solução.

Os valores de CI_{50} , definida como a concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH[•] para os extratos de γ -orizanol, foram calculados a partir da equação da reta. Para determinar a equação da reta (Equação 2) as absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos foram plotadas no eixo Y e diluição dos extratos de γ -orizanol ($\mu\text{g/mL}$) no eixo X.

$$y = -ax + b \quad (2)$$

Onde y é a absorvância inicial do controle dividido por 2, e x é a CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

2.6.2 Captura do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

A capacidade de captura do radical catiônico ABTS^{•+} pelos extratos foi realizada de acordo com Rufino et al. (2007). O radical ABTS^{•+} foi gerado pela oxidação do ABTS 7 mM com o persulfato de potássio 2,45 mM, após repouso de 16 h no escuro, à temperatura

ambiente. A solução contendo o radical foi diluída em etanol, até obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm. Em 3 mL de solução diluída de ABTS^{•+} foram adicionados 30 μ L dos antioxidantes extratos de γ -orizanol (35 μ g/mL), e padrão de γ -orizanol (35 μ g/mL). As medidas de absorvância foram realizadas a 734 nm após 6 min de reação. Os valores foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) como $\text{mmol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, usando uma curva de calibração de Trolox (0,1 a 2 μ mol/mL).

2.6.3 Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada em meio emulsionado, através da técnica de co-oxidação de substratos, segundo Marco (1968) e modificada por Miller (1971). Para o preparo da mistura reativa, foram adicionados 27 μ L de ácido linoleico, 0,1 mL de Tween 80, 1 mL de solução clorofórmica de β -caroteno a 5 mg/mL. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio em evaporador rotatório à 50 °C. A esta mistura isenta de clorofórmio foram adicionados 50 mL de água deionizada, e agitada vigorosamente, para formar uma emulsão. A mistura reativa, assim preparada, apresentou-se límpida com absorvância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Paralelamente, foi realizado um controle utilizando 27 μ L de ácido linoléico, 0,1 mL de Tween 80 e 50 mL de água deionizada. Para as reações, foram adicionados 5 mL da emulsão em tubos de ensaio contendo 0,5 mL dos extratos de γ -orizanol (25 μ g/mL) ou 0,5 mL do antioxidante sintético Butil-hidroxi-anisol (BHA) (200 μ g/mL) e a absorvância medida a 470 nm no tempo zero, e em intervalos de 15 min até completar 120 min. Em cada tempo de leitura foram verificadas a absorvância da amostra e do controle. A redução da absorvância das amostras (Abs_{am}) foi correlacionada com a queda do controle (Abs_{c}), obtendo-se a porcentagem de inibição de oxidação (% IO) através da Equação 3.

$$\% \text{ IO} = [1 - (\text{Abs}_{\text{c}}^{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{c}}^{\text{final}} / \text{Abs}_{\text{am}}^{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{am}}^{\text{final}})] * 100 \quad (3)$$

2.6.4 Determinação da estabilidade oxidativa

A estabilidade do azeite de oliva adicionado do extrato de γ -orizanol foi avaliada pelo emprego da luz ultravioleta (UV) em comprimento de onda de 324 nm (UVA) para promover a oxidação acelerada. Em placas de Petri foram adicionados 5 g de azeite de oliva e

1 mL do extrato de γ -orizanol na concentração 20 $\mu\text{g/mL}$ e nas amostras controle 1 mL de isopropanol. As misturas foram homogeneizadas e expostas à luz UV à temperatura ambiente por 10 h, sendo realizado a cada 2 h o índice de peróxidos (IP) conforme AOAC nº 965.33 (2000) com valores expressos em miliequivalente de peróxidos por kilograma de azeite ($\text{meq}_{\text{peróxidos}}/\text{kg}_{\text{amostra}}$) e valor *p*-anisidina (VA), segundo Esteves, Gonçalves e Barrera-Arellano (1995) pela leitura da absorvância das amostras, em espectrofotômetro em comprimento de onda 350 nm. O valor de oxidação total (TOTOX) foi calculado baseado na Equação 4, onde o valor TOTOX foi correlacionado com a soma de duas vezes o IP e VA (SAMARAM et al., 2014).

$$\text{TOTOX} = 2 * \text{IP} + \text{VA} \quad (4)$$

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar as significâncias das diferenças das variáveis dependentes (γ -orizanol, componentes majoritários do γ -orizanol e atividades antioxidantes) no decorrer do cultivo (variável independente) foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de diferenças de médias Tukey e análise de regressão para avaliar a correlação da atividade antioxidante dos extratos de γ -orizanol com os ácidos graxos insaturados, utilizando o Software *Statistica* 6.0. Diferenças com um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foram consideradas significativas, e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

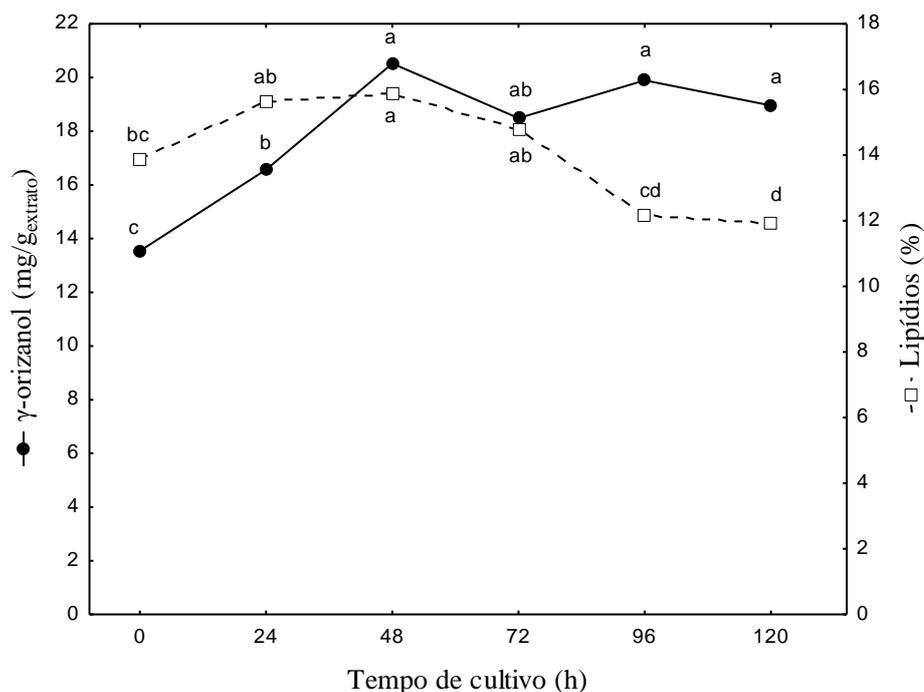
3.1 γ -ORIZANOL

A padronização da granulometria do farelo de arroz utilizado como substrato no cultivo foi baseada em estudos anteriores (Dados não publicados). Com a granulometria padronizada, foram determinados os macrocomponentes umidade 11,2% \pm 0,29, cinzas 10,0% \pm 0,52, fibras 6,5% \pm 4,11, lipídios 17,9% \pm 5,75, proteínas 13,0% \pm 4,29 e carboidratos 41,3% \pm 3,01. Com esta composição o farelo resultante pode ser empregado como substrato para cultivo de *Rizophus oryzae*, pois os macronutrientes são suficientes para a geração de

biomassa fúngica após a complementação com micronutrientes minerais e ajuste de umidade com adição de água estéril.

No decorrer do cultivo foram determinadas as concentrações do composto γ -orizanol e dos lipídios (Figura 1).

Figura 1 - Concentração de γ -orizanol e de lipídios durante cultivo em estado sólido



As enzimas responsáveis pela degradação dos resíduos lignocelulolíticos são principalmente produzidas por fungos, visto que estes micro-organismos possuem dois sistemas enzimáticos extracelulares: um sistema hidrolítico que produz hidrolases, que são capazes de degradar polissacarídeos, e outro sistema ligninolítico oxidativo, que degrada lignina e abre anéis de fenol, aumentando o conteúdo de fenóis livres (SANCHEZ, 2009).

A concentração de γ -orizanol na amostra controle (0 h) foi de 13,54 mg/g, resultado similar ao verificado por Heidtmann-Bemvenuti, Nora e Badiale-Furlong (2012), quando estudaram cinco métodos de extração de γ -orizanol de farelo de arroz e otimizaram o melhor método, obtendo 13,98 mg de γ -orizanol por g de amostra. Ao longo do cultivo com o fungo *Rhizopus oryzae* a concentração de γ -orizanol aumentou em 51,5% em 48 h (20,52 mg/g), quando comparado ao controle (13,54 mg/g). Também houve aumento de lipídios em 14,7%. Para o melhor rendimento de extração de γ -orizanol é interessante que o farelo contenha elevado conteúdo lipídico, pois é onde há maior teor do composto γ -orizanol (PESTANA-BAUER et al., 2012).

O fungo *Rhizopus oryzae* durante o seu desenvolvimento produz uma variedade de enzimas (MARTINS et al., 2011) que podem degradar a parede da célula tornando os compostos intracelulares mais acessíveis para extração (LI; SMITH; HOSSAIN, 2006). Como o γ -orizanol é derivado do ácido fenólico, ácido ferúlico esterificado com esteróis de plantas, o aumento do mesmo com o cultivo pode estar associado ao aumento do ácido ferúlico (SCHMIDT et al., 2014).

No estudo de Goufo et al. (2014) o teor de γ -orizanol diminuiu nas frações de moagem do arroz sob elevado CO₂, acompanhado da redução do conteúdo de ácido ferúlico, e os autores relacionaram a diminuição do conteúdo de γ -orizanol devido a redução do ácido ferúlico.

3.1.1 Caracterização do γ -orizanol

3.1.1.1 Perfil dos ácidos graxos

Os extratos de γ -orizanol obtidos da biomassa fúngica foram caracterizados em relação ao perfil de ácidos graxos (Tabela 1).

Dos 37 ácidos graxos analisados, o ácido γ -linolênico (18:3n6) apresentou-se em maior quantidade (41,6% à 44,6%), seguido do ácido linoleico (18:2n6c) (34,2% à 37,4%) e ácido palmítico (16:0) (15,2% à 20,0%). Na amostra controle (0 h) a maior parte dos ácidos graxos foram poli-insaturados (78,8%), seguidos dos saturados (20,3%) e monoinsaturados (0,9%). No intervalo de 96 h de cultivo, os ácidos graxos poli-insaturados aumentaram em 5,8% (83,3%) e os saturados reduziram em 22,3% (15,8%), o que ocasionou aumento da relação dos ácidos graxos poli-insaturados e saturados de 3,9% para 5,3%. Apesar dos ácidos graxos insaturados serem benéficos à saúde, eles também são os mais susceptíveis a oxidação (SOARES, 2002), demandando por ação antioxidante mais intensa do γ -orizanol. Além disso, o aumento dos ácidos graxos insaturados pode contribuir para a atividade antioxidante do extrato, pois foi demonstrado que existe coeficiente de correlação elevado entre ácidos graxos insaturados e atividade antioxidante (TANG et al., 2015).

Tabela 1 - Perfil dos ácidos graxos dos extratos do γ -orizanol das biomassas

Ácidos graxos	Conteúdo de ácidos graxos (%)					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
12:0	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
14:0	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	n.d	n.d
15:0	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
16:0	20,0	16,7	17,1	15,5	15,2	15,8
18:0	n.d	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
23:0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
24:0	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Σ Saturados	20,3	17,3	17,6	16,1	15,8	16,6
14:1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
15:1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
16:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
24:1n9	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8
Σ Monoinsaturados	0,9	0,8	0,9	0,9	0,9	1,0
18:2n6c	34,2	34,4	35,7	36,4	37,4	36,2
18:3n6	41,6	44,6	42,8	43,4	42,8	43,1
18:3n3	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5
20:2	<0,1	n.d	n.d	<0,1	<0,1	<0,1
20:3n6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
20:3n3	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7
20:4n6	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8
20:5n3	n.d	n.d	n.d	<0,1	0,1	<0,1
22:02	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
22:6n3	n.d	n.d	n.d	<0,1	<0,1	<0,1
Σ Poli-insaturados	78,8	81,9	81,5	82,9	83,3	82,4
P/S	3,9	4,7	4,6	5,1	5,3	5,0

Σ = somatório, P/S = relação dos ácidos graxos poli-insaturados e saturados

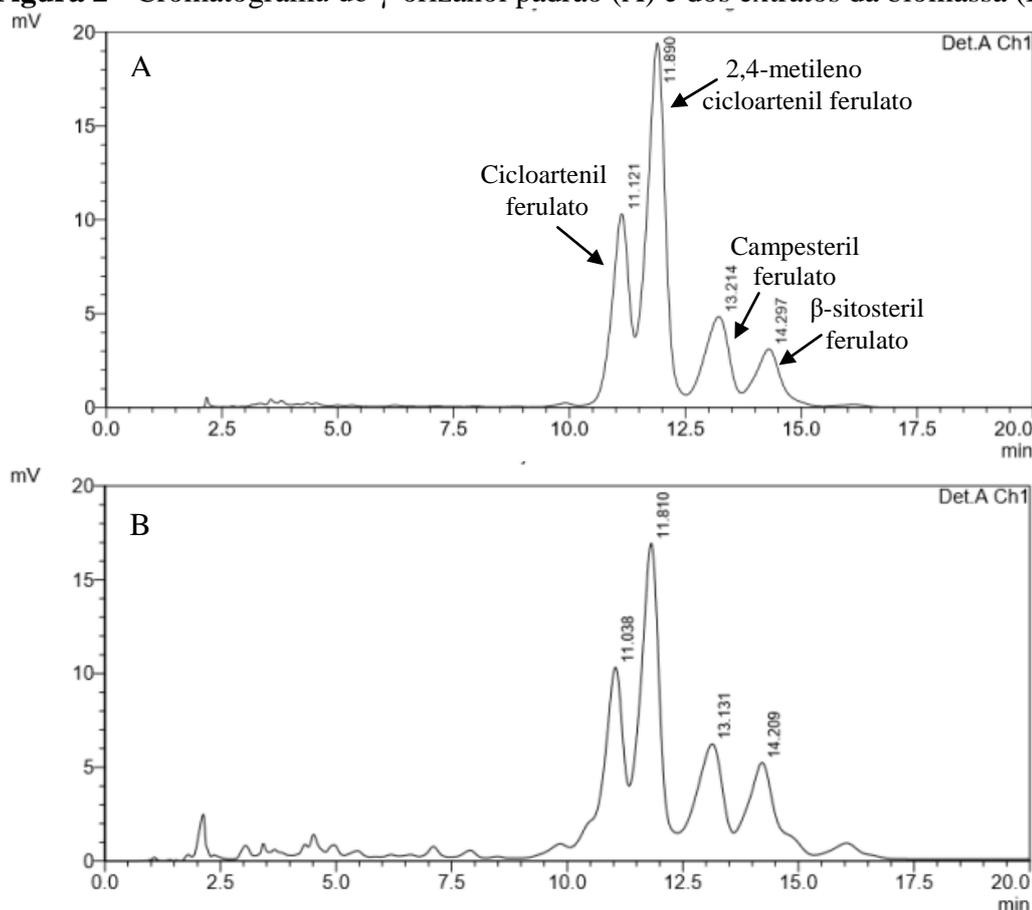
3.1.1.2 Perfil dos componentes majoritários

Os componentes majoritários do γ -orizanol foram avaliados em todos os tempos de cultivo (Figura 2B) e pode-se verificar que estão presentes em todas as amostras com os

mesmos tempos de retenção do padrão (Figura 2A), confirmando que os componentes do γ -orizanol estão presentes nos extratos obtidos das biomassas.

Os quatro sinais cromatográficos majoritários correspondem, respectivamente, ao cicloartenil ferulato (11,12 min), 2,4-metileno cicloartenil ferulato (11,89 min), campesteril ferulato (13,21 min) e β -sitosteril ferulato (14,29 min). Pode-se verificar que o composto 2,4-metileno cicloartenil ferulato foi predominante nas amostras. Esses resultados estão de acordo com a literatura, a qual menciona que dos 25 componentes de γ -orizanol encontrados, cinco deles representam cerca de 95% do conteúdo total de γ -orizanol. Sendo predominante o 2,4-metileno cicloartenil ferulato (34%-44%), seguido do cicloartenil ferulato (19%-26%), campesteril ferulato (15%-23%), β -sitosteril ferulato (7%-17%), e estigmasteril ferulato (1%-7%) (GOUFO; TRINDADE, 2014).

Figura 2 - Cromatograma do γ -orizanol padrão (A) e dos extratos da biomassa (B)



Além da confirmação da presença dos componentes majoritários nos extratos de γ -orizanol, também foi avaliado a alteração do perfil destes componentes durante o cultivo fúngico (Tabela 2).

Tabela 2 - Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol durante o cultivo

Tempos de cultivo (h)	Cicloartenil	2,4-metileno	Campesteril	β -sitosteril
	ferulato (%)	cicloartenil ferulato (%)	ferulato (%)	ferulato (%)
0	19,2 \pm 0,1 ^b	45,1 + 0,1 ^b	21,1 + 0,1 ^a	14,6 + 0,3 ^c
24	18,0 + 0,2 ^c	45,9 + 0,2 ^a	21,4 + 0,0 ^a	14,8 + 0,1 ^c
48	17,8 + 0,1 ^c	45,9 + 0,1 ^a	21,3 + 0,0 ^a	15,2 + 0,0 ^{bc}
72	18,1 + 0,4 ^c	45,5 + 0,3 ^{ab}	21,3 + 0,0 ^a	15,2 + 0,1 ^{bc}
96	20,2 + 0,1 ^a	43,6 + 0,0 ^c	20,7 + 0,2 ^b	15,5 + 0,3 ^b
120	20,2 \pm 0,2 ^a	43,5 + 0,2 ^c	20,1 + 0,0 ^c	16,3 + 0,0 ^a

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

O perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol foi alterado durante o cultivo, apresentando aumento significativo dos compostos 2,4-metileno cicloartenil ferulato nos tempos 24 e 48 h e cicloartenil ferulato e β -sitosteril ferulato a partir de 96 h, com produção de 11,6% do componente β -sitosteril ferulato no final do cultivo. Estudos demonstram que o composto 2,4-metileno cicloartenil ferulato reduz os riscos de câncer e colesterol (KIM et al., 2015a; KIM et al., 2015b), e junto com cicloartenil ferulato exercem função antioxidante, enquanto o campesteril ferulato e β -sitosteril ferulato agem na diminuição da síntese do colesterol (BERGER et al., 2005).

3.2 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

3.2.1 DPPH e ABTS

O efeito do cultivo, nas atividades antioxidantes dos extratos de γ -orizanol, foi verificado através do % de inibição do radical DPPH^{*}, atividade antioxidante equivalente ao Trolox e concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH^{*} (Tabela 3), comparativamente ao padrão de γ -orizanol.

Tabela 3 – Efeito do cultivo nas atividades antioxidantes dos extratos de γ -orizanol

Antioxidante	Tempo cultivo (h)	DPPH (% inibição)	TEAC (mmol_{Trolox}/g_{extrato})	CI₅₀ (μg/mL)
γ -orizanol	0	43,8 ^b	3,26 ^a	24,21 ^{ab}
	24	54,6 ^{ab}	3,24 ^a	20,92 ^b
	48	55,2 ^{ab}	3,19 ^b	19,46 ^b
	72	59,0 ^a	3,19 ^b	19,20 ^b
	96	55,5 ^{ab}	3,14 ^b	20,14 ^b
	120	48,9 ^{ab}	3,19 ^b	22,75 ^b
Padrão de γ -orizanol		6,8 ^c	2,96 ^c	79,67 ^a

Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

TEAC= atividade antioxidante equivalente ao Trolox, CI₅₀= concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH*

O extrato γ -orizanol obtido da biomassa de 72 h apresentou elevada atividade antioxidante (59,0%), sendo esta 88,5% mais eficaz que o padrão de γ -orizanol (6,8%). Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que o extrato γ -orizanol contém outras formas químicas e estas atuam sinergicamente na captura do radical livre. Devido a isso, alguns autores sugerem o uso de extratos brutos para proteção contra a oxidação em matrizes alimentícias (DE ABREU; RODRIGUEZ; CRUZ, 2012; NASCIMENTO et al., 2015).

A estimativa da quantidade de extrato γ -orizanol necessário para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH (CI₅₀) demonstrou que o extrato mais eficaz foi o obtido da biomassa produzida em 72 h, sendo necessário 20,7% a menos de γ -orizanol em comparação com o extrato γ -orizanol controle (0 h). Estes valores de CI₅₀ foram inferiores ao encontrado no estudo de Heidtmann-Bemvenuti (2014), cujo CI₅₀ foi de 29 μ g/mL, proveniente de granulometria padronizada pelo autor que diferia do nosso estudo.

Dentre os extratos de γ -orizanol obtidos das biomassas todos apresentaram valores de mmol_{Trolox}/g_{extrato} cerca de 10% maiores que o γ -orizanol padrão. A inativação do radical ABTS^{•+} é mais sensível do que o radical DPPH[•], enquanto que este último envolve transferência de hidrogênio, a reação com o radical ABTS^{•+} está relacionada à transferência de elétrons (TUBA; GÜILÇIN, 2008). Desta forma, constatou-se que os compostos bioativos presentes no extrato γ -orizanol são eficientes para sequestrar radicais livres, tanto pela doação de hidrogênio, como a de elétrons.

Os ácidos graxos insaturados comprovadamente atuam como antioxidantes, sendo proporcional ao seu grau de instauração (RICHARD et al., 2008; VILLA-RODRIGUEZ et al. 2011). Em vista disto, uma análise de regressão foi realizada para correlacionar a atividade antioxidante dos extratos de γ -orizanol das biomassas coletadas em vários intervalos de cultivo, considerando que havia diferenças no perfil dos ácidos graxos deles (Tabela 4).

Tabela 4 – Coeficiente de correlação de Pearson (r) e probabilidade (p) da regressão linear entre ácidos graxos insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados e atividades antioxidantes avaliadas pelo DPPH e ABTS

Ácidos Graxos	DPPH		ABTS	
	R	p	r	p
Insaturados	0,78	0,0673	-0,82	0,0455
Monoinsaturados	0,29	0,5821	-0,21	0,6899
Poli-insaturados	0,80	0,0589	-0,82	0,0479

Valores de $p < 0,05$ há diferença estatística

A maior correlação positiva foi verificada para atividade antioxidante DPPH com os ácidos graxos poli-insaturados, o que também foi verificado no estudo de Villa Rodriguez et al. (2011), no qual também identificaram essa relação entre grau de insaturação e atividade antioxidante.

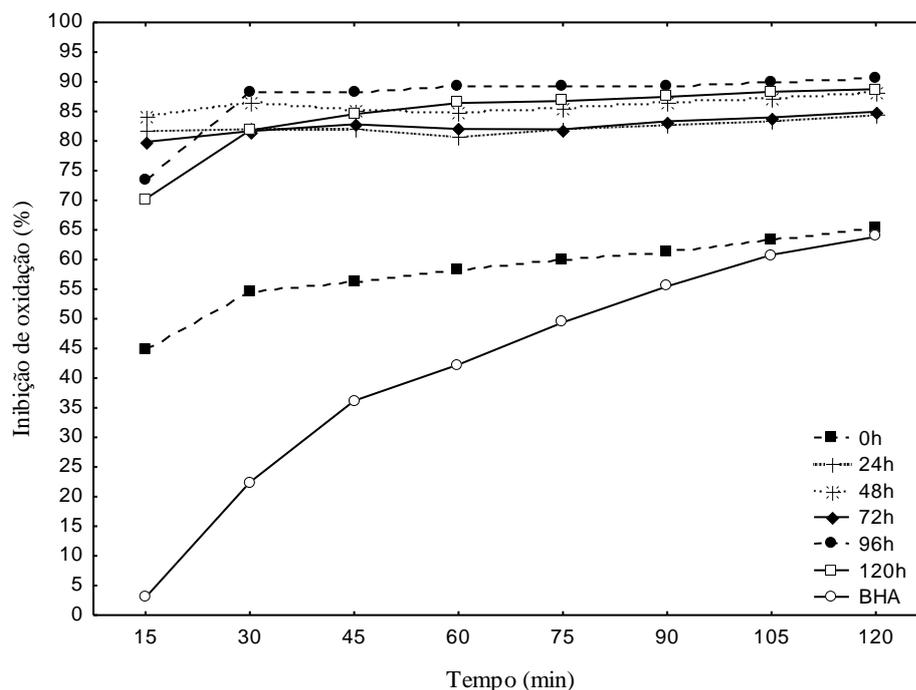
Para o ensaio ABTS a correlação foi negativa, provavelmente devido às diferenças nos mecanismos da reação, onde o ensaio ABTS baseia-se na transferência de elétrons e o DPPH envolve transferência de hidrogênio (TUBA; GÜILÇIN, 2008).

3.2.2 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Os extratos γ -orizanol obtidos de cultivo a partir de 24 h apresentaram inibição de oxidação acima de 70% (Figura 3).

O γ -orizanol recuperado da biomassa cultivada por 96 h apresentou 38,6% de inibição maior em relação ao controle (0 h) e 41,7% quando comparado ao antioxidante sintético BHA. Foi escolhido o BHA para a comparação, por ser um dos antioxidantes sintéticos amplamente empregado pela indústria alimentícia brasileira na concentração máxima permitida pela legislação, a qual o Ministério da Saúde limita 200 mg/kg (ANVISA, 2010).

Figura 3 - Cinética de inibição de oxidação dos extratos de γ -orizanol (25 $\mu\text{g/mL}$) obtidos das biomassas e do antioxidante BHA (200 $\mu\text{g/mL}$) pelo método de β -caroteno/ácido linoleico



A inibição de oxidação promovida pelos extratos de γ -orizanol obtidos das biomassas de 48, 96 e 120 h foram maiores em relação aos outros, e a explicação pode ser a composição, pois esses extratos apresentaram aumento de β -sitosteril ferulato em 4,1%, 6,2% e 11,6%, respectivamente. O estudo de Yagi e Ohishi (1979) demonstrou que a oxidação do ácido linoleico sob irradiação UV foi mais efetivamente inibida pelo 2,4-metileno cicloartenil ferulato e campestril ferulato do que pelo cicloartenil ferulato.

A inibição da oxidação no sistema de emulsão pelo extrato de γ -orizanol foi similar ao observado por Frankel et al. (1994), que verificaram mais eficiência dos antioxidantes lipofílicos para controlar o processo de oxidação em emulsão do que em óleo. Segundo os autores esses resultados são relacionados à maior interação na interface ar-óleo dos antioxidantes polares e na interface óleo-água dos antioxidantes apolares. Portanto, os excelentes resultados de inibição oxidativa do γ -orizanol obtido das biomassas neste estudo demonstram que o mesmo pode ser utilizado como antioxidante em emulsões.

3.2.3 Determinação da estabilidade oxidativa

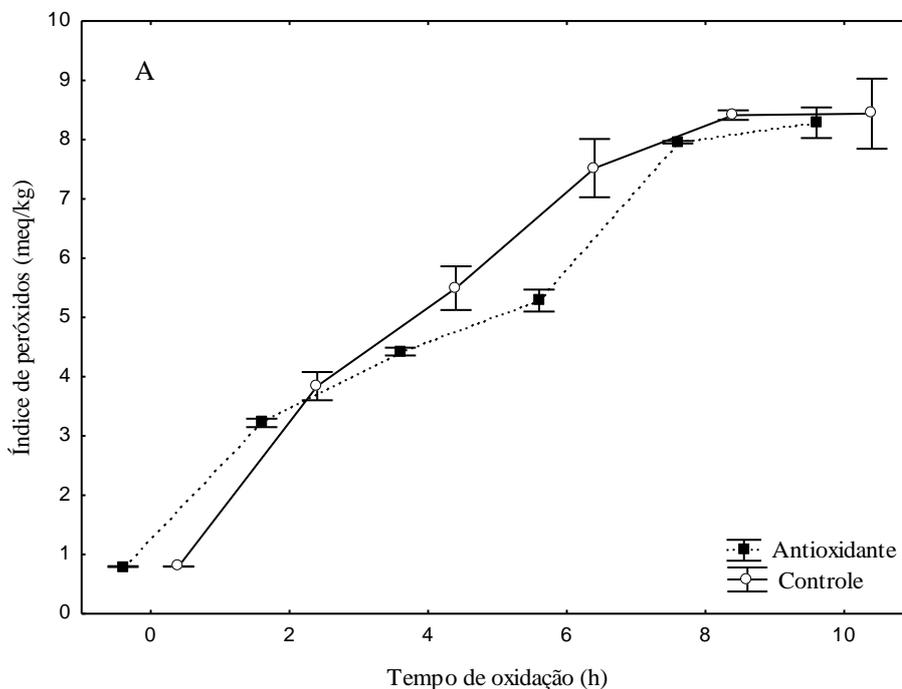
Todos os indicadores químicos de oxidação aumentaram nas amostras de azeite de oliva durante exposição à luz ultravioleta (UV) (Figura 4), demonstrando que a luz UV pode

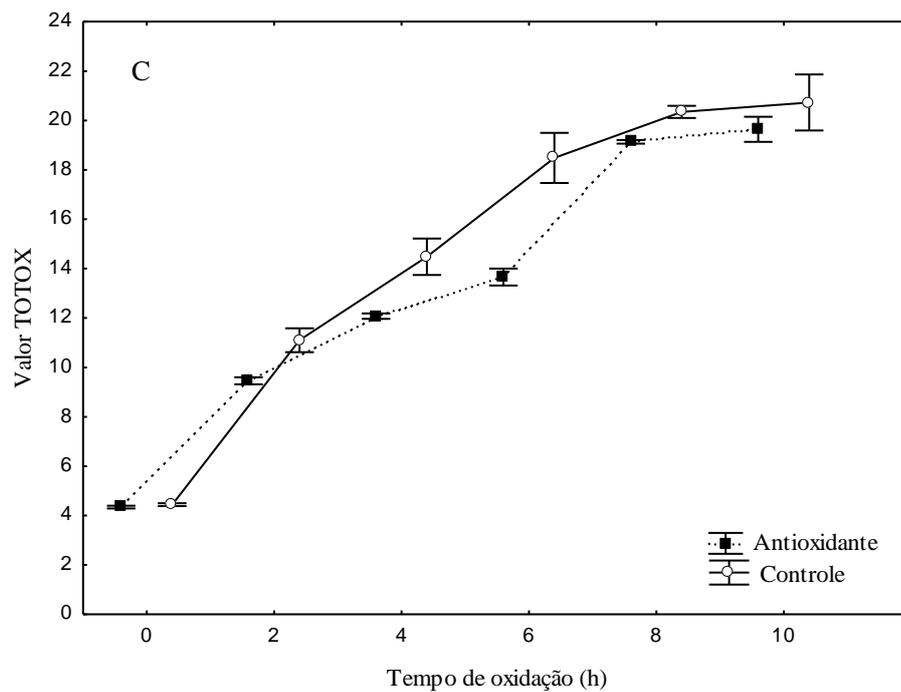
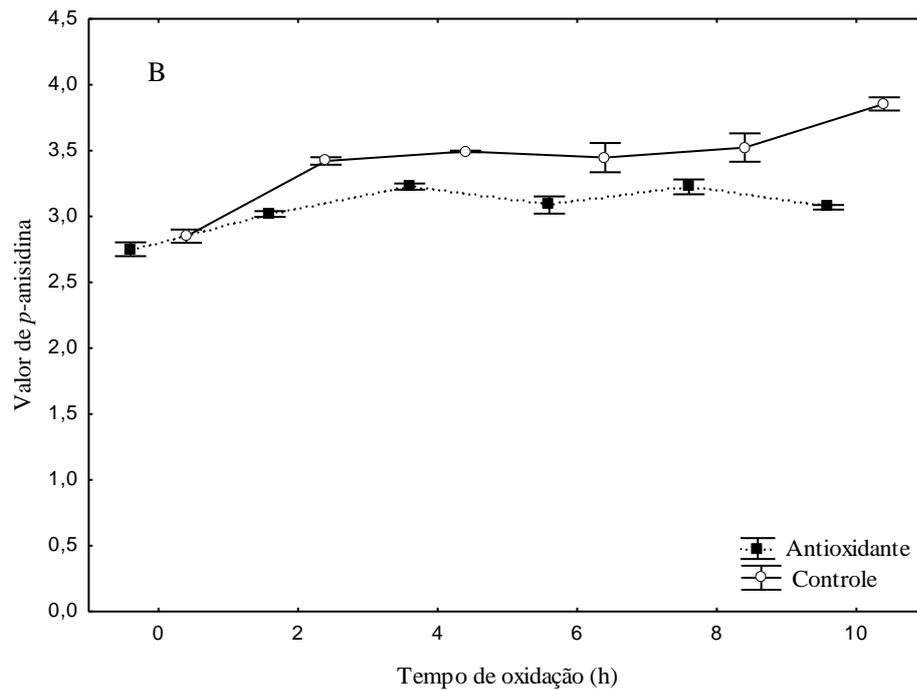
ser utilizada como um método acelerado para determinação da estabilidade oxidativa, o que contribui para prever a vida útil de óleos e gorduras, pois o acompanhamento das alterações ocorridas nestes produtos, nas condições de armazenamento, é lento e pode consumir grande quantidade de reagentes.

O extrato de γ -orizanol obtido da biomassa cultivada por 96 h foi utilizado em experimento que empregou sistema lipídico, pela sua destacada ação inibidora (90,5%) na emulsão β -caroteno/ácido linoleico.

A amostra controle (sem o extrato de γ -orizanol) apresentou o maior índice de peróxidos a partir de 4 h de exposição e valores de p-anisidina significativamente diferentes a partir de 2 h. A determinação da eficácia de um antioxidante corresponde à medida do prolongamento do período de indução pelo antioxidante, ou seja, quanto tempo a mais o lipídio será resistente à oxidação, correspondendo ao fator de proteção do antioxidante ao óleo (ANTONIASSI, 2001).

Figura 4 – Índice de peróxidos (A), valor de p-anisidina (B) e valor TOTOX (C) de azeite de oliva com e sem adição do antioxidante γ -orizanol (20 μ g/mL) durante oxidação acelerada por luz UV





O extrato de γ -orizanol obtido da biomassa atuou na inibição de formação de produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) e conseqüentemente preveniu a formação de produtos secundários da oxidação lipídica (aldeídos).

No estudo de Olmedo, Nepote e Grosso (2014) o óleo essencial de orégano apresentou bons resultados para inibição dos processos de oxidação lipídica em óleo de

girassol e em outro estudo frações de óleo de arroz ricas em γ -orizanol também apresentaram inibição da oxidação em óleo de girassol, avaliada pelo índice de peróxidos (CHIM; ZAMBIAZI; LEITÃO, 2006).

Portanto, os resultados dos valores de índice de peróxidos, p-anisidina e TOTOX indicaram que o extrato de γ -orizanol utilizado no estudo promoveu a estabilidade oxidativa do azeite de oliva, demonstrando o potencial uso do γ -orizanol em azeite de oliva como uma alternativa para substituir os antioxidantes sintéticos.

4 CONCLUSÃO

Processo de cultivo em estado sólido do farelo de arroz resultou em efeitos favoráveis para a recuperação e composição da fração γ -orizanol, demonstrado por um aumento de 51,5% e formação do 2,4-metileno cicloartenil ferulato presente nos extratos da biomassa cultivada por 24 e 48 h e cicloartenil ferulato e β -sitosteril ferulato (96 h). O extrato da biomassa cultivada por 72 h foi o mais eficiente para inibir o DPPH, o de 96 h inibiu em 90,5% a oxidação em sistema de emulsão β -caroteno/ácido linoleico, além disso, atuou na inibição de formação de indicadores químicos de oxidação. Portanto, o cultivo em estado sólido com fungo *Rhizopus oryzae* mostrou-se adequado para o tratamento do farelo de arroz integral no que diz respeito a maior disponibilidade de γ -orizanol e melhorias de suas propriedades antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras, **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Categoria 2 – Óleos e gorduras**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/81e3778042bf6435b798f7a824db78e0/Categoria+2+%C3%93leos+e+gorduras.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 07 de set. 2015, 15:00:00.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.
- BERGER, A.; REIN, D.; SCHAFER, A.; MONNARD, I.; GREMAUD, G.; LAMBELET, P.; BERTOLI, C. Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied γ -oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men. **European Journal of Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 163-173, 2005.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; LEITÃO, A. M. Farelo de arroz: capacidade antioxidante de frações ricas em orizanóis. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 279-288, 2006.

DE ABREU, P.; RODRIGUEZ, K. V.; CRUZ, J. M. Extraction, purification and characterization of an antioxidant extract from barley husks and development of an antioxidant active film for food package. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 13, p. 134-141, 2012.

ESTEVES, W.; GONÇALVES, L. A. G.; BARRERA-ARELLANO, D. **Metodologia padrão alemã para análise de gorduras e outros lipídios**. Campinas:UNICAMP/FEA/Laboratório de Óleos e Gorduras, 1995.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FRANKEL, E. N.; HUANG, S.; KANNER, J.; GERMAN, J. B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 2 p. 1054-1059, 1994.

GOUFO, P.; PEREIRA, J.; FIGUEIREDO, N.; OLIVEIRA, M. B. P.; CARRANCA, C.; ROSA, E. A.; TRINDADE, H. Effect of elevated carbon dioxide (CO₂) on phenolic acids, flavonoids, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol and antioxidant capacities of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 1, p. 15-24, 2014.

GOUFO, P.; TRINDADE, H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 75-104, 2014.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; NORA, N. S.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of gamma-oryzanol from rice bran. *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 36, n. 6, p. 665-673, 2012.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. **Inibição de linhagens do complexo *Fusarium graminearum* por compostos naturais e sintéticos**. 2014. 177 f. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.; SEÑORÁNS, F.J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p.417–423, 2005.

ISLAM, M. S.; MURATA, T.; FUJISAWA, M.; NAGASAKA, R.; USHIO, H.; BARI, A. M.; OZAKI, H. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. **British journal of pharmacology**, v. 154, n. 4, p. 812-824, 2008.

KIM, H. W.; KIM, J. B.; CHO, S. M.; CHO, I. K.; LI, Q. X.; JANG, H. H.; HWANG, K. A. Characterization and quantification of γ -oryzanol in grains of 16 Korean rice varieties. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 2, p. 166-174, 2015a.

KIM, H. W.; LIM, E. J.; JANG, H. H.; CUI, X.; LEE, S. H.; KIM, H. R.; PARK, J. H. 24-Methylenecycloartanyl ferulate, a major compound of γ -oryzanol, promotes parvin-beta expression through an interaction with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 in human breast cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 468, n. 4, p. 574-579, 2015b.

LERMA-GARCIA, M. J.; HERRERO-MARTINEZ, J. M.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; MENDONÇA, C. R.; RAMIS-RAMOS, G. Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 389-404, 2009.

LI, B. B.; SMITH, B.; HOSSAIN, Md M. Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. **Separation and Purification Technology**, v. 48, n. 2, p. 189-196, 2006.

LILITCHAN, S.; TANGPRAWAT, C.; ARYUSUK, K.; KRISNANGKURA, S.; CHOKMOH, S.; KRISNANGKURA, K. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran. **Food Chemistry**, v.106, n.2, p.752-759, 2008.

MARCO, G. A. rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.45, n. 9, p.594-598, 1968.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTINEZ-AVILA, G.; MONTANEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

METCALFE, L. D.; SCHIMTZ, A. A.; PELKE, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.48, n. 2, p.91, 1971.

MOO-HUCHIN, V. M.; MOO-HUCHIN, M. I.; ESTRADA-LEÓN, R. J.; CUEVAS-GLORY, L.; ESTRADA-MOTA, I. A.; ORTIZ-VAZQUEZ, E.; SAURI-DUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food chemistry**, v. 166, p. 17-22, 2015.

NASCIMENTO, R. R. G.; MONTEIRO, J. A.; PIMENTA, A. T. A.; TREVISAN, M. T. S.; BRAZ-FILHO, R.; DE SOUZA, E. B.; LIMA, M. A. S. NOVOS FLAVONOIDES DE *Margaritopsis carrascoana* COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE. **Química Nova**, v. 38, n. 1, p. S1-S14, 2015.

NIWA, Y.; MIYACHI, Y.. Antioxidant action of natural health products and Chinese herbs. **Inflammation**, v. 10, n. 1, p. 79-91, 1986.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L.A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTa - Journal of Food**, v. 8, n. 3, p. 229–236, 2010.

OLMEDO, R.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. **Food chemistry**, v. 156, p. 212-219, 2014.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; SILVA, L. H.; SOUZA, S. A. A.; GONÇALVES, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa L.*) em condições brandas para preservação do γ -orizanól. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 45-53, 2007.

PESTANA-BAUER, V. R.; ZAMBIAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B., BENEITO-CAMBRA, M.; RAMIS-RAMOS, G. γ -oryzanól and tocopherol contents in residues of rice bran oil refining. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1479–1483, 2012.

RICHARD, D.; KEFI, K.; BARBE, U.; BAUSERO, P.; VISIOLI, F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. **Pharmacological Research**, v. 57, n. 6, p. 451-455, 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{·+}. **Comunicado técnico on line da Embrapa**, v. 128, n. 1, p. 1-4, 2007.

SAMARAM, S.; MIRHOSSEINI, H.; PING, T. C.; GHAZALI, H. M.; BORDBAR, S.; SERJOUIE, A. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Oil from Papaya Seed by Response Surface Methodology: Oil Recovery, Radical Scavenging Antioxidant Activity, and Oxidation Stability. **Food Chemistry**, v. 172, p. 7-17, 2014.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SCHMIDT, C. G.; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; FURLONG, E. B. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 146, p. 371-377, 2014.

SIRIPAHOJ, W.; KAEWCHADA, A.; JAREE, A. Synthesis of molecularly imprinted polymers for the separation of gamma-oryzanól by using methacrylic acid as functional monomer. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 2, p. 338-346, 2014.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SON, M. J.; RICO, C. W.; NAM, S. H.; KANG, M. Y. Effect of Oryzanól and Ferulic Acid on the Glucose Metabolism of Mice Fed with a High-Fat Diet. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. H7-H10, 2011.

SUKHONTHARA, S.; KAEWKA, K.; THEERAKULKAIT, C. Inhibitory effect of rice bran extracts and its phenolic compounds on polyphenol oxidase activity and browning in potato and apple puree. **Food chemistry**, v. 190, p. 922-927, 2016.

TANG, Y.; LI, X.; CHEN, P. X.; ZHANG, B.; HERNANDEZ, M.; ZHANG, H.; TSAO, R. Characterisation of fatty acid, carotenoid, tocopherol/tocotrienol compositions and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. **Food Chemistry**, v. 174, p. 502-508, 2015.

TUBA, A.; GÜİLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico. Biological Interactions*, v. 174, n.1, p.27-37, 2008.

VILLA-RODRIGUEZ, J. A.; MOLINA-CORRAL, F. J.; AYALA-ZAVALA, J. F.; OLIVAS, G. I.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1231-1237, 2011.

WANYO, P.; MEESO, N.; SIRIAMORNUN, S. Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk. **Food Chemistry**, v. 157, p. 457-463, 2014.

YAGI, K.; OHISHI, N. Action of ferulic acid and its derivatives as antioxidants. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 25, n. 2, p. 127-130, 1979.

CAPÍTULO IV

5 CONCLUSÃO

O processo de cultivo em estado sólido de *Rhizopus oryzae* em farelo de arroz integral promoveu um aumento na ordem de 17,3% nos lipídios totais e 29% nos fosfolipídios nas primeiras 12 h, os quais foram reduzindo com a continuidade do cultivo. Os ácidos graxos saturados reduziram em 6,2% e os insaturados aumentaram em 13%, com redução do oleico (15,5%) e aumento do linolelaídico (11,9%) na biomassa cultivada por 84 h. Neste mesmo intervalo os ácidos graxos essenciais ($\omega 6$ e $\omega 3$) aumentaram em 13,3%. O fósforo inorgânico aumentou a partir de 12 h de cultivo e atingiu conteúdo maior que o orgânico com 36 h, com 70% de fósforo inorgânico no final do cultivo.

A fração granulométrica de farelo de arroz com partículas menores que 0,39 mm propiciou maior rendimento de extração de γ -orizanol, obtendo-se 1,54 mg/g. No entanto, os extratos de γ -orizanol provenientes das menores frações granulométricas do farelo de arroz (menores que 0,73 mm) apresentaram a menor atividade antioxidante específica (entre 0,9% e 2,0%) e o extrato da fração de partículas com tamanhos entre 1,67 e 073 mm foi mais eficaz na inibição do radical DPPH (6,7%), com CI_{50} de 6,63 $\mu\text{g/mL}$.

O cultivo fúngico resultou em efeitos favoráveis para a recuperação e composição do γ -orizanol. A maior concentração de γ -orizanol (20,52 mg/g) foi obtida na biomassa de 48 h, além disso o cultivo promoveu alterações no perfil dos ácidos graxos e dos componentes majoritários, com aumento dos ácidos graxos poli-insaturados e formação do componente 2,4-metileno cicloartenil ferulato nos tempos 24 e 48 h e cicloartenil ferulato e β -sitosteril ferulato a partir de 96 h com produção de 11,6% do componente β -sitosteril ferulato no final do cultivo. O extrato da biomassa de 72 h foi o mais eficiente com inibição de 59% do radical DPPH e CI_{50} de 19,20 $\mu\text{g/mL}$, já o extrato de 96 h inibiu em 90,5% a oxidação em sistema de emulsão β -caroteno/ácido linoleico, além disso, reduziu em 30% a formação de indicadores químicos de oxidação.

Cultivo em estado sólido com fungo *Rhizopus oryzae* mostrou-se adequado para o tratamento do farelo de arroz integral para maior disponibilidade de γ -orizanol, alterar o seu perfil dos ácidos graxos e componentes majoritários, melhorando as suas propriedades antioxidantes. Além disso, pode ser aplicado para alteração do perfil de lipídios e fosfolipídios nas suas primeiras horas de formação da biomassa fúngica, com destaque para aumento dos ácidos graxos essenciais e da disponibilidade de fósforo.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMIN, I.; NORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K. I. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched Amaranthus species. **Food chemistry**, v. 94, n. 1, p. 47-52, 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob estocagem. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 498-502, 2008.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras, **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.
- BITENCOURT, R. G.; RAMMAZZINA, W. A. F.; PAULA, J. T.; GARMUS, T. T.; CABRAL, F. A. Solubility of γ -oryzanol in supercritical carbon dioxide and extraction from rice bran. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 196-200, 2016.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S. D.; SILVA, A. M. D. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; MANCINI-FILHO, J. Evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds naturally contained in by-products of the cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. D. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.
- BUCCI, R.; MAGRÍ, A. D.; MAGRÍ, A. L.; MARINI, F. Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of γ -oryzanol in rice bran oil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 8, p. 1254-1259, 2003.
- BURLANDO, B.; CORNARA, L. Therapeutic properties of rice constituents and derivatives (*Oryza sativa* L.): A review update. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 1, p. 82-98, 2014.
- BUTSAT, S.; SIRIAMORNUN, S. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 606-613, 2010.
- CALHEIROS, M. N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

CANAN, C.; DELAROZA, F.; CASAGRANDE, R.; BARACAT, M.M; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.L. Antioxidant capacity of phytic acid purified from rice bran. **Acta Science Technology**, v. 34, n. 4, p. 457-463, 2012.

CANAN, C.; CRUZ, F. T. L.; DELAROZA, F.; CASAGRANDE, R.; SARMENTO, C. P. M.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Studies on the extraction and purification of phytic acid from rice bran. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1057-1063, 2011.

CHANDRA, S.; KHAN, S.; AVULA, B.; LATA, H.; YANG, M. H.; ELSOHLY, M. A.; KHAN, I. A. Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Properties, and Yield of Aeroponically and Conventionally Grown Leafy Vegetables and Fruit Crops: A Comparative Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1- 9, 2014.

CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; FIGUEIREDO, A. V. D.; VITTI, D.; SILVA FILHO, J. C. D. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz em frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 547-552, 2002.

DA SILVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, M. D. S.; BADIALE-FURLONG, E. Conteúdo lipídico e perfil em ácidos graxos de farelos submetidos à fermentação por *Aspergillus oryzae* em estado sólido. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 133-140, 2010.

DANIELS, Y.; ZHU, X.; ALEXANDRATOS, S. D. Distinguishing between organic and inorganic phosphorus in hydroxyapatite by elemental analysis. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 263-265, 2013.

DEBNATH, D.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; BARUAH, K.; YENGGOKPAM, S.; MUKHERJEE, S. C. Present scenario and future prospects of phytase in aquafeed. **Asian-australasian Journal of Animal Sciences**, v. 18, n. 12, p. 1800-12, 2005.

DE OLIVEIRA BRAGA, E. C.; MENDONÇA, L. G. Discussão do uso racional da ração humana, com enfoque para seus principais constituintes: linhaça e quinoa. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 1-2, p. 32-43, 2011.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em estado sólido**. São Paulo:Edgard Blücher, v. 2, 2001.

DIACK, M.; SASKA, M. Separation of vitamin E and γ -oryzanols from rice bran by normal-phase chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 11, p. 1211-1217, 1994.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ERDMAN J. W. Oilseed phytates: nutritional implications. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, n. 8, p. 736-741, 1979.

- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 497-509, 1957.
- GOUFO, P.; TRINDADE, H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 75-104, 2014.
- GRAF, E.; Antioxidant Potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 435-448, 1992.
- GUL, K.; YOUSUF, B.; SINGH, A. K.; SINGH, P.; WANI, A. A. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2015.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.
- HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; NORA, N. S.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of gamma-oryzanol from rice bran. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 36, n. 6, p. 665-673, 2012.
- HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.; SEÑORÁNS, F.J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 417-423, 2005.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro: [s..n], 2015.
- ITO, K.; KAWASE, T.; SAMMOTO, H.; GOMI, K.; KARIYAMA, M.; MIYAKE, T. Uniform culture in solid-state fermentation with fungi and its efficient enzyme production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 300-305, 2011.
- JANG, H-D.; YANG, S-S. Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6181-6189, 2008.
- JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, n. 1, p. 146-154, 2005.
- KHAN, M. H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, n. 4, p. 381-386, 2007.
- KULLENBERG, D.; TAYLOR, L. A.; SCHENEIDER, M.; MASSING, U. Health effects of dietary phospholipids. **Lipids Health Disease**, v. 11, n. 3, p. 1-16, 2012.
- KUPSKI, L.; PAGNUSSATT, F. A; BUFFON, J. G.; BADIALE-FURLONG, E. Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: production, characterization, and thermal stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 458-468, 2014.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Rhizopus. **Encyclopedia of food microbiology**, n. 2, p. 284-290, 2014.

LEMOS, M. R. B.; SOUZA-SOARES, L. A. Rice and its byproducts in southern Brazil. **Vetor-Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 10, p. 21-36, 2000.

LEMUS, C.; ANGELIS, A.; HALABALAKI, M.; LEANDROS A. γ -Oryzanol: An Attractive Bioactive Component from Rice Bran. **Wheat and Rice in Disease Prevention and Health: Benefits, risks and mechanisms of whole grains in health promotion**, p. 409-430, 2014.

LERMA-GARCIA, M. J.; HERRERO-MARTINEZ, J. M.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; MENDONÇA, C. R.; RAMIS-RAMOS, G. Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 389-404, 2009.

LIANG, Y.; GAO, Y.; LIN, Q.; LUO, F.; WU, W.; LU, Q.; LIU, Y. A review of the research progress on the bioactive ingredients and physiological activities of rice bran oil. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 2, p. 169-176, 2014.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

LIU, L.; WATERS, D. L. E.; ROSE, T. J.; BAO, J.; KING, G. J. Phospholipids in rice: significance in grain quality and health benefits: a review. **Food chemistry**, v. 139, n. 1, p. 1133-1145, 2013.

LUKKAKULA, N. R.; LIMA, M.H; WALKER, T. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. **Bioresource Technology**, v.92, p.157–161, 2004.

MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; FENDRICH, R. C.; BIANCA, B. E. D.; HAMINIUK, C. W. I.; SOCCOL, C. R. Study of Some Parameters wich Affect Xylanase Production: Strain Selection, Enzyme Extraction Optimization, and Influence of Drying Conditions. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 6, p. 748-755, 2009.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARCO, G. A. rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, n. 9, p. 594-598, 1968.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p.365-373, 2011.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M. E.; DA GLÓRIA, N. A. Determinação das várias formas de fósforo em tortas de filtro rotativo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 47, n. 1, p. 147-161, 1990.

McDOWELL R. W.; BIGGS, B. J.; SHARPLEY, A. N. NGUYEN, L. Connecting phosphorus loss from agricultural landscapes to surface water quality. **Chemistry and Ecology**, v. 20, n. 1, p. 1-40, 2004.

MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7842-7847, 2008.

MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1581-1586, 2011.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MOTTA, V. T. Bioquímica básica. **Autolab Análises Clínicas**, v. 9, p. 227, 2006.

NEE'NIGAM P. S. Production of bioactive secondary metabolites. **Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilization**, p. 129–145, 2009.

NEE'NIGAM, P. S.; PANDEY, A. Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**, p. 197-221, 2009.

NIWA, Y.; MIYACHI, Y.. Antioxidant action of natural health products and Chinese herbs. **Inflammation**, v. 10, n. 1, p. 79-91, 1986.

NYSTROM, L.; MAKINEN, M.; LAMPI, A. M.; PIIRONEN, V. Antioxidant activity of steryl ferulate extracts from rye and wheat bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2503-2510, 2005.

NZAI, J. M.; PROCTOR, A. Phospholipids determination in vegetable oil by thin-layer chromatography and imaging densitometry. **Food Chemistry**, v. 63, n.4, p.571-576, 1998.

OLIVEIRA, M. S.; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8335-8338, 2011.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L.A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTa - Journal of Food**, v. 8, n. 3, p. 229–236, 2010.

OLIVEIRA, M. **Disponibilização de compostos funcionais em farelo de arroz fermentado em estado sólido**. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

PATINO, J. M. R.; CARO, A. L.; NIÑO, M. R. R.; MACKIE, A. R.; GUNNING, A. P.; MORRIS, V. J. Some implications of nanoscience in food dispersion formulations containing phospholipids as emulsifiers. **Food Chemistry**, v. 102, n. 2, p. 532-541, 2007.

PELIZER, L. H.; DE CARVALHO, J. C. M.; DE OLIVEIRA MORAES, I. Protein production by *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in solid state cultivation using sugarcane bagasse as support. **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 70-76, 2015.

PARDO, P.; RAURET, G.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J. F. Shortened screening method for phosphorus fractionation in sediments: a complementary approach to the standards, measurements and testing harmonised protocol. **Analytica Chimica Acta**, v. 508, n. 2, p. 201-206, 2004.

PEREZ-GUERRA, N.; TORRADO-AGRASAR, A.; LÓPEZ-MARIAS, C.; PASTRANA, L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 3, 2003.

PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R.; ZAMBIAZI, R. C. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde e aplicações. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, 2008.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. London:Blackie Academic & Professional, 2. ed., 1997.

POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, v. 44, n. 3, p. 797-820, 2013.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidante capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 6. ed., 2004.

RAJAGOPALAN, G.; HE, J.; YANG, K. L. One-pot fermentation of agricultural residues to produce butanol and hydrogen by *Clostridium* strain BOH3. **Renewable Energy**, v. 85, p. 1127-1134, 2016.

RIBEIRO, I. S.; SHIRAHIGUE, L. D.; SUCASAS, L. F. A.; CARPES, S. T.; OETTERER, M. Evaluation of antioxidant activity of seaweed through accelerated oxidation methods. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 5, p. 2145-2149, 2014.

- ROCHA, D. L.; ROCHA, F. R. P. Photochemical micro-digestion in a multi-pumping flow system for phosphorus fractionation in cereals. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 139-144, 2013.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 7, p. 726-740, 2010.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS.+. **Comunicado técnico on line da Embrapa**, n. 128, 2007.
- SCHACHTMAN, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant physiology**, v. 116, n. 2, p. 447-453, 1998.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, V. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. **Edgard Blucher Ltda**, v. 2, p. 593, 2001.
- SCHMIDT, C. G.; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; FURLONG, E. B. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 146, p. 371-377, 2014.
- SILVA, M.A.; SANCHES, C.; AMANTE, E.R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 4, p. 487-491, 2006.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.
- SILVEIRA, C. M.; BADIALE-FURLONG, E. Characterization of nitrogenated compounds in solid state fermented bran. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, n. 4, p. 805-811, 2007.
- SIRIPAHOJ, W.; KAEWCHADA, A.; JAREE, A. Synthesis of molecularly imprinted polymers for the separation of gamma-oryzanol by using methacrylic acid as functional monomer. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 2, p. 338-346, 2014.
- SON, M. J.; RICO, C. W.; NAM, S. H.; KANG, M. Y. Effect of Oryzanol and Ferulic Acid on the Glucose Metabolism of Mice Fed with a High-Fat Diet. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. H7-H10, 2011.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Revista Uopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUKHONTHARA, S.; KAEWKA, K.; THEERAKULKAIT, C. Inhibitory effect of rice bran extracts and its phenolic compounds on polyphenol oxidase activity and browning in potato and apple puree. **Food chemistry**, v. 190, p. 922-927, 2016.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

TOLENTINO, M. C. **Avaliação da qualidade de óleos vegetais sob estresse fotooxidativo e termoxidativo por espectroscopia de UV e RMN de ¹H**. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

TOMITA, K.; MACHMUDAH, S.; FUKUZATO, R.; KANDA, H.; QUITAIN, A. T.; SASAKI, M.; GOTO, M. Extraction of rice bran oil by supercritical carbon dioxide and solubility consideration. **Separation and Purification Technology**, v. 125, p. 319-325, 2014.

VILLAÑO, D.; FERNANDEZ-PACHÓN, M. S.; MOYÁ, M. L. TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.

WANYO, P.; MEESO, N.; SIRIAMORNpun, S. Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk. **Food chemistry**, v. 157, p. 457-463, 2014.

WATANABE, M.; MAEDA, I.; KOYAMA, M.; NAKAMURA, K.; SASANO, K. Simultaneous recovery and purification of rice protein and phosphorus compounds from full-fat and defatted rice bran with organic solvent-free process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 2, p. 206-211, 2015.

WINKLER-MOSER, J. K.; RENNINCK, K. A.; PALMQUIST, D. A.; BERHOW, M. A.; VAUGHN, S. F. Comparison of the impact of γ -oryzanol and corn steryl ferulates on the polymerization of soybean oil during frying. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 243-252, 2012.

XU, Z.; GODBER, S. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 5, p. 547-551, 2000.

YOSHIDA, H.; TANIGAWA, T.; YOSHIDA, N.; KURIYAMA, I.; TOMIYAMA, Y.; MIZUSHINA, Y. Lipid components, fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in rice brans. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 479-484, 2011.

YOUNAS, A.; BHATTI, M. S.; AHMED, A.; RANDHAWA, M. A. Effect of rice bran supplementation on cookie baking quality. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 48, n. 2, p. 129-134, 2011.