

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

FERNANDA THAÍS VIEIRA RUBIO

**BIOSSORÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAGAÇOS DE  
UVA EM *Saccharomyces cerevisiae*: MECANISMOS DO PROCESSO  
E BIOACESSIBILIDADE**

DISSERTAÇÃO

CAMPO MOURÃO

2017

FERNANDA THAÍS VIEIRA RUBIO

**BIOSSORÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAGAÇOS DE  
UVA EM *Saccharomyces cerevisiae*: MECANISMOS DO PROCESSO  
E BIOACESSIBILIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Alimentos”.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

Co-orientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel

CAMPO MOURÃO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R896b Rubio, Fernanda Thaís Vieira

Biossorção de compostos fenólicos de bagaços de uva em *Saccharomyces cerevisiae*: mecanismos de processo e bioacessibilidade/ Fernanda Thaís Vieira Rubio.--. 2017.

89 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk.  
Coorientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2017.  
Inclui bibliografias.

1.Biomassa 2.Fenóis 3. Tecnologia em Alimentos – Dissertações.  
I. Haminiuk, Charles Windson Isidoro, orient. II. Maciel, Giselle Maria, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Campo Mourão  
Lígia Patrícia Torino CRB 9/1278



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **BIOSSORÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAGAÇO DE UVA EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: MECANISMOS DO PROCESSO E BIOACESSIBILIDADE**

Por

**FERNANDA THAÍS VIEIRA RUBIO**

Essa dissertação foi apresentada às treze horas e trinta minutos, do dia vinte de fevereiro de dois mil e dezessete, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk (Orientador – PPGTA)

---

Prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior (Membro externo – UTFPR)

---

Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe (Membro externo – UFPR)

\* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

Àquela que me ensina todos os dias o tipo de pessoa que quero ser, pelo seu caráter, humildade, pelo coração cheio de amor e por, mesmo sem perceber, me incentivar a nunca desistir diante das adversidades. Você é a razão do meu sucesso, da minha realização, a razão de eu ter chegado até aqui. Ao amor da minha vida, a quem tenho o orgulho de chamar de mãe.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e principalmente a Deus, que me permite, todos os dias, recomeçar. Me dá a chance de falhar e aqui mesmo aprender e correr atrás de reparar meus erros. Me dá a oportunidade de trabalhar e colher os frutos do meu esforço. Não me desampara nos momentos de tristeza. Acredito que tudo que acontece em minha vida tem um motivo muito maior e sou muito grata por ter chegado até aqui, por ter ido muito mais longe do que eu acreditava conseguir alcançar. A Deus toda minha gratidão.

Aos meus pais, por fazerem tudo que estava ao alcance para que esse mestrado fosse realizado. Os dois contribuíram de formas muito diferentes para o meu trabalho e meu jeito de ser, mas que, somadas, me ajudaram a moldar quem eu sou. Minha mãe sempre carinhosa, sempre amiga, confidente de tristezas e alegrias, meu ombro amigo para todo e qualquer momento, me ensinou principalmente o perdão e o amor incondicional. Meu pai, realista, prático, sempre me mostrando como ser “pé no chão”, independente, como ser uma mulher adulta. Vocês equilibraram minha personalidade, me transbordaram com o amor mais verdadeiro que existe e fizeram de mim uma pessoa muito melhor e realizada. Obrigada por me permitirem chegar até aqui e por não medirem esforços para que eu alcançasse meus sonhos!

Ao meu avô Nelson, que sempre se preocupou em me dar a melhor formação, investindo em mim, desde pequena. Por todo carinho, por confiar no meu potencial. Um dos meus objetivos maiores sempre será te deixar orgulhoso e feliz, o senhor é muito importante na minha vida e sempre vou querer retribuir tudo o que fez por mim até hoje, toda a dedicação e amor. Meu pai com açúcar, minha felicidade é sua!

Ao meu namorado, Guilherme, pela compreensão comigo, por ter entendido todas as vezes que não pude dar atenção, por ter até mesmo me acompanhado no laboratório tantas vezes, só para não me deixar sozinha, por cuidar de mim e por comemorar cada conquista ao meu lado. Obrigada pelos abraços apertados e cheios de carinho que sempre foram capazes de melhorar qualquer dia ruim. Obrigada por me fazer mais forte, por sempre acreditar na minha capacidade, por ser meu porto seguro. Que meu sucesso seja também sucesso seu!

Às minhas amigas do coração, Jéssica e Amanda, por me acompanharem desde a graduação, por me ouvirem nas horas felizes e também difíceis, por me

deixarem segura de que nunca estarei sozinha. Aos amigos do mestrado: Melina, Larissa, Alexandre e Gustavo. Nossa turma foi demais! Obrigada pela companhia nas viagens cansativas - mas engraçadas - à Medianeira, pelos momentos de descontração, por tornarem essa trajetória menos pesada. Vocês todos são muito queridos para mim e sou grata por todo o bem que me fizeram.

Agradeço especialmente ao meu orientador e à minha co-orientadora, Charles e Giselle. Obrigada por acreditarem no meu potencial para desenvolvimento desse projeto tão importante, por confiarem no meu trabalho mesmo distante e por toda a paciência nesses anos todos de parceria. Como já disse, vocês são meus pais acadêmicos e sou muito grata por todas as oportunidades que me deram até hoje. Vocês fizeram parte de todo o meu crescimento profissional, de todo meu desenvolvimento dentro da universidade. Levo vocês comigo!

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos pela excelência no ensino e dedicação aos alunos. O sucesso dos mestres que saem do PPGTA hoje em dia é reflexo da qualidade do programa que vocês constroem.

Aos técnicos e estagiários do laboratório C004, onde passei muitos dias nesse último ano. Obrigada por fazerem do nosso local de trabalho um ambiente muito mais organizado, por toda ajuda que sempre prestaram, por toda a dedicação para cuidar dos nossos laboratórios. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Em especial, agradeço ao Marcos, por toda a experiência compartilhada, por sempre auxiliar e aconselhar. Sou, sem dúvidas, uma profissional muito melhor graças a tudo que me ensinou. Nunca perca a paixão que tem pela pesquisa, ela é a força motriz que impulsiona outras pessoas à sua volta.

À CAPES pelo financiamento dos meus estudos e à UTFPR pela minha formação, tenho orgulho de ter feito parte do crescimento dessa Universidade.

A todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, do desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada!

## RESUMO

A biossorção de compostos fenólicos dos bagaços de uva em *Saccharomyces cerevisiae* representa uma alternativa viável para o reaproveitamento desses dois resíduos industriais descartados em larga escala e para a valorização desses subprodutos por meio da transformação em itens com valor agregado. Os compostos fenólicos totais (CFT) dos bagaços de uva das variedades Cabernet Sauvignon e Bordeaux foram biossorvidos por biomassas de leveduras *S. cerevisiae* modificadas por tratamentos químicos e térmico. A avaliação da biossorção foi feita com base no estudo cinético, estudo de equilíbrio, análise da interação dos CFT com o material biossorvente, utilizando espectroscopia de infravermelho médio com reflectância total atenuada (MIR-ATR) e técnicas de caracterização como a microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio X (DRX) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Extratos e suspensões de levedura foram submetidos à simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*. O processo de biossorção foi melhor descrito pelo modelo de pseudo-segunda ordem e as leveduras modificadas com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio foram as mais eficientes na biossorção dos CFT dos extratos de bagaços de uva Bordeaux (EB) e Cabernet Sauvignon (ECS), respectivamente, visto que apresentaram capacidades de sorção mais altas comparadas aos outros tratamentos. A isoterma de Temkin apresentou melhor ajuste para os dados de equilíbrio da biossorção de CFT do ECS em levedura básica, enquanto os dados de sorção dos CFT do EB em levedura ácida foram melhor descritos pelo modelo de Dubinin-Radushkevich. Houve diferença significativa entre as leveduras antes e após a biossorção, com exceção das leveduras que sofreram tratamento térmico. A caracterização das leveduras e dos extratos demonstrou que a biomassa foi enriquecida com os compostos fenólicos, basicamente por mudanças nas biomassas e nos extratos após a biossorção. O estudo de digestão *in vitro* demonstrou que a biossorção é capaz de aumentar a bioacessibilidade de compostos bioativos presentes nos extratos após biossorção e que leveduras enriquecidas desempenham papel importante na preservação da atividade antioxidante e na bioacessibilidade de compostos adsorvidos.

**Palavras-chave:** Biomassa enriquecida, Cabernet Sauvignon, Bordeaux, Pseudo-segunda ordem, Temkin, Dubinin-Radushkevich, Bioacessibilidade.



## ABSTRACT

The biosorption of phenolic compounds from grape pomace by *Saccharomyces cerevisiae* represents a viable alternative to the reuse of these two industrial wastes discarded on a large scale and for the valorization of by-products through their transformation into value-added items. Total phenolic compounds (TPC) from Cabernet Sauvignon and Bordeaux grape pomaces varieties were adsorbed by *S. cerevisiae* biomasses modified by chemical and thermal treatments. The evaluation of biosorption was based on kinetic study, equilibrium study, analysis of the interaction of TPC with the biosorbent, using mid-infrared attenuated total reflectance (MIR-ATR) and characterization techniques such as scanning electron microscopy (SEM), x-ray diffraction (XRD) and high performance liquid chromatography (HPLC). Extracts and suspensions of yeast were submitted to a gastrointestinal digestion simulated *in vitro*. The biosorption process followed a pseudo-second order model and yeasts modified with sulfuric acid and sodium hydroxide were the most efficient in biosorption of TPC from Bordeaux grape pomace extract (BE) and Cabernet Sauvignon grape pomace extract (CSE), respectively, once they showed higher sorption capacity. Temkin isotherm showed a better fit for the equilibrium data of biosorption of TPC from CSE in basic yeast whereas sorption data of TPC from BE in acid yeast were best described by the Dubinin-Radushkevich model. There was a significant difference between treated and control yeasts and these biomasses before and after biosorption, with the exception of the yeast thermally treated. The yeasts and extracts characterization showed that the biomasses were enriched with phenolic compounds because of changes in biomasses and extracts after biosorption. The *in vitro* digestion study demonstrated that the biosorption is capable to cause an increase in the bioaccessibility of bioactive compounds present in extracts after biosorption and enriched yeasts displays an important role in the preservation of the antioxidant activity and bioaccessibility of adsorbed compounds.

**Keywords:** Enriched biomass, Cabernet Sauvignon, Bordeaux, Pseudo-second order, Temkin, Dubinin-Radushkevich, Bioaccessibility.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de adsorção .....	16
<b>Figura 2.</b> Amostras de bagaço de uva a) Cabernet Sauvignon ( <i>Vitis vinifera</i> ) e b) Bordeaux ( <i>Vitis labrusca</i> ) .....	29
<b>Figura 3.</b> Biomassa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a) durante a lavagem com água destilada, b) depois da retirada de resíduos de cerveja com diversas lavagens, c) úmida e d) seca por liofilização .....	29
<b>Figura 4.</b> Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a) sem tratamento (controle), b) modificada por tratamento ácido, c) modificada por tratamento térmico (autoclavada), c) modificada por tratamento básico .....	31
<b>Figura 5.</b> Gráfico da curva padrão de Ácido Gálico para quantificação de compostos fenólicos totais.....	32
<b>Figura 6.</b> Gráfico da curva padrão de Trolox para determinação da atividade antioxidante .....	33

# SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	8
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	12
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE UVA .....	13
3.2 BIOSSORÇÃO .....	15
3.3 ADSORÇÃO APLICADA A ALIMENTOS .....	18
3.4 MATERIAL BIOSSORVENTE .....	20
3.4.1 Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
3.4.2 Modificações do Material Biossorvente .....	22
3.4.3 Técnicas de Caracterização do Material Biossorvente .....	23
3.5 CINÉTICA DE BIOSSORÇÃO .....	24
3.6 ISOTERMAS DE BIOSSORÇÃO .....	25
3.7 DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> .....	26
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 REAGENTES .....	28
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS DE BAGAÇOS DE UVA .....	28
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS DE LEVEDURA .....	29
4.4 MODIFICAÇÕES DO MATERIAL BIOSSORVENTE .....	30
4.4.1 Modificação Ácida e Modificação Básica .....	30
4.4.2 Modificação Térmica .....	30
4.5 PREPARO DOS EXTRATOS .....	31
4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS .....	31

4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	32
4.8 CINÉTICA DE BIOSORÇÃO.....	33
4.9 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS BIOSORVIDOS .....	34
4.10 ADEQUAÇÃO DO MODELO CINÉTICO .....	35
4.11 ISOTERMAS DE BIOSORÇÃO .....	35
4.13 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	37
4.14 CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS .....	38
4.14.1 Espectroscopia no Infravermelho Médio com Reflectância Total Atenuada (MIR- ATR) .....	38
4.14.2 Difração de raio X.....	39
4.14.3 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	39
4.15 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA <i>IN VITRO</i> .....	39
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>6 ARTIGO – BIOMASS OF <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ENRICHED WITH PHENOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE POMACE EXTRACTS: BIOSORPTION AND BIOACCESSIBILITY STUDIES .....</b>	<b>49</b>
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>88</b>

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é apresentada em duas partes. A primeira contém a introdução ao tema, os objetivos gerais e específicos, a revisão bibliográfica e os materiais e métodos. A segunda parte é composta por um manuscrito que foi submetido ao *Journal of Functional Foods*. As tabelas e figuras, bem como os resultados obtidos neste trabalho, estão apresentados no formato de artigo requisitado pela revista.

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica e a necessidade de reutilizar a grande quantidade de subprodutos agrícolas gerados anualmente têm despertado especial interesse em materiais residuais que sejam fontes de compostos bioativos passíveis de reaproveitamento. A produção vinícola, especificamente, ganhou atenção nos últimos anos devido ao valor significativo de antioxidantes presentes em seus resíduos (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2015), especialmente os compostos fenólicos (MELO et al., 2015).

Na elaboração do vinho, os compostos fenólicos da uva são transferidos para o mosto durante a etapa de maceração, até que sejam atingidas as condições de equilíbrio características do processo. Entretanto, como a maior parte dos compostos fenólicos são provenientes das partes sólidas da uva, uma grande proporção desses compostos ainda permanece retida nos tecidos vegetais remanescentes (JARA-PALACIOS et al., 2015; BARCIA et al., 2014). Estima-se que, para cada seis litros de vinho produzido, um quilograma de bagaço seja descartado (TOURNOUR et al., 2015). Como fonte barata e sustentável de bioativos com alto valor biológico, esses materiais podem ser incorporados em alimentos e reutilizados como aditivos substitutos ou novos ingredientes de grande interesse industrial (MELO et al., 2015; JARA-PALACIOS et al., 2015).

Os compostos fenólicos das uvas são responsáveis não só por importantes características do vinho – como cor, adstringência, sabor e corpo – mas estão, também, relacionados a efeitos benéficos na saúde humana, com o consumo moderado da bebida (LÓPEZ-MIRANDA et al., 2016). Os compostos fenólicos desempenham importante papel na proteção celular, pois são capazes de sequestrar ou inibir as diversas espécies de oxigênio reativo, transferir elétrons para radicais livres, ativar enzimas antioxidantes e inibir enzimas oxidases (DUMITRIU et al., 2015) desempenhando forte ação na prevenção do estresse oxidativo, apontado como causa de doenças como arteriosclerose, diabete, câncer e doenças neurodegenerativas (ASADI et al., 2010). Ademais, esses compostos estão frequentemente associados à inibição do crescimento de células cancerígenas (JARA-PALACIOS et al., 2015; LEE et al., 2006; VU et al., 2012), além da ação anti-

inflamatória, analgésica, gastroprotetora (LAJILI et al., 2016) e antimicrobiana (CETINKARACA; NEWMAN, 2015) às quais estão relacionados.

Apesar de a atividade antioxidante de plantas e alimentos ser amplamente investigada, são escassos os estudos que buscam apurar o efeito da digestão gastrointestinal sobre os compostos bioativos. A quantidade de compostos fenólicos totais e antioxidantes presentes em uma matriz alimentar não reflete o conteúdo total disponível para metabolização pelo corpo humano, pois apenas os compostos que não são degradados estarão biodisponíveis para absorção e desempenho de sua função biológica no organismo. Uma vez digeridos, os componentes dos alimentos estão constantemente expostos a diferentes condições físicas, químicas e bioquímicas. Em consequência disso, os compostos bioativos podem ser modificados e ter sua atividade biológica alterada (PINACHO et al., 2015; MOSELE et al., 2016). Por isso a importância de testes como a digestão *in vitro*, capaz de simular as condições fisiológicas do processo digestivo humano, incluindo a boca, o estômago e o intestino (DE LIMA et al., 2016).

Jilani et al. (2015) realizaram o estudo da digestão *in vitro* de compostos fenólicos do chá preto e do chá verde bioadsorvidos em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e comprovaram que houve, no geral, um aumento na atividade antioxidante após a bioadsorção e digestão. O complexo formado entre as células de leveduras e os fenólicos preveniu alterações estruturais dos antioxidantes dos chás durante as diferentes condições da digestão, especialmente na fase gástrica, aumentando a bioacessibilidade dos compostos fenólicos em ambas infusões. Os autores demonstraram que a bioadsorção em leveduras é um meio promissor de preservação da bioatividade de antioxidantes durante uma digestão, atuando como um efetivo sistema de liberação.

As leveduras *Saccharomyces* spp. representam o segundo maior resíduo da produção cervejeira e ganham atenção na indústria de alimentos principalmente por conter um alto valor nutritivo: a biomassa é composta predominantemente por proteínas (35 a 60% em base seca) e pode ser reutilizada para produzir concentrados e isolados proteicos sem perder suas propriedades funcionais e nutricionais. Além de excelente fonte de proteínas, as leveduras representam uma fonte barata de nitrogênio, apresentam de 35 a 45% de carboidratos em base seca, minerais (Ca, Mg, K, e Fe), lipídeos, vitaminas do complexo B e compostos imunoestimulantes, como  $\beta$ -glucanas e ácidos nucleicos (FERREIRA et al., 2010; AMORIM et al., 2016;

HOSEINIFAR; MIRVAGHEFI; MERRIFIELD, 2011). A *Saccharomyces cerevisiae*, em especial, é geralmente reconhecida como segura (“GRAS” – generally reconized as safe) e pode ser facilmente aceita pelo público quando aplicada em formulações alimentícias ou farmacêuticas (WANG; CHEN, 2006). Concentrados proteicos de levedura, por exemplo, são encontrados na forma de pós, flocos ou comprimidos, que podem ser misturados com alimentos sólidos ou líquidos (FERREIRA et al., 2010).

Células de levedura mortas por condições físicas ou químicas extremas podem apresentar propriedades diferentes de acumulação, comparadas com a levedura original. À vista disso, diversas modificações de natureza química e física têm sido investigadas na tentativa de alterar os grupos funcionais e características da superfície celular, removendo ou mascarando os grupos funcionais ou expondo sítios de ligação, em busca do aprimoramento dos materiais biossorventes e de sua capacidade de ligação (ABDOLALI et al., 2014; WANG; CHEN, 2009).

Os resíduos sólidos e líquidos gerados pela indústria de alimentos não representam apenas um problema ambiental, mas também uma perda de produtos valiosos (MACHADO et al., 2014). Nesse contexto, a biossorção possibilita não só a recuperação de compostos bioativos que seriam perdidos com o descarte, mas também reflete uma opção para o reaproveitamento de biomassa com grandes potenciais nutricionais, mesmo após sua inviabilização no processo fermentativo da cerveja. Desse modo, os subprodutos gerados podem ser transformados em novos itens com valor agregado.

Portanto, esse trabalho teve como finalidades: (i) enriquecer a biomassa de *S. cerevisiae* com compostos bioativos de bagaços de uva, por meio da biossorção; (ii) investigar qual biomassa proporciona a maior sorção de compostos fenólicos, utilizando diferentes técnicas analíticas, como CLAE, MIR-ATR, DRX e MEV; (iii) realizar o estudo de digestão *in vitro* com o intuito de verificar a influência das condições gastrointestinais na bioacessibilidade dos compostos fenólicos. Ainda, esse é o primeiro trabalho na literatura científica que aborda a biossorção de compostos bioativos de bagaços de uva em biomassas modificadas de *Saccharomyces cerevisiae*.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a biossorção de compostos fenólicos do bagaço de uva (variedades Cabernet Sauvignon e Bordeaux) em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* descartadas do processo cervejeiro, para obtenção de uma biomassa enriquecida com antioxidantes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e quantificar os compostos fenólicos e antioxidantes dos bagaços de uva;
- Modificar as leveduras por meio de três tratamentos distintos (ácido, básico e térmico) e verificar a influência de cada tratamento sobre as propriedades da *S. cerevisiae* como biossorvente;
- Avaliar a adsorção obtendo como resposta a quantificação dos compostos fenólicos totais;
- Avaliar a cinética de adsorção de cada extrato nas leveduras modificadas e no controle e ajustar os dados experimentais a modelos cinéticos;
- Realizar o estudo de isotermas a partir de modelos de adsorção de monocamada com dois parâmetros;
- Caracterizar os extratos (puros e biossorvidos) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Caracterizar as leveduras (com e sem tratamento, antes e depois da biossorção) por espectroscopia no infravermelho médio (MIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raio X (DRX);
- Estudar a biossorção como uma estratégia para proteger a capacidade antioxidante e aumentar a bioacessibilidade de compostos bioativos durante uma digestão gastrointestinal.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE UVA

As frutas representam ricas fontes de vitaminas, açúcares e compostos bioativos (incluindo fibras e compostos fenólicos) e estão frequentemente relacionadas com a redução do risco da maioria das doenças crônicas degenerativas (SINGH et al., 2016). O reconhecimento dos valores nutricionais e terapêuticos e a crescente preocupação do consumidor com a saúde tiveram um grande impacto no consumo de frutas (HAMINIUK et al., 2011).

A produção de uva (*Vitis vinifera* L.) – aproximadamente 75,1 milhões de toneladas em 2013 – representa o maior cultivo mundial de fruta (MEDOUNI-ADRAR et al., 2015) e tem a maior parte destinada à produção de vinhos (ZAGKLIS; PARASKEVA, 2015). Estudos epidemiológicos sugerem efeitos benéficos do vinho na saúde humana, relacionando o consumo moderado da bebida com a prevenção de doenças cardíacas. Esses efeitos são atribuídos à parte não alcoólica da bebida, provavelmente ao conteúdo de compostos fenólicos (ZAGKLIS; PARASKEVA, 2015).

As uvas contêm uma quantidade considerável de diferentes compostos fenólicos, presentes nas folhas, cascas, polpa e sementes, os quais são responsáveis por propriedades de interesse, relacionadas principalmente com sua atividade antioxidante. A composição química é um dos critérios mais importantes para determinação da qualidade de produtos derivados da uva, uma vez que a concentração de compostos fenólicos e ácidos orgânicos confere características sensoriais para a uva e seus derivados. Essa concentração depende da variedade da uva e é influenciada por fatores climáticos e ambientais, práticas de cultivo e o estágio de maturação (FARHADI et al., 2016; SILVA; QUEIROZ, 2016).

Durante a produção vinífera, compostos bioativos são transferidos para o mosto principalmente durante a etapa de maceração. Mesmo depois de o bagaço de uva, que consiste principalmente em cascas, engaço e sementes, permanecer em contato com o vinho fermentando por vários dias e ser sujeito a uma longa extração etanólica, ainda contém altas concentrações de compostos fenólicos majoritariamente retida nas cascas

(BARCIA et al., 2014; PINELO; ARNOUS; MEYER, 2006). No Brasil, a maior parte do bagaço formado é tratada como resíduo com baixos lucros, utilizado na alimentação animal (ROCKENBACH et al., 2011). Apesar de o bagaço representar problemas, tanto do ponto de vista biológico quanto econômico, para estocagem, transformação ou eliminação, representa uma fonte acessível de antioxidantes naturais, o que torna o seu reaproveitamento uma oportunidade de interesse para as indústrias de alimentos, fármacos ou cosméticos, principalmente no que diz respeito à recuperação dos compostos bioativos desse resíduo agroindustrial (BARCIA et al., 2014; LÓPEZ-MIRANDA et al., 2016).

Os compostos fenólicos estão presentes em todas as frutas como um grupo de metabólitos secundários, ou seja, componentes que não são essenciais para a sobrevivência da fruta inteira ou de certas partes dela (ROBARDS et al., 1999). A síntese desses metabólitos ocorre durante o desenvolvimento normal de plantas, em resposta a diferentes situações, tais como estresse e radiações ultravioleta (HAMINIUK et al., 2012). Os compostos fenólicos possuem anel aromático em sua estrutura química e têm estrutura variável, conferindo a eles características multifuncionais. O grupo dos fenólicos é composto por moléculas simples e moléculas com alto grau de polimerização, as quais podem estar ligadas nos vegetais em sua forma livre ou associadas a açúcares e proteínas. Dentre os fenóis distintos presentes na natureza, destacam-se os flavonoides (incluindo as antocianinas), ácidos fenólicos e taninos (ANGELO; JORGE, 2007). No bagaço de uva são encontrados fenólicos como o ácido gálico, a catequina, ácido cafeico, ácido siringico, epicatequina, rutina, resveratrol e quercetina (ROCKENBACH et al., 2011; TOURNOUR et al., 2015).

O primeiro passo para a utilização dos compostos fenólicos para aplicação na indústria é a extração. O método mais utilizado é a extração sólido-líquido, que submete o bagaço da uva ao contato com diferentes tipos de solventes orgânicos, como o etanol, metanol, acetona e acetato de etila (LÓPEZ-MIRANDA et al., 2016), entretanto, prefere-se a utilização de misturas de água e etanol nas indústrias, por não afetarem a saúde humana (ZAGKLIS; PARASKEVA, 2015).

Pesquisas recentes abordam a capacidade antioxidante, antirradical, antimicrobiana, anti-inflamatória e cardioprotetora dos compostos bioativos. A importância dos compostos fenólicos torna o estudo de subprodutos interessante para as indústrias de alimentos, nutracêutica, farmacêutica e química, principalmente devido à possibilidade de aproveitar os resíduos, ricos em compostos fenólicos, para produção de extratos e novos

produtos de manutenção da saúde humana. A extração desses compostos de materiais derivados das práticas industriais representa uma alternativa atrativa, sustentável e de baixo custo para obter bioativos com alto valor biológico, os quais podem ser incorporados em alimentos (JARA-PALACIOS et al., 2015).

### 3.2 BIOSSORÇÃO

As atividades industriais têm recebido cada vez mais atenção nas últimas décadas devido aos perigos gerados à saúde humana e efeitos prejudiciais ao meio ambiente. A geração de grandes quantidades de efluentes contendo metais pesados tóxicos, metaloides e poluentes orgânicos como fenóis, pigmentos, pesticidas e detergentes, pressionam as indústrias para a aplicação de métodos eficientes no tratamento de seus despejos ou na prevenção e limitação dos mesmos (ABDOLALI et al., 2014; FOMINA; GADD, 2014).

A persistência contra degradação química e biológica e a forte tendência de bioacumulação desses poluentes torna a maioria das tecnologias de tratamento de efluentes existentes complicadas, não efetivas e pouco econômicas. Além disso, cresce a tentativa de utilização de técnicas ecologicamente corretas. Nesse contexto, a biossorção surgiu como uma alternativa simples para diminuir os custos operacionais e totais de tratamento, quando comparados com sistemas convencionais (ABDOLALI et al., 2014).

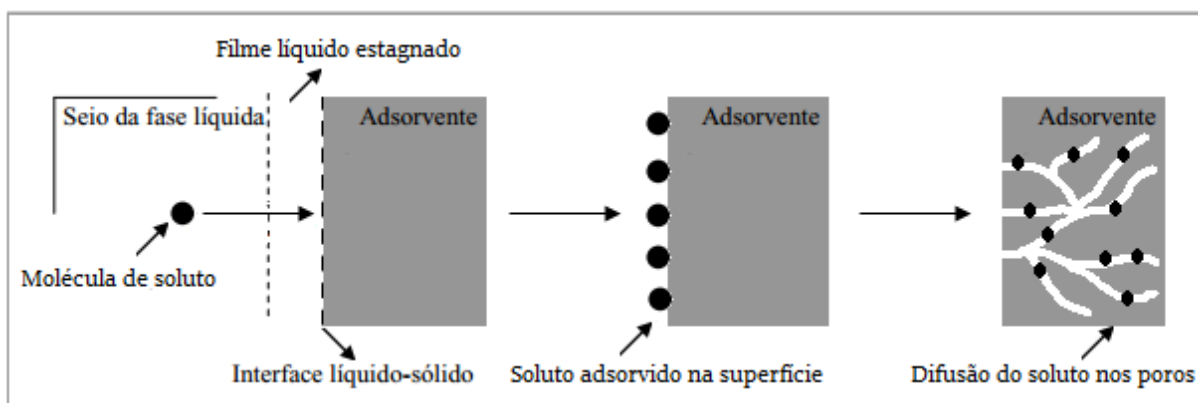
O termo “sorção” se refere ao processo físico-químico em que uma substância é atraída por outra (FOMINA; GADD, 2014). O termo pode ser utilizado para retratar tanto a absorção como a adsorção de substâncias. Ambos processos são frequentemente confundidos, por isso, faz-se necessária a distinção entre os dois mecanismos: enquanto a absorção envolve a incorporação de uma substância, em um estado físico, por outra em estado físico diferente, a adsorção caracteriza a aderência física ou ligação de íons e moléculas na superfície de um material necessariamente sólido (GADD, 2009).

Quando a matriz sólida envolvida na adsorção é um material biológico, o mecanismo de sorção carrega o prefixo “bio”, é denominado de biossorção. Nesse caso, a remoção, retenção ou recuperação de substâncias – orgânicas ou inorgânicas – presentes em solução aquosa pode ser realizada por organismos vivos, mortos ou alguns de seus

componentes (GADD, 2009; MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013). A biossorção se caracteriza por ser rápida, reversível (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013) e independente de controle metabólico (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003).

Uma vez que a captação não depende do metabolismo do material biológico envolvido, os mecanismos responsáveis pela ligação biossorbato-biossorvente podem mudar de acordo com o tipo de biomassa (VIJAYARAGHAVAN; BALASUBRAMANIAN, 2015). Os mecanismos físico-químicos de captação do biossorvente incluem adsorção física, adsorção química, quelação, troca iônica, complexação e microprecipitação (BORBA et al., 2006; VIJAYARAGHAVAN; BALASUBRAMANIAN, 2015).

Segundo Borba et al. (2012), o primeiro mecanismo de transferência de massa durante a adsorção é a difusão do soluto de uma fase fluida para a superfície do material adsorvente, ou seja, o transporte através do filme líquido estagnado entre a fase líquida e a interface líquido-sólido. Em sequência, ocorre a adsorção do soluto na superfície do adsorvente e, por último, a difusão do soluto nos poros do material utilizado para a adsorção (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de adsorção  
**Fonte:** Adaptada de Borba et al. (2012)

A eficiência da sorção em material biológico não pode ser prevista somente conhecendo a composição química do biossorvente ou a natureza dos biossorbatos. A biossorção é fortemente influenciada por parâmetros operacionais e pelas características físico-químicas das soluções (ARIEF et al., 2008; VIJAYARAGHAVAN; BALASUBRAMANIAN, 2015) tais como pH da solução, temperatura de operação, força iônica, tamanho do biossorvente, tempo de contato, dosagem de solvente, concentração

inicial de soluto, velocidade de agitação durante o processo, natureza do biossorvente e disponibilidade de seus sítios de ligação (FOMINA; GADD, 2014).

Por utilizar, geralmente, biomassas de baixo custo, a biossorção é vantajosa quando comparada com métodos convencionais de tratamento de efluentes industriais, pois oferece baixo custo de operação, diminuição do volume de despejos químicos ou biológicos, alta eficiência de sorção e não é necessário o fornecimento de nutrientes para que a biomassa realize a captação dos poluentes (SHENG; TING; CHEN, 2007). Ainda, a técnica de biossorção é seletiva, efetiva mesmo em concentrações baixas de solutos e é ecologicamente correta, uma vez que não gera resíduos tóxicos (ARIEF et al., 2008).

A primeira publicação a retratar o processo de biossorção foi realizada na década de 1950 por Ullrich e Smith (1951), aplicando a técnica no tratamento de esgoto doméstico. A partir de então, conhecendo a possibilidade de remover poluentes tóxicos de soluções aquosas até níveis baixos desejados, pesquisas foram impulsionadas para compreender o mecanismo de biossorção, seus métodos de quantificação e fatores que desempenham influência na eficiência e na taxa do processo, gerando grandes expectativas na área acadêmica e industrial (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

Recentemente, a biossorção tem sido utilizada para remoção de metais pesados de soluções aquosas (AMIRNIA; RAY; MARGARITIS, 2015; LIMCHAROENSUK et al., 2015; SRIVASTAVA; AGRAWAL; MONDAL, 2015), de compostos organoclorados (KUMAR; WOO; MIN, 2012; XU et al., 2016), de antibióticos (PRADO; OCHOA; AMRANE, 2009; RATHOD; HALDAR; BASHA, 2015) de pesticidas tóxicos (MACIEL et al., 2013; MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009) e pigmentos de indústria têxtil (ALBADARIN; MANGWANDI, 2015; KIM; LEE; CHO, 2015; YU et al., 2009). Apesar de pesquisas recentes abordarem especial atenção na biossorção como alternativa para o enriquecimento do biossorvente (JELÍNEK et al., 2015; STAFUSSA et al., 2016) e como meio efetivo de aumentar a bioacessibilidade de compostos bioativos (JILANI et al., 2015; JILANI et al., 2016), ainda há uma grande demanda de estudos que relacionem a biossorção com a área alimentícia.

### 3.3 ADSORÇÃO APLICADA A ALIMENTOS

A adsorção de compostos bioativos de alimentos foi, inicialmente, realizada em resinas com o intuito de reaproveitar os antioxidantes eliminados durante a fabricação de bebidas, mas sem interesse alimentício no adsorvente. Di Mauro et al. (2002) fizeram uma abordagem sobre perdas no processo de fabricação de sucos cítricos. Junto com a polpa de laranja descartada, quantidades significativas de açúcares, ácidos orgânicos, flavonoides, compostos fenólicos, pectinas e antocianinas também eram eliminadas durante o processo e deixavam, assim, de serem aproveitadas para outras finalidades. Em seus estudos, verificaram a eficiência de seis tipos de resinas como adsorventes na concentração de antocianinas, com o objetivo de recuperá-las e propor uma alternativa de aproveitamento de resíduos.

Resinas – geralmente estireno-divinilbenzeno (SDVB) ou polímeros acrílicos – possuem alta capacidade adsorptiva, são facilmente regeneráveis, de baixo custo, são aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) para entrar em contato com alimentos (SCORDINO et al., 2004; LIU et al., 2007) e têm sido frequentemente utilizadas para a recuperação de antocianinas (CHANG et al., 2012; KAMMERER et al., 2005; KOHNO et al., 2014; LIU et al., 2007; SCORDINO et al., 2004) e outros flavonoides de extratos de plantas (SCORDINO et al., 2003).

Concomitantemente com os estudos relatados, a adsorção de antioxidantes começou também a ser estudada em materiais biológicos residuais de processos fermentativos. Durante a estocagem de vinhos, ocorre um escurecimento normal provocado, essencialmente, por reações químicas envolvendo compostos fenólicos. Pesquisadores utilizaram leveduras de pão como agentes refinadoras do vinho, com a finalidade de reter os compostos fenólicos nas suas paredes celulares e corrigir a cor da bebida sem alterar as propriedades sensoriais (RAZMKHAB et al., 2002). Por outro lado, ao perceberem a perda de coloração em vinhos tintos quando os depósitos de leveduras e outras partículas são retirados durante a fabricação, Morata et al. (2003) avaliaram o mecanismo de bioadsorção das antocianinas da uva em cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para melhor compreensão do mecanismo e da perda de cor em vinhos.

Stafussa et al. (2016) foram os pioneiros a elucidarem a bioadsorção de antocianinas extraídas de bagaços de diferentes tipos de uva (Tannat, Merlot, Cabernet

Sauvignon e Bordeaux) em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com o propósito de enriquecer a biomassa. Nesse estudo, dois resíduos industriais de grande impacto – as leveduras, esgotadas da produção cervejeira, e o bagaço de uva, subproduto da fabricação vinífera – foram reaproveitados como matérias-primas para a produção de concentrado proteico com características antioxidantes. Além de apresentar uma alternativa promissora para a indústria farmacêutica e/ou alimentícia, o estudo evidenciou mais uma potencial aplicação para a bioabsorção. Além disso, diferente dos outros estudos publicados até então, não há necessidade de regenerar o bioabsorvente após o processo e o complexo bioabsorvente-bioabsorvato pode ser aproveitado na íntegra.

Durante a digestão gastrointestinal, componentes funcionais, como antocianinas, flavonoides e outros compostos fenólicos, podem ser transformados e ter sua atividade biológica alterada. O potencial antioxidante desses compostos depende da sua bioacessibilidade no organismo – quantidade ingerida que, após as transformações digestivas, ainda continua disponível para absorção na mucosa intestinal (JILANI et al., 2015). Visto a importância da bioacessibilidade, Jilani et al. (2015) realizaram a recuperação de compostos fenólicos do chá verde e do chá preto em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e Jilani et al. (2016) bioabsorveram compostos fenólicos de folhas de oliveira em *S. cerevisiae*, com a finalidade de avaliar a influência da bioabsorção na bioacessibilidade e como estratégia de preservação da capacidade antioxidante total dos compostos fenólicos após uma digestão gastrointestinal simulada *in vitro*. Por meio dos dois estudos, os autores provaram que a bioabsorção em levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um promissor “delivery system” e um meio efetivo de proteger a bioatividade de antioxidantes.

Esse contexto instiga novos estudos que englobem a bioabsorção, a investigação do envolvimento entre bioabsorvato e bioabsorvente, a avaliação da bioabsorção em biomassas modificadas e até a aplicação do complexo bioabsorvato-bioabsorvente em formulações alimentícias e farmacêuticas.



### 3.4 MATERIAL BIOSORVENTE

Uma extensa gama de biomateriais disponíveis na natureza tem sido empregada como biossorvente, incluindo biomassas de plantas, animais ou microbianas. Dentre as biomassas microbianas investigadas nos estudos de biossorção, estão as bactérias, cianobactérias, algas, microalgas, macroalgas e fungos (até mesmo nas formas filamentosas, como as leveduras unicelulares, corpos de frutificação e líquens) (GADD, 2009; MICHALAK; CHOJNACKA, WITEK-KROWIAK, 2013). Subprodutos industriais, resíduos agrícolas, biomateriais, resíduos industriais e polissacarídeos também podem ser empregados como biossorventes e, mesmo depois de já utilizados, os mesmos podem ser regenerados e aplicados repetidamente (EL-GENDY et al., 2015; MICHALAK; CHOJNACKA, WITEK-KROWIAK, 2013). Empresas podem vender o subproduto descartado, ao mesmo tempo, poupar o custo associado com o descarte da biomassa residual gerada (WANG; CHEN, 2006).

Estudos de viabilidade demonstram que o processo biossortivo usando biomassa morta é mais aplicável do que processos bioacumulativos utilizando biomassa viva (PARK; YUN; PARK, 2010). A utilização de biomassa morta para o processo de biossorção não requer nutrientes ou meio de crescimento, descarta a preocupação com a toxicidade do meio. Células mortas podem ser facilmente estocadas ou usadas por longos períodos de tempo e existem técnicas capazes de remover os contaminantes da biomassa para reutilizá-la. Já nas biomassas vivas, a recuperação de materiais biossorvidos é limitada, uma vez que podem estar ligados no espaço intracelular. Sendo assim, biomassas inativas são mais vantajosas em comparação a biomassas vivas. (MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009; PARK; YUN; PARK, 2010; MICHALAK; CHOJNACKA, WITEK-KROWIAK, 2013).

Para que o processo de adsorção cumpra com a proposta de reduzir o impacto ambiental, o material adsorvente deve ser efetivo, renovável, abundante e deve precisar do mínimo processamento antes da utilização (BACELO; SANTOS; BOTELHO, 2016). Subprodutos da indústria fermentativa têm recebido atenção principalmente pela questão econômica, uma vez que são gerados em grandes quantidades. Em comparação com outros tipos de biomassas microbianas residuais, as leveduras são de mais fácil obtenção e podem ser geradas por diversas indústrias de bebidas (WANG; CHEN, 2006).

### 3.4.1 Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras de pão e cerveja representam o gênero *Saccharomyces* e são o tipo mais importante de leveduras comerciais. Leveduras são microrganismos unicelulares, pertencentes ao reino Fungi e eucariontes, ou seja, apresentam núcleo organizado, envolto por membrana, e várias organelas membranosas. Devido à organização celular, são mais complexas e maiores que células procariontes (WANG; CHEN, 2009). A sua utilização ainda é limitada, sendo destinada principalmente à alimentação animal, entretanto, leveduras podem ser valorosas como matéria-prima para diferentes utilizações: na biotecnologia (por exemplo nos processos fermentativos para a produção de etanol), como substrato para o cultivo de microrganismos ou simplesmente na extração de compostos (FERREIRA et al., 2010).

As leveduras são responsáveis pela conversão dos açúcares da cerveja em álcool e dióxido de carbono, durante a fermentação, e também produzem compostos como ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos e cetonas, os quais desempenham papel essencial no perfil sensorial da bebida. As células são utilizadas quatro a seis vezes, de uma fermentação para outra, e depois são descartadas. A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura utilizada para produção de cerveja do tipo ale e se diferencia de leveduras fermentadoras de cerveja lager, *S. pastorianus*, por suas características fenotípicas e genotípicas (FERREIRA et al., 2010). Apesar de as duas cepas citadas possuírem similaridade na ultraestrutura de suas superfícies, apresentam diferenças nos graus de hidrofobicidade, nas propriedades de seus polissacarídeos e na elasticidade de suas paredes celulares (PINTO et al., 2015).

A *S. cerevisiae* se diferencia de outras espécies de leveduras pela estrutura, grupos funcionais presentes na parede celular, área superficial e diferenças morfológicas. A presença de polissacarídeos, com propriedades de troca iônica, proteínas e lipídeos na parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* oferece uma gama de grupos funcionais (grupos amino, carboxílico, sulfídrico, fosfato e tiol) que são capazes de se ligarem a moléculas de sorbatos presentes em solução aquosa (AKSU, 2005).

Devido a essa capacidade de ligação, a *S. cerevisiae* tem sido amplamente investigada na biossorção de diversos compostos, prevalecendo a finalidade de recuperá-los e removê-los de soluções (MORATA et al., 2003; GAEDHI et al., 2013; AMIRNIA; RAY; MARGARITIS, 2015; MAHMOUD, 2016). Não menos importante, mais recentemente, a

biomassa também tem sido alvo de estudos por se tratar de um meio propício para a incorporação de compostos bioativos (STAFUSSA et al., 2016; JILANI et al., 2015) com a intenção de valorizar o bioissorvente.

A utilização da biomassa de *S. cerevisiae* é vantajosa sobretudo pela facilidade de cultivá-la em larga escala, sem necessidade de técnicas sofisticadas ou meios caros de cultivo, e por ser de fácil obtenção das indústrias de fermentação, em comparação com outros tipos de biomassa microbiana residual. Ademais, a *S. cerevisiae* não é apenas considerada como resíduo, mas também como *commodity* comercial (WANG; CHEN, 2006; GHORBANI et al., 2008).

### 3.4.2 Modificações do Material Bioissorvente

Biomassas provenientes de descartes industriais, após seguirem sucessivos processos, podem apresentar baixas capacidades bioissorvivas e requerem algum tipo de tratamento que auxilie na exposição ou ativação dos sítios de ligação presentes na superfície do material bioissorvente, aumentando sua capacidade de sorção (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008). Células degradadas por algum tipo de tratamento podem oferecer maior área de superfície e expor componentes intracelulares e novos sítios de ligação exteriorizados devido à destruição das membranas celulares (WANG; CHEN, 2006).

Os métodos físicos incluem tratamento a vácuo, liofilização, aquecimento, autoclavagem e rompimento mecânico. Os métodos químicos incluem tratamentos com reagentes orgânicos ou inorgânicos, tais como soluções ácidas (ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico), básicas (hidróxido de sódio, carbonato de sódio) e compostos orgânicos (formaldeído, metanol, etilenodiamina) (WANG; CHEN, 2006; NGAH; HANAFIAH, 2008). Os tratamentos físicos são mais simples e menos custosos, porém, são geralmente menos efetivos do que as modificações químicas. A biomassa sem nenhum tratamento prévio pode apresentar alguns grupos que inibem a bioissorção do sorbato de interesse. Nesse caso, a eliminação química dos grupos de inibição pode gerar bioissorventes mais eficientes (PARK; YUN; PARK, 2010).

Strandberg, Schmate e Parrot (1981) reportaram o aumento da taxa de sorção de urânio em *Saccharomyces cerevisiae* tratada com formaldeído. Brady e Duncan (1994) demonstraram um aumento na acumulação de  $\text{Cu}^{2+}$  em *S. cerevisiae* após tratamento químico. Jianlong (2002) modificou a biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* com formaldeído, glutaraldeído e metanol, com o intuito de investigar o efeito da modificação química nas capacidades biossorbitivas e o papel dos grupos funcionais na adsorção de cobre (II). Os experimentos de biossorção demonstraram que a biomassa modificada com metanol apresentou melhor desempenho na ligação com o cobre. Estudos conduzidos com outras biomassas microbianas também demonstram o aumento na capacidade biossorbitiva (MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009; AKAR; CELIK; AKAR, 2010; SUN et al., 2011), elucidando a importância dos pré-tratamentos na eficiência de sorção de materiais biossorbitivos.

### 3.4.3 Técnicas de Caracterização do Material Biossorbitivo

Diversas técnicas são capazes de elucidar a biossorção por meio da caracterização das biomassas, tais como a espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e difração de raio X. Cada uma dessas técnicas é capaz de revelar aspectos sobre o estado do sorbato e sua interação com os sítios de ligação (VOLESKY, 2007).

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que se baseia na absorção da radiação infravermelha por várias moléculas presentes em uma amostra e, com isso, possibilita a caracterização de matrizes complexas, como microrganismos. É uma metodologia rápida, efetiva e requer uma quantidade pequena de biomassa para a identificação de seus grupos funcionais. As estruturas químicas e orientações tridimensionais das moléculas são responsáveis por gerar diferentes absorções da radiação infravermelha, dependendo da natureza das ligações. A interpretação dos espectros de absorção possibilita o reconhecimento dos grupos funcionais em uma molécula. A espectroscopia de infravermelho é altamente específica para cada espécie analisada e representa a composição química total da célula (SANTOS et al., 2010). Para a biossorção, a comparação entre as bandas da biomassa original e da biomassa com

compostos biossorvidos fornece uma indicação do grau de interação dos grupos funcionais do material biológico com os sorbatos (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

A microscopia eletrônica de varredura permite uma confirmação visual da morfologia da superfície do biossorvente (PARK; YUN; PARK, 2010). A técnica permite a avaliação qualitativa das mudanças que ocorrem na estrutura da parede celular da biomassa após a biossorção do sorbato (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

A difratometria de raio X representa uma técnica não destrutiva que fornece informações detalhadas sobre a estrutura cristalográfica de materiais. Apresenta alta acurácia, capacidade de detectar estruturas monocristalinas, policristalinas ou amorfas. A combinação das técnicas de caracterização fornece informações importantes sobre as características químicas e físicas dos biossorventes e auxilia na compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de biossorção (ARIEF et al., 2008).

### 3.5 CINÉTICA DE BIOSSORÇÃO

O estudo cinético da biossorção fornece informações detalhadas sobre a captação do biossorvato e também sobre o controle da mesma, ao limitar a transferência externa de massa, a transferência de massa intrapartícula e as reações biossorbitivas. Os modelos de cinética para operações em batelada são necessários para descrever o comportamento do sistema frente a mudanças causadas por variações nas condições experimentais e nas propriedades dos biossorventes (PARK; YUN; PARK, 2010).

Os modelos cinéticos têm como finalidade relacionar a concentração do biossorvato com o tempo de agitação. Essa concentração, em solução, decresce com o tempo, até atingir um valor constante, ou seja, até que seja alcançado o equilíbrio dinâmico entre a quantidade do adsorvato com a quantidade que está sendo desorvida. O tempo necessário para alcançar este estágio é chamado tempo de equilíbrio e a quantidade do material adsorvido retido neste tempo reflete a capacidade de adsorção no equilíbrio em condições estabelecidas (DABROWSKI, 2001).

Dentre os modelos cinéticos disponíveis na literatura, estão os modelos de pseudo-primeira ordem (LAGERGREN, 1898) e de pseudo-segunda ordem (HO; MCKAY, 1999). Ambos modelos são baseados na ordem de reação química e assumem que a taxa de sorção é proporcional ao número de sítios livres de ligação na superfície do material bioissorvente. O modelo é, geralmente, escolhido com base no valor dos coeficientes de determinação, mas, em geral, a maioria dos processos é melhor ajustada pelo modelo de pseudo-segunda ordem (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

### 3.6 ISOTERMAS DE BIOSSORÇÃO

As isotermas são relações termodinâmicas que descrevem o equilíbrio do processo de bioissorção. Elas indicam a capacidade de adsorção de um adsorvente, a relação entre a quantidade adsorvida por unidade de massa de bioissorvente e a concentração de equilíbrio do soluto na solução, a uma mesma temperatura e sob condição de equilíbrio. As isotermas fornecem a informação da distribuição do soluto entre as fases líquida e sólida em várias concentrações de equilíbrio (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013; RANGABHASHIYAM et al., 2014).

Em geral, o tempo ótimo de contato e os melhores parâmetros operacionais determinados pelos testes de cinética são usados para o estudo de isotermas. Então, ao agitar uma massa de material bioissorvente com volumes de solução com concentrações crescentes de soluto, em uma determinada temperatura, as amostras terão o seu equilíbrio atingido após um período de tempo. Nesta situação, o soluto terá uma distribuição definida entre as fases sólida e líquida. A partir desse procedimento, é possível construir isotermas de adsorção, relacionando a capacidade de sorção do sólido com a concentração residual do soluto a uma dada temperatura (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

Vários modelos de isotermas de dois parâmetros têm sido comumente utilizados para modelar o processo de adsorção, tais como Langmuir, Freundlich, Temkin e Dubinin-Radushkevich (CHEN, 2015). A isoterma de Langmuir é o modelo mais simples e utilizado. A teoria de Langmuir considera a formação de uma monocamada de adsorvato no exterior da superfície bioissorvente e representa a distribuição de equilíbrio do bioissorvato entre as fases sólida e líquida. Esse modelo se baseia nas seguintes hipóteses: cada sítio pode

acomodar uma, e somente uma, entidade adsorvida, satisfazendo a regra da monocamada; a energia de adsorção é constante e não depende do grau de ocupação dos sítios da superfície e nem da presença ou ausência de outras entidades adsorvidas nos sítios vizinhos; o biossorvente é estruturalmente homogêneo; todos os sítios de ligação são idênticos e energeticamente equivalentes; e as forças de ligações intermoleculares diminuem rapidamente com o afastamento das moléculas (RANGABHASHIYAM et al., 2014).

Segundo Chen (2015), a isoterma de Freundlich corresponde a uma distribuição não ideal e reversível do adsorvato no material adsorvente. Assume uma superfície heterogênea e pode ser aplicada a processos de multicamada. Este modelo admite a interação entre as moléculas adsorvidas e implica que a energia de adsorção decresce exponencialmente conforme ocorre a ligação das moléculas de adsorvato nos sítios de ligação. As constantes do modelo indicam o grau de linearidade e de não-linearidade do processo (RANGABHASHIYAM et al., 2014).

As isotermas de Temkin são caracterizadas por considerar os efeitos das interações indiretas entre as moléculas de adsorvato. Este modelo segue o princípio de que o processo de adsorção é caracterizado por uma distribuição uniforme da energia de ligação, até um máximo, e o calor de adsorção de todas as moléculas da camada diminui linearmente, não exponencialmente, com o grau de cobertura, devido às interações adsorvente-adsorvato (TEMKIN; PYZHEV, 1940).

Já a isoterma de Dubinin-Radushkevich, é aplicada para distinguir se o processo de adsorção é de natureza física ou química, para estimar a energia livre aparente e as características de adsorção. Neste modelo, a vizinhança da superfície do sólido é caracterizada por uma série de equipotenciais superficiais, ou seja, todos os pontos apresentam o mesmo potencial de sorção (DUBININ; RADUSHKEVICH, 1947; RANGABHASHIYAM et al., 2014).

### 3.7 DIGESTÃO *IN VITRO*

Métodos de digestão *in vitro* simulam os processos biológicos e são amplamente utilizados para estudar o comportamento gastrointestinal de alimentos ou fármacos. A

digestão simulada geralmente inclui a fase oral, gástrica, do intestino delgado e, ocasionalmente, a fase fermentativa no intestino grosso. Os métodos tentam mimetizar as condições fisiológicas *in vivo*, levando em consideração a presença de enzimas digestivas e suas concentrações, pH, tempo de cada fase, concentrações de sais (MINEKUS et al., 2014) e presença de bactérias normalmente presentes na flora gastrointestinal (COLES; MOUGHAN; DARRAGH, 2005).

Historicamente, os métodos de digestão *in vitro* tinham principal foco na simulação do trato digestivo superior, não considerando a importância nutricional da parte inferior. Entretanto, a busca por metodologias que se aproximem mais fielmente das condições *in vivo* culminou no surgimento de métodos que reconhecem o papel do intestino grosso na nutrição e na saúde intestinal (COLES; MOUGHAN; DARRAGH, 2005).

Os resultados do estudo de digestibilidade e bioacessibilidade de vários alimentos pode ser diferente ao comparar metodologias *in vivo* e *in vitro*. Isso acontece porque a digestão humana é dependente de muitos fatores e está relacionada com a composição do alimento, estrutura, quantidade e características enzimáticas. Entretanto, modelos *in vitro* têm sido cada vez mais aprimorados para simular a passagem de qualquer alimento pelo sistema gastrointestinal, visando aproximar cada fase do método às condições do organismo. Nesse contexto, a digestão *in vitro* é uma técnica barata e rápida, em comparação a estudos *in vivo*, além de não oferecer restrições éticas e representar uma alternativa para rastrear rapidamente o comportamento de alimentos durante a digestão, para modelo animal e humano. (LEE et al., 2016).

Algumas espécies de plantas e até compostos isolados não evidenciam efeitos positivos em estudos *in vitro*, mas apresentam um potencial antioxidante forte quando estudos *in vivo* são conduzidos, e vice-versa. Acontece que a bioacessibilidade efetiva de diferentes antioxidantes não é claramente definida. Enquanto muitos deles são digeridos na forma ativa, outros precisam ser metabolizados para se tornarem biologicamente ativos ou inativos. Além disso, a co-ingestão de outros nutrientes, fatores endógenos e suas variações podem afetar a bioacessibilidade em relação à dose ingerida (MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016).



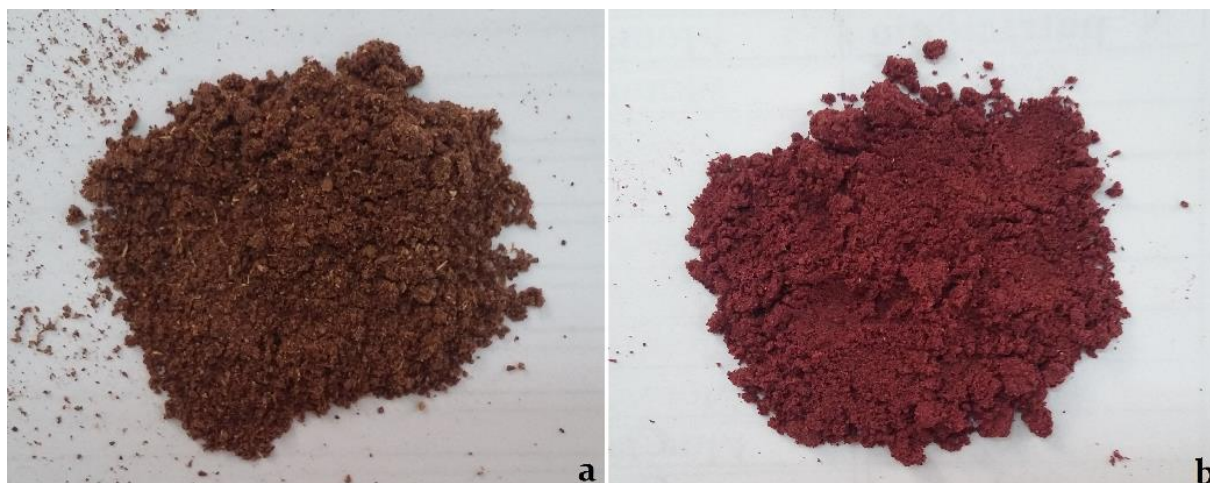
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

Ácido sulfúrico (Êxodo) e hidróxido de sódio (Dinâmica): modificação da biomassa de *S. cerevisiae*. Etanol P.A. (Sigma-Aldrich) diluído com água destilada para obter etanol 40%: preparo dos extratos. Carbonato de sódio (Sigma-Aldrich), ácido gálico (Dinâmica) e Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich): análises de compostos fenólicos totais. Análise de atividade antioxidante: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), metanol P.A. e Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) adquiridos da Sigma Aldrich. Ácido acético e metanol: CLAE. Digestão *in vitro*: bicarbonato de sódio (Dinâmica), ácido clorídrico, cloreto de sódio, cloreto de potássio (Dinâmica), pepsina, sais biliares e pancreatina (adquiridos da Sigma-Aldrich).

### 4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS DE BAGAÇOS DE UVA

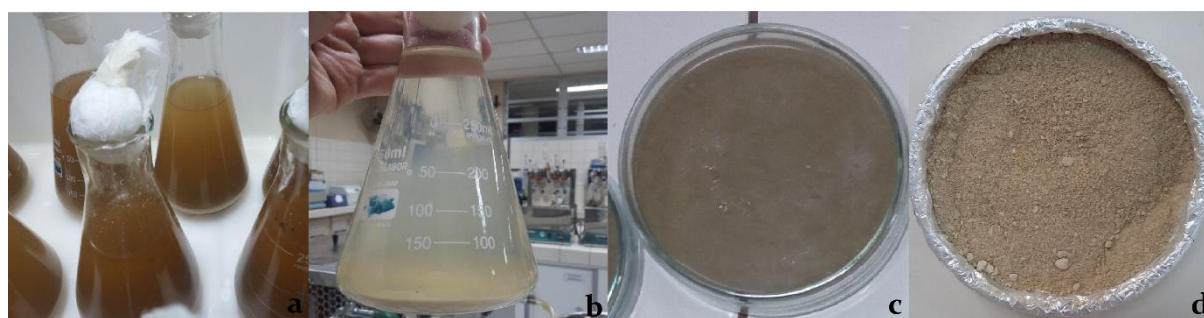
O bagaço de uva da variedade Bordeaux (espécie *Vitis labrusca*) foi cedido em 2013 pela cooperativa Coaviti, situada na cidade de Marialva, Paraná, Brasil. O material foi seco em forno com circulação forçada de ar (Tedesco turbo power expert), a 40 °C, por 36 horas. As uvas Cabernet Sauvignon (espécie *Vitis vinifera*), cultivadas na região de Toledo, Paraná – Brasil, safra de 2012, foram colhidas e pressionadas manualmente. O suco remanescente foi usado para produção vinífera tinta e o resíduo, considerado como bagaço, foi seco a 50 °C em forno com circulação de ar (QUIMIS), por 12 horas. Depois de secos, os bagaços das duas variedades (Figura 2) foram submetidos à moagem, em moinho de facas (SL 31, SOLAB), e embalados a vácuo ao abrigo de luz. O armazenamento foi feito em refrigerador, a uma temperatura de 4 °C, para utilização nas análises posteriores.



**Figura 2.** Amostras de bagaço de uva a) Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*) e b) Bordeaux (*Vitis labrusca*)

### 4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS DE LEVEDURA

As leveduras residuais da produção de cerveja tipo ale foram gentilmente cedidas pela Cervejaria Araucária, situada na cidade de Maringá, Paraná, Brasil. O material orgânico foi distribuído igualmente em frascos de Erlenmeyer de 250 mL e lavado com água destilada para completa retirada dos resíduos de cerveja. Após cada lavagem, a biomassa foi separada da água de lavagem por decantação. As leveduras lavadas foram secas pelo processo de liofilização (LIOTOP-L101) por 48 horas. Depois de seco, o material biológico foi embalado em placas Petri e armazenado sob congelamento a - 20 °C. A Figura 3 ilustra os passos do preparo das amostras.



**Figura 3.** Biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* a) durante a lavagem com água destilada, b) depois da retirada de resíduos de cerveja com diversas lavagens, c) úmida e d) seca por liofilização

## 4.4 MODIFICAÇÕES DO MATERIAL BIOSORVENTE

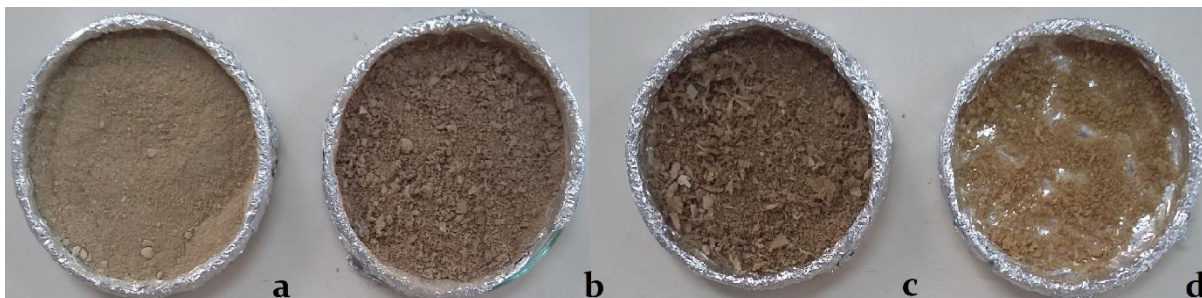
### 4.4.1 Modificação Ácida e Modificação Básica

Para os tratamentos ácido e básico, foram suspensos, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, 5 g de levedura seca em 500 mL de ácido sulfúrico 0,1 mol/L e 5 g de levedura seca em 500 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol/L, respectivamente (MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009). As suspensões foram agitadas em mesa agitadora orbital (MARCONI) a 125 rpm e temperatura ambiente, por 24 horas. Finalizados os tratamentos, as suspensões foram filtradas a vácuo, utilizando-se filtro quantitativo. Posteriormente, as leveduras foram liofilizadas (LIOTOP-L101) por 48 horas e armazenadas em temperatura de -20 °C.

### 4.4.2 Modificação Térmica

Em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, foram adicionados 250 mL de água destilada em 5 g de levedura seca. A suspensão foi autoclavada (autoclave vertical linha CS, PRISMATEC) a 121 °C por 20 minutos (MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009). Após o tratamento, a amostra foi filtrada a vácuo, em filtro quantitativo. A levedura retida no filtro foi coletada, seca por liofilização (LIOTOP-L101) por 48 horas e armazenada em congelador, a -20 °C.

A Figura 4 apresenta os quatro tipos de leveduras obtidas que foram utilizados para os experimentos posteriores.



**Figura 4.** Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* a) sem tratamento (controle), b) modificada por tratamento ácido, c) modificada por tratamento térmico (autoclavada), d) modificada por tratamento básico

#### 4.5 PREPARO DOS EXTRATOS

O preparo dos extratos de bagaços de uva das variedades Bordeaux e Cabernet Sauvignon foi realizado na proporção de 1 g de bagaço seco em pó para 20 mL de etanol 40% (IORA et al., 2015). As amostras, alocadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, foram agitadas em banho termostático com agitação (DIST 950M), a 125 rpm e temperatura ambiente. O tempo de extração foi fixado em 3 horas. Passado este período, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm, por 10 minutos, a fim de separar a parte sólida e o extrato etanólico líquido. O sobrenadante foi reservado e armazenado em refrigeração a 4 °C até a realização dos experimentos seguintes.

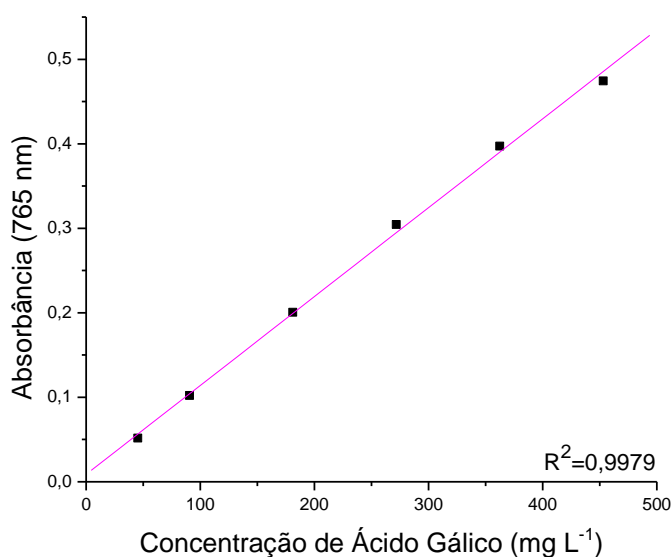
#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de compostos fenólicos totais presentes nas amostras foi estimado por ensaio colorimétrico seguindo o método proposto por Singleton e Rossi (1965). O preparo das amostras foi realizado sem a presença de luz, para que não houvesse degradação dos reagentes e dos compostos. 100 µL de cada sobrenadante devidamente diluído foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL contendo 5 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, 2 mL da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15% foram pipetados e o

volume da solução foi completado para 10 mL com água destilada. O branco para calibração no espectrofotômetro foi preparado seguindo o mesmo procedimento, entretanto, ao invés de 100 µL de sobrenadante, foram utilizados 100 µL da solução extratora, no caso, etanol 40%. Passado o tempo de duas horas de reação, no escuro e em temperatura ambiente, foi feita a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro portátil (USB650-UV-VIS, Ocean Optics), em 765 nm.

Os resultados, em absorvância, foram substituídos na equação linear (Equação 1) obtida pela curva padrão de ácido gálico (Figura 5) construída na faixa de 45-500 mg de ácido gálico por litro, e foram, então, expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG).

$$y = 0,0011x + 0,0088 \quad (1)$$



**Figura 5.** Gráfico da curva padrão de Ácido Gálico para quantificação de compostos fenólicos totais

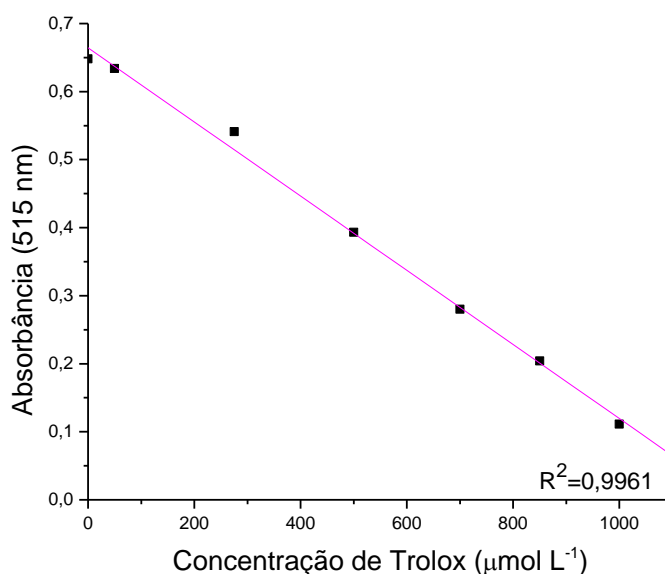
#### 4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método do radical livre 2,2-difenill-1-picrilhidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS; CUEVELIER; BERSET, 1995). O preparo das amostras foi realizado sem a presença de luz, para que não houvesse

degradação dos reagentes e dos compostos. 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram adicionados a 3,9 mL da solução de DPPH 0,06  $\text{mmol L}^{-1}$ . O branco de cada amostra foi preparado com 100  $\mu\text{L}$  de amostra e 3,9 mL do solvente de preparo da solução de DPPH (metanol). O controle negativo foi preparado com 3,9 mL de DPPH e 100  $\mu\text{L}$  de solução extratora de cada amostra.

Após meia hora de reação, no escuro e em temperatura ambiente, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro portátil (USB650-UV-VIS, Ocean Optics) em 515 nm. Os resultados, em absorvância, foram substituídos na equação linear (Equação 2) obtida pela curva padrão de Trolox (Figura 5b) e foram expressos em mmol de equivalente de Trolox por litro (mmol ET/L).

$$y = -0,0008x + 0,8189 \quad (2)$$



**Figura 6.** Gráfico da curva padrão de Trolox para determinação da atividade antioxidante

## 4.8 CINÉTICA DE BIOSSORÇÃO

As amostras destinadas ao experimento de cinética de bioissorção foram preparadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL na proporção de 0,05 g de levedura

seca para cada 12,5 mL de extrato. O experimento foi conduzido em banho termostático com agitação (DIST 950M) a 150 rpm, 25 °C e sob proteção da luz (MACIEL et al., 2013). As suspensões foram agitadas por períodos de 6 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 5 minutos e 1 minuto, e foram retiradas juntas. Após centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi utilizado para quantificar as concentrações finais de CFT em cada amostra. Foi preparada uma amostra controle (AC), contendo apenas 12,5 mL de extrato puro. Esse controle foi submetido às mesmas condições das outras amostras, a fim de determinar possíveis perdas de compostos fenólicos totais durante o processo, principalmente por adsorção na vidraria.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS BIOSSORVIDOS

A quantidade de CFT biossorvidos pela biomassa de leveduras ( $\text{mg g}^{-1}$  de biomassa seca) foi obtida através da Equação 3 (DABROWSKI, 2001).

$$q = \frac{C_o - C_f}{M} \cdot V \quad (3)$$

onde:  $q$  = capacidade de sorção ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $C_o$  = concentração inicial de CFT no extrato, antes da biossorção ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $C_f$  = concentração final de CFT no extrato ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $V$  = volume da fase aquosa (L);  $M$  = massa de levedura (g).

A concentração de compostos fenólicos perdida no extrato puro que foi submetido às mesmas condições do experimento de biossorção (AC) foi subtraída da  $C_f$ , a fim de descontar o conteúdo de compostos fenólicos que é adsorvido pela vidraria ou perdido durante o processo.

## 4.10 ADEQUAÇÃO DO MODELO CINÉTICO

As equações de pseudo-primeira ordem (LAGERGREN, 1898) e pseudo-segunda ordem (HO; MCKAY, 1999), Equação 4 e Equação 5, respectivamente, foram utilizadas para ajustar os dados experimentais de bioissorção aos modelos matemáticos.

$$\frac{1}{q} = \frac{K_1}{(q_e t)} + \frac{1}{q_e} \quad (4)$$

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (5)$$

onde:  $q$  = capacidade de sorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ) no tempo  $t$ ;  $q_e$  = capacidade de sorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ) no equilíbrio; e  $K_1$  e  $K_2$  são as constantes de velocidade das Equações 4 e 5, respectivamente. A escolha do melhor modelo foi feita com base na comparação entre os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) do ajuste linear e na comparação entre os valores experimentais e teóricos de capacidades de sorção.

## 4.11 ISOTERMAS DE BIOSSORÇÃO

Inicialmente, o extrato etanólico dos bagaços de uva foi diluído cinco vezes, utilizando 11, 9,5, 8,0, 6,5 e 5 mL de extrato puro e completando o volume para 12,5 mL com etanol 40%. 50 mg de biomassa foram suspensos em cada uma das seis soluções, nas diferentes concentrações, em erlenmeyers de 250 mL. Uma amostra controle (AC), contendo apenas extrato puro foi também preparada. Todas as amostras foram submetidas às mesmas condições do experimento de cinética de adsorção e pelo tempo de equilíbrio obtido a partir do mesmo (6 horas para a levedura controle e 4 horas para as leveduras modificadas).

Após o experimento de bioissorção, as suspensões foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos. Todos os sobrenadantes foram quantificados em relação



ao conteúdo de CFT. As leveduras remanescentes da centrifugação das amostras preparadas com 12,5 mL de extrato puro (não diluídas) foram liofilizadas e armazenadas para as análises de MIR-ATR (Espectroscopia de infravermelho médio com reflectância total atenuada), MEV (microscópio eletrônico de varredura) e difratometria de raio X.

Para descrever e avaliar o comportamento do processo de biossorção dos CFT na biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizados os modelos de Langmuir (LANGMUIR, 1916), Freundlich (FREUNDLICH, 1906), Temkin (TEMKIN; PYZHEV, 1940) e Dubinin-Radushkevich (DUBININ; RADUSHKEVICH, 1947), Equações 6 a 9, apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Modelos de Isotermas de Adsorção

Isoterma	Equação	
Langmuir	$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_0 K_L} + \frac{C_e}{q_0}$	(6)
Freundlich	$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e$	(7)
Temkin	$q_e = B \ln A + B \ln C_e$	(8)
Dubinin-Radushkevich	$\ln q_e = \ln q_s - \beta \varepsilon^2$	(9)

onde:  $q_e$  = capacidade máxima de sorção em equilíbrio (mg g<sup>-1</sup>);  $C_e$  = concentração de equilíbrio na solução (mg L<sup>-1</sup>);  $q_0$  = capacidade de cobertura máxima em monocamada (mg g<sup>-1</sup>);  $K_L$  = constante da isoterma de Langmuir (L mg<sup>-1</sup>);  $A$  = constante da isoterma de ligação de equilíbrio (L g<sup>-1</sup>);  $B$  = constante da isoterma de Temkin (J mol<sup>-1</sup>);  $K_F$  = constante da isoterma de Freundlich (L g<sup>-1</sup>);  $n$  = intensidade de adsorção;  $q_s$  = capacidade de saturação teórica (mg g<sup>-1</sup>);  $\beta$  = constante da isoterma de Dubinin-Radushkevich [mol<sup>2</sup> (KJ<sup>2</sup>)<sup>-1</sup>];  $\varepsilon$  = potencial de Polanyi.

A constante adimensional “ $R_L$ ”, do modelo de Langmuir, também chamada de fator de separação ou parâmetro de equilíbrio, pôde ser calculada através da Equação 10 (LANGMUIR, 1916).

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (10)$$

na qual  $C_0$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) expressa a concentração inicial adsorvida em solução aquosa e  $K_L$  ( $\text{L mg}^{-1}$ ) é a constante de Langmuir.

No modelo da isoterma de Temkin, o parâmetro B foi determinado pela Equação 11 (TEMKIN; PHYZEV, 1940).

$$B = \frac{RT}{b} \quad (11)$$

onde T é a temperatura absoluta (K); R se trata da constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ); e b é o coeficiente angular da relação linear da isoterma de Temkin.

Para o cálculo do Potencial de Polanyi, do modelo de Dubinin-Radushkevich, foi utilizada a Equação 12 (DUBININ; RADUSHKEVICH, 1947).

$$\varepsilon = RT \ln \left( 1 + \frac{1}{C_e} \right) \quad (12)$$

onde R é a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ); T é a temperatura absoluta (K); e  $C_e$  é a concentração de equilíbrio na solução ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

A energia livre de adsorção (E) foi calculada utilizando a Equação 13 (HAMAYUN et al., 2014).

$$E = \frac{1}{\sqrt{-2\beta}} \quad (13)$$

onde  $\beta$  é a constante da isoterma de Dubinin-Radushkevich [ $\text{mol}^2 (\text{KJ}^2)^{-1}$ ].

#### 4.13 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para comparar o perfil dos compostos fenólicos (“fingerprint”) nos extratos de bagaços de uva antes e depois dos experimentos de biossorção. Um equipamento de CLAE (Shimadzu Prominence) com

detector de arranjo de fotodiodos foi utilizado nos ensaios. A fase móvel consistiu em água acidificada 1% (v/v) com ácido acético (fase A) e metanol (fase B). A taxa de fluxo usada foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup> segundo o seguinte gradiente: 0–10% de B por 2 minutos; 10–20% de B por 3 minutos; 20–30% de B por 5 minutos; 30–35% de B por 5 minutos; 35–50% de B por 10 minutos; 50–60% de B por 5 minutos; 60–80% de B por 5 minutos; 80–100% de B por 10 minutos. Por fim, lavagem e acondicionamento da coluna com 100% de B por 7 minutos, 100-5% por 5 minutos. O volume de injeção foi de 10 µL e a separação foi feita por meio de uma coluna Acclaim® 120 C18, de 4,6 mm x 250 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Dionex, UT, USA). Os compostos fenólicos foram monitorados em 280 nm.

## 4.14 CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS

### 4.14.1 Espectroscopia no Infravermelho Médio com Reflectância Total Atenuada (MIR-ATR)

Com o intuito de possibilitar comparações entre os grupamentos funcionais de cada amostra, a análise de MIR-ATR foi realizada com doze amostras: os quatro tipos de levedura (uma controle e três tratadas) e os quatro tipos de leveduras com compostos fenólicos bioabsorvidos dos extratos dos dois bagaços de uva. Utilizou-se um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (VARIAN, 640-IR) e um acessório de reflectância total atenuada (PIKE, miracle), com cristal de seleneto de zinco. Os espectros foram obtidos na região do infravermelho médio, na faixa de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. Antes da análise de cada amostra, foi feita a leitura de um *background* do ar, para descontar a influência dos componentes do ar nos espectros.

#### 4.14.2 Difração de raio X

A técnica espectroscópica de raio X por difração de energia foi feita com os quatro tipos de leveduras estudados, sem e com compostos bioissorvidos dos extratos de bagaços de uva. As amostras foram colocadas em um porta-amostra e analisadas por um difratômetro de raio X (Shimadzu, XRD-7000), operando com radiação  $\text{Cu}_{k\alpha}$  (comprimento de onda de 1,506 nm) a um tempo de varredura de 0,5 s. A região de varredura do ângulo de difração foi de 10-80° ( $2\theta$ ), usando um gerador de tensão de 40 kV e uma corrente emissora de 40 mA.

#### 4.14.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com as amostras de leveduras sem tratamento e modificadas, com e sem compostos fenólicos totais bioissorvidos dos dois extratos de bagaços de uva utilizados. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss, EVO MA 15. As amostras foram metalizadas com liga de ouro/paládio sob condição de vácuo e, então, foram produzidas as imagens microscópicas.

### 4.15 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA *IN VITRO*

O procedimento foi realizado como descrito por Koehnlein et al. (2016), com algumas modificações. Foram utilizadas quatro amostras diferentes no experimento: extrato antes da bioissorção, extrato após bioissorção, levedura antes da bioissorção e levedura após bioissorção. As leveduras foram suspensas com etanol a 40% (v/v). Foi também preparado um branco com etanol 40% para reduzir interferências ou uma provável contribuição de constituintes não-antioxidantes na capacidade antioxidante total. As amostras foram submetidas a um modelo *in vitro* simulando a digestão gástrica e intestinal.

O pH das amostras foi ajustado para 1,2 por adição de HCL 5 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, para cada 10 mL de amostra, adicionaram-se 30 mL de fluido gástrico simulado (preparado com pepsina 3,2 g L<sup>-1</sup> em solução de NaCl 0,03 mol L<sup>-1</sup>) após agitação a 150 rpm, durante 120 min e 37 °C em proteção da luz. Depois das 2 horas, a digestão com pepsina foi interrompida mantendo as amostras em banho de gelo durante 10 minutos. Depois disso, o pH das amostras foi ajustado para 6,0 com NaHCO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, para simular o ambiente intestinal. Após a adição de 5 mL de NaCl 120 mmol L<sup>-1</sup> e 5 mL de KCl 5 mmol L<sup>-1</sup>, adicionaram-se 30 mL de fluido intestinal recentemente preparado (preparado por dissolução de 0,05 g de pancreatina e 0,3 g de sais biliares para cada 35 mL solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>). A mistura final foi agitada durante 60 minutos, sob as mesmas condições de incubação. Finalizada a digestão, os frascos foram mantidos em gelo durante 10 minutos adicionais e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes recolhidos no final do processo foram armazenados a -20 °C até a realização das análises de CFT e capacidade antioxidante.

As porcentagens de bioacessibilidade foram calculadas pela Equação 14, onde  $D$  é o conteúdo de CFT dividido pela capacidade antioxidante, ambos da fração bioacessível (após digestão intestinal);  $I$  é o conteúdo inicial de CFT dividido pela capacidade antioxidante antes da digestão (JILANI et al., 2015).

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \left(\frac{D}{I}\right) \times 100 \quad (14)$$

#### 4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste t de Student foi utilizado para comparação entre duas médias. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando o valor de p era menor que 5%. A análise foi feita pelo *software* STATISTICA 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). A análise dos componentes principais (ACP) foi utilizada para investigar diferenças entre os espectros obtidos pela espectroscopia no infravermelho médio. O pré-processamento dos dados consistiu em correção de linha de base, alisamento com correção de espalhamento multiplicativo (MSC) e isolamento da área de “fingerprint”. A ACP e o pré-processamento foram feitos pelo *software* MATLAB R2013a (The MathWorks Inc., Natick, USA).

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLALI, A. et al. Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 57-66, 2014.

AKAR, T.; CELIK, S.; AKAR, S. T. Biosorption performance of surface modified biomass obtained from *Pyracantha coccinea* for the decolorization of dye contaminated solutions. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 466-472, 2010.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 99-1026, 2005.

ALBADARIN, A. B.; MANGWANDI, C. Mechanisms of Alizarin Red S and Methylene blue biosorption onto olive stone by-product: Isotherm study in single and binary systems. **Journal of Environmental Management**, v. 164, p. 86-93, 2015.

AMIRNIA, S.; RAY, M. B.; MARGARITIS, A. Heavy metals removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae* in a novel continuous bioreactor biosorption system. **Chemical Engineering Journal**, v. 264, p. 863-872, 2015.

AMORIM, M. et al. Nutritional ingredients from spent brewer's yeast obtained by hydrolysis and selective membrane filtration integrated in a pilot process. *Journal of Food Engineering*, v. 185, p. 42-47, 2016.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007

ARIEF, V. O. et al. Recent Progress on Biosorption of Heavy Metals from Liquids Using Low Cost Biosorbents: Characterization, Biosorption Parameters and Mechanism Studies. **Clean – Soil, Air, Water**, v. 36, p. 937-962, 2008.

ASADI, S. et al. *In vitro* antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: A comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1341-1349, 2010.

BARCIA, M. T. et al. Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. **Food Chemistry**, v. 159, p. 95-105, 2014.

BACELO, H. A. M.; SANTOS, S. C. R.; BOTELHO, C. M. S. Tannin-based biosorbents for environmental applications – A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 303, p. 575-587, 2016.

BORBA, C. E. et al. Removal of nickel(II) ions from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: Experimental and theoretical breakthrough curves. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 184-191, 2006.

BORBA, C. E. et al. Estudo da cinética e do equilíbrio de adsorção dos corantes azul turquesa QG e amarelo reativo 3R em carvão ativado. **Engevista**, v. 14, n. 2, p. 135-142, 2012.

BRADY, D.; DUNCAN, J. R. Cation loss during accumulation of heavy metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 543-548, 1994.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Food Bioscience**, v. 11, p. 8-16, 2015.

CHANG, X. L. et al. Adsorption and desorption properties of macroporous anthocyanins from the calix extract of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 2368-2376, 2012.

CHEN, X. Modeling of Experimental Adsorption Isotherm Data. **Information**, v. 6, p. 14-22, 2015.

COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 421-444, 2005.

DABROWSKI, A. Adsorption – from theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 135-224, 2001.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37, p. 4311-4330, 2003.

DE LIMA, A. C. S. et al. Processing of three different cooking methods of cassava: Effects on *in vitro* bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, in press, 2016.

DI MAURO, A. et al. Recovery of anthocyanins from pulp wash of pigmented oranges by concentration on resins. **Food Chemistry**, v. 50, p. 5968-5974, 2002.

DUMITRIU, D. et al. Grape pomace extract improves the *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro Ximénez grapes. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p.380-387, 2015.

DUBININ, M. M.; RADUSHKEVICH, L. V. Equation of the characteristic curve of activated charcoal. **Proceedings of the Academy of Science, Physical Chemistry Section, U.S.S.R.**, v. 55, p. 331-333, 1947.

EL-GENDY, N. S. Statistical optimization of Basic Blue 41 dye biosorption by *Saccharomyces cerevisiae* spent waste biomass and photo-catalytic regeneration

using acid TiO<sub>2</sub> hydrosol. **Journal of Water Process Engineering**, v. 6, p. 193-202, 2015.

FARHADI, K. et al. Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. **Food Chemistry**, v. 199, p. 847-855, 2016.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p.77-84, 2010.

FOMINA, M.; GADD, G. M.; Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 3-14, 2014.

FREUNDLICH, H. Over the adsorption in the solution. **Journal Physical Chemistry**, v. 57, p. 384-410, 1906.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 13-28, 2009.

GAEDHI, M. et al. *Saccharomyces cerevisiae* for the biosorption of basic dyes from binary component systems and the high order derivative spectrophotometric method for simultaneous analysis of Brilliant green and Methylene blue. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, p. 227-233, 2013.

GHORBANI, F. et al. Biomass-derived biosorbents for metal ions sequestration: Adsorption modification and activation methods and adsorbent regeneration. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 239-259, 2014.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. et al. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 506-514, 2015.

HAMAYUN, M. et al. Equilibrium and kinetics studies of arsenate adsorption by FePO<sub>4</sub>. **Chemosphere**, v. 99, p. 207-215, 2014.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1529-1537, 2011.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2023-2024, 2012.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochem.**, v. 34, p. 451-465, 1999.

HOSEINIFAR, S. H.; MIRVAGHEFI, A.; MERRIFIELD, D. L. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth,



physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). **Aquaculture**, v. 318, p. 90-94, 2011.

IORA, S. R. F. et al. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 62-69, 2015.

JARA-PALACIOS, M. J. et al. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**, v. 183, p. 78-82, 2015.

JELÍNEK, L. et al. *Chlorella vulgaris* biomass enriched by biosorption of polyphenols. **Algal Research**, v. 10, p. 1-7, 2015.

JIANLONG, W. Biosorption of copper(II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 847-850, 2002.

JILANI, H. et al. Biosorption of green and black tea polyphenols into *Saccharomyces cerevisiae* improves their bioaccessibility. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 11-21, 2015.

JILANI, H. et al. Improved bioaccessibility and antioxidant capacity of olive leaf (*Olea europaea* L.) polyphenols through biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 131-138, 2016.

KAMMERER, D. et al. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L.cv. Cabernet Mito) using a polymeric adsorber resin. **European Food Research and Technology**, v. 220, p. 431-437, 2005.

KIM, T.; LEE, J.; CHO, S. Application of residual brewery yeast for adsorption removal of Reactive Orange 16 from aqueous solution. **Advanced Powder Technology**, v. 26, p. 267-274, 2015.

KOEHNLEN, E. A. et al. Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, p. 614-623, 2016.

KOHNO, Y. et al. Adsorption behavior of natural anthocyanin dye on mesoporous silica. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 75, p. 48-51, 2014.

KUMAR, N. S.; WOO, H. S.; MIN, K. Equilibrium and kinetic studies on biosorption of 2,4,6-trichlorophenol from aqueous solutions by *Acacia leucophala* bark. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 125-132, 2012.

LAGERGREN, S. Zur theorie der sogenannten adsorption gel oster stoffe Sven K. Vetenskapsakad. **Handlingar**, v. 24, p. 1-39, 1898.

LAJILI, S. et al. Anti-inflammatory, analgesic activities and gastro-protective effects of the phenolic contents of the red alga, *Laurencia obtusa*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, p. 298-306, 2016.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, p. 2221-2295, 1916.

LEE, S. J. et al. Development of novel *in vitro* human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. **Journal of Functional Foods**, v. 22, 113-121, 2016.

LEE, S. Y. H. et al. The reaction of flavonols with nitrous acid protects against N-nitrosamine formation and leads to the formation of nitroso derivatives which inhibit cancer cell growth. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 323-334, 2006.

LIMCHAROENSUK, T. et al. Bioaccumulation and biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 322-330, 2015.

LIU, X. et al. Adsorption Characteristics of Anthocyanins from purple-fleshed potato (*Solanum tuberosum* Jasim) extract on macroporous resins. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, p. 1-16, 2007.

LÓPEZ-MIRANDA, S. et al. Use of cyclodextrins to recover catechin and epicatechin from red grape pomace. **Food Chemistry**, v. 203, p. 379-385, 2016.

MACHADO, S. et al. Utilization of food industry wastes for the production of zero-valent iron nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v. 496, p. 233-240, 2014.

MACIEL, G. M. et al. Biosorption of herbicide picloram from aqueous solutions by live and heat-treated biomasses of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Trametes* sp. **Chemical Engineering Journal**, v. 215-216, p. 331-338, 2013.

MAHMOUD, M. S. Decolorization of certain reactive dye from aqueous colution using Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain. **HRBC Journal**, v. 12, p. 88-98, 2016.

MARTINS, N.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 1-12, 2016.

MATHIALAGAN, T.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 549-558, 2009.

MEDOUNI-ADRAR, S. et al. Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 123-132, 2015.

MELO, P. S. et al. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160-169, 2015.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of art for the biosorption process – A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1389-1416, 2013.

MINEKUS, M. et al. A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v. 5, p. 1113-1124, 2014.

MORATA, A. et al. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4084-4088, 2003.

MOSELE, J. I. et al. Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation. **Food Chemistry**, v. 201, p. 120-130, 2016.

NGAH, W. S. W.; HANAFIAH, M. A. K. M. Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3935-3948, 2008.

PARK, D.; YUN, Y. S.; PARK, J. M. The past, present and future trends of biosorption. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 86-102, 2010.

PINACHO, R. et al. Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 49-62, 2015.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 579-590, 2006.

PINTO, M. et al. Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 215-222, 2015.

PRADO, N.; OCHOA, J.; AMRANE, A. Biodegradation and biosorption of tetracycline and tylosin antibiotics in activated sludge system. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1302-1306, 2009.

RANGABHASHIYAM, S. Relevance of isotherm models in biosorption of pollutants by agricultural byproducts. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 398-414, 2014.

RATHOD, M.; HALDAR, S.; BASHA, S. Nanocrystalline cellulose for removal of tetracycline hydrochloride from water via biosorption: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Ecological Engineering**, v. 84, p. 240-249, 2015.

RAZMKHAB, S. et al. Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7432-7437, 2002.

ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

ROCKENBACH, I. I. et al. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis Labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011.

SANTOS, C. et al. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 168-175, 2010.

SCORDINO, M. et al. Adsorption of flavonoids on resins: hesperidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6998-7004, 2003.

SCORDINO, M. et al. Adsorption of flavonoids on resins: cyaniding 3-glucoside. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1965-1972, 2004.

SHENG, P. X.; TING, Y. P.; CHEN, J. P. Biosorption of Heavy Metal Ions (Pb, Cu, and Cd) from Aqueous Solutions by the Marine Alga *Sargassum sp.* In Single – and Multiple – Metal Systems. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 2438-2444, 2007.

SILVA, L. R.; QUEIROZ, M. Bioactive compounds of red grapes from Dão region (Portugal): Evaluation of phenolic and organic profile. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, p. 315-321, 2016.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SINGH, B. et al. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – A review. **Food Chemistry**, v. 206, p. 1-11, 2016.

SRIVASTAVA, S.; AGRAWAL, S. B.; MONDAL, M. K. Biosorption isotherms and kinetics on removal of Cr(VI) using native and chemically modified *Lagerstroemia speciosa* bark. **Ecological Engineering**, p. 56-66, 2015.

STAFUSSA et al. Biosorption of anthocyanins from grape pomace extracts by waste yeast: kinetic and isotherm studies. **Journal of Food Engineering**, v. 169, p. 53-60, 2016.

STRANDBERG, G. W.; SCHMATE, S. E.; PARROT, J. R. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 41, p. 237-245, 1981.

SUN, F. et al. Biosorption of antimony(V) by freshwater cyanobacteria *Microcystis* biomass: Chemical modification and biosorption mechanisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, p. 1082-1090, 2011.

TEMKIN, M. J.; PYZHEV, V. Recent modifications to Langmuir isotherms. **Acta Physicochimica**, v. 12, p. 217-222, 1940.

TOURNOUR, H. H. et al. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 397-406, 2015.

ULLRICH, A. H.; SMITH, M. W. The Biosorption Process of Sewage and Waste Treatment. **Sewage and Industrial Wastes**, v. 23, n. 10, p. 1248-1253, 1951.

VIJAYARAGHAVAN, K.; BALASUBRAMANIAN, R. Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. **Journal of Environmental Management**, v. 160, p. 283-296, 2015.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y. S. Bacterial biosorbents and biosorption. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 266-291, 2008.

VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water Research**, v. 41, p. 4017-4029, 2007.

VU, K. D. et al. Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the antiproliferative activity against two colon cancer cell lines. **Food Chemistry**, v. 132, p. 959-967, 2012.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 427-451, 2006.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 195-226, 2009.

XU, L. et al. Characterization of the biosorption and biodegradation properties of *Ensifer adhaerens*: A potential agent to remove polychlorinated biphenils from contaminated waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 302, p. 314-322, 2016.

YU, J. X. et al. Polymer modified biomass of baker's yeast for enhancement adsorption of methylene blue, rhodamine B and basic magenta. *Journal of Hazardous Materials*, v. 168, p. 1147-1154, 2009.

ZAGKLIS, D. P.; PARASKEVA, C. A. Purification of grape marc phenolic compounds through solvent extraction, membrane filtration and resin adsorption/desorption. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 328-335, 2015.

1 **6 ARTIGO – BIOMASS OF *Saccharomyces cerevisiae* ENRICHED**  
2 **WITH PHENOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE POMACE EXTRACTS:**  
3 **BIOSORPTION AND BIOACCESSIBILITY STUDIES**

4  
5 Fernanda Thaís Vieira Rubio<sup>a</sup>, Marcos Vieira da Silva<sup>b</sup>, Giselle Maria Maciel<sup>c</sup>, Vanesa  
6 Correia Gesser<sup>d</sup>, Rosane Marina Peralta<sup>d</sup>, Charles Windson Isidoro Haminiuk<sup>a,c,\*</sup>

7  
8 <sup>a</sup> *Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de*  
9 *Alimentos (PPGTA), Campus Campo Mourão, CEP (87301-899), PR, Brazil.*

10 <sup>b</sup> *Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento Acadêmico de Alimentos (DALIM),*  
11 *Campus Campo Mourão, CEP (87301-899), PR, Brazil.*

12 <sup>c</sup> *Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento Acadêmico de Química e Biologia*  
13 *(DAQBi), Campus Ecoville, CEP (81280-340), PR, Brazil.*

14 <sup>d</sup> *Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPC),*  
15 *Campus Maringá, CEP (87020-900), PR, Brazil.*

16  
17 **Abstract**

18 *Saccharomyces cerevisiae* biomass obtained from brewing industry was thermally and  
19 chemically modified and applied for the biosorption of phenolic compounds from Cabernet  
20 Sauvignon and Bordeaux grape pomace extracts. Yeasts prepared by alkaline treatment  
21 showed the best performance in the uptake of phenolic compounds, with the highest  
22 sorption capacity of 190.28 mg g<sup>-1</sup> when in contact with Cabernet Sauvignon extract, 93.2%  
23 higher in comparison to non-treated yeast biomass. Biosorption was able to increase the  
24 bioaccessibility of grape pomace extracts. Alkaline pretreated yeasts showed an antioxidant  
25 capacity of 188.90 μmol TE L<sup>-1</sup>, 196% higher than yeasts without treatment, and a  
26 bioaccessibility 147% higher than control yeast suspension. Enriched biomasses display an  
27 important role in the preservation of the antioxidant capacity and in the bioaccessibility of  
28 compounds even after an *in vitro* digestion.

29  
30 Keywords: By-product; *in vitro* digestion, structural characterization, yeast modification.

31  
32  
33  
34

## 35 1 INTRODUCTION

36

37 The increasing demand from food, cosmetic and pharmaceutical industries and the  
38 concern about the large amount of agricultural residues annually generated have aroused  
39 special interest in waste materials which, even after being processed, still contain significant  
40 amounts of bioactive compounds. Wine production, specifically, gained attention in recent  
41 years due to the antioxidants present in its by-products, especially phenolic compounds  
42 (González-Centeno, Comas-Serra, Femenia, Rosselló, & Simal, 2015).

43 In wine elaboration, phenolic compounds of grapes are transferred to the must  
44 during the maceration stage. However, since the major content of phenolic compounds is  
45 derived from the solid parts of the grape, a large proportion of these compounds still remain  
46 retained in the plant tissues leftover: the grape pomace (Barcia, Pertuzatti, Gómez-Alonso,  
47 Godoy, & Hermosín-Gutiérrez, 2014; Jara-Palacios et al., 2015). It is estimated that for  
48 every six liters of wine produced, one kilogram of pomace is discarded (Tournour et al.,  
49 2015). As a cost effective and sustainable source of bioactive compounds with high  
50 biological value, that pomace can be incorporated into foods as additive substitutes or new  
51 ingredients (Jara-Palacios et al., 2015; Melo et al., 2015).

52 Phenolic compounds of grapes are responsible not only for important  
53 characteristics of wine – such as color, astringency, flavor and body – but are also related  
54 to beneficial effects on human health, with the moderate consumption of beverage (López-  
55 Miranda et al., 2016). The phenolic compounds play an important role in cell protection  
56 ascribed to their capacity of scavenging or inhibiting different species of reactive oxygen,  
57 transferring electrons to free radicals, activating antioxidant enzymes and inhibiting oxidase  
58 enzymes (Dumitriu, Peinado, Peinado, & de Lerma, 2015). Besides, those compounds  
59 have protective action against the oxidative stress, which has been suggested as the root  
60 cause of aging and human disorders such as arteriosclerosis, diabetes, cancer and  
61 neurodegenerative diseases (Asadi et al., 2010), and they are often associated with the  
62 inhibition of cancer cells growth (Jara-Palacios et al., 2015; Lee, Lee, Chung, Myung-SLee,  
63 S.-J., Lee, S. Y., Chung, M.-S., & Hur, S. J. (2016). Development of novel in vitro human  
64 digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. *Journal of*  
65 *Functional Foods*, 22, & Hur, 2016; Vu et al., 2012), anti-inflammatory, analgesic,  
66 gastroprotective (Lajili, Azouaou, Turki, Muller, & Bouraoui, 2016) and antimicrobial actions  
67 (Cetin-Karaca & Newman, 2015).

68           Although the antioxidant activity of plants and foods is widely discussed, there are  
69 few studies that attempt to investigate the effect of gastrointestinal digestion on bioactive  
70 compounds. The amount of total phenolic compounds and antioxidants present in a food  
71 matrix does not reflect the total content available for metabolization by the human body,  
72 since only those compounds that are not degraded will be bioavailable for absorption and  
73 performance of their biological function in the body. Once digested, the food components  
74 are constantly exposed to different physical, chemical and biochemical conditions. As a  
75 consequence, the bioactive compounds can be modified and their biological activity altered  
76 (Mosele, Maciá, Romero, & Motilva, 2016; Pinacho, Cavero, Astiasarán, Ansorena, &  
77 Calvo, 2015). Hence, the importance of tests such as *in vitro* digestion, capable of simulating  
78 physiological conditions of the human digestive process, including the mouth, stomach and  
79 intestines (de Lima et al., 2017).

80           Jilani, Cilla, Barberá, & Hamdi (2015) studied the *in vitro* digestion of green and  
81 black tea phenolic compounds biosorbed into yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and  
82 showed that there was, in general, an increase in the antioxidant activity after biosorption  
83 and digestion. The complex formed between yeast cells and phenolics prevented structural  
84 changes in the teas antioxidants during different digestion conditions, especially in the  
85 gastric phase, increasing the bioaccessibility of phenolic compounds in both infusions. The  
86 authors demonstrated that the biosorption by yeast is a promising means to protect the  
87 bioactivity of antioxidants during digestion, acting as an effective delivery system.

88           *Saccharomyces* spp. represents the second major residue of brewing production  
89 and gains attention in the food industry mainly because of its high nutritional value: the  
90 biomass is predominantly composed of proteins (35 to 60% in dry basis) and can be reused  
91 to produce protein concentrates and isolates without losing their functional and nutritional  
92 properties. In addition to being an excellent source of proteins, yeasts represent an  
93 inexpensive source of nitrogen, whereas they have 35-45% of carbohydrates in dry basis,  
94 minerals (Ca, Mg, K, and Fe), lipids, B vitamins and immunostimulatory compounds, such  
95 as  $\beta$ -glucans and nucleic acids (Amorim et al., 2016; Ferreira, Pinho, Vieira, & Tavela,  
96 2010; Hoseinifar, Mirvaghefi, & Merrifield, 2011). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in  
97 particular, is generally recognized as safe (GRAS) and can be easily accepted by the public  
98 when applied in food or pharmaceutical formulations (Wang & Chen, 2006). Yeast protein  
99 concentrates, for example, can be found in the form of powders, flakes or tablets, which can  
100 be mixed with solid or liquid foods (Ferreira et al., 2010).



101 Yeast cells hydrolyzed by extreme physical or chemical conditions may have  
102 different accumulation properties, compared to the original yeast. In view of this, various  
103 modifications of chemical and physical nature have been investigated in an attempt to alter  
104 the functional groups and characteristics of the cell surface, removing or masking the  
105 functional groups or exposing binding sites, in order to improve the biosorbent materials and  
106 their binding capacity (Abdolali et al., 2014; Wang & Chen, 2009).

107 Solid and liquid residues generated by the food industry does not only represent an  
108 environmental problem but also a loss of valuable products (Machado, Grosso, Nouws,  
109 Albergaria, & Delerue-Matos, 2014). In this context, biosorption allows the recovery of  
110 bioactive compounds that would be lost with the disposal and also reflects an option for the  
111 reuse of biomass with great nutritional potentials, even after its unfeasibility in the beer  
112 fermentation process. Thus, the by-products generated can be transformed into new value-  
113 added items.

114 Therefore, the objectives of this study were: (i) to enrich the biomass of *S.*  
115 *cerevisiae* with bioactive compounds from grape pomace through biosorption; (ii) to  
116 investigate which biomass provides the highest sorption of phenolic compounds, using  
117 different analytical techniques, such as HPLC, MIR-ATR, X-ray diffraction and SEM; (iii) to  
118 perform the *in vitro* digestion in order to verify the influence of gastrointestinal conditions in  
119 the bioaccessibility of phenolic compounds. Also, this is the first work in the scientific  
120 literature that provides a better understand of the biosorption of bioactive compounds from  
121 grape pomace in different modified biomasses of *Saccharomyces cerevisiae*.

122

## 123 **2 MATERIALS AND METHODS**

124

### 125 **2.1 Reagents**

126 All chemicals and solvents used in this work were of analytical grade (>99%).  
127 Sulfuric acid was obtained from Êxodo Científica (Hortolândia, SP, Brazil). Gallic acid and  
128 sodium hydroxide, sodium bicarbonate, hydrochloric acid, sodium chloride and potassium  
129 chloride were acquired from Dinâmica (Diadema, SP, Brazil). Ethanol, acetic acid, Folin-  
130 Ciocalteu, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-  
131 tetramethylchroman-2-carboxylic acid), sodium carbonate, methanol HPLC grade, pepsin,  
132 bile salts and pancreatin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

133

134

## 135                    **2.2 Grape pomace samples**

136                    In this work, two varieties of grape pomace were used: Bordeaux (*Vitis labrusca*)  
137 and Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). The Bordeaux grape pomace was provided by  
138 Coaviti Cooperative (Marialva, PR, Brazil). The material was dried in an oven with forced air  
139 circulation (Tedesco turbo power expert) at 40 °C for 24 hours. The Cabernet Sauvignon  
140 grape pomace, from the region of Toledo, Paraná - Brazil, was dried at 50 °C in an oven  
141 with forced air circulation (QUIMIS) for 12 hours. After drying, the two varieties of pomace  
142 were ground in a knife mill (SL 31, SOLAB), vacuum packed and stored in dark environment  
143 at 4 °C, until subsequent analysis.

144

## 145                    **2.3 Biosorbent preparation**

146                    The brewery waste yeast, used in the pale ale brewing, was kindly provided by  
147 Cervejaria Araucária (Maringá, PR, Brazil). The organic material was washed with distilled  
148 water until complete removal of the beer residue. The biomass was separated from the  
149 wash water by decantation and then it was dried by lyophilization (LIOTOP-L101) for 48  
150 hours. After drying, the yeast was packed in Petri dishes and stored at -20 °C.

151

## 152                    **2.4 Chemical and thermal conditioning of *Saccharomyces cerevisiae***

153                    The control yeast biomass was modified by chemical and thermal processes  
154 following Mathialagan & Viraraghavan (2009) methodology, with minor modifications.  
155 For acid and basic treatments, 5 g of dried yeast were suspended in 500 mL of 0.1 mol  
156 L<sup>-1</sup> sulfuric acid and 5 g of dried yeast were added to 500 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium  
157 hydroxide, respectively. Suspensions were shaken on an orbital shaker table  
158 (MARCONI) at 125 rpm and 25 °C for 24 hours. For thermal treatment, 5 g of dried  
159 yeast were added to 250 mL of distilled water. The suspension was autoclaved (vertical  
160 line autoclave CS, PRISMATEC) at 121 °C for 20 minutes. After all treatments,  
161 suspensions were vacuum filtered and the retained biomass was collected, dried by  
162 lyophilization (LIOTOP-L101) for 48 hours and stored at -20 °C.

163

## 164                    **2.5 Extracts preparation**

165                    Extracts from Bordeaux and Cabernet Sauvignon grape pomace varieties (BE  
166 and CSE) were prepared following a proportion of solute/solvent of 1:20 (w/v), using  
167 40% (v/v) ethanol as solvent (Iora et al., 2015). Samples were shaken in a thermostatic  
168 shaking bath (DIST 950M) at 125 rpm and 25 °C for 3 hours. After this time, samples

169 were centrifuged (NOVATECNICA, NT 825) at 6000 rpm for 10 minutes. The  
170 supernatant was stored at 4 °C until further analyses.

171

## 172 **2.6 Determination of total phenolic content**

173 The total phenolic compounds (TPC) were determined by using Folin-  
174 Ciocalteu colorimetric method (Singleton & Rossi, 1965). Absorbance was recorded at  
175 765 nm using a spectrophotometer (USB650-UV-VIS, Ocean Optics). Gallic acid was  
176 employed as a calibration standard and results were expressed as milligrams of gallic acid  
177 equivalents (GAE) per 100 g of dried sample. Three replicates were analyzed for each  
178 sample.

179

## 180 **2.7 Trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC)**

181 The TEAC assessment was performed in terms of radical scavenging ability  
182 according to the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method (Brand-Williams,  
183 Cuvelier, & Berset, 1995). Absorbance was measured at 515 nm. Trolox (6-hydroxy-  
184 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as a calibration standard and  
185 results of the total antioxidant capacity (TAC) were expressed as milligrams of Trolox  
186 Equivalents (TE) per liter of extract. Three replicates were analyzed for each sample.

187

## 188 **2.8 TPC biosorption study**

189 Biosorption of phenolic compounds from BE and CSE onto each modified  
190 biomass was investigated in batch experiments. An amount of 0.05 g of each  
191 biosorbent was mixed with 12.5 mL of the extracts for 360, 240, 120, 60, 30, 15, 10, 5  
192 and 1 min. The experiment was carried out according to Maciel et al. (2013): samples  
193 were agitated in a dark environment in a shaker at 150 rpm and 25 °C. Samples were  
194 taken at the same time and were centrifuged at 6000 rpm for 10 minutes. The  
195 supernatant was used for the quantification of the final TPC content (by the method  
196 described in the section 2.6). A control sample was prepared with only 12.5 mL of  
197 crude extract, which was shaken at the same conditions of the others, in order to verify  
198 possible losses of TPC during the experiment, mainly for adsorption in the glass wall.  
199 The amount of TPC biosorbed by the yeast biomass was obtained by using the  
200 following equation:

201

$$q = \frac{C_0 - C_f}{M} \cdot V \quad (1)$$

203

204 where  $q$  is the sorption capacity ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_0$  and  $C_f$  are the TPC concentrations ( $\text{mg g}^{-1}$ ) in the initial extract and in the solution after biosorption, respectively. The volume of  
 205 1) in the initial extract and in the solution after biosorption, respectively. The volume of  
 206 the liquid phase (L) is represented by  $V$  and  $M$  is the amount of yeast (g). The TPC  
 207 content lost in the control sample was subtracted from  $C_f$ .

208

## 209 **2.9 Kinetic studies**

210 The kinetic behavior of the biosorption was evaluated by pseudo-first and  
 211 pseudo-second order mathematical models, equations (2) and (3), respectively.

212

$$\frac{1}{q} = \frac{K_1}{(q_e t)} + \frac{1}{q_e} \quad (2)$$

214

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (3)$$

216

217 where  $q$  is the sorption capacity ( $\text{mg g}^{-1}$ ) at time  $t$ ;  $q_e$  is the sorption capacity ( $\text{mg g}^{-1}$ ) at  
 218 equilibrium; and  $K_1$  and  $K_2$  are the rate constants of pseudo-first and pseudo-second order  
 219 models, respectively. The choice of the best model was made based on the determination  
 220 coefficient and the comparison between experimental and theoretical values of sorption  
 221 capacity.

222

## 223 **2.10 Isotherm studies**

224 For isotherm studies, 0.05 g of each biomass of *S. cerevisiae* were mixed with 12.5  
 225 mL of the extracts in six different concentrations, including the initial concentration of crude  
 226 extract. The experiment was carried out under the same conditions of the kinetic study and  
 227 for the equilibrium time obtained in the kinetics. After this time, samples were centrifuged at  
 228 6000 rpm for 10 minutes. All supernatants were quantified, based on the TPC content, and  
 229 the resulting yeasts were lyophilized for 24 hours and stored for further analyses of MIR-  
 230 ATR (mid-infrared attenuated total reflectance), SEM (scanning electron microscopy) and  
 231 XRD (x-ray diffraction).

232 In order to describe and evaluate the behavior of the TPC biosorption onto *S.*  
 233 *cerevisiae*, Langmuir (Langmuir, 1916), Freundlich (Freundlich, 1906), Temkin  
 234 (Temkin & Pyzhev, 1940) and Dubinin-Radushkevich (Dubinin & Radushkevich, 1947)  
 235 isotherm models were applied (equations 4 to 7, respectively).

$$237 \quad \frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_0 K_L} + \frac{C_e}{q_0} \quad (4)$$

$$238 \quad \ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (5)$$

$$241 \quad q_e = \frac{RT}{b_T} \ln A + \frac{RT}{b_T} \ln C_e \quad (6)$$

$$243 \quad \ln q_e = \ln q_s - \beta \varepsilon^2 \quad (7)$$

244 where  $q_e$  is the amount of TPC adsorbed at equilibrium (mg g<sup>-1</sup>);  $C_e$  = equilibrium  
 245 concentration of TPC in solution (mg L<sup>-1</sup>);  $q_0$  = monolayer adsorption capacity (mg g<sup>-1</sup>);  $K_L$   
 246 = Langmuir constant (L mg<sup>-1</sup>);  $A$  = equilibrium binding constant (L g<sup>-1</sup>);  $RT/b_T$  = Temkin  
 247 constant (J mol<sup>-1</sup>) related to the sorption energy;  $K_F$  = Freundlich constant (L g<sup>-1</sup>);  $1/n$  =  
 248 heterogeneity factor;  $q_s$  = Dubinin-Radushkevich monolayer capacity (mg g<sup>-1</sup>);  $\beta$  = Dubinin-  
 249 Radushkevich constant [mol<sup>2</sup> (KJ<sup>2</sup>)<sup>-1</sup>];  $\varepsilon$  = Polanyi potential.

251

## 252 **2.11 High performance liquid chromatography**

253 The high performance liquid chromatography (HPLC) analysis was used to  
 254 compare the profile of phenolic compounds (fingerprint) in grape pomace extracts before  
 255 and after biosorption experiments. A Shimadzu Prominence HPLC with photodiode array  
 256 detector was used for the assays. The mobile phase consisted of 1% (v/v) aqueous acetic  
 257 acid (eluent A) and methanol (eluent B) and the flow rate used was 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The  
 258 following gradient was performed: 0–10% B for 2 min; 10–20% B for 3 min; 20–30% B for  
 259 5 min; 30–35% B for 5 min; 35–50% for 10 min; 50–60% B for 5 min; 60–80% B for 5 min;  
 260 80–100% B for 10 min, followed by washing and column reconditioning with 100% B for 7  
 261 min; 100–5% B for 5 min. The injection volume was 10  $\mu$ L and the separation was performed

262 onto a Acclaim® 120 C18 column of 4.6 mm x 250 mm, 5 µm particle size (Dionex, UT,  
263 USA). Phenolic compounds were monitored at 280 nm.

264

### 265 **2.12 Mid-infrared attenuated total reflectance**

266 The mid-infrared attenuated total reflectance (MIR-ATR) analysis was carried  
267 out in twelve samples: four different samples of yeast (control and three treated yeasts)  
268 and four yeasts with compounds biosorbed from the extracts BE and CSE. A Fourier  
269 transform infrared spectrophotometer (VARIAN, 640-IR) equipped with attenuated  
270 total reflectance accessory (PIKE, miracle) was used. Spectra were obtained within a  
271 range of 4000 to 600 cm<sup>-1</sup>, with 4 cm<sup>-1</sup> resolution.

272

### 273 **2.13 X-ray diffraction**

274 The x-ray diffraction (XRD) patterns of yeasts before and after biosorption  
275 were measured using a Shimadzu XRD-7000 X-ray diffractometer, equipped with a  
276 copper anode ( $\lambda=1,506$  nm) and operated at 40 mA, 40 kV, from 10° to 80° (2 $\theta$ ), in a  
277 scan speed of 2 degrees per minute.

278

### 279 **2.14 Scanning electron microscopy (SEM)**

280 Yeasts morphology, before and after biosorption, was observed using a  
281 scanning electron microscope (Carl Zeiss, EVO MA 15) with X-ray microanalysis  
282 (Oxford X-Max). The specimen was coated with Au-Pd and coated samples were then  
283 observed in 3500x.

284

### 285 **2.15 *In vitro* simulated gastrointestinal digestion**

286 The procedure was carried out as described by (Koehnlein et al., 2016), with  
287 slight modifications. Four different samples were used in the experiment: extract before  
288 biosorption, extract after biosorption, yeast before biosorption and yeast after  
289 biosorption. These latter were suspended with 40% (v/v) ethanol. A blank was also  
290 prepared with 40% ethanol, to discount interferences or a probable contribution of non-  
291 antioxidant constituents in the antioxidant capacity. Samples were submitted to an *in*  
292 *vitro* model simulating gastric and intestinal digestion.

293

294 The pH of the samples were adjusted to 1.2 by the addition of 5 mol L<sup>-1</sup> HCL.  
295 Posteriorly, for each 10 mL of sample, 30 mL of simulated gastric fluid (prepared with  
3.2 g L<sup>-1</sup> of pepsin in 0.03 mol L<sup>-1</sup> NaCl solution) was added following shaking at 150

296 rpm, for 120 min and 37 °C in a dark environment. Afterward, pepsin digestion was  
297 stopped by keeping the digest on ice for 10 minutes. After that, the pH was adjusted  
298 to 6.0 with 1 mol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, to perform the intestine environment. After the addition  
299 of 5 mL of 120 mmol L<sup>-1</sup> NaCl and 5 mL of 5 mmol L<sup>-1</sup> KCl, 30 mL of freshly prepared  
300 intestinal fluid (prepared by dissolving 0.05 g of pancreatin and 0.3 g of bile salts for  
301 each 35 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> solution) was added. The final mixture was shaken  
302 for 60 min, under the same incubating conditions. After digestion, flasks were kept on  
303 ice for 10 additional minutes and then, samples were centrifuged at 6000 rpm for 10  
304 minutes. The supernatants collected at the end of the process were stored at -20 °C  
305 until TPC and TEAC analyses.

306 The bioaccessibility percentages were calculated by Equation 8, where D is  
307 the TPC content divided by the antioxidant capacity, both of the bioaccessible fraction  
308 (after intestinal digestion); I is the initial content of TPC divided by the antioxidant  
309 capacity before digestion (Jilani et al., 2015).

310

$$311 \quad \textit{Bioaccessibility} (\%) = \left(\frac{D}{I}\right) \times 100 \quad (8)$$

312

### 313 **2.16 Statistical analysis**

314 Student's t-test was used for comparison between two means. A difference  
315 was considered statistically significant when  $p \leq 0,05$ . The analysis was performed  
316 using STATISTICA 7.1 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). A principal component  
317 analysis (PCA) was used in MIR-ATR spectra. For this purpose, a preprocessing of  
318 data was made, consisting in a baseline correction, a multiplicative scatter correction  
319 (MSC) smoothing and isolation of the fingerprint area. PCA and preprocessing data  
320 were performed in MATLAB R2013a (The MathWorks Inc., Natick, USA).

321

## 322 **3 RESULTS AND DISCUSSION**

323

### 324 **3.1 Phenolic compounds content and total antioxidant capacity**

325 The solute biosorption efficiency is affected by the initial concentration, which  
326 provides an important driving force to overcome all mass transfer resistances between  
327 aqueous and solid phases (Aksu, 2005). Hence the importance of quantifying and

328 knowing the phenolic and antioxidant profile of the grape pomace extracts used in the  
329 biosorption process.

330 Table 1 shows the total phenolic content and antioxidant activity for the two  
331 varieties of grape pomaces. For both analyses, values were significantly higher ( $p <$   
332 0.05) in the hydroethanolic extract from Cabernet Sauvignon grape pomace (CSE). In  
333 another work, Rockenbach et al. (2011) presented similar relation between CSE and  
334 BE. The authors compared four varieties of grape pomaces and the Cabernet  
335 Sauvignon extract also had higher total phenolic compounds content and total  
336 antioxidant activity than Bordeaux.

337 Iora et al. (2015) evaluated three red grapes pomace and total phenolic  
338 contents were within a range of 3014 to 5102 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>, with highest values  
339 found in Cabernet Sauvignon pomace. In another study, Yi et al. (2009) reported a  
340 TPC content of 250 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> of fresh weight in grape pomace powder from  
341 Cabernet Sauvignon. Deng, Penner, & Zhao (2011) determined total phenolic  
342 compounds in five different varieties of wine grape pomace skins extracted by two  
343 different methods and the authors found 2670 and 1270 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> in Cabernet  
344 Sauvignon samples. Rockenbach et al. (2011) reported antioxidant activities values in  
345 a range of 249 to 486  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  for Cabernet Sauvignon grape pomace and 193 to  
346 209  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  of pomace on dry basis for Bordeaux (in contrast to 216.33 and 119.33  
347  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  obtained in our study). The authors also evaluated the total phenolic  
348 content for Bordeaux and found a mean value of 6331 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>.

349 The chemical composition of grapes depends on the different agricultural  
350 practices, winemaking conditions, type of soil and mainly the agroclimatic factors  
351 (Jara-Palacios, Hernanz, Escudero-Gilete, & Heredia, 2014; Sri Harsha, Gardana,  
352 Simonetti, Spigno, & Lavelli, 2013). Also, the quantity and composition of the extract  
353 will be affected by type, time and temperature of extraction, as well as by the solvent  
354 nature and solvent-matrix ratio (da Silva, Rocha-Santos, & Duarte, 2016). According  
355 to Roohinejad et al. (2016), extraction represents the key for the recovery and  
356 purification of active compounds from plant materials. Thus, differences between the  
357 values found in the present work and another data found in literature can be explained  
358 due to all those combined cited factors.

359

360

361



## 3.2 Biosorption of total phenolic compounds

### 3.2.1 Biosorption kinetics

Kinetic models are essential to better understand biosorption mechanisms and to evaluate the performance of biosorbents for the removal of a sorbate of interest (Wang & Chen, 2006). Based on the equilibrium state of the sorption system, it was possible to determine the adsorption capacity of biosorbent. The biosorption data were fitted to pseudo-first and pseudo-second order models, used in most biosorption studies (Park, Yun, & Park, 2010)

Table 2 presents values of kinetic parameters obtained by fitting the biosorption data to the pseudo-second order model for all treatments of yeasts studied in contact with CSE and BE. Pseudo-second order model graphs of  $t/q_e$  as function of  $t$  provide a linear relationship by which sorption capacities of the model and rate constants  $K_2$  were determined by angular and linear coefficients, respectively.

For all yeasts (with and without treatment) and the two extracts of grape pomace used in the experiments, the pseudo-second order model had the best fit for data during the contact time. Determination coefficients ( $R^2$ ) from pseudo-first order model fit had values below 0.94 (data not shown), which was low compared to the determination coefficients obtained by the pseudo-second order model. In addition, experimental and theoretical sorption capacities ( $q_e$ ) presented discrepant values in most cases. Other studies of biosorption involving *Saccharomyces cerevisiae* biomass also report equivalent kinetic behavior (Chen & Wang, 2016; Ghaedi, Hajati, Barazesh, Karimi, & Ghezlbash, 2013; Khakpour, Younesi, & Mohammadhosseini, 2014; Nguyen & Juang, 2015; Stafussa et al., 2016).

According to Gautam, Mudhoo, Lofrano, & Chattopadhyaya (2014), the pseudo-first order model has disadvantages, although it is widely used. First, the experimental data of sorption capacities ( $q_e$ ) do not agree with the determined theoretical values. Second, the theoretical and experimental data follow a linearity only in the first 20-30 minutes of reaction, after that time, data do not correlate well. Therefore, Lagergren's pseudo first-order model was not applied to the entire contact time between *S. cerevisiae* biomass and total phenolic compounds, mainly due to the long contact time between biosorbate and biosorbent until reaching equilibrium (4-6 hours).

395 In many biosorption systems, both physisorption and chemisorption can occur,  
396 and in such cases, the pseudo-second order model correlates satisfactorily (Kumar &  
397 Min, 2011). In addition, this model assumes that two reactions are occurring during  
398 biosorption: the first is fast and reaches equilibrium quickly and the second is slow and  
399 lasts for a longer period. Both can occur either in series or in parallel (Khakpour et al.,  
400 2014).

401 As the pseudo-second order model is predominant in the biosorption of total  
402 phenolic compounds in biomasses of *S. cerevisiae*, chemical sorption is assumed as  
403 the sorption limiting factor, involving covalent bonds through sharing or exchanging  
404 electrons between biosorbent and biosorbate (Ho & McKay, 2000).

405 During kinetic tests, the total phenolic compounds content biosorbed by the  
406 yeast biomass increased according to the contact time between the extract and  
407 biological material until reaching a dynamic equilibrium condition between the  
408 biosorbate concentration in aqueous solution and biosorbed concentration. The  
409 equilibrium time of the biosorption of phenolic compounds from black and green tea and  
410 olive leaves in *S. cerevisiae* obtained by Jilani et al. (2015) and Jilani, Cilla, Barberá, &  
411 Hamdi (2016), respectively, was reached in 3 hours and the biosorption of anthocyanins  
412 from grape pomace extracts in *S. cerevisiae*, performed by Stafussa et al. (2016), reached  
413 equilibrium in 2 hours. The highest equilibrium times (4 and 6 hours) obtained in the present  
414 study may indicate that yeast treatments increased the access of phenolic compounds into  
415 the binding sites of *S. cerevisiae* and, possibly, an intra-particle diffusion occurred into the  
416 cell through pores (Ghorbani et al., 2008).

417 Thus, the kinetic study suggests the biosorption occurred according to the following  
418 steps: migration of phenolic compounds from the solution to the boundary layer; TPC  
419 diffusion through the boundary layer yeast biomass surface; TPC intra-particle diffusion into  
420 the biomass pores; and TPC sorption to the active sites both outside and inside the cell (Yu,  
421 Li, Sun, Yuan, & Chi, 2009).

422 According to the data obtained from experimental sorption capacity, basic-treated  
423 yeast had the best performance in the biosorption of phenolic compounds from CSE,  
424 whereas acid-modified yeast showed higher sorption capacity for TPC from the Bordeaux  
425 extract. For all treatments, the TPC sorption capacity of Cabernet Sauvignon extract was  
426 higher than the  $q_e$  of TPC from the Bordeaux extract. This difference occurred due to the  
427 fact that the crude Cabernet Sauvignon extract presented the highest initial concentration  
428 of total phenolic compounds. According to Fomina & Gadd (2014), when the initial

429 biosorbate concentration increases, the amount of biosorbed compound per unit weight of  
430 biosorbent also increases. Basic and acid yeast had the best performance in the TPC  
431 uptake: basic yeast provided an increase of 93.2% in the sorption capacity of TPC from  
432 CSE whereas acid yeast showed a sorption capacity of TPC from EB 34.77% higher, both  
433 compared to the control yeast.

434

435 3.2.2 Equilibrium study: biosorption isotherms

436 When the equilibrium condition is reached in a system, the amount of solute  
437 adsorbed per unit weight of adsorbent material and concentration of adsorbate in  
438 solution at a given temperature can be described by means of sorption isotherms  
439 (Subbaiah & Kim, 2016). Equilibrium relationships explain how interaction between the  
440 biosorbent material and biosorbate occurs and its importance in the optimization of  
441 biosorption mechanisms (Rangabhashiyam, Anu, Giri Nandagopal, & Selvaraju,  
442 2014). Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich models were used to  
443 describe the biosorption mechanisms of total phenolic compounds into yeast  
444 *Saccharomyces cerevisiae*. Table 3 express the parameters of each isotherm studied  
445 in the TPC biosorption from Cabernet Sauvignon and Bordeaux pomaces,  
446 respectively, in the four types of yeast.

447 The Langmuir isotherm did not present a satisfactory fitting for the equilibrium  
448 data (data not shown) of TPC biosorption from Cabernet Sauvignon extract in different  
449 types of yeast. Langmuir introduced the concept of a monomolecular adsorption on  
450 energetically homogeneous surfaces (Dąbrowski, 2001). However, in complex  
451 systems, including biological materials such as yeasts, the interaction between the  
452 adsorbed species is very likely to occur, which invalidates Langmuir's theory (Gadd,  
453 2009).

454 The Dubinin-Radushkevich isotherm is well applied to adsorbents with porous  
455 structures, including pores of different shapes and widths, and is based on the  
456 adsorption energy (Dąbrowski, 2001). This model is able to calculate the mean free  
457 energy ( $E$ ) of adsorption and can evaluate the sorption properties of the system,  
458 indicating if the main mechanism involved is chemical ( $8 < E < 16 \text{ KJ mol}^{-1}$ ) or physical  
459 ( $E < 8 \text{ KJ mol}^{-1}$ ) (Abdolali et al., 2014; Maciel et al., 2013). The constants  $\beta$  and  $q_s$  of  
460 the model were respectively found by means of the angular and linear coefficient of  
461 the graph  $\varepsilon^2$  versus  $\ln q_e$ . The biosorption of TPC from ECS in control yeast had its  
462 behavior better described by the Dubinin-Radushkevich model, presenting a

463 determination coefficient of 0.987. The mean free energy obtained by the model, 6,376  
464 KJ mol<sup>-1</sup>, suggests the physical mechanism is predominant in this adsorption process,  
465 including Van der Waals' weak attraction forces. The values below 8 KJ mol<sup>-1</sup>, found  
466 in the biosorption of TPC from CSE in the other two yeast types, imply that these cited  
467 processes also follow a physical binding mechanism.

468 Based on the determination coefficients, Temkin model exhibited the best fit  
469 for biosorption of TPC from CSE in yeasts modified by thermal, acid and basic  
470 treatment. The constants  $A$  and  $B$  were determined by the linear and angular  
471 coefficients, respectively, of the linear relation  $q_e$  versus  $\ln C_e$ . Temkin isotherm, instead  
472 of the Langmuir model, considers the effect of the interactions between biosorbent and  
473 biosorbate, assuming that, as a result of these interactions, there is a decrease in the  
474 adsorption heat with the solute coverage of binding sites present in the adsorbent  
475 material (Can, Ömür, & Altındal, 2016).

476 The Freundlich isotherm is an empirical model used to describe a multilayer  
477 adsorption with interaction between the adsorbed molecules. It is applied to  
478 adsorptions on heterogeneous surfaces by a uniform distribution of energy and  
479 reversible bonds (Rangabhashiyam et al., 2014). From the linear relationship between  
480  $\ln C_e$  and  $\ln q_e$ , the constants  $K_F$  and  $n$  were obtained, using the linear and angular  
481 coefficients, respectively. The values of  $n$  (dimensionless), obtained by the biosorption  
482 of TPC from CSE in all yeasts, between 0 and 10, indicate that the adsorption of these  
483 compounds by the biosorbent material is a favorable process (Stafussa et al., 2016).

484 The adsorption of total phenolic compounds from Bordeaux grape pomace  
485 extract in control yeast and acid yeast had their data better fitted by the Dubinin-  
486 Radushkevich model, suggesting that these yeasts have a porous surface. The mean  
487 free energies ( $E$ ) obtained by the model infer that the adsorption of TPC from BE in  
488 control and acid yeast follows a physical binding mechanism ( $E < 8$  KJ mol<sup>-1</sup>), with  
489 weaker interactions, whereas the adsorption of TPC from BE in basic and autoclaved  
490 yeast follows a chemical mechanism ( $8 < E < 16$  KJ mol<sup>-1</sup>), resulting from strong  
491 bindings between biosorbent and biosorbate functional groups (Abdolali et al., 2014).

492 The TPC adsorption from BE by autoclaved and basic yeast was best  
493 described by Langmuir model, based on the higher values of determination coefficients  
494 (0,989 and 0,971). The Langmuir constants  $q_0$  (maximum coverage capacity in  
495 monolayer) and  $K_L$  were obtained, respectively, from the angular and linear coefficients

496 from the linear relationship between  $C_e/q_e$  and  $C_e$ . The model proposed by Langmuir  
497 assumes the surface homogeneity of biosorbent material (Rangabhashiyam et al.,  
498 2014), uniformity and energetically equivalence between the binding sites (Dąbrowski,  
499 2001; Gadd, 2009). The results consider the formation of a monolayer of TPC from EB  
500 outside the biosorbent surface and suggest that the adsorption energy, in this case, is  
501 constant and independent of the occupation of binding sites present in the surface. In  
502 addition, the best fit by this model considers that there is no interaction between  
503 adsorbed TPC molecules at nearby sites. An important parameter proposed by this  
504 model is the dimensionless constant  $R_L$ , related to the adsorption energy, which value  
505 indicates whether the nature of the adsorption is irreversible ( $R_L=0$ ), favorable ( $0 < R_L <$   
506  $1$ ), linear ( $R_L=1$ ) or unfavorable ( $R_L > 1$ ) (Rangabhashiyam et al., 2014).

507 The equilibrium parameters of Langmuir ( $R_L$ ), within a range of the 0 and 1 and  
508 the adsorption intensity ( $n$ ) of the Freundlich model, within a range of 0 and 10, indicate  
509 that the adsorption process of TPC from BE in all studied yeasts is favorable.

510

### 511 **3.3 Characterization of the extracts**

512 Crude extracts and extracts after biosorption (supernatants) were evaluated  
513 by HPLC to confirm the removal of TPC from grape pomace extracts by yeasts and  
514 the chromatograms are shown in Fig. 1. In Fig. 1a and Fig. 1b, it can be observed that,  
515 after the contact of acid and basic yeasts with BE and CSE, there was a reduction of  
516 the peaks, mainly in the retention times from 10 to 40 minutes, in both cases. The  
517 peaks I, II, III present in the Fig. 1a decreased 12%, 2,75% and 9,5%, respectively,  
518 after the contact between CSE and basic yeast, whereas peaks I, II and III shown in  
519 Fig. 1c decreased 3,5%, 6,5% and 11,5%, in this order, after the biosorption of TPC  
520 from BE by acid yeast. It is probable that this decreasing concentration of compounds  
521 after the contact with yeasts is related to removal of TPC by the yeasts in the  
522 biosorption. The same behavior was noticed by Stafussa et al. (2016), where a  
523 reduction on the area of the peaks was observed after the biosorption of anthocyanins  
524 from Tannat and Bordeaux grape pomace extracts by *S. cerevisiae*. The higher  
525 reduction in specific peaks could be explained by a specificity of *Saccharomyces cerevisiae*  
526 toward some types of compounds. Generally, larger polyphenols have stronger affinity for  
527 proteins than smaller phenolics, besides, biomass properties, such as polarity, hydrophobic  
528 or hydrophilic nature define its ability to adsorb certain phenols (Jilani et al., 2015).

529

### 3.4 Characterization of *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.4.1. MIR-ATR and multivariate statistical analysis

The main objective of this analysis was observing changes between yeasts and in these biomasses after TPC uptake, in order to verify if the yeasts were indeed enriched with bioactive compounds from grape pomaces. The multivariate statistical analysis of the principal components produce a lower dimensional description of the multivariate data in order to reduce the dimension of the dataset through linear combinations, to better interpret complex data (Link, Lemes, Marquetti, Scholz, & Bona, 2014). In this work, the PCA was applied considering the response obtained when working with the preprocessed spectra between 1800 and 900  $\text{cm}^{-1}$  (fingerprint). Two principal components were sufficient to explain 88.10% of the spectral variation for samples (PC1 represents a variability of 74.56 %).

According to scores profile, samples can be separated in five groups, circulated and identified in Fig. 2a. Based on these groups, it can be affirmed that there is a difference between the four yeasts studied in this work and between these same biomasses before and after the TPC uptake, with the exception of autoclaved yeast, which is aggregated in the same cluster even after TPC biosorption from both grape pomaces. The explanation for this result is that the thermal treatment of the yeast did not culminate in the increase of its sorption capacity, as it was evidenced in the kinetic study. The TPC uptake by thermally-treated yeast was not sufficient to consider that there was a significant difference between its chemical groups after biosorption process.

Loadings profile from PC1 and PC2 are shown in Fig. 2b and determine the influence of each wave number on the variance along the studied region. PC1 and PC2 positive side shows amide I (around 1630  $\text{cm}^{-1}$ , essentially carbonyl band C=O) and amide II (around 1570 and 1550  $\text{cm}^{-1}$ , N-H and C-N) bands (Chen & Wang, 2016). The PC2 positive and PC1 negative sides are related to C=O stretching in lipid esters (around 1740  $\text{cm}^{-1}$ ), C-O stretching free nucleotides and C-O-C carbohydrates (within the range of 1215-1190  $\text{cm}^{-1}$ ) and mannans and  $\beta$ -1,3 glucans (around 1135  $\text{cm}^{-1}$ ) (Burattini et al., 2008). On negative sides of both PC1 and PC2, there is a range between 1100 and 900  $\text{cm}^{-1}$  which is characteristic of polysaccharides absorption region, sugars present in the yeast cell wall (Galichet, Sockalingum, Belarbi, & Manfait, 2001). Peaks around 1045  $\text{cm}^{-1}$  reveal the presence of glycitols (C-OH) and the stretching band of P-O-C (Zhang, Liu, Xu, Zheng, & Zhao, 2010). For last, the part corresponding to PC1 positive side and PC2 negative side

564 on the loadings graph represents bands between 1500 and 1290  $\text{cm}^{-1}$ . The absorbance  
565 peak at approximately 1440  $\text{cm}^{-1}$  indicates  $\text{CH}_2$  deformation mainly in proteins and peptides  
566 (Burattini et al., 2008), peak around 1400  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to symmetric stretching of  
567 carboxyl groups from amide III, as well as the band around 1290  $\text{cm}^{-1}$  (C-N and C-O  
568 stretching, N-H and O=C-N bending) (Burattini et al., 2008; Zhang et al., 2010).

569 Thus, also based on the loadings plot, PC2 high-intensity at around 1630, 1530  
570 and 1000  $\text{cm}^{-1}$  were observed and it might explain that this principal component has amide  
571 I, amide II and polysaccharides as principal functional groups, responsible for grouping a  
572 higher number of samples. On the other side, amide II and amide III (1580 and 1400  $\text{cm}^{-1}$ ,  
573 respectively) are the principal groups responsible for explaining PC1. As expected, the main  
574 zones with high influence in the spectra samples variance coincided with the regions where  
575 the signals, in general, show more differences in spectra (Fig. 3a). In addition, an important  
576 information is evidenced by Fig. 3b: it can clearly shows that control, acid and alkaline yeasts  
577 overlaps in the regions of 1630  $\text{cm}^{-1}$ , 1135-1250  $\text{cm}^{-1}$  and 1290-1500  $\text{cm}^{-1}$ , respectively,  
578 agreeing with the overlapped bands in loadings plot and the quadrant that explains each  
579 one.

580 Visually, in Fig. 3b, spectral intensity differences are more evident within the range  
581 of 1290 and 1500  $\text{cm}^{-1}$ , where interestingly bands of phenolic compounds can be found.  
582 Fragoso et al. (2011) studied the spectral response of different phenolic compounds by  
583 adding increasing amounts of compounds in grape extract. The authors reported that these  
584 additions revealed evident variations in the spectral region from 1457 to 1168  $\text{cm}^{-1}$  for gallic  
585 and tannic acids and from 1322 to 1238  $\text{cm}^{-1}$  and 1457 to 1373  $\text{cm}^{-1}$  for catechins. Thus,  
586 considering that the TPC from CSE had higher sorption uptake by alkaline yeast - which  
587 had an overlapped spectra practically in the same region -, it might be possible that those  
588 cited compounds have higher affinity for chemical groups such as amide III. On the other  
589 hand, phenolic compounds from BE might have a greater affinity for groups present at  
590 around 1135 and 1250  $\text{cm}^{-1}$ , important in acid yeast. It is known by the literature (Laghi,  
591 Versari, Parpinello, Nakaji, & Boulton, 2011) that several aromatic C-H in-plane bending  
592 vibration are attributed to 950-1225  $\text{cm}^{-1}$  and, in particular, the peak at around 1285  $\text{cm}^{-1}$  is  
593 characteristic for flavonoid-based tannins. Within the range of 1135-1250  $\text{cm}^{-1}$  it is possible  
594 to appear organic acids, sugars and condensed tannins (proanthocyanidins) (De Souza,  
595 Thomazini, Balieiro, & Fávaro-Trindade, 2015). Thus, these kinds of compounds might have  
596 been predominantly biosorbed in acid yeast. In addition, mannans and  $\beta$  glucans found in  
597 the region that characterized the autoclaved yeast seems to be less important for the

598 biosorption of phenolic compounds from grape pomace, since this biomass had the worst  
599 TPC uptake performance among all others.

600

### 601 3.4.2 X-ray diffraction

602 The XRD patterns of acid and basic yeasts before and after biosorption are  
603 shown in Fig. 4. The four biomasses showed intense diffraction peaks at 37.75°,  
604 44.05°, 64.4° and 77.5°. Amorphous materials are present in large quantities. All  
605 samples presented similar patterns, however, the intensity of the mentioned peaks  
606 decreased after the uptake of TPC. This decreasing intensity is attributed to the  
607 incorporation of organic groups (Anbia & Amirmahmoodi, 2011) into the cells, once the  
608 addition of organic species distorts the regular arrangement and, thereby, decreases  
609 the order of structures (Kim, Lee, Choo, & Choi, 2014). This analysis suggests that the  
610 biosorption process resulted in a less ordered structure and, therefore, the yeasts were  
611 enriched with phenolic compounds.

612

### 613 3.4.3 Scanning electron microscopy

614 Control, alkaline and acid *Saccharomyces cerevisiae* cells were analyzed by  
615 scanning electron microscopy to verify changes in their surface structure and the results are  
616 shown in Fig. 5. Fig. 5a shows clusters of control *S. cerevisiae* cells. Some of them seem  
617 to be damaged, slightly shrunked, which might be due to the repeated use in beer production  
618 and in washing/drying processes that the cells were submitted before treatments and  
619 biosorption studies. Acid yeasts before biosorption (Fig. 5b) are mostly oval shaped with  
620 smooth surface. After biosorption, cells presented more damages in their wall and spherical  
621 shape and many collapsed cells can be observed (Fig. 5c). Also, the biomass seems to be  
622 more clustered than before. Alkaline-treated cells (Fig. 5d) exhibited a very different aspect  
623 from the ellipsoid shape reported as typical for *S. cerevisiae* (Chen & Wang, 2008). After  
624 the TPC uptake (Fig. 5e), there was a significant change on its outer morphology. By the  
625 images, base-treated yeasts had more differences after the TPC uptake, in comparison to  
626 acid-treated yeast. The SEM result is in agreement with kinetic studies, once the alkaline  
627 yeast showed a higher sorption capacity among all others and also was the biomass which  
628 presented more morphological changes after TPC biosorption.

629

630

631



### 3.5 Influence of an *in vitro* digestion on TPC and TAC

632

633

634

635

636

637

638

639

In this study, only control yeast, the sample that presented best performance in the uptake of TPC (alkaline biomass) and CSE (before and after biosorption) were submitted to the *in vitro* simulated digestion. During the development of effective enriched-foods, is of vital importance to study the interactions between the matrix and the bioactive compounds involved, once the structure and composition of food matrix may either enhance or prevent the release and solubilization of compounds of interest and, hence, their bioavailability (Pineda-Vadillo et al., 2017).

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

Table 4 shows the total phenolic content and total antioxidant capacity of the extracts before and after an *in vitro* digestion. Although there was in general a decrease in TPC content and TAC after biosorption, bioaccessibility increased 21,92% and 1,97% after extract biosorption by control and alkaline yeast, respectively, compared to the bioaccessibility of the crude CSE. The loss of phenolic compounds during the simulated digestion might be caused mainly because of the alkaline conditions found in the small intestine. The pH of the intestinal environment and the action of bile salts can cause alterations in the chemical structures, resulting in new compounds with different bioavailability and biological activities (Koehelein et al., 2016). Despite the degradation of TPC during digestion, the increase in the bioaccessibility of the extracts after contact with studied biomasses indicates that the nature of the matrix used has a significant influence on bioaccessibility (Jilani, Cilla, Barberá, & Hamdi, 2016). Also, it indicates that the highest bioaccessibility is not related necessarily with highest phenolic compounds content (Zeng, Liu, Luo, Chen, & Gong, 2016). The contact with the yeasts might have enhanced the stability of chemical groups of the bioactive compounds remaining in extracts after biosorption, culminating in a lower decrease in TPC content compared to crude extract and preserving their bioaccessibility. Thus, even after digestion and TPC loss, more compounds are available to be absorbed and exert their beneficial effects.

658

659

660

661

662

663

664

665

Table 5 shows there was an increase in the phenolic content and antioxidant capacity of alkaline yeast suspensions after gastric digestion step. The main phenolic compounds are released during gastric phase as the stomach is the major site for extracting bioactives (Jilani et al., 2016). After intestinal phase, the bioaccessible fractions exhibited lower TAC in comparison to undigested counterparts and TPC were not detected. TPC possibly become more soluble after their release and, then, more susceptible to the action of the alkaline pH, being degraded after the gastric phase. In the intestine, TPC were no longer extracted. The difficulty of extracting TPC in yeast suspensions might be explained

666 by the intra-particle diffusion of phenolic compounds. TPC biosorbed in the cell wall were  
667 easily released but those biosorbed in active sites inside the cells might require other  
668 conditions to be extracted, such as longer periods in contact with intestinal fluids. After  
669 digestion, although, alkaline yeast showed a TAC 196% higher than control yeast. Besides,  
670 the bioaccessibility of the antioxidants in the alkaline biomass suspension was 147% higher  
671 than the bioaccessibility of antioxidants in control biomass suspension, demonstrating that  
672 the alkaline treatment made the yeast capable to protect more the bioactivity and to increase  
673 the bioaccessibility of the antioxidants, exhibiting best performance than non-treated  
674 biomass.

675

#### 676 **4 CONCLUSIONS**

677

678 Chemically conditioning of biomass might have made available more active binding  
679 sites in the yeast cells, increasing the access of phenolic compounds. Biosorption  
680 mechanism of alkaline yeast was best described by Temkin model, considering a decrease  
681 in the adsorption heat with the solute coverage of adsorbent binding sites. PCA of MIR-ATR  
682 data evidenced significant changes in yeast functional groups, especially in alkaline yeast  
683 with TPC from CSE. HPLC chromatograms showed a decrease in specific peaks of  
684 phenolic compounds, pointing the biosorption as the main cause. SEM images showed  
685 differences in yeast outer morphology, whereas XRD evidenced the disorganization in the  
686 structure after biosorption. *In vitro* digestion studies demonstrated that the biosorption  
687 increased bioaccessibility and was able to protect the TAC. Biosorption is a promising way  
688 to recover residues with nutritional importance in human diet and the enriched biomass  
689 produced after the process is a novel carrier of antioxidants, able to protect and deliver them.  
690 This study opens new perspectives for the study of enriched protein concentrates as an  
691 interesting novelty for industrial applications.

692

#### 693 **REFERENCES**

694

- 695 Abdolali, A., Guo, W. S., Ngo, H. H., Chen, S. S., Nguyen, N. C., & Tung, K. L. (2014).  
696 Bioresource Technology Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption  
697 process in water and wastewater treatment: A critical review. *Bioresource Technology*,  
698 160, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.037>  
699 Aksu, Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review.

- 700 *Process Biochemistry*, 40(3–4), 997–1026. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.008>
- 701 Amorim, M., Pereira, J. O., Gomes, D., Pereira, C. D., Pinheiro, H., & Pintado, M. (2016).  
702 Nutritional ingredients from spent brewer's yeast obtained by hydrolysis and selective  
703 membrane filtration integrated in a pilot process. *Journal of Food Engineering*, 185, 42–  
704 47. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.03.032>
- 705 Anbia, M., & Amirmahmoodi, S. (2011). Adsorption of phenolic compounds from aqueous  
706 solutions using functionalized SBA-15 as a nano-sorbent. *Scientia Iranica*, 18(3), 446–452.  
707 <https://doi.org/10.1016/j.scient.2011.05.007>
- 708 Asadi, S., Ahmadiani, A., Esmaeili, M. A., Sonboli, A., Ansari, N., & Khodagholi, F. (2010). In  
709 vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from  
710 Iran: A comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5), 1341–1349.  
711 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.035>
- 712 Barcia, M. T., Pertuzatti, P. B., Gómez-Alonso, S., Godoy, H. T., & Hermosín-Gutiérrez, I.  
713 (2014). Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid  
714 cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. *Food Chemistry*, 159, 95–105.  
715 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.163>
- 716 Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to  
717 evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.  
718 [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- 719 Burattini, E., Cavagna, M., Dell'Anna, R., Malvezzi Campeggi, F., Monti, F., Rossi, F., & Torriani,  
720 S. (2008). A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast  
721 *Saccharomyces cerevisiae*. *Vibrational Spectroscopy*, 47(2), 139–147.  
722 <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2008.04.007>
- 723 Can, N., Ömür, B. C., & Altındal, A. (2016). Modeling of heavy metal ion adsorption isotherms  
724 onto metallophthalocyanine film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 237, 953–961.  
725 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.026>
- 726 Cetin-Karaca, H., & Newman, M. C. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds  
727 against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. *Food Bioscience*, 11, 8–16.  
728 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.03.002>
- 729 Chen, C., & Wang, J. (2008). Investigating the interaction mechanism between zinc and  
730 *Saccharomyces cerevisiae* using combined SEM-EDX and XAFS. *Applied Microbiology  
731 and Biotechnology*, 79(2), 293–299. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1415-4>
- 732 Chen, C., & Wang, J. (2016). Uranium removal by novel graphene oxide-immobilized  
733 *Saccharomyces cerevisiae* gel beads. *Journal of Environmental Radioactivity*, 162–163,

- 734 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.05.012>
- 735 da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction  
736 of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40–51.  
737 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>
- 738 Dąbrowski, A. (2001). Adsorption - From theory to practice. *Advances in Colloid and Interface*  
739 *Science*, 93(1–3), 135–224. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(00\)00082-8](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00082-8)
- 740 de Lima, A. C. S., da Rocha Viana, J. D., de Sousa Sabino, L. B., da Silva, L. M. R., da Silva,  
741 N. K. V., & de Sousa, P. H. M. (2017). Processing of three different cooking methods of  
742 cassava: Effects on in vitro bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity.  
743 *LWT - Food Science and Technology*, 76, 253–258.  
744 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.023>
- 745 De Souza, V. B., Thomazini, M., Balieiro, J. C. D. C., & Fávoro-Trindade, C. S. (2015). Effect of  
746 spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment  
747 obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and*  
748 *Bioproducts Processing*, 93(June), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.001>
- 749 Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and  
750 polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research*  
751 *International*, 44(9), 2712–2720. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.026>
- 752 Dubinin, M. M., & Radushkevich, L. V. (1947). The equation of the characteristic curve of  
753 activated charcoal. *Proceedings of the Academy of Sciences, Physical Chemistry Section*,  
754 55, 331–333.
- 755 Dumitriu, D., Peinado, R. A., Peinado, J., & de Lerma, N. L. (2015). Grape pomace extract  
756 improves the in vitro and in vivo antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro  
757 Ximénez grapes. *Journal of Functional Foods*, 17, 380–387.  
758 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.003>
- 759 Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., & Tavarela, J. G. (2010). Brewer's  
760 *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food*  
761 *Science and Technology*, 21(2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.008>
- 762 Fomina, M., & Gadd, G. M. (2014). Biosorption: current perspectives on concept , definition and  
763 application. *Bioresource Technology*, 160, 3–14.  
764 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.102>
- 765 Fragoso, S., Aceña, L., Guasch, J., Busto, O., & Mestres, M. (2011). Application of FT-MIR  
766 spectroscopy for fast control of red grape phenolic ripening. *Journal of Agricultural and*  
767 *Food Chemistry*, 59(6), 2175–2183. <https://doi.org/10.1021/jf104039g>

- 768 Freundlich, H. M. F. (1906). Over the adsorption in solution. *The Journal of Physical Chemistry*,  
769 57, 385–471.
- 770 Gadd, G. M. (2009). Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance  
771 and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and*  
772 *Biotechnology*, 84(1), 13–28. <https://doi.org/10.1002/jctb.1999>
- 773 Galichet, A., Sockalingum, G. D., Belarbi, A., & Manfait, M. (2001). FTIR spectroscopic analysis  
774 of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Study of an anomalous strain exhibiting a pink-  
775 colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters*, 197(2), 179–186.  
776 [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00101-X)
- 777 Gautam, R. K., Mudhoo, A., Lofrano, G., & Chattopadhyaya, M. C. (2014). Biomass-derived  
778 biosorbents for metal ions sequestration: Adsorbent modification and activation methods  
779 and adsorbent regeneration. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 239–  
780 259. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.12.019>
- 781 Ghaedi, M., Hajati, S., Barazesh, B., Karimi, F., & Ghezelbash, G. (2013). *Saccharomyces*  
782 *cerevisiae* for the biosorption of basic dyes from binary component systems and the high  
783 order derivative spectrophotometric method for simultaneous analysis of Brilliant green  
784 and Methylene blue. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(1), 227–233.  
785 <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.08.006>
- 786 Ghorbani, F., Younesi, H., Ghasempouri, S. M., Zinatizadeh, A. A., Amini, M., & Daneshi, A.  
787 (2008). Application of response surface methodology for optimization of cadmium  
788 biosorption in an aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering*  
789 *Journal*, 145(2), 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.04.028>
- 790 González-Centeno, M. R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., & Simal, S. (2015).  
791 Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and  
792 antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and  
793 modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506–514.  
794 <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.027>
- 795 Ho, Y. S., & McKay, G. (2000). The kinetics of sorption of divalent metal ions onto sphagnum  
796 moss peat. *Water Research*, 34(3), 735–742. [https://doi.org/10.1016/S0043-](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00232-8)  
797 [1354\(99\)00232-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00232-8)
- 798 Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A., & Merrifield, D. L. (2011). The effects of dietary inactive  
799 brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological  
800 responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 318(1–2), 90–  
801 94. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.043>

- 802 Iora, S. R. F., Maciel, G. M., Zielinski, A. A. F., da Silva, M. V., Pontes, P. V. de A., Haminiuk,  
803 C. W. I., & Granato, D. (2015). Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant  
804 capacity of grape pomace. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(1), 62–  
805 69. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12583>
- 806 Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., Cifuentes-Gomez, T., Escudero-Gilete, M. L., Heredia, F. J.,  
807 & Spencer, J. P. E. (2015). Assessment of white grape pomace from winemaking as  
808 source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chemistry*, *183*, 78–  
809 82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.022>
- 810 Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Antioxidant  
811 potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity  
812 measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Research*  
813 *International*, *66*, 150–157.
- 814 Jilani, H., Cilla, A., Barberá, R., & Hamdi, M. (2015). Biosorption of green and black tea  
815 polyphenols into *Saccharomyces cerevisiae* improves their bioaccessibility. *Journal of*  
816 *Functional Foods*, *17*, 11–21. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.006>
- 817 Jilani, H., Cilla, A., Barberá, R., & Hamdi, M. (2016). Improved bioaccessibility and antioxidant  
818 capacity of olive leaf (*Olea europaea* L.) polyphenols through biosorption on  
819 *Saccharomyces cerevisiae*. *Industrial Crops and Products*, *84*, 131–138.  
820 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.002>
- 821 Khakpour, H., Younesi, H., & Mohammadhosseini, M. (2014). Two-stage biosorption of  
822 selenium from aqueous solution using dried biomass of the baker's yeast *Saccharomyces*  
823 *cerevisiae*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *2*(1), 532–542.  
824 <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.010>
- 825 Kim, Y.-H., Lee, B., Choo, K.-H., & Choi, S.-J. (2014). Adsorption characteristics of phenolic and  
826 amino organic compounds on nano-structured silicas functionalized with phenyl groups.  
827 *Microporous and Mesoporous Materials*, *185*, 121–129.  
828 <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.10.017>
- 829 Koehnlein, E. A., Koehnlein, E. M., Correa, R. C. G., Nishida, V. S., Correa, V. G., Bracht, A., &  
830 Peralta, R. M. (2016). Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant  
831 capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food*  
832 *Sciences and Nutrition*, *67*(6), 614–623. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1186156>
- 833 Kumar, N. S., & Min, K. (2011). Phenolic compounds biosorption onto *Schizophyllum commune*  
834 fungus: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling. *Chemical Engineering*  
835 *Journal*, *168*(2), 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.023>

- 836 Laghi, L., Versari, A., Parpinello, G. P., Nakaji, D. Y., & Boulton, R. B. (2011). FTIR  
837 Spectroscopy and Direct Orthogonal Signal Correction Preprocessing Applied to Selected  
838 Phenolic Compounds in Red Wines. *Food Analytical Methods*, 4(4), 619–625.  
839 <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9240-2>
- 840 Lajili, S., Azouaou, S. A., Turki, M., Muller, C. D., & Bouraoui, A. (2016). Anti-inflammatory,  
841 analgesic activities and gastro-protective effects of the phenolic contents of the red alga,  
842 *Laurencia obtusa*. *European Journal of Integrative Medicine*, 8(3), 298–306.  
843 <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2015.12.006>
- 844 Langmuir, I. (1916). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I.  
845 Solids. *Journal of the American Chemical Society*, 38(11), 2221–2295.  
846 <https://doi.org/10.1021/ja02268a002>
- 847 Lee, S.-J., Lee, S. Y., Chung, Myung-SLee, S.-J., Lee, S. Y., Chung, M.-S., & Hur, S. J. (2016).  
848 Development of novel in vitro human digestion systems for screening the bioavailability  
849 and digestibility of foods. *Journal of Functional Foods*, 22, 113–121.  
850 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.005ub>, & Hur, S. J. (2016). Development of novel in  
851 vitro human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods.  
852 *Journal of Functional Foods*, 22, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.005>
- 853 Link, J. V., Lemes, A. L. G., Marquetti, I., Scholz, M. B. dos S., & Bona, E. (2014). Geographical  
854 and genotypic classification of arabica coffee using Fourier transform infrared  
855 spectroscopy and radial-basis function networks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory*  
856 *Systems*, 135, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.04.008>
- 857 López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Hernández-Sánchez, P., Guardiola, L., Pérez-  
858 Sánchez, H., Fortea, I., ... Núñez-Delicado, E. (2016). Use of cyclodextrins to recover  
859 catechin and epicatechin from red grape pomace. *Food Chemistry*, 203, 379–385.  
860 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.100>
- 861 Machado, S., Grosso, J. P., Nouws, H. P. A., Albergaria, J. T., & Delerue-Matos, C. (2014).  
862 Utilization of food industry wastes for the production of zero-valent iron nanoparticles.  
863 *Science of The Total Environment*, 496, 233–240.  
864 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.058>
- 865 Maciel, G. M., Souza, C. G. M. De, Araújo, C. A. V. De, Bona, E., Haminiuk, C. W. I., Castoldi,  
866 R., ... Peralta, R. M. (2013). Biosorption of herbicide picloram from aqueous solutions by  
867 live and heat-treated biomasses of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Trametes*  
868 sp. *Chemical Engineering Journal*, 215–216, 331–338.  
869 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.127>

- 870 Mathialagan, T., & Viraraghavan, T. (2009). Bioresource Technology Biosorption of  
871 pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. *Bioresource Technology*,  
872 *100*(2), 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.054>
- 873 Melo, P. S., Massarioli, A. P., Denny, C., Dos Santos, L. F., Franchin, M., Pereira, G. E., ... De  
874 Alencar, S. M. (2015). Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition  
875 and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species.  
876 *Food Chemistry*, *181*, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.087>
- 877 Michalak, I., Chojnacka, K., & Witek-Krowiak, A. (2013). State of the art for the biosorption  
878 process - A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *170*(6), 1389–1416.  
879 <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0269-0>
- 880 Mosele, J. I., Maciá, A., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2016). Stability and metabolism of  
881 *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion  
882 and colonic fermentation. *Food Chemistry*, *201*, 120–130.  
883 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.076>
- 884 Nguyen, M. L., & Juang, R.-S. (2015). Modification of crosslinked chitosan beads with histidine  
885 and *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced Ni(II) biosorption. *Journal of the Taiwan*  
886 *Institute of Chemical Engineers*, *56*, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.03.033>
- 887 Park, D., Yun, Y.-S., & Park, J. M. (2010). The past, present, and future trends of biosorption.  
888 *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *15*(1), 86–102.  
889 <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0199-4>
- 890 Pinacho, R., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., & Calvo, M. I. (2015). Phenolic  
891 compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their  
892 antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*, *19*, 49–62.  
893 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.015>
- 894 Pineda-Vadillo, C., Nau, F., Guerin-Dubiard, C., Jardin, J., Lechevalier, V., Sanz-Buenhombre,  
895 M., ... Dupont, D. (2017). The food matrix affects the anthocyanin profile of fortified egg  
896 and dairy matrices during processing and in vitro digestion. *Food Chemistry*, *214*, 486–  
897 496. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.049>
- 898 Rangabhashiyam, S., Anu, N., Giri Nandagopal, M. S., & Selvaraju, N. (2014). Relevance of  
899 isotherm models in biosorption of pollutants by agricultural byproducts. *Journal of*  
900 *Environmental Chemical Engineering*, *2*(1), 398–414.  
901 <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.01.014>
- 902 Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliar, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E.  
903 de S. S., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace



- 904 from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil.  
905 *Food Chemistry*, 127(1), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.137>
- 906 Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Greiner, R., Orlie, V., & Lebovka, N. I. (2016).  
907 Negative pressure cavitation extraction: A novel method for extraction of food bioactive  
908 compounds from plant materials. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 98–108.  
909 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.005>
- 910 Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-  
911 Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–  
912 158. <https://doi.org/10.12691/ijeb-2-1-5>
- 913 Sri Harsha, P. S. C., Gardana, C., Simonetti, P., Spigno, G., & Lavelli, V. (2013).  
914 Characterization of phenolics, in vitro reducing capacity and anti-glycation activity of red  
915 grape skins recovered from winemaking by-products. *Bioresource Technology*, 140, 263–  
916 268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.092>
- 917 Stafussa, A. P., Maciel, G. M., Da Silva Anthero, A. G., Da Silva, M. V., Zielinski, A. A. F., &  
918 Haminiuk, C. W. I. (2016). Biosorption of anthocyanins from grape pomace extracts by  
919 waste yeast: kinetic and isotherm studies. *Journal of Food Engineering*, 169, 53–60.  
920 <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.016>
- 921 Subbaiah, M. V., & Kim, D.-S. (2016). Adsorption of methyl orange from aqueous solution by  
922 aminated pumpkin seed powder: Kinetics, isotherms, and thermodynamic studies.  
923 *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 109–117.  
924 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.016>
- 925 Temkin, M. J., & Pyzhev, V. (1940). Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalyst.  
926 *Acta Physicochimica USSR*, 12, 217–222.
- 927 Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhães, L. M., Barreiros, L., Queiroz, J., & Cunha, L. M.  
928 (2015). Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant  
929 properties. *Industrial Crops and Products*, 74, 397–406.  
930 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.055>
- 931 Vu, K. D., Carlettini, H., Bouvet, J., Côté, J., Doyon, G., Sylvain, J.-F., & Lacroix, M. (2012).  
932 Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the  
933 antiproliferative activity against two colon cancer cell lines. *Food Chemistry*, 132(2), 959–  
934 967. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.078>
- 935 Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A  
936 review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 427–451.  
937 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.001>

- 938 Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future.  
939 *Biotechnology Advances*, 27(2), 195–226.  
940 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>
- 941 Yi, C., Shi, J., Kramer, J., Xue, S., Jiang, Y., Zhang, M., ... Pohorly, J. (2009). Fatty acid  
942 composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. *Food Chemistry*,  
943 114(2), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.103>
- 944 Yu, J., Li, B., Sun, X., Yuan, J., & Chi, R. (2009). Polymer modified biomass of baker ' s yeast  
945 for enhancement adsorption of methylene blue , rhodamine B and basic magenta, 168,  
946 1147–1154. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.144>
- 947 Zeng, Z., Liu, C., Luo, S., Chen, J., & Gong, E. (2016). The Profile and Bioaccessibility of  
948 Phenolic Compounds in Cereals Influenced by Improved Extrusion Cooking Treatment.  
949 *PLoS ONE*, 11(8), e0161086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161086>
- 950 Zhang, Y., Liu, W., Xu, M., Zheng, F., & Zhao, M. (2010). Study of the mechanisms of Cu<sup>2+</sup>  
951 biosorption by ethanol/caustic-pretreated baker's yeast biomass. *Journal of Hazardous*  
952 *Materials*, 178(1–3), 1085–1093. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.051>
- 953
- 954
- 955
- 956
- 957
- 958
- 959
- 960
- 961
- 962
- 963
- 964
- 965
- 966
- 967
- 968
- 969
- 970
- 971

972 **Table 1**

973 Total phenolic content and antioxidant capacity of Bordeaux and Cabernet Sauvignon  
 974 grape pomaces

<b>Grape pomace</b>	<b>Phenolic Compounds Content*</b>	<b>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity**</b>
Bordeaux	1978.79 <sup>a</sup> ± 52.49	4760.00 <sup>a</sup> ± 61.10
Cabernet Sauvignon	3766.67 <sup>b</sup> ± 26.24	8640.00 <sup>b</sup> ± 23.09

975 \*mg GAE 100 g<sup>-1</sup> (milligram of gallic acid equivalents per 100 g of dried pomace)

976 \*\*μmol TE L<sup>-1</sup> (micromoles of Trolox equivalents per liter of extract)

977 Values in a column followed by different letters indicates significant difference (p <  
 978 0.05), by the Tukey test.

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

1001

1002

1003 **Table 2**

1004 Pseudo-second order parameters for all yeasts before contact with Cabernet  
 1005 Sauvignon and Bordeaux grape pomaces

Kinetic parameters	Control yeast	Autoclaved yeast	Acid yeast	Basic yeast
<b>Cabernet Sauvignon</b>				
$q_e$ exp (mg g <sup>-1</sup> )	98.490	86.110	103.170	190.280
$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	99.010	89.290	105.260	196.080
$K_2$ (g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) x 10 <sup>4</sup>	15.340	7.180	11.890	131.220
Determination coefficient	0.997	0.995	0.995	0.999
Equilibrium time (min.)	360	240	240	240
<b>Bordeaux</b>				
$q_e$ exp (mg g <sup>-1</sup> )	62.120	45.830	83.720	35.110
$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	62.890	47.170	85.470	35.710
$K_2$ (g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) x 10 <sup>4</sup>	2.740	1.370	10.220	0.460
Determination coefficient	0.995	0.998	0.998	0.997
Equilibrium time (min.)	360	240	240	240

1006 Where  $q_e$  is the sorption capacity at time t and at equilibrium and  $K_2$  is the rate constant  
 1007 of the pseudo-second order model.

1008

1009

1010

1011

1012

1013

1014

1015

1016

1017

1018

1019

1020

1021

1022

1023

1024

1025

1026 **Table 3**

1027 Isotherms parameters for all yeasts after the contact with Cabernet Sauvignon and  
 1028 Bordeaux grape pomaces

	Control	Autoclaved	Acid	Basic
<b>Cabernet Sauvignon</b>				
Freundlich				
$K_F$ (L g <sup>-1</sup> )	1,162	12,175	4,413	
n	1,162	0,923	0,910	-
R <sup>2</sup>	0,983	0,966	0,891	
Temkin				
$B$ (J mol <sup>-1</sup> )	40,340	67,850	28,180	15,682
$A$ (L g <sup>-1</sup> )	161,861	349,77	278,906	473,005
R <sup>2</sup>	0,947	0,968	0,917	0,959
D-R				
$q_s$ (mg g <sup>-1</sup> )	3292,492	2313,924	6777,747	
$E$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	6,376	5,439	5,472	-
$\beta$	0,0123	0,0169	0,0167	
R <sup>2</sup>	0,987	0,967	0,901	
<b>Bordeaux</b>				
Langmuir				
$q_0$ (mg g <sup>-1</sup> )		185,185		172,414
$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	-	0,00955	-	0,00726
$R_L$		0,138		0,168
R <sup>2</sup>		0,989		0,971
Freundlich				
$K_F$ (L g <sup>-1</sup> )	2,258	38,252	1,490	27,562
n	1,101	4,523	1,438	3,906
R <sup>2</sup>	0,906	0,900	0,888	0,8532
Temkin				
$B$ (J mol <sup>-1</sup> )	94,051	317,936	142,012	307,45
$A$ (L g <sup>-1</sup> )	145,514	3,890	97,019	7,774
R <sup>2</sup>	0,883	0,891	0,887	0,8425
D-R				
$q_s$ (mg g <sup>-1</sup> )	1731,944	278,997	816,723	274,980
$E$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	6,324	13,131	7,255	12,127
$\beta$	0,0125	0,0029	0,0095	0,0034
R <sup>2</sup>	0,909	0,900	0,891	0,8547

1029 \* (-) Data have not fitted significantly to the model

1030 Where:  $q_0$  = monolayer adsorption capacity;  $K_L$  = Langmuir constant;  $R_L$  = Langmuir  
 1031 equilibrium parameter;  $A$  = equilibrium binding constant;  $B$  = Temkin constant;  $K_F$  =  
 1032 Freundlich constant; n = adsorption intensity;  $q_s$  = Dubinin-Radushkevich monolayer  
 1033 capacity;  $\beta$  = Dubinin-Radushkevich constant;  $E$  = mean free energy.

1034

1035

1036

1037 **Table 4**

1038 Total phenolic content and total antioxidant capacity in analyzed extracts and  
 1039 bioaccessible fractions

<b>Samples</b>	<b>Total content</b>	<b>Bioaccessible fraction</b>
Polyphenols (mg GAE L <sup>-1</sup> )		
Crude extract BB	1543.03 ± 10.49	1283.77 ± 3.84
Crude extract AB CY	1246.06 ± 20.99	1264.00 ± 12.78
Crude extract AB BY	1203.64 ± 18.18	1021.11 ± 16.92
Antioxidant capacity (μmolTE L <sup>-1</sup> )		
Crude extract BB	7665.00 ± 124.77	4924.71 ± 216.70
Crude extract AB CY	7053.70 ± 19.98	4290.40 ± 79.84
Crude extract AB BY	9130.00 ± 19.98	3279.81 ± 22.13

1040 BB: before biosorption; AB: after biosorption; CY: control yeast; BY: basic yeast

1041

1042

1043

1044

1045

1046

1047

1048

1049

1050

1051

1052

1053

1054

1055

1056

1057

1058

1059

1060

1061 **Table 5**

1062 Total phenolic content and total antioxidant capacity of *Saccharomyces cerevisiae*  
 1063 suspensions

<b>Samples</b>	<b>Before digestion</b>	<b>After gastric phase</b>	<b>After intestinal phase</b>
Polyphenols (mg GAE L <sup>-1</sup> )			
Control yeast AB	21.51	n.d.	n.d.
Basic yeast AB	37.45	63.03	n.d.
Antioxidant capacity (μmolTE L <sup>-1</sup> )			
Control yeast AB	200.67	41.54	63.82
Basic yeast AB	240.00	1702.63	188.90

1064 AB: after biosorption. Total phenolic content and total antioxidant capacity of control  
 1065 and basic yeast before biosorption were subtracted from values obtained after  
 1066 biosorption

1067 \*n.d.: not detected

1068

1069

1070

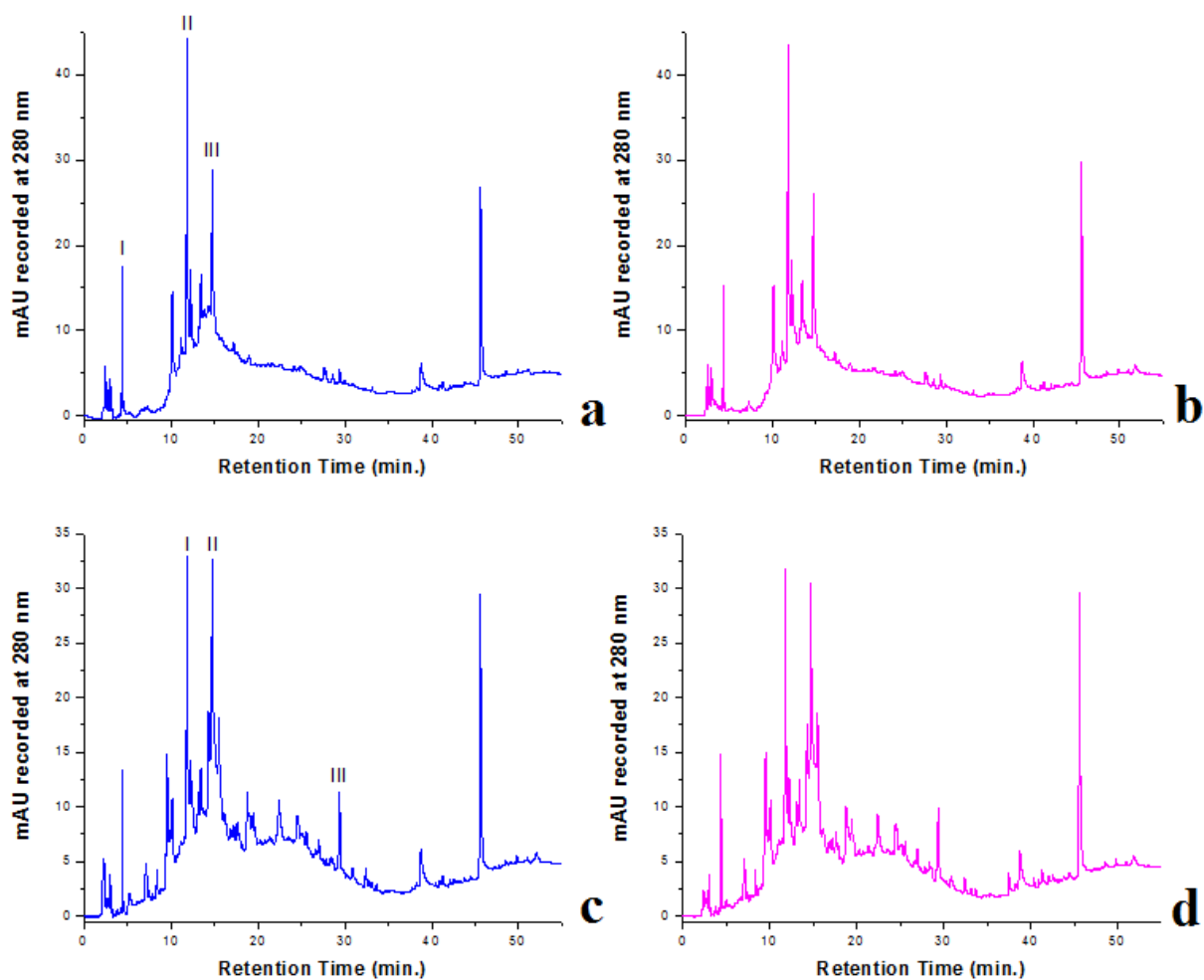
1071

1072

1073

1074

1075



1076

1077 Fig. 1 – Chromatogram (fingerprint of phenolic compounds at 280 nm) of a) CSE, b)

1078 CSE after biosorption by basic yeast, c) BE and d) BE after the contact with acid yeast.

1079 Peaks I, II, III indicated in the Fig. 1a decreased 12%, 2,75% and 9,5%, respectively,

1080 after the contact between CSE and basic yeast, whereas peaks I, II and III shown in

1081 Fig. 1c decreased 3,5%, 6,5% and 11,5% after the biosorption of TPC from BE by acid

1082 yeast

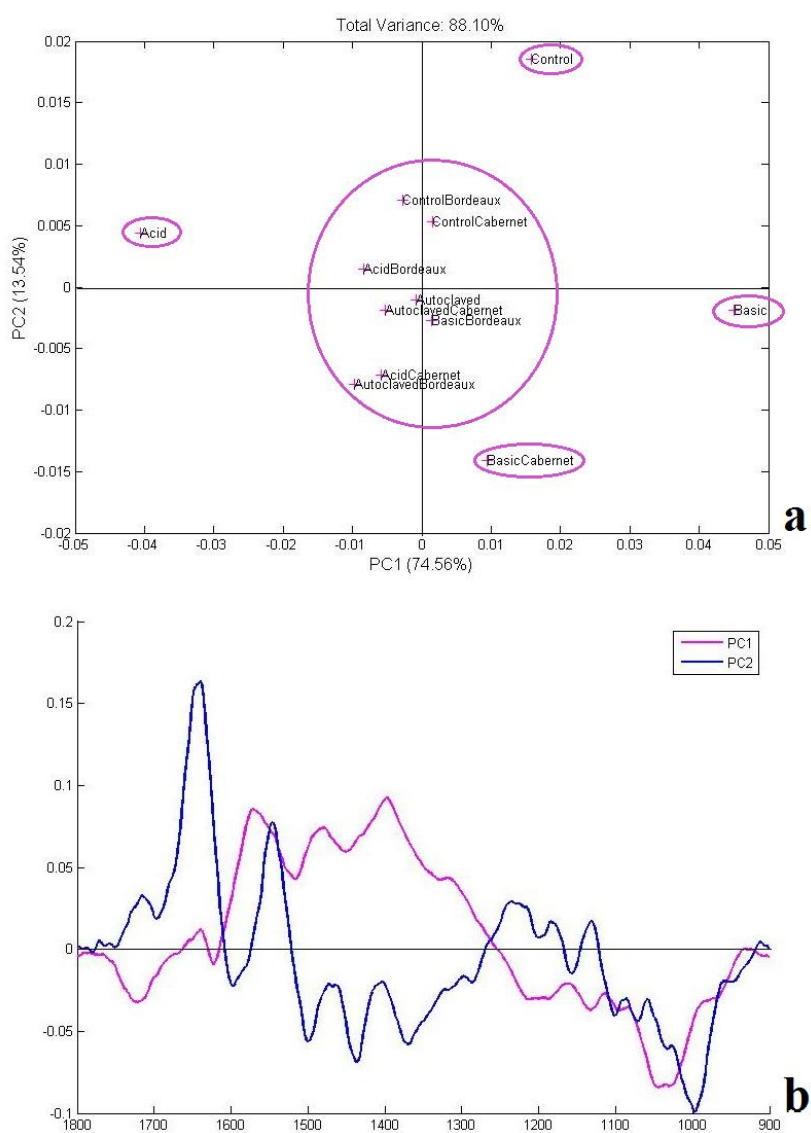
1083

1084

1085

1086



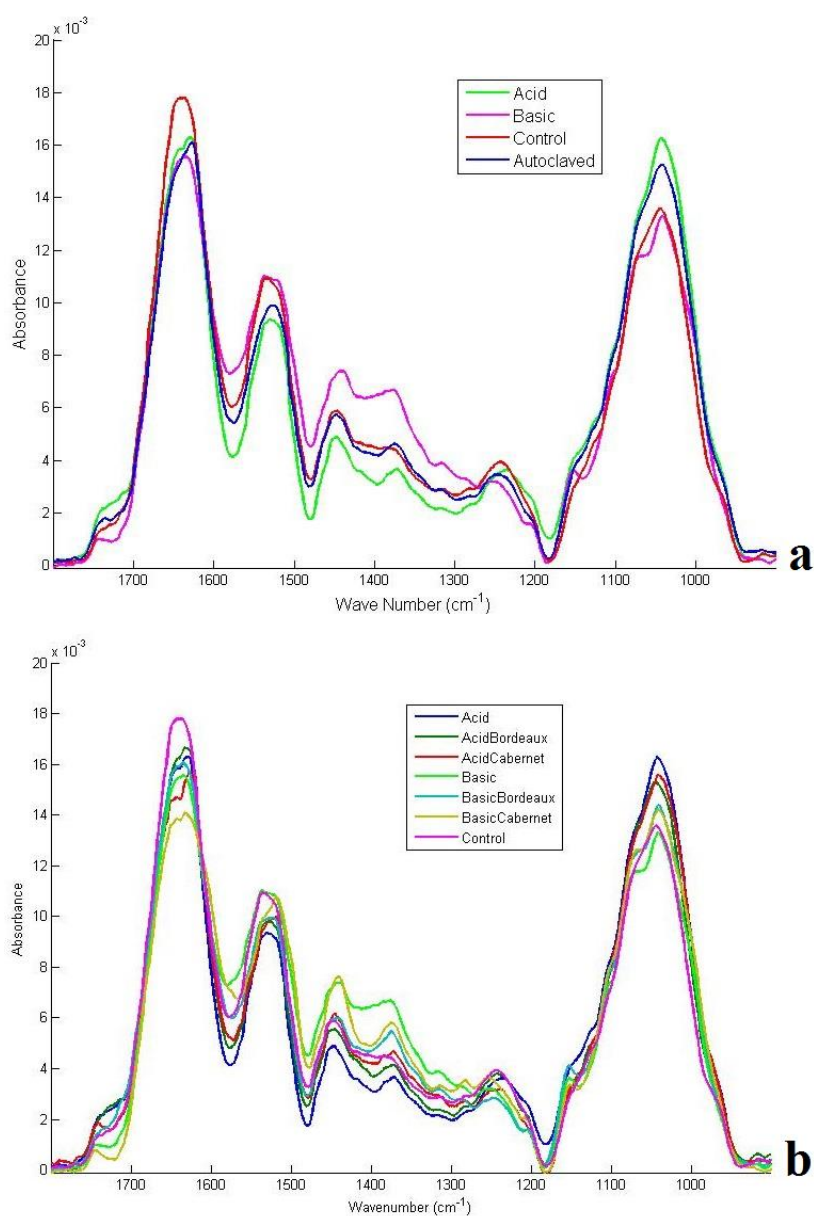


1087

1088 Fig. 2 – (a) PCA scores/scores plot, (b) PC1 and PC2 loadings profile, in the 1800-900  
 1089  $\text{cm}^{-1}$  spectral region

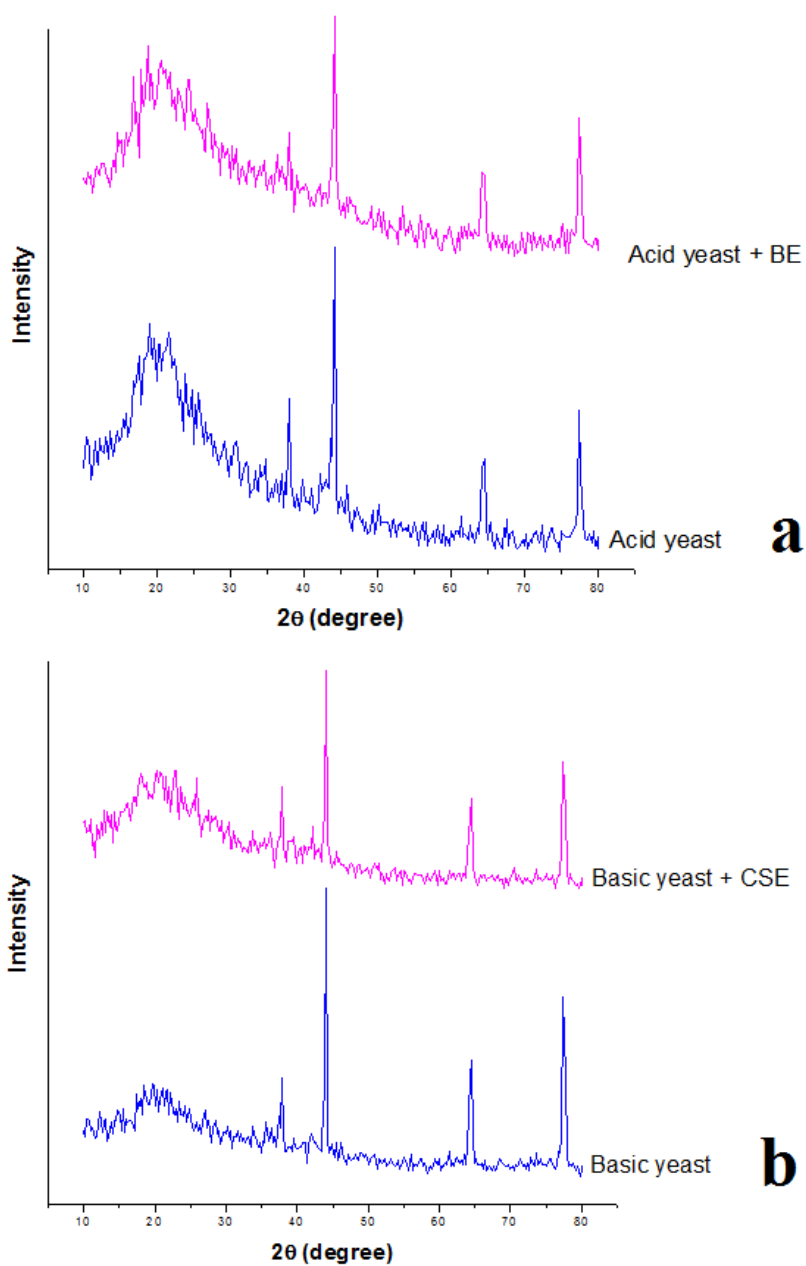
1090

1091



1092

1093 Fig. 3 – (a) spectra of acid, alkaline, control and autoclaved yeasts and (b) spectra of  
 1094 control yeast and acid and alkaline yeasts before and after biosorption of TPC from  
 1095 CSE and BE, in the 1800-900  $\text{cm}^{-1}$  spectral region



1096

1097 Fig. 4 – X-ray spectra of (a) acid yeast before and after the contact with BE and (b)

1098 basic yeast before and after the contact with CSE

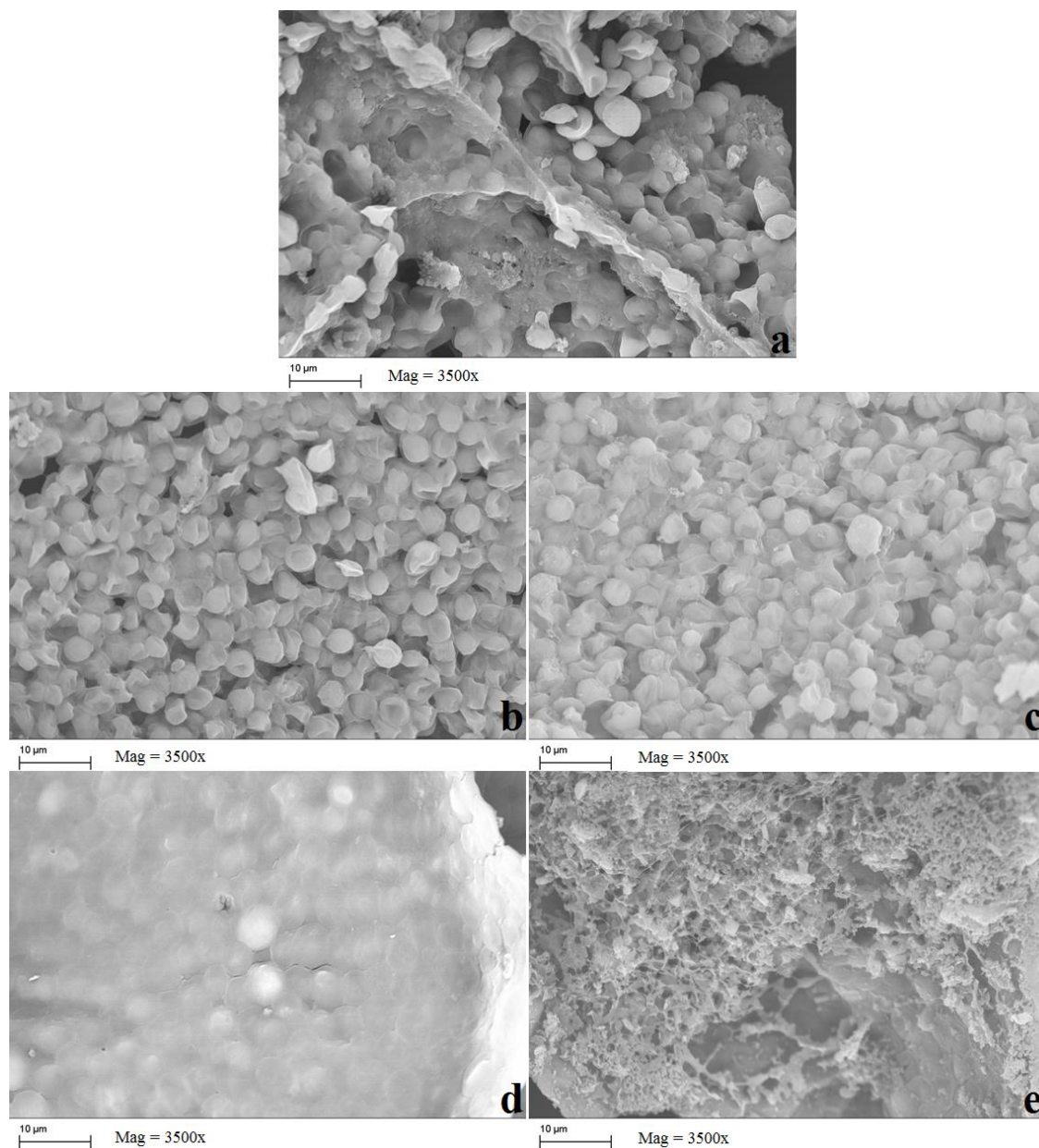


Fig. 5 – Scanning electron microscopy of (a) control yeast, (b) acid yeast, (c) acid yeast after contact with BE, (d) alkaline yeast and (e) alkaline yeast before contact with CSE

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

A modificação química de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* se mostrou um eficiente modo de aprimorar as capacidades bioativas do material biológico, visto que as leveduras tratadas com ácido e base apresentaram as maiores capacidades de sorção no estudo cinético. A levedura básica forneceu um aumento de 93,2 % na capacidade de sorção dos CFT do ECS e a levedura ácida apresentou uma capacidade de sorção dos CFT do EB 34,77% maior, ambas comparadas à levedura controle. A modificação térmica foi menos eficiente do que os tratamentos químicos, pois apresentou menores capacidades de sorção, até mesmo se comparadas com a levedura controle.

O modelo de pseudo-segunda ordem teve o melhor ajuste para os dados cinéticos da bioativação dos CFT do ECS e EB nos quatro tipos de leveduras estudados. O parâmetro  $n$  da isoterma de Freundlich caracterizou a bioativação dos CFT de ambos extratos nas quatro leveduras estudadas como um processo favorável. As isotermas de Temkin e Dubinin-Radushkevich apresentaram melhor ajuste para os dados de equilíbrio da bioativação de CFT do ECS em levedura básica e do EB em levedura ácida, respectivamente.

Pela análise das componentes principais, foi possível notar diferença entre as leveduras tratadas e controle e entre essas biomassas antes e depois do processo de bioativação de compostos fenólicos. A análise multivariada dos dados do MIR-ATR também evidenciou uma especificidade de compostos fenólicos de cada bagaço estudado com grupos funcionais diferentes presentes nas leveduras. A diminuição dos picos nos cromatogramas, nos gráficos de difração de raio x e as diferenças morfológicas entre as leveduras antes e depois da remoção dos CFT dos bagaços de uva indicaram que as biomassas de leveduras foram enriquecidas.

A digestão *in vitro* dos extratos mostrou que houve um aumento na bioacessibilidade dos compostos presentes nos extratos que passaram pelo processo de bioativação, sugerindo que a matriz alimentar envolvida com os compostos tem influência na bioacessibilidade e que as leveduras provavelmente são capazes de aumentar a estabilidade dos compostos bioativos dos extratos de bagaço de uva. Além disso, a digestão simulada *in vitro* contribuiu para afirmar que a levedura com

melhor desempenho foi a levedura modificada por tratamento básico, uma vez que foi capaz de proteger a atividade antioxidante dos compostos bioabsorvidos mesmo após liberação durante a fase gástrica. A bioacessibilidade dos antioxidantes bioabsorvidos em levedura alcalinizada foi 147% maior em relação à levedura controle.

A levedura enriquecida com compostos fenólicos representa uma fonte de baixo custo de antioxidantes e opção viável para aplicação em formulações alimentícias, capaz de aumentar a funcionalidade do produto de interesse, proteger a bioatividade e garantir maior bioacessibilidade dos compostos bioabsorvidos, mesmo durante a digestão do complexo levedura-antioxidantes.