

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**ANNA LOU MUCHARSKI STRAFIT DE OLIVEIRA**

**Estudo da biossorção de flavonoides do bagaço de uva em  
*Saccharomyces cerevisiae***

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA**

**2019**

**ANNA LOU MUCHARSKI STRAFIT DE OLIVEIRA**

**Estudo da bio sorção de flavonoides do bagaço de uva em  
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

CURITIBA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

048e Oliveira, Anna Lou Mucharski Strafit de  
2019 Estudo da biossorção de flavonoides do bagaço de uva  
em *Saccharomyces cerevisiae* / Anna Lou Mucharski Strafit  
de Oliveira.-- 2019.  
1 arquivo de texto : PDF ; 1,29 MB

Disponível em Wide Word Web  
Texto em português, com resumo em inglês  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência  
e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2019  
Bibliografia: p. 71-89

1. Engenharia ambiental - Dissertações. 2. Compostos  
bioativos. 3. Leveduras. 4. Adsorção. 5. Vinho e vinificação.  
I. Haminiuk, Charles Windson Isidoro, orient. II. Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação  
em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst. III. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

---

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba  
Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271

## TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 092

A Dissertação de Mestrado intitulada ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAGAÇO DE UVA EM *Saccharomyces cerevisiae*, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Anna Lou Mucharski Strafit de Oliveira**, no dia 26 de fevereiro de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias E Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

### BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Charles Windson Isidoro Haminiuk - Presidente - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Fabiola Iagher – UFPR

Prof(a). Dr(a). Giselle Maria Maciel – UTFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2018.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, pela vida;

Aos meus pais, sem eles eu nada seria. Por todo o incentivo ao estudo, por todo trabalho dedicado à minha educação e do meu irmão;

Ao meu noivo, pela compreensão e auxílio nas horas difíceis, pelo sorriso nas horas de felicidade;

Ao meu orientador Charles, pela oportunidade de trabalho e confiança;

Ao Prof. Marcus Liz, pela paciência, dedicação e atenção;

Às minhas colegas de laboratório, Valéria, Aline Hermann, Aline Bisinella, Fernanda Rubio e Ana Paula. Vocês foram fundamentais para que esse projeto fosse bem-sucedido;

## RESUMO

OLIVEIRA, A. L. M. S. de. **ESTUDO DA BIOSSORÇÃO DE FLAVONOIDES DO BAGAÇO DE UVA EM *Saccharomyces cerevisiae***. 94 f. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Vinícolas e cervejarias produzem grande quantidade de resíduos agroindustriais que podem ser reaproveitados. Na produção de vinhos, os compostos fenólicos presentes nas uvas não são totalmente extraídos, sendo descartados junto com o bagaço. Já na indústria de cerveja, a levedura utilizada na fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, pode ser reaproveitada, porém parte de sua eficiência é perdida, o que gera grande quantidade de resíduo, sendo necessário repor o microrganismo para a continuidade do processo. Ambas indústrias geram então, grandes volumes de resíduos, com alto potencial de reaproveitamento. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como substrato biossorvente para flavonoides extraídos do bagaço de uva das variedades *Merlot* e *Tannat*. O resíduo de levedura e o bagaço de uva foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV - EDS), onde foi possível verificar os danos celulares iniciais, sendo notório que após a biossorção as células se apresentaram inchadas e com pequenos grumos em sua superfície. Além da microscopia, utilizou-se de Espectroscopia no Infravermelho Médio com Refletância Total Atenuada (FTIR/ATR) para a caracterização e posterior comparação. Com o FTIR, foram identificados os principais grupos funcionais relacionados com a biossorção, como grupos carboxila, amino/hidroxila e amida. A concentração de flavonoides dos extratos hidroalcoólicos foi identificada via cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD/UV-Vis). Para as análises de cromatografia, precedeu-se com a validação do método, onde foram avaliados 5 flavonoides, sendo os mesmos buscados nas amostras antes e após a biossorção, no entanto, a catequina foi o único flavonoide encontrado nas amostras, sendo que seu pico sofreu redução de 16% e 50% para as amostras *Merlot* e *Tannat* biossorvidas. Para a determinação de compostos fenólicos totais (CFT) utilizou-se do método de de Folin - Ciocalteu, enquanto que para a determinação dos flavonoides totais foi utilizada a metodologia baseada no reagente cloreto de alumínio. Para a variedade *Merlot* os flavonoides corresponderam a cerca de 24,5% dos CFT, enquanto que para a variedade *Tannat*, esse valor se aproxima de 42% do total de compostos fenólicos totais. Para os ensaios de biossorção, utilizou-se o tempo de equilíbrio de 4 horas, sendo aplicados os modelos cinéticos de Pseudo – segunda ordem e difusão intrapartícula. O primeiro modelo descreve que a taxa de sorção é proporcional ao número de sítios livres de ligação na superfície do material biossorvente, e o segundo considera que mais de um fator pode interferir na adsorção, resultando em adsorção de vários estágios. Com isso, os dados ajustaram-se melhor ao modelo de pseudo – segunda ordem, com coeficientes de determinação de 0,9968 e 0,9914 para as variedades *Merlot* e *Tannat*, respectivamente. Para a variedade *Merlot* obteve-se duplo ajuste para o modelo de difusão intrapartícula, indicando 2 principais estágios de biossorção. Já no estudo das isotermas, foram testados os modelos de Langmuir, Freundlich, Temkin e Dubinin – Radushkevich. Observou-se o melhor ajuste, bem como os parâmetros de cada isoterma. Com isso o modelo de melhor ajuste foi o de Dubinin – Radushkevich, indicando que a levedura tem alta porosidade, sendo a adsorção de caráter físico, ou seja, ocorrendo principalmente por interações de van der Waals. Com a digestão in vitro avaliou-se a degradabilidade dos flavonoides biossorvidos na levedura. Na etapa gástrica observou-se a diminuição da concentração de flavonoides, fato que pode ter relação com as condições químicas do meio, já na etapa intestinal o pH básico pode modificar os compostos, gerando novas moléculas, com diferentes atividades biológicas. Assim, a levedura é um meio interessante para incorporação de flavonoides, já que ela é capaz de protegê-los durante a etapa gástrica e entregá-los na fase intestinal, onde serão absorvidos.

**Palavras-chave:** Compostos bioativos. Levedura. Adsorção. CLAE/DAD.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, A. L. M. S. de. **BIOSORPTION STUDY OF PHENOLIC COMPOUNDS OF GRAPEVINE IN *Saccharomyces cerevisiae*** 94 f. Dissertation. Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2019.

Wineries and Breweries produce large amount of agro-industrial wastes which can be reused. In the production of wines, the phenolic compounds present in grapes are not fully extracted, being discarded with pomace. In the production of beer, the yeast used in fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, can be reused, but part of your efficiency is lost, being necessary the replacement of the yeast during the process. Both industries generate, therefore, large amounts of waste, with high potential of reutilization. In this context, this study aimed to evaluate the use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a biosorbent substrate for flavonoids extracted from the grape pomace of the varieties *Merlot* and *Tannat*. The yeast residue and the grape pomace were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) where it was possible to verify the initial cell damage, being notorious after biosorption cells showed swollen and with small lumps in the surface area. In addition, the Medium Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (MIR/ATR) was used for the characterization and comparison of the samples. With spectroscopy analysis, the main functional groups were identified related to the biosorption, as groups, carboxyl and hydroxyl amino/amide. The phenolic content of hydroalcoholic extracts was identified via High-Performance Liquid Chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). For the analysis of chromatography, preceded with the validation of the method, where they were assessed 5 flavonoids, and the same searched in the samples before and after the biosorption. However, the catechin was the only flavonoid found in the samples, with your peak reduced 16% and 50% for samples *Merlot* e *Tannat* bioadsorved. For the determination of total phenolic compounds (TPC), the method of the Folin-Ciocalteu reagent was used, while for the determination of flavonoids the methodology based in the aluminium chloride reagent was applied. For the *Merlot* variety, the flavonoids corresponded to about 24.5% of the CFT, while for the *Tannat* variety, this value approached 42% of the total phenolic compounds. For the biosorption assays, the equilibrium time was 4 hours, being applied the kinetic models of Pseudo - second order and intraparticle diffusion. The first model describes that the sorption rate is proportional to the number of free binding sites on the surface of the biosorbent material, and the second one considers that more than one factor can interfere with the adsorption, resulting in adsorption of several stages. Thus, the data were better fitted to the pseudo-second order model, with determination coefficients of 0.9968 and 0.9914 for the varieties *Merlot* and *Tannat*, respectively. The *Merlot* variety showed a double fit curve for the intraparticle diffusion model, indicating 2 main stages of biosorption. In the study of the isotherms, the Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin - Radushkevich models were tested. The best model fit, as well as the parameter of each isotherm, were analysed. The Dubinin – Raduschkevich model showed the best fit for the two varieties tested. This model indicates a yeast with high porosity, being an adsorption of physical character, that is, occurring mainly by interactions of van Waals. In vitro digestion was evaluated for the degradability of the biosorbent flavonoids in yeast. In the gastric stage, the concentration of flavonoids decreased, which may be related to the chemical conditions gastric environment, in intestinal step the pH basic can change the compounds, generating new molecules with different biological activities. Thus, the yeast is interesting for incorporation of flavonoids, since she is able to protect them during the gastric phase and deliver them in the intestinal phase, where they will be absorbed.

**Keywords:** Bioactive compounds. Yeast. Adsorption. HPLC-DAD.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção Mundial de vinho no ano de 2015.....	15
Figura 2: Fluxograma do processo de vinificação .....	17
Figura 3: Estrutura de compostos fenólicos presentes em uvas.....	21
Figura 4: Estrutura básica de um flavonoide .....	22
Figura 5: Fluxograma simplificado do processo produtivo de cerveja do tipo Pilsen .....	25
Figura 6: Representação dos possíveis tipos de adsorção no tempo de equilíbrio de reação .....	34
Figura 7: Fluxograma representativo das etapas metodológicas do projeto .....	42
Figura 8: - Cinética de adsorção de flavonoides pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (50 mg de massa do adsorvente; 293,15K de temperatura; 120 rpm de agitação; volume total de solução de 12,5 mL e com tempo de contato máximo de 240 minutos).....	49
Figura 9: Ajuste do modelo de Pseudo - segunda ordem para os testes de bioadsorção de flavonoides em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	51
Figura 10: Ajuste do ensaio cinético para o Modelo de Difusão Intrapartícula para as variedades <i>Merlot</i> e <i>Tannat</i> , na bioadsorção em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	52
Figura 11: Ajuste para a Isoterma de Langmuir para as variedades <i>Merlot</i> e <i>Tannat</i> .....	55
Figura 12: Ajuste para a Isoterma de Freundlich para as variedades <i>Merlot</i> e <i>Tannat</i> .....	56
Figura 13: Ajuste para a Isoterma de Temkin para as variedades <i>Merlot</i> e <i>Tannat</i> .....	58
Figura 14: Ajuste da Isoterma de Dubinin Radushkevich para o bagaço <i>Tannat</i> .....	59
Figura 15: Imagens de Microscopia Eletronica de Varredura para a amostra de levedura pura (a), bioadsorvida com extrato da variedade <i>Merlot</i> (b) e <i>Tannat</i> (c).....	60
Figura 16: Espectro de Infravermelho Médio para as amostras puras de levedura liofilizada e bagaços de uva secos.....	61
Figura 17: Espectro de Infravermelho Médio para as amostras de levedura liofilizada e levedura enriquecida com o extrato dos bagaços de uva das variedades <i>Merlot</i> e <i>Tannat</i> ..	63
Figura 18: Cromatograma dos padrões, na concentração de 10 ppm.....	64
Figura 19: Cromatograma do MIX dos padrões, na concentração de 10ppm, em 280 e 370 nm.....	65
Figura 20: Grafico da curva analítica dos 5 padrões utilizados.....	66
Figura 21: Cromatograma da comparação entre o extrato bagaço da variedade <i>Merlot</i> antes e após a bioadsorção, em 280nm .....	68
Figura 22: Cromatograma da comparação entre o extrato bagaço da variedade <i>Tannat</i> antes e após a bioadsorção, em 280nm .....	69



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação entre CFT e flavonoides nas espécies <i>Merlot</i> e <i>Tannat</i> .....	48
Tabela 2: Comparativo dos parâmetros cinéticos avaliados dos Modelos Pseudo - Segunda Ordem e Difusão Intrapartícula, para as variedades <i>Merlot</i> e <i>Tannat</i> .....	51
Tabela 3: Parâmetros das Isotermas de Freundlich, Temkin e Dubinin – Radushkevich para as espécies <i>Merlot</i> e <i>Tannat</i> .....	54
Tabela 4: Dados dos tempos de retenção, área dos picos e concentração de catequina encontrados nas corridas das amostras puras e bioSORVIDAS, em HPLC - DAD .....	67
Tabela 5: Flavonoides totais presentes nas amostras após a digestão gastrointestinal.....	69

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1	UVAS .....	14
3.2	VINHO.....	15
3.2.1	Processo de Vinificação.....	16
3.3	BAGAÇO DE UVA.....	19
3.4	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	20
3.4.1	Flavonoides .....	22
3.5	CERVEJA.....	23
3.5.1	Processo de Fabricação de Cerveja.....	24
3.5.2	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS E EXTRATOS.....	27
3.6.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
3.6.2	Espectroscopia no Infravermelho Médio com Refletância Total Atenuada (FTIR/ATR).....	28
3.6.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de Diodos (CLAE/DAD).....	29
3.7	ADSORÇÃO.....	30
3.7.1	Biossorção.....	30
3.7.2	Isotermas de Biossorção .....	34
3.7.3	Aplicações da Biossorção em alimentos / Estado da Arte.....	39
3.8	DIGESTÃO IN VITRO .....	40
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	42
4.1	SECAGEM DO BAGAÇO DE UVA.....	42
4.2	PREPARO DO BIOSSORVENTE .....	42
4.3	PREPARO DO EXTRATO HIDRO-ALCOOLICO DE BAGAÇO DE UVA .....	43
4.4	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS SOLÚVEIS (CFT) ATRAVÉS DO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU.....	43
4.4.1	Quantificação de Flavonoides.....	43

4.5	EXPERIMENTOS DE BIODSORÇÃO .....	44
4.5.1	Determinação da Cinética de Biossorção .....	44
4.5.2	Estudo das Isotermas de Biossorção .....	45
4.6	ANÁLISES DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	45
4.7	ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR/ATR) .....	46
4.8	ANÁLISES POR CROMATOGRÁFICA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE - DAD) E VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	46
4.9	EXPERIMENTOS DE DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
5.1	CFT e FLAVONOIDES .....	48
5.2	CINÉTICA DE BIODSORÇÃO .....	49
5.3	ISOTERMAS DE BIODSORÇÃO .....	53
5.3.1	Isoterma de Langmuir .....	54
5.3.2	Isoterma de Freundlich .....	55
5.3.4	Isoterma de Temkin .....	57
5.3.5	Isoterma de Dubinin – Radushkevich .....	58
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	59
5.5	ESPECTROSCOPIA NO INFRATERMELHO MÉDIO COM REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR/ATR) .....	61
5.6	CLAE – DAD/UV-VIS .....	63
5.6.1	Validação do Método .....	63
5.6.2	<i>Análise de CLAE – DAD/UV-Vis dos Extratos</i> .....	67
<b>5.7</b>	<b>DIGESTÃO IN VITRO</b> .....	<b>69</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>72</b>
	<b>APÊNDICE A - Gráfico da curva de calibração para o cálculo da quantificação dos CFT, em (mgGAE L<sup>-1</sup>)</b> .....	<b>92</b>
	<b>APÊNDICE B - Gráfico da curva de calibração para o cálculo da quantificação de flavonoides totais, em (ECAT L<sup>-1</sup>)</b> .....	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE C – Dados da validação do método</b> .....	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O bagaço de uva (BU) é o resíduo mais abundante da indústria vinícola consistindo principalmente de cascas e sementes que permanecem após a fermentação e maceração durante a elaboração do vinho (PINELO et al., 2006, FONTANA, ANTONIOLLI, BOTTINI, 2013). Este subproduto contém níveis elevados de compostos fenólicos devido à extração incompleta durante o processo de vinificação (ROCKENBACH, 2008; BARCIA, PERTUZATTI, GÓMEZ-ALONSO, GODOY, HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2014; JARA-PALACIOS et al., 2015)

Compostos fenólicos extraídos do bagaço da uva podem constituir matéria-prima barata destinada à preparação de suplementos alimentares ou nutracêuticos; como ingrediente funcional e como aditivo para produtos alimentares, farmacêuticos e cosméticos (CACACE, MAZZA, 2003; ROCKENBACH et al., 2011).

No contexto agroindustrial, o setor vinícola destaca-se mundialmente e tem se expandido no Brasil. Na safra de 2013 – 2014, a produção brasileira de uva alcançou 1,5 milhão de toneladas, consolidando o aumento progressivo na produção dessa fruta no País (FAO, 2016).

Paralelamente às vinícolas, as indústrias cervejeiras produzem excedentes industriais em grandes volumes, sendo um dos principais rejeitos a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizada na fermentação.

A levedura esgotada do processo de fermentação alcoólica pode ser empregada em diversos setores, como para a produção de ração animal pelo fato de ser uma excelente fonte de proteína (HUIGE, 2006), para a nutrição de peixes, podendo compensar em até 50% a proteína da sua alimentação sem nenhum efeito negativo (FERREIRA et al. 2010). Também é utilizada na indústria de biotecnologia, por exemplo para a produção de celulose, na indústria alimentícia para a obtenção de sabores de determinados alimentos e indústria farmacêutica (LIN, et al., 2013).

Como o Brasil é um grande produtor de bebidas e combustíveis através de fermentação alcoólica, acredita-se que a levedura esgotada possa ser utilizada em processos de adsorção. Conseqüentemente, o custo para essas empresas pode diminuir, pois seu efluente altamente poluente se transforma na matéria prima para o processo de adsorção de compostos de interesse.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biossorção e bioacessibilidade de flavonóides de amostras de bagaço de uva (variedades *Merlot* e *Tannat*), utilizando biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como material biossorvente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as amostras de bagaço de uva, levedura seca e levedura biossorvida através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia no Infravermelho Médio com Refletância Total Atenuada (FTIR/ATR);
- Quantificar os compostos fenólicos totais do bagaço de uva através do método de Folin - Ciocalteu;
- Quantificar os flavonoides totais nas amostras de bagaço de uva;
- Avaliar a cinética de biossorção de flavonoides em *Saccharomyces cerevisiae*, através dos modelos cinéticos de Pseudo-Segunda Ordem e modelo de Difusão Intrapartícula;
- Estudar o ajuste de isotermas da adsorção de flavonoides na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por modelos de monocamada e multicamada;
- Caracterizar os extratos (puros e resultantes da biossorção) por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE/DAD);
- Estudar a bioacessibilidade de flavonoides adsorvidos em *Saccharomyces cerevisiae* frente à digestão estomacal e intestinal *in vitro*;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 UVAS

A partir da introdução do cultivo da videira no Brasil, ocorrida em 1535, muitas regiões brasileiras em diferentes estados chegaram a experimentar e desenvolver o cultivo da uva juntamente com a produção de vinhos (GUERRA, 2009).

A vitivinicultura brasileira, embora presente em vários estados se concentra em poucas regiões. É especialmente importante para o Rio Grande do Sul, na serra gaúcha, onde quase a totalidade da produção se destina à agroindústria do suco e do vinho e essencialmente é produzida por pequenos agricultores de agricultura familiar. Na produção de uvas de mesa, a cultura se destaca no Vale do São Francisco (Pernambuco e Bahia) e em São Paulo, gerando renda para milhares de famílias. Nos últimos anos, com a implementação das Indicações Geográficas no Brasil, a viticultura tem contribuído fortemente para o desenvolvimento dos territórios envolvidos, promovendo a agregação de valor aos produtos e a valorização de seus respectivos fatores naturais e culturais (MELLO, 2016)

A videira botanicamente é classificada como arbusto sarmentoso e trepador da família *Vitaceae* gênero *Vitis*. Diversas variedades são cultivadas no mundo. Estima-se que existam em torno de 5.000 variedades *Vitis vinífera* e 2.000 *Vitis labrusca* além dos híbridos (AGEITEC, 2017)

Na safra 2015, o Rio Grande do Sul, estado que responde por cerca de 90% da produção da fruta para processamento no país, produziu 702,9 milhões de quilos de uva. A produção de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) foi de 781.412 milhões de quilos de uvas, em 2015, representando 52,12% da produção nacional. O restante da produção (47,88%) foi destinado ao consumo in natura. A quantidade de uvas processadas para elaboração de vinhos e suco apresentou aumento de 16,03% em 2015, comparativamente ao ano de 2014 (MELLO, 2016).

Os vinhos de mesa, elaborados com uvas americanas e híbridas, mostraram aumento de 7,21% na sua produção, com alta de 7,63% para os tintos e de 5,66% para os brancos (MELLO, 2016).

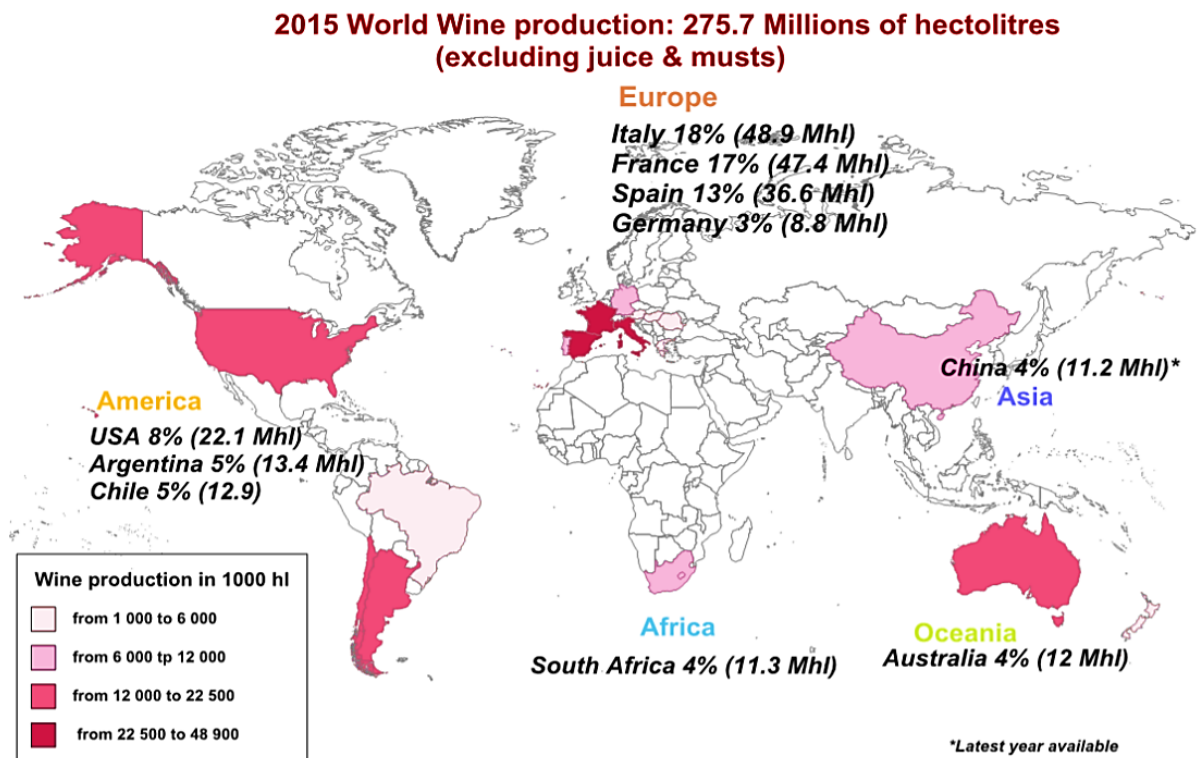
O suco de uva apresentou incremento de produção de 9,63%, sendo o maior aumento de suco de uva integral (20,54%). A produção de suco concentrado aumentou em 6,79%. Cabe destacar também o aumento de produção de mosto simples em 75,24%. Este pode ser usado tanto para vinificação quanto para a elaboração de suco e outros derivados (MELLO, 2016).

### 3.2 VINHO

Vinho é a bebida obtida a partir da fermentação alcoólica parcial ou total do mosto da uva, com uma graduação alcoólica mínima de 8,5° %. Trata-se de uma das bebidas fermentadas mais antigas e que apresenta elevado valor cultural, devido à sua identidade com o clima e o solo e, até mesmo, com a população da região de onde provém (RIZZON, AGNOL, 2007).

De acordo com a Figura 1, o maior produtor mundial de vinho é a Itália, compondo cerca de 16% da produção mundial. O Brasil está na 15ª posição conforme o ranking mundial de 2015 (VINHO, 2015).

**Figura 1: Produção Mundial de vinho no ano de 2015**



FONTE: (VINHO, 2015)

O consumo de vinhos no Brasil é considerado baixo, se comparado aos países europeus e até mesmo ao consumo da Argentina, por exemplo. Os vinhos importados são apreciados e preenchem boa parte do mercado interno, inclusive são mais competitivos em termos de preço, no caso de vinhos vindos da Argentina e Chile principalmente. Mais recentemente, o Brasil está evoluindo como exportador de vinhos, devido aos esforços do setor para conquistar espaço no mercado externo. Esse aumento das exportações deve-se especialmente à aceitação dos espumantes brasileiros (RIZZON, AGNOL, 2007).

### 3.2.1 Processo de Vinificação

Os vinhos podem ser classificados como vinhos de mesa, sendo produtos de cultivares americanas (*Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis aestivalis*, *Vitis berlandieri*), ou vinhos finos sendo elaborados exclusivamente por uvas viníferas (*Vitis vinifera*) (CASTILLOS, 2012)

O álcool etílico ou etanol representa 99,5% do álcool contido no vinho, sendo 0,5% distribuído entre metanol, e álcoois superiores isobutílico e isoamílico. O etanol atua como solvente para a extração de pigmentos, taninos e compostos voláteis, sendo importante para a estabilidade, envelhecimento e aperfeiçoamento sensorial do vinho (CASTILLOS, 2012). O processo de produção de forma simplificada do vinho tinto pode ser visto na Figura 2.

O processamento do vinho se inicia com o recebimento, classificação e pesagem da uva. Nessa etapa do processo, são realizadas avaliações do estado sanitário e confirmação da variedade utilizada (RIZZON, 2006; BARNABÉ, 2006).

De acordo com Rizzon (2006), o desengace é realizado por intermédio de um equipamento denominado desengaçadeira – esmagadeira que tem por objetivo separar a ráquis (eixo da inflorescência) da baga da uva para, posteriormente, esmagá-la.

O esmagamento da uva consiste em romper a baga para liberar o mosto e dispersar as células de leveduras que provocam aeração favorável para sua multiplicação, contribuindo para o início da fermentação alcoólica (CATALUÑA, 1988). Entretanto, o efeito mais significativo é a sua contribuição no processo de



maceração, o que permite um aumento da superfície de contato entre o mosto e a parte sólida, facilitando a dissolução do tanino e da matéria corante (RIZZON, 2006).

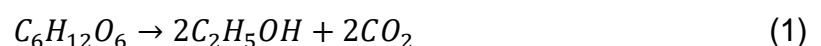
**Figura 2: Fluxograma do processo de vinificação**



**FONTE: Adaptado de CASTILLOS (2012)**

A etapa seguinte chama-se sulfitagem, que é a adição de  $\text{SO}_2$  no mosto. O uso de dióxido de enxofre em enologia como antioxidante e bactericida é uma prática bastante antiga. No mosto ocorre um equilíbrio entre as várias formas químicas do produto, sendo o  $\text{SO}_2$  a forma mais eficaz no controle do crescimento de leveduras e bactérias. A eficácia depende da quantidade de açúcar, de acetaldeído, do pH e da temperatura do mosto e do vinho em elaboração. Ao longo da vinificação, faz-se novas sulfitagens, visando corrigir os teores de  $\text{SO}_2$ , uma vez que diminuem por evaporação ou por reações químicas (GUERRA, 2009).

Uma das principais etapas do processo de vinificação é a fermentação alcoólica que acontece simultaneamente com a maceração conforme a Equação 1.



O processo fermentativo (fermentação tumultuosa) consiste na formação de álcool etílico e dióxido de carbono em estado gasoso a partir de açúcares fermentescíveis. A fermentação alcoólica pode ser determinada pela ação das leveduras autóctones ou de leveduras inoculadas no mosto (RIZZON; MANFROI, 2006). A fermentação tumultuosa dura cerca de 3 dias e se manifesta por um grande desprendimento de gás carbônico e pela elevação da temperatura do meio. Essa etapa é caracterizada pela intensa formação de álcool etílico, produto da reação de fermentação das leveduras que se encontram na fase de crescimento exponencial. Nesta etapa, as polpas e cascas flutuam para o topo da cuba formando um extrato rígido chamado “chapéu” que é pressionado para cima pelo gás carbônico, produto da reação de fermentação alcoólica. O líquido que se encontra próximo às cascas irá adquirir cor, mas o líquido inferior permanecerá incolor. Então, torna-se fundamental fazer circular o suco através da massa das cascas, numa operação denominada remontagem (AMARANTE, 1983).

A fermentação malolática consiste na transformação do ácido málico em ácido láctico, pela ação de bactérias conhecidas como bactérias lácticas. De maneira geral, os vinhos tintos são beneficiados com esta fermentação ao adquirirem maior complexidade aromática e suavidade gustativa. Normalmente a fermentação malolática inicia ao final da fermentação alcoólica, quando a autólise das leveduras se intensifica. Pode ocorrer de forma espontânea ou através da inoculação de bactérias lácticas ao vinho (GUERRA, 2009).

O período no qual a parte sólida da uva, película e semente permanecem em contato com o mosto é chamado de maceração. É nessa etapa que os compostos da película passam para o mosto e atribuem cor (antocianinas) e estrutura (taninos, minerais, substâncias nitrogenadas, polissacarídeos) ao vinho. A quantidade desses compostos que passam para o mosto é determinada pelo tempo de maceração, pela temperatura de fermentação e remontagens realizadas (RIZZON; MANFROI, 2006).

Após as etapas de fermentação alcoólica, com aplicação de remontagens e maceração, o mosto é separado da fase sólida através da etapa de descuba. O momento de descuba é fixado pela queda da temperatura de fermentação, pela paralisação no desprendimento de gás carbônico, pela diminuição de densidade do mosto ou pela intensidade da cor (RIZZON; MANFROI, 2006).

A parte sólida resultante da descuba pode ser submetida a processos de prensagem com o objetivo de extrair o mosto secundário para posterior incorporação ao vinho primário. A prensagem do bagaço pode resultar em um aumento de rendimento do processo de vinificação de 10% a 15% pela extração do vinho retido nos interstícios da parte sólida (GUERRA, 2009).

Entende-se por trasfegas o ato de translocar o vinho de um recipiente para outro, visando separá-lo das precipitações que, ao término da fermentação, decantam por ação da gravidade, devido ao esgotamento do açúcar e a consequente paralisação da liberação de gás carbônico (BRASIL, 2011).

Colagem ou clarificação consiste em adicionar ao vinho um produto clarificante (orgânico ou mineral) que, por adsorção eletrostática, apresenta a faculdade de coagular, flocular e arrastar as partículas em suspensão. É utilizada com a finalidade de se obter rápida limpidez no vinho e evitar o armazenamento de um produto turvo e mal-acabado por longo tempo (BRASIL, 2011).

A filtração de vinhos é uma prática que deve ser efetuada com muita precisão, pois deve servir para a retirada de micropartículas indesejáveis do vinho sem, no entanto, diminuir demasiadamente sua estrutura e sua intensidade aromática. Por esse motivo, é muitas vezes dispensada para vinhos de alta qualidade (GUERRA, 2009).

O engarrafamento consiste em colocar em um recipiente certa quantidade de vinho, deixando um espaço vazio, necessário para eventual dilatação e para aplicar o sistema de vedação. Assim, o vinho de mesa deve repousar por no mínimo 30 dias com a finalidade de reencontrar o seu equilíbrio (RIZZON; MENEGUZZO, 2003; AMARANTE, 1983).

### 3.3 BAGAÇO DE UVA

O bagaço de uva é um resíduo industrial obtido a partir do processo de fabricação de vinho e é composto pela semente, casca e engaço da uva. A semente da uva é composta aproximadamente de: 40% fibras, 16% óleo, 11% proteínas, 7% compostos fenólicos complexos (taninos), açúcares, sais minerais, etc. Ela é rica em óleo essencial, o qual possui um alto valor agregado, sendo utilizado nas indústrias químicas, de cosméticos e farmacêutica. A casca da uva é uma fonte de

antocianidinas e antocianinas, que são corantes naturais e possuem propriedades antioxidantes, são inibidores de lipoperoxidação e também apresentam atividades antimutagênicas. O engaço por sua vez é rico em compostos tânicos, os quais apresentam alto potencial nutracêutico e farmacológico (MURGA et al., 2000).

Na produção de 100 litros de vinho branco obtêm-se 31,7 kg de resíduos e na produção de 100 litros de vinho tinto obtêm-se 25 kg de resíduos. Dos mais de 30 kg de resíduos dos vinhos brancos, aproximadamente 20 kg são de bagaço. Já dos 25 kg de subproduto dos vinhos tintos, aproximadamente 17 kg são de bagaço. Estes subprodutos têm como principal aplicação ração animal e como adubo de vinhedos, beneficiando os sistemas agrícolas familiares e por outro lado permitindo às vinícolas darem um destino pela doação ou mesmo venda, sendo que o acúmulo desses subprodutos pode vir a tornar-se um sério problema ambiental (AGRONEGÓCIO, 2004).

Os compostos fenólicos encontrados no bagaço de uva são principalmente antocianinas, flavonóis, flavonoides, ácidos fenólicos e resveratrol (SANTOS et al., 2011; ROCKENBACH et al., 2011).

Um destino mais nobre pode ser dado a esses resíduos industriais pela extração de substâncias com propriedades farmacológicas que estão presentes no bagaço de uva como antioxidantes e ácidos graxos. A agregação de valor aos subprodutos de vinícolas pode ser justificada através dos valores comerciais de alguns produtos de importação feitos à base de óleo de uva e seus compostos.

### 3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

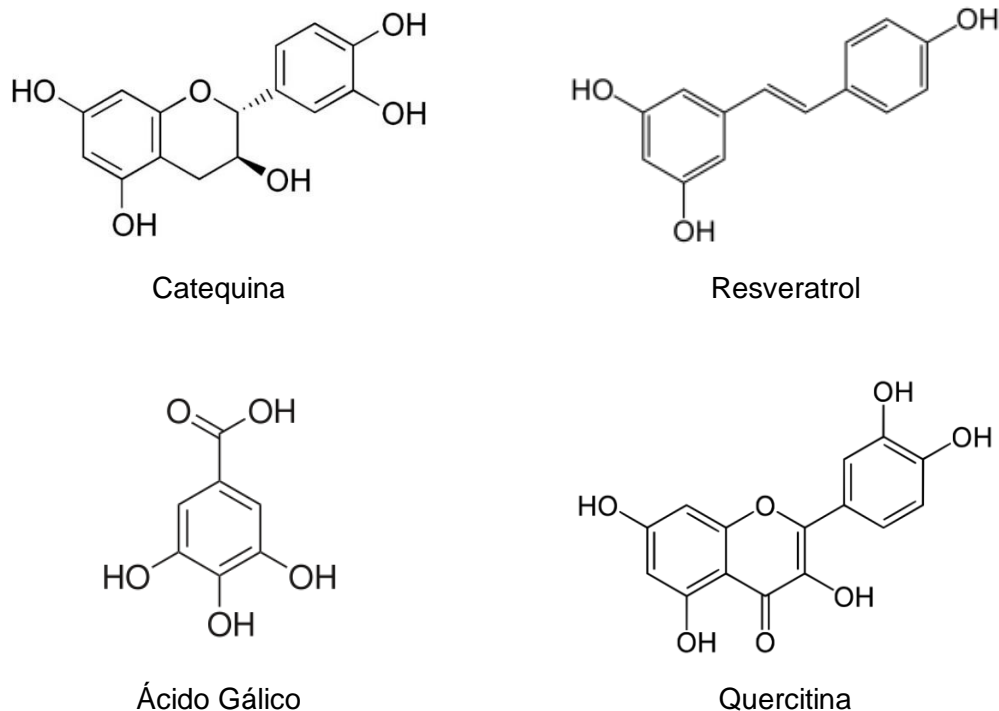
Os compostos fenólicos fazem parte de uma classe de compostos que abrangem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que apresentam pelo menos um grupo fenol, sendo um grupo hidroxila em um anel aromático. Aproximadamente 10.000 compostos formam este grupo quimicamente heterogêneo de metabólitos vegetais secundários. Os metabólitos secundários, embora não sejam imprescindíveis, contribuem para o desenvolvimento das plantas, por favorecerem a adaptação das mesmas nas relações planta-planta, planta-animal e planta-microrganismo. Os metabólitos secundários, por serem bioativos, protegem

contra a radiação ultravioleta e inibem a herbivoria, atraindo animais dispersores de sementes, entre outras funções (TAIZ, ZEIGER, 2004).

Estes compostos apresentam importante função na indústria de alimentos, podendo ser utilizados para evitar a deterioração oxidativa, além de serem relatados como agentes anti-inflamatórios, anticancerígenos, antimutagênicos, antimicrobianos e inibidores de lipoproteína humana de baixa densidade (YI et al., 2009, VU et al., 2012; JARA PALACIOS et al., 2015; CETIN KARACA, NEWMAN, 2015; LEE, LEE, CHUNG, HUR, 2016; LAJILI, AZOUAOU, TURKI, MULLER, BOURAOUI, 2016).

As uvas possuem um alto teor de compostos fenólicos, sendo consideradas umas das maiores fontes, que estão distribuídos na semente, pele, folha, caule e polpa, em ordem decrescente de concentração deste composto. Entretanto, a concentração destes compostos pode variar em função da variedade de uva, clima, doenças causadas por fungos e origem geográfica. Os principais compostos fenólicos encontrados na uva são as proantocianidinas, antocianinas, flavonóis, ácidos fenólicos e resveratrol (BRUNO, SPARAPANO, 2007; HERNANDEZ-JIMENEZ et al., 2009). A Figura 3 mostra a estrutura de alguns dos compostos fenólicos encontrados em uvas (XIA et al., 2010).

**Figura 3: Estrutura de compostos fenólicos presentes em uvas**



**Fonte: Adaptado de XIA, et al. (2010)**

A determinação da concentração exata de compostos fenólicos através de métodos colorimétricos não é possível, utiliza-se então uma estimativa da concentração total destes compostos, conhecida como índice de polifenóis totais (ARCHELA, ANTONIA, 2013).

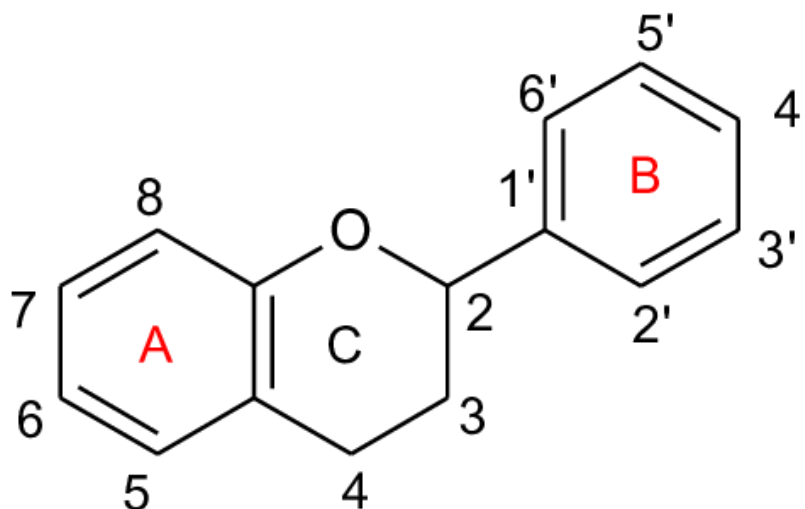
Tradicionalmente, os termos fenólicos totais se referem às medidas feitas por métodos espectrofotométricos, especialmente o método de Folin e Ciocalteu (SINGLETON, ROSSI, 1965).

Embora o método Folin - Ciocalteu seja o método de quantificação de compostos fenólicos mais extensivamente utilizado (SOUSA et al., 2007) outros métodos espectrofotométricos também são aplicados para medida de alguns fenóis específicos para a determinação de ácidos hidroxicinâmicos (BONOLI et al., 2004).

#### 3.4.1 Flavonoides

Os flavonoides são formados pela combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina pela via metabólica do ácido chiquímico e constituem a maior classe de fenólicos vegetais. A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anéis A e B, unidos por um anel pirano (C) (Figura 4) (MERKEN; BEECHER, 2000; TSAO; YANG, 2003; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

**Figura 4: Estrutura básica de um flavonoide**



**FONTE: BEHLING et al. (2004)**

Existem em torno de 14 classes em que os flavonoides são subdivididos. Esta classificação depende das variações na substituição do anel C e do seu nível de oxidação. A diversidade estrutural destes compostos pode ser atribuída às modificações causadas por reações de oligomerização, alquilação, hidroxilação, metilação e glicosilação. Entre os flavonoides destacam-se seis classes consideradas essenciais na dieta humana: os flavanóis (catequina, epicatequina); flavonóis (quercetina e caempferol); flavonas (rutina, apigenina, luteoleína); antocianidinas (cianidina, petunidina, malvidina); isoflavonas (genisteína, coumestrol, daidzeína) e as flavononas (mirecetina, hesperidina, naringina, naringenina).

Além das variações relacionadas ao anel C, há também diferenças relacionadas à substituição dos anéis A e B, os quais podem ser encontrados na natureza sob a forma de agliconas, glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados, as modificações no anel central dessas substâncias levam as classes citadas anteriormente como flavanóis, antocianidinas, e assim sucessivamente (HOLLMAN; KATAN, 1999; PIETTA, 2000; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; COUTINHO, MUZITANO, COSTA, 2009).

A maioria das classes dos flavonoides apresentam características biológicas e químicas em comum, como atividade antioxidante, capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, sequestrar eletrófilos, quelar metais como ferro e cobre, por exemplo, potencial para produzir peróxido de hidrogênio na presença de alguns metais e capacidade de modular a atividade de algumas enzimas celulares (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Com o passar do tempo, os benefícios de uma dieta enriquecida com flavonoides vem sendo objeto de investigações. Esses estudos incluem relações entre a ingestão de flavonoides específicos ou alimentos que os contenham tornam o organismo mais resistente a doenças como acidente vascular cerebral (HOLLMAN, GEELLEN, KROMHOUT, 2010; ARAB, LIU, 2009; MURSU et al., 2008), doenças cardiovasculares (MURSU et al. 2008; MINK et al., 2007), disfunções cognitivas (LETENNEUER et al., 2007; NURK et al., 2009) e câncer (MURSU et al., 2008; CUTLER et al., 2008).

### 3.5 CERVEJA

Segundo as Normas Técnicas Relativas a Alimentos e Bebidas, cerveja é o produto obtido da fermentação alcoólica, pela *Saccharomyces cerevisiae*, de um mosto preparado com cevada maltada, adicionado ou não de outros cereais não maltados, lúpulo e água (OETTERER, 2015).

Para fabricar cerveja necessita-se de basicamente malte (enzimas), complementos do malte (amido), levedura, lúpulo e água. Na Figura 5 (Seção 3.5.1) tem-se um esquema simplificado do processo produtivo de cerveja do Tipo Pilsen.

As cervejas podem ser classificadas de acordo com seu processo fermentativo em dois grandes grupos, de alta fermentação e de baixa fermentação. A primeira é referente às cervejas tradicionais (Ale), em que fermentação ocorre em temperaturas ao redor de 18°C durante 4 ou 5 dias. As cervejas de baixa fermentação são do tipo Lager, sendo que fermentação ocorre a uma temperatura de 12°C durante 8 ou 9 dias (OETTERER, 2015).

No processo de produção de cerveja, o microrganismo utilizado é a *Saccharomyces cerevisiae*, onde durante o processo fermentativo, a levedura utiliza 90% dos açúcares fermentáveis disponíveis para gerar álcool, e apenas 10% para a produção de biomassa (CETESB, 2005), porém pensando em nível industrial e nacional, 10% refere-se a uma grande quantidade de resíduo.

O Brasil está entre os três maiores produtores de cerveja do mundo, produzindo cerca de 14 bilhões de L/ano. Em relação ao consumo, o brasileiro consome em média 66,9 L/ano, ocupando o 27º lugar em consumo. (ANUÁRIO CERVBRAZIL, 2015; CERVBRAZIL, 2016)

### 3.5.1 Processo de Fabricação de Cerveja

Todo o processo começa com a adição de água ao malte e adjuntos já moídos. Normalmente os adjuntos são produtos do beneficiamento de cereais ou de outros vegetais ricos em carboidratos. Esta mistura é então cozida e, durante o processo, o amido do malte é transformado em açúcar. O resultado é um líquido turvo e grosso, chamado de mosto. O mosto é filtrado e novamente fervido. Neste momento é adicionado o lúpulo, o responsável pelo sabor amargo da cerveja. Para seguir para seu próximo estágio, o mosto é resfriado (CARVALHO et al., 2007).



O processo de fermentação tem como objetivo principal a conversão de açúcares em etanol e gás carbônico e compostos aromáticos pela levedura sob condições anaeróbicas. As leveduras produzem os compostos do aroma e do sabor da cerveja como subprodutos da síntese de substâncias necessárias ao seu crescimento e metabolismo, e os teores destes compostos variam com os padrões de crescimento celular, que são influenciados pelas condições de processo (VENTURINI, 2005).

Logo após a fermentação ocorre a maturação, ou também denominada de fermentação secundária, sendo que os principais objetivos são: estabilizar o diacetil, composto formado na fermentação primária; iniciar a clarificação da cerveja pela sedimentação de células de leveduras e proteínas; propiciar a carbonatação (quando em baixa temperatura, o gás carbônico é absorvido pela cerveja); melhorar o odor e sabor da cerveja, pela redução de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico (BORTOLI et al., 2013).

Finalmente, a cerveja é estabilizada pelo resfriamento a temperatura igual ou inferior a 0 °C por um período de até três dias. Diferentes agentes estabilizantes, como sílica gel e taninos, podem ser utilizados. Leveduras e complexos entre proteínas e compostos fenólicos irão precipitar, sendo filtrados em seguida. A carbonatação, a pasteurização e o envase finalizam o processo de produção (CARVALHO et al., 2007).

A utilização do resíduo de cervejaria ainda é pouco difundida, fazendo com que sua qualidade como ingrediente seja subjugada e seu potencial como fonte alternativa de alimento pouco explorada, sobretudo por ser de um elemento de baixo custo.

**Figura 5: Fluxograma simplificado do processo produtivo de cerveja do tipo Pilsen**



**FONTE: BIER HOFF (2016)**

### 3.5.2 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo aeróbio facultativo, isto é, que tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (SANTOS, GUSMÃO, GOUVEIA, 2010). Do ponto de vista industrial, a levedura é um dos biocatalizadores mais utilizados, devido principalmente à sua fácil disponibilidade, baixo custo, fácil manipulação e não patogenicidade (BARALDI; CORRÊA, 2004).

A biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o segundo maior subproduto da indústria cervejeira. Seu uso ainda é limitado, sendo basicamente utilizado como ração animal. (FERREIRA et al., 2010). Anualmente, a fabricação de cerveja envolve a geração de vários resíduos e subprodutos em grandes quantidades nas principais indústrias, devido ao aumento do volume de produção de cerveja.

As leveduras recebem pouca atenção como uma mercadoria negociável, e sua disposição é um problema ambiental. No entanto, podem ter alto valor agregado como matéria-prima. Várias tentativas têm sido feitas para utilizá-los em processos biotecnológicos, como por exemplo, em processos fermentativos para a produção de compostos de valor acrescentado, tais como o etanol; como substrato para o cultivo

microrganismos, ou simplesmente matéria-prima para a extração de compostos. (FERREIRA et al., 2010).

As vantagens que torna a levedura um microrganismo interessante para processos industriais são: capacidade de desenvolvimento em substrato barato e facilmente disponível, facilidade de obtenção e de multiplicação, utilização de nutrientes nas suas formas mais simples, possibilidade de cultivo independente do ambiente, pequena exigência de água e de área e formação de produtos de valor nutritivo (OURA, 1995).

Existem vários fatores que podem influenciar a melhoria no desempenho do fenômeno de bioadsorção, dentre eles estão: o tipo de biomassa, o pH da solução, temperatura da solução, a presença de outros íons concorrentes (cátions e ânions) e a força iônica (OLIVEIRA, 2012).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é muito relatada na literatura em ensaios de bioadsorção. Pelo fato de ser um dos resíduos mais gerados em indústrias de alimentos, esta biomassa surge como um bioadsorvente de baixo custo (NGUYEN, JUANG, 2015).

### 3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS E EXTRATOS

Diversas técnicas são capazes de caracterizar as biomassas, nesse trabalho foram utilizadas a espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. Para a caracterização dos extratos, utilizou-se de cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos.

#### 3.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de caracterização que utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional. Os aparelhos modernos permitem aumentos de 300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos, podem fornecer informações como a composição, topografia, textura, características da superfície de uma amostra

sólida, formando uma imagem tridimensional (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007)

A técnica de MEV é amplamente utilizada para amostras biológicas, contudo, exige uma série de cuidados para a preparação das amostras a fim de evitar as possíveis interferências e erros de interpretação na análise de resultados. Em geral, as amostras totalmente isentas de umidade são fixadas com uma fita de carbono dupla face em um *stub* (porta-amostra específico para amostras biológicas), e submetidas a metalização com uma fina camada de ouro, isto torna as amostras condutoras de elétrons, melhorando a resolução. Os elétrons retroespalhados são captados por um detector formando a imagem. Deste modo é possível observar com detalhes a superfície celular e as possíveis alterações na morfologia das células (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

### 3.6.2 Espectroscopia no Infravermelho Médio com Refletância Total Atenuada (FTIR/ATR)

A espectroscopia de infravermelho foi proposta como metodologia de identificação de microrganismos já em 1911, devido a sua capacidade de produzir dados que relacionam bandas espectrais com a composição da amostra. O processo envolve a análise do comportamento de diferentes grupamentos moleculares que, quando expostos a um feixe de radiação infravermelha em um dado comprimento de onda, promove um sinal ao equipamento que apresenta isso na forma de bandas correspondentes a cada tipo de ligação, sem destruir amostra ou causar alterações em sua composição (NAUMANN 2009; WENNING, SCHERER 2013).

No entanto, dos vários modos que existem para a obtenção dos espectros de absorção infravermelha, destaca-se o modo ATR. A partir da técnica de caracterização de FTIR- ATR é possível adquirir-se espectros de amostras que não podem ser diluídas, como é o caso dos substratos sólidos utilizados neste projeto, colocando os mesmos em contato com um cristal que pode ser de seleneto de zinco ou de germânio (MONTEIRO, 2011).

### 3.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de Diodos (CLAE/DAD)

A cromatografia líquida na análise de flavonoides é uma técnica muito utilizada e bastante eficiente na separação destas substâncias, mesmo em misturas complexas. A CLAE pode ser utilizada com diferentes tipos de fase estacionária, atuando por adsorção, partição, exclusão ou troca iônica. As colunas mais utilizadas para a análise dos flavonoides são as recheadas com uma fase reversa. Estas, consistem em cadeias de grupos alquílicos com 18 átomos de carbono ligados à sílica, que interagem com as moléculas de solvente e soluto, sendo consequentemente empregadas com solventes polares ou misturas aquosas (SHAHIDI, NACZK, 2004; MARKHAM, 1982).

O detector UV-Visível é o mais empregado em CLAE para as análises de flavonoides, especialmente porque estes compostos apresentam duas bandas de absorção bem características na região do UV. O detector por arranjo de diodos é um tipo de detector de comprimento de onda variável que opera na região do UV, e torna possíveis análises em diferentes comprimentos de onda simultaneamente, pois possibilitam uma “varredura” na região UV-Vis em uma única corrida cromatográfica, disponibilizando-os mesmo após a análise ter sido realizada. Nesse tipo de detector, a grade de refração é alternada e colocada depois da cela de amostra, sendo adicionado um conjunto de fotodiodos onde os comprimentos de onda resultantes são focalizados. Este, realiza a varredura do espectro do componente na faixa de 200 – 800 nm, o qual pode ser armazenado (KATZ, 1996; MEYER, 1993)

A identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD garante bons resultados, uma vez que o detector DAD possui alta resolução espectral e permite checar a identidade do composto e a pureza do sinal cromatográfico. Assim, dados espectrais para cada sinal cromatográfico podem ser coletados e armazenados à medida que os compostos eluem da coluna, fornecendo informações adicionais para confirmar a identidade do sinal (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; CALDAS et al., 2011).

### 3.7 ADSORÇÃO

A adsorção é o processo de transferência de um ou mais constituintes (adsorbatos) de uma fase fluida para uma fase sólida (adsorvente). No processo de adsorção as moléculas presentes na fase fluida são atraídas para a zona interfacial, devido à existência de forças atrativas não compensadas na superfície do adsorvente. A atração e fixação do adsorbato à superfície do adsorvente ocorrerem através de forças físicas (adsorção física) ou interações químicas (adsorção química). As forças envolvidas na adsorção física incluem as forças de van der Waals (repulsão e dispersão) e interações eletrostáticas compreendendo as interações de polarização, dipolo e quadrupolo (RUTHVEN, 1984).

O processo de adsorção depende de vários fatores tais como: natureza do adsorvente e das condições operacionais. As características do adsorvente incluem área superficial, tamanho do poro, densidade, grupos funcionais presentes na superfície e hidrofobicidade do material. Por outro lado, a natureza do adsorbato, depende da polaridade, tamanho da molécula solubilidade e acidez ou basicidade. As condições operacionais incluem principalmente, temperatura, pH, e natureza do solvente. Outro fator importante é a presença de espécies diferentes do adsorbato, que podem provocar competição por sítios de adsorção (COONEY, 1999; RUTHVEN, 1984; MCKAY, 1996).

#### 3.7.1 Biossorção

Biomassa é toda matéria orgânica de origem vegetal, animal ou microbiana, incluindo os materiais procedentes das suas transformações naturais ou artificiais, podendo ser classificada da seguinte forma (NOGUEIRA, NASCIMENTO, 2007)

- Biomassa natural: Produzida na natureza, sem intervenção humana.
- Biomassa produzida: Cultivada, com o propósito de obter um material para transformá-lo num produto comercializável.
- Biomassa residual: Gerada como subproduto de atividades humana, tais como: processos agropecuários e processos fermentativos. Dentre os materiais de origem biológica que possuem a capacidade de adsorver poluentes dissolvidos podemos citar:

- Partes ou tecidos específicos de vegetais: Cascas, bagaço ou sementes.
- Microrganismos: bactérias, microalgas e fungos.
- Vegetais macroscópicos: algas, gramíneas, plantas aquáticas.

A adsorção utilizando biomassa microbiana pode ser definida como uma ligação do soluto ao organismo, através de um processo que não envolve transporte de energia metabólica (KAUSHIK, MALIK, 2009). Além de proporcionar reconhecidas vantagens, conforme descrito na literatura (FÁVERE, RIELLA, 2010) a biomassa pode ser reutilizada, os compostos podem ser removidos da solução independentemente do grau de toxidez, os tempos de operação são pequenos quando o equilíbrio é alcançado, não produz compostos secundários com toxicidade elevada podendo ser altamente seletiva, o material adsorvido pode ser reutilizado, além de ser economicamente viável. Porém, a capacidade de adsorção depende do tipo de biomassa, o tipo de adsorbato, a presença de íons competidores no meio e valor de pH (MITTER, SANTOS, ALMEIDA, 2012).

A biossorção tem sido empregada principalmente na remoção de metais pesados a partir de soluções aquosas, sendo uma alternativa viável tecnicamente e economicamente atraente aos métodos convencionais para a remoção de metais pesados a partir de águas residuais industriais. Por isso a biossorção se tornou um dos métodos preferidos para a remoção de metais pesados nos últimos anos (TAŞAR et al., 2014).

Segundo estudos de Machado et al. (2008) e Khakpour et al. (2014), as células de levedura possuem capacidade de acumular uma ampla gama de metais pesados em diversas condições externas. Assim, eles também constituem uma alternativa de tratamento de águas residuais, onde a rentabilidade é a atração principal. Apesar dos altos graus de desestabilização do sistema, o processo de biossorção apresenta vantagens como, aplicação de um material adsorvente de baixo custo e biodegradáveis, e a realização de elevada eficiência de remoção de substâncias em baixas concentrações (CAPRIO et al., 2014).

#### *3.7.1.1 Cinética de Biossorção*

O processo de biossorção inclui uma fase sólida (biossorvente) e uma fase líquida (solvente, normalmente água) que apresenta uma espécie dissolvida que é o

adsorvato (por ex. íons metálicos). A afinidade eletrostática existente entre o bioissorvente e as espécies metálicas que compõem o adsorvato, atraem o sólido pelos mecanismos acima citados (WANG & CHEN, 2006).

Este processo é constante, até a ocorrência da fase de equilíbrio entre a concentração do adsorvato dissolvido em solução e a concentração do adsorvato presente sobre o bioissorvente (concentração de equilíbrio,  $C_e$ ) promovida pela saturação do adsorvato sobre o bioissorvente. A associação entre o bioissorvente e o adsorvato define a distribuição entre a fase sólida e a líquida. A qualidade do bioissorvente utilizado é classificada pela capacidade de atração e retenção do adsorvato (AKAR & TUNALI, 2005).

A quantificação da capacidade de bioissorção está relacionada ao balanço do material do sistema, ou seja, todo o adsorvato removido da solução deve estar presente no bioissorvente. A capacidade de adsorção pode ser expressa em diversas unidades, dependendo do sistema; por exemplo, miligramas do metal sorvido por grama do material (seco) do bioissorvente (quando se baseia em cálculos de balanço de massa), ou  $\text{mmol g}^{-1}$  ou  $\text{meq g}^{-1}$  quando se considera a cinética ou estequiometria da reação (WANG & CHEN, 2006).

O ajuste dos modelos cinéticos aos resultados experimentais permite estudar a influência de diferentes fatores na cinética de bioissorção, nomeadamente na constante cinética, na quantidade adsorvida e na velocidade inicial de bioissorção (RAFAEL, 2016).

Os modelos cinéticos serão aplicáveis pela avaliação dos dados do gráfico plotado. O coeficiente de correlação deve ser próximo de 1, para que o ajuste seja satisfatório.

Para a obtenção do tempo de equilíbrio, um gráfico  $q_t$  versus  $t$  foi construído. Os modelos que foram utilizados neste trabalho foram os de Pseudo-Segunda ordem e Difusão Intrapartícula. O modelo cinético de Pseudo – primeira ordem não foi utilizado, pois ele é apropriado somente para os primeiros 20 a 30 minutos de adsorção, e não para longos períodos (HO, MCKAY, 1998<sup>a</sup> apud TRAN et al; 2017). Segundo Febrianto et al., 2009, o valor de  $q_e$  calculado usando a equação de pseudo - primeira ordem não é igual ao valor  $q_e$  experimental, o que indica ainda a incapacidade de equação ajustar os dados de adsorção.



### 3.7.1.1.2 Cinética de Pseudo Segunda Ordem

Ao contrário do modelo pseudo - primeira ordem, esse modelo prediz o comportamento cinético sobre toda faixa de tempo de adsorção (ANDIA, 2009) e é baseado na capacidade de adsorção da fase sólida, refletindo o comportamento do processo em toda a faixa de tempo de contato.

Logo, podemos expressar a equação na sua forma linear (Equação 2).

$$\frac{t}{q_e} = \frac{1}{K_2 \cdot q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (2)$$

Onde:  $K_2$  é a constante de taxa de adsorção ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ );  $q_e$  é a concentração de flavonoides adsorvidos no equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $q_t$  é a concentração de flavonoides na superfície do adsorvente em um tempo  $t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Se a cinética de pseudo - segunda ordem é aplicável, um gráfico ( $t/q$ ) versus  $t$  deve mostrar uma relação linear, com coeficiente linear ( $1/q_e^2$ ) e coeficiente angular ( $1/q_e$ ). E valor da constante  $K_2$  é obtido através do coeficiente linear da reta (HO, MACKAY, 1998; HO, MACKAY, 1999).

Geralmente, embora o modelo pseudo – segunda ordem possa descrever adequadamente dados experimentais cinéticos de adsorção, este modelo não revela os mecanismos de adsorção (TRAN et al., 2017). Aplica-se então outros modelos, tais como de difusão intrapartícula.

### 3.7.1.1.3 Cinética de Difusão Intrapartícula

O mecanismo de adsorção do sistema adsorvente/adsorvato pode envolver diversas etapas: difusão externa, difusão na superfície e difusão nos poros (AHMAD e KUMAR, 2010). A teoria de difusão intrapartícula assume que a difusão do filme líquido que cerca o adsorvente é desprezível e a difusão intrapartícula é a única taxa que controla as etapas do processo de adsorção (HO, MCKAY, 1998; FEBRIANTO, 2009).

A Equação 3 é a expressão matemática utilizada para descrever esse modelo.

$$q_t = k_{dif} \cdot t^{1/2} + C \quad (3)$$

Onde:  $q_t$  é a quantidade de flavonoides adsorvida em um determinado tempo;  $k_{dif}$  é a constante de velocidade de difusão intrapartícula ( $\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$ );  $t$  é o tempo de reação (min);  $C$  é o coeficiente de resistência à difusão.

Quando a difusão intrapartícula está envolvida na adsorção um gráfico de  $q_t$  versus  $t^{1/2}$  resulta em uma reta, permitindo calcular o valor de  $k_{dif}$  pela sua inclinação e o valor de  $C$  pelo valor da intersecção (OZCAN, 2004).

Em muitos casos, esses gráficos apresentam multilinearidade, demonstrando que duas ou mais etapas podem ocorrer. Sendo a primeira etapa a adsorção de superfície e a segunda a fase da adsorção gradual, onde a difusão intrapartícula é limitada, e a terceira a fase de equilíbrio final, onde a taxa de difusão é diminuída em função da baixa concentração de soluto na solução (JUANG, 2002; SUN, 2003).

### 3.7.2 Isotermas de Biossorção

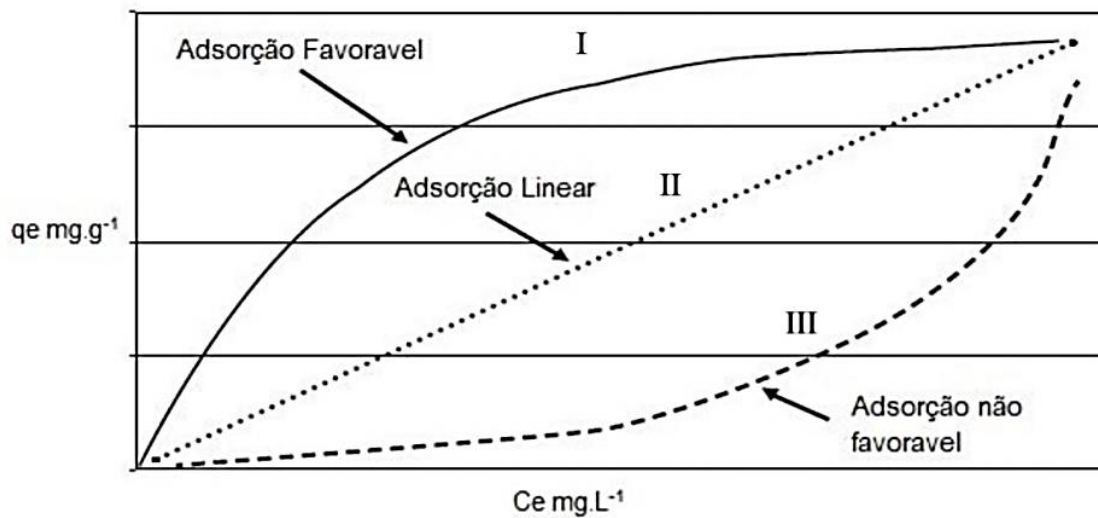
A partir dos dados de equilíbrio (tempo de equilíbrio), é possível construir ensaios de isotermas.

Isotermas de adsorção indicam a forma como o adsorvente efetivamente adsorverá o soluto. Elas expressam a relação entre a quantidade que é adsorvida por unidade de massa do biossorvente e a concentração em solução no equilíbrio a uma determinada temperatura constante (VOLESKY, 2003).

Nesse ensaio, a concentração de adsorbato deve ser variada e o ensaio deve acontecer nas mesmas condições de equilíbrio obtidas na etapa da cinética.

A Figura 6 relaciona os diversos tipos de adsorção possíveis (favorável, linear e não favorável) quando um gráfico do tipo  $Q_e$  (quantidade de soluto adsorvida no equilíbrio) versus  $C_e$  (concentração de soluto no equilíbrio) é construído.

**Figura 6: Representação dos possíveis tipos de adsorção no tempo de equilíbrio de reação**



**FONTE: RAFAEL, 2016**

Quando a concentração de equilíbrio de um adsorvente, em fase sólida, aumenta acentuadamente, a adsorção é favorável e resulta numa isoterma na forma convexa (Tipo I). Quando a concentração de equilíbrio de um adsorvente, na fase sólida, aumenta linearmente com a concentração de equilíbrio do adsorvente na fase líquida, a isotérmica é chamada linear (Tipo II). Se a isoterma tem uma forma côncava, a adsorção é desfavorável (Tipo III), e irá originar uma frente dispersiva, tornando o processo pouco eficiente (RAFAEL, 2016).

Ao longo do tempo foram desenvolvidos diferentes modelos de equilíbrio de forma a descrever os fenômenos que ocorrem na interface sólido/líquido, no processo de adsorção. Os modelos clássicos de equilíbrio são os de Langmuir, Freundlich, e Brunauer, Emmett e Teller. Os modelos mais usados para representar o equilíbrio nos processos de sorção são as isotermas de Langmuir e Freundlich, estas representam formas convexas de isotermas favoráveis à biossorção (BARROS, 2003).

### 3.7.2.1 Isoterma de Langmuir

A isoterma de Langmuir (Equação 4) é um dos modelos mais utilizados em estudos de adsorção onde se pressupõem que a superfície do adsorvente detém sítios energéticos sendo estes idênticos e homogêneos entre si onde cada molécula do adsorvato ocupa um único sítio; portanto; admite-se a formação de uma

monocamada de cobertura do adsorvato na superfície do adsorvente (ARAÚJO, 2011).

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{m\acute{a}x}} + \frac{C_e}{q_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

Onde:  $C_e$  é a concentração de equilíbrio na solução ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $q_e$  é a capacidade de sorção no equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $k_L$  é a constante da isoterma de Langmuir ( $\text{L mg}^{-1}$ );  $q_{m\acute{a}x}$  é a capacidade máxima de cobertura em monocamada ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Nesse modelo é possível serem obtidos os parâmetros  $q_{m\acute{a}x}$ , que representa a capacidade máxima de captação do biossorvente e  $b$ , que representa a afinidade do biossorvente pelo adsorvato. Portanto, este modelo considera que as partículas adsorvidas ficam alojadas em uma camada monomolecular onde todas as partes da superfície apresentam a mesma energia de adsorção. Conseqüentemente, este modelo considera que não há interação adsorvato – adsorvato e que as moléculas adsorvidas possuem localizações definidas na superfície (LAVARDA, 2010).

### 3.7.2.2 *Isoterma de Freundlich*

Este modelo considera a existência de uma estrutura com adsorção em multicamadas em superfícies heterogêneas (SABER-SAMANDARI & HEYDARIPOUR, 2015), e não prevê a saturação da superfície baseada no processo de adsorção. Assim, o modelo permite a existência de uma cobertura superficial infinita. Ela corresponde a uma distribuição exponencial de vários sítios de adsorção com energias diferentes, sendo particularmente aplicada a líquidos (GEANKOPLIS, 2003).

É um modelo utilizado para sistemas que possuem superfície heterogênea, e não prevê a saturação da superfície onde a adsorção ocorre em multicamadas com interação entre as moléculas de adsorvato, onde os sítios energéticos possuem energias adsortivas diferentes (ARAÚJO, 2011).

Na Equação 5 tem-se o Modelo de Freundlich não linearizado.

$$q_{eq} = k_F C_{eq}^{\frac{1}{n}} \quad (5)$$

Onde:  $k_F$  ( $L g^{-1}$ ) e  $n$  são constantes empíricas;  $K_F$  está relacionado com a capacidade de adsorção do adsorvente e  $n$  representa a intensidade de adsorção. A adsorção é favorável quando  $1 < n < 10$ .

A análise da constante de Freundlich ( $K_F$ ) está relacionada com a capacidade de adsorção, segundo Falone e Vieira, (2004), e pode ser classificada em:

- Pequena ( $0 - 24 L g^{-1}$ );
- Média ( $25 - 49 L g^{-1}$ );
- Grande ( $50 - 149 L g^{-1}$ ) e
- Elevada (acima de  $150 L g^{-1}$ )

### 3.7.2.3 *Isoterma de Temkin*

A teoria de Temkin (Equação 6) é baseada na adsorção em monocamadas sobre superfícies heterogêneas. Considerando que existem interações indiretas entre as moléculas do adsorvato e a superfície do adsorvente fazendo com que os sítios mais energéticos sejam primeiramente ocupados. Contudo, a afinidade tende a decrescer linearmente com o aumento da adsorção, este modelo assume que o calor de adsorção de todas as moléculas que recobrem o adsorvente diminui linearmente em função do seu recobrimento. A adsorção é caracterizada por uma distribuição uniforme de energias de ligação (OLIVEIRA, 2013).

$$q_e = B \ln A + B \ln C_e \quad (6)$$

Onde:  $B = RT/b$ ,  $T$  é a temperatura absoluta (K) e  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 J mol^{-1} K^{-1}$ ).

A constante adimensional  $B$  está relacionada com o calor de adsorção. De acordo com a Equação 6, um gráfico de  $Q_e$  versus  $\ln C_e$  permite a determinação das constantes  $A$  e  $B$  da isoterma.

Sendo  $A_t$  constante de adsorção de Temkin ( $L mg^{-1}$ ) e  $B_t$  a constante de Temkin que relaciona o calor de adsorção com o número total de sítios ( $mg g^{-1}$ ).

### 3.7.2.4 Isoterma de Dubinin – Radushkevich

A isoterma de Dubinin-Radushkevich é aplicada para distinguir se o processo de adsorção é de natureza física ou química. Baseando-se no modelo de Dubinin-Radushkevich, a vizinhança da superfície do sólido é caracterizada por uma série de equipotenciais superficiais tendo o mesmo potencial de sorção. A isoterma de Dubinin-Radushkevich pode ser representada pela Equação 7 (DUBININ; RADUSHKEVICH, 1947).

$$q_e = q_s \exp(\beta \varepsilon^2) \quad (7)$$

Onde:  $q_s$  representa a capacidade máxima teórica ( $\text{mol g}^{-1}$ );  $\beta$  é a constante do modelo Dubinin – Radushkevich ( $\text{mol}^2(\text{kJ})^{-2}$ );  $\varepsilon$  é o potencial Polanyi, que pode ser calculado pela Equação 8 (DUBININ; RADUSHKEVICH, 1947).

$$\varepsilon = RT \ln\left(1 + \frac{1}{C_e}\right) \quad (8)$$

Onde: R é a constante universal dos gases ideais ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) e T é a temperatura da solução absoluta (298,15K).

Um gráfico de  $\ln q$  versus  $\varepsilon^2$  é usado para estimar a constante  $\beta$ , que representa a energia livre de adsorção (E) e é calculada utilizando a Equação 9 (MACIEL et al, 2013).

$$E = \frac{1}{\sqrt{-2\beta}} \quad (9)$$

O valor de E pode ser aplicado para determinar se a adsorção ocorre como um mecanismo de adsorção química ou física. Quando E situa-se entre 8 e 16  $\text{kJ mol}^{-1}$  a adsorção é um processo químico e quando  $E < 8 \text{ kJ mol}^{-1}$  esse processo é físico (MACIEL et al, 2013).

A isoterma de D-R admite o processo como um efeito de preenchimento de poros, onde relaciona a energia livre de adsorção a esse preenchimento, sendo mais do que uma adsorção camada a camada, de forma que a isoterma de D–R varia

para diferentes sistemas adsorvente – adsorvato e diferentes concentrações, ajustando-se apenas às concentrações baixas (STAFUSSA, 2014).

### 3.7.3 Aplicações da Biossorção em alimentos / Estado da Arte

Em estudos recentes, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como biossorvente na determinação de compostos fenólicos de chá verde e preto, além de vários estudos já publicados utilizarem-na para biossorção de metais traço e outros poluentes (JILANI et al., 2015; STAFUSSA et al., 2016; WANG, CHEN, 2006).

Vários estudos avaliaram o efeito da incorporação de resíduo cervejeiro como substituto de farinha de trigo, onde observa-se que a qualidade física de biscoitos é mantida, além de obter-se um aumento no teor de N, de fibra bruta e fibra dietética (ÖZTÜRK et al., 2002). Ktenioudaki et al. (2013) observaram que biscoitos com 10% deste resíduo demonstraram elevados índices de crocância e foi altamente aceitável, destacando a possibilidade de utilização de deste resíduo para a formulação de lanches.

No estudo de Stojceska e Ainsworth (2008), o resíduo foi incorporado em diferentes níveis (0 - 30%) em pães de farinha de trigo tratada com quatro enzimas diferentes, de forma que o teor de fibra dos pães foi significativamente aumentado e a sua utilização combinada com enzimas adequadas é capaz de melhorar a vida de prateleira, textura e volume dos pães. Da mesma forma, quando a farinha de milho de lanche extrudido foi substituída a níveis de 10, 20, 25 e 30 %, o percentual proteico, o teor de gordura e fibra aumentaram, enquanto que o amido diminuiu, de maneira que, foi sugerido que os alimentos fortificados com resíduo cervejeiro podem ser considerados como alimentos funcionais (AINSWORTH et al., 2007).

Özvural et al. (2009) demonstraram que o aumento dos tamanhos das partículas do resíduo seco está diretamente relacionado com a redução dos níveis de gordura. Os autores sugeriram que o resíduo pode ser utilizado para produzir produtos à base de carne de baixo teor de gordura e ricos em fibras, com a adição limitada entre 3% a 5%. Kim et al. (2013) ao extraírem fibra alimentar de RC e adicionar em hambúrgueres de frango observaram que formulações contendo 3 % do extrato de fibra dietética garantiu maior aceitabilidade ao produto.

Dentre as várias alternativas existentes de incorporação dos resíduos em formulações alimentícias, destaca-se o aproveitamento para a produção de farinhas (PELISSARI et al., 2012; AZIZ et al., 2012.) que podem ser aplicadas, por exemplo, em produtos de panificação tais como bolos, pães e cookies entre outros (COELHO e WOSIACKI, 2010; LOPEZ et al., 2011).

Mildner - Szkudlarz e colaboradores (2013) avaliaram a incorporação do bagaço de uva em diferentes níveis (10, 20 e 30%) nas formulações de biscoitos com a finalidade de avaliar a influência nas propriedades nutracêuticas, físicas e sensoriais. Concluíram que a incorporação aumentou gradualmente os potenciais antioxidantes e o teor de fibras e a dureza dos biscoitos.

Estudos realizados com resíduos de *V. vinifera* demonstraram importantes efeitos biológicos, tais como: atividade anti-mutagênica, anti-carcinogênica (Parry et al., 2011), anti-inflamatória, antioxidante (Hogan et al., 2010; Scola et al., 2010, 2011; Álvarez et al., 2012; Doshi et al., 2013), prevenção de doenças cardiovasculares (Bagchi et al., 2003; Karthikeyan et al., 2007), aumento da expectativa de vida e diminuição de doenças relacionadas ao envelhecimento (Paredes-López et al., 2010).

Os resíduos da indústria vitivinícola também podem atuar na melhoria da conservação de diversos alimentos, devido à inibição e diminuição da oxidação (Fontana et al., 2013), capacidade antimicrobiana, prevenção da rancificação, melhora na estabilidade de cor, aroma e pH, aumentos da quantidade de fibras e do teor de antioxidantes.

Para além da sua utilização como ração para animais, o RC pode ser incorporado em gêneros alimentícios destinados ao consumo humano. Dado o seu baixo custo e elevado valor nutricional, o RC representa um ingrediente ideal para a alimentação humana, particularmente onde existe necessidade de aumentar o teor de fibras. Vários estudos têm avaliado o efeito da incorporação de RC como substituto de farinha de trigo, onde observa-se que a qualidade física de biscoitos é mantida, além de obter-se um aumento no teor de N, de fibra bruta e fibra dietética (ÖZTÜRK et al., 2002).

### 3.8 DIGESTÃO IN VITRO



Os ensaios *in vitro* concebidos para a digestão consistem numa sucessão de biorreações que recriam o ambiente nos diferentes compartimentos do trato digestivo por onde o alimento passa. Em cada compartimento (boca, estômago e duodeno) as condições de pH, temperatura, força iônica e concentrações enzimáticas são recriadas e ajustadas. Estes modelos são simples e fáceis de usar, mas não são fisiologicamente realistas uma vez que é extremamente complicado recriar todas as condições complexas existentes no trato gastrointestinal. As condições bioquímicas transientes, as enzimas utilizadas (geralmente de origem não-mamífera), as concentrações enzimáticas e iônicas, o fluxo do alimento através dos diferentes compartimentos e ainda a microbiota existente no organismo, são exemplos de fatores fisiológicos que são complicados de simular em laboratório, mas que tem sido estudados de forma a desenvolver modelos de digestão cada vez mais confiáveis (GUERRA et al., 2012).

Para que um composto químico possa exercer atividade biológica, deve atingir o alvo fisiológico em uma concentração mínima que apresente esse efeito. A liberação de um constituinte alimentar da matriz do alimento, tornando-o disponível para a absorção, é definida como bioacessibilidade (SAURA-CALIXTO et al., 2007).

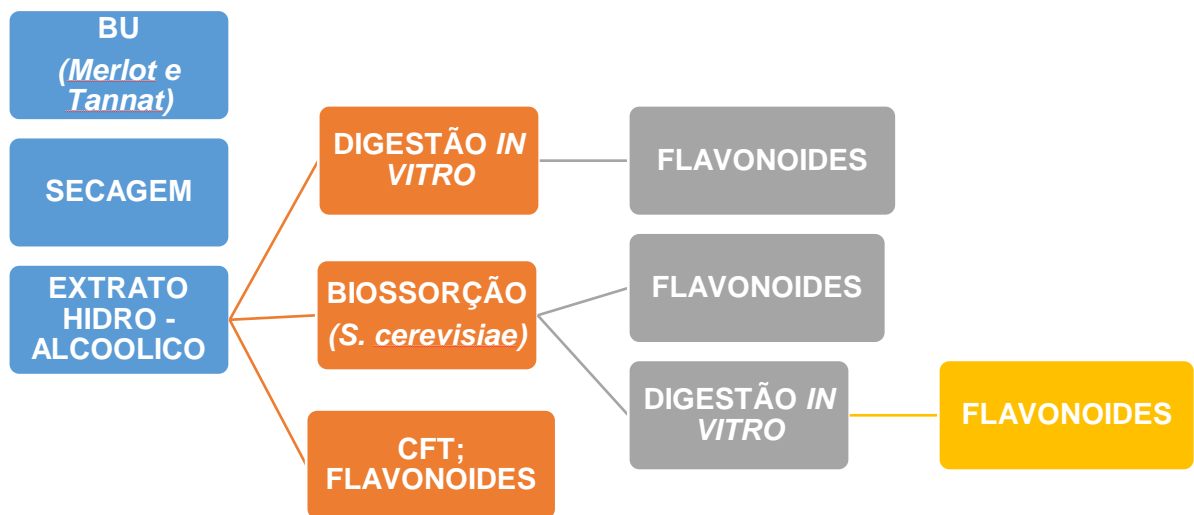
Assim, o primeiro passo para avaliar a biodisponibilidade dos componentes presentes nos alimentos é a digestão gastrointestinal, onde uma fração bioacessível é obtida (SAURA-CALIXTO et al., 2007).

Contudo para estabelecer evidências conclusivas da eficácia dos polifenóis na prevenção de doenças e melhoria da saúde humana, é essencial determinar a distribuição destes compostos na dieta, bem como as interações biológicas que os polifenóis podem ter com macromoléculas, células, enzimas e microflora do cólon para avaliar a sua atividade biológica em tecidos alvo (HAMINIUK et al., 2012). Entretanto, devido à diversidade dos compostos fenólicos presentes nos alimentos, o estudo da sua biodisponibilidade é complexo (BRAVO, 1998).

## 4 METODOLOGIA

Todos os materiais e equipamentos necessários foram fornecidos pela UTFPR Curitiba, laboratórios de Biotecnologia e NIPTA. A Figura 7 representa a perspectiva geral do projeto, em suas principais etapas.

**Figura 7: Fluxograma representativo das etapas metodológicas do projeto**



### 4.1 SECAGEM DO BAGAÇO DE UVA

As amostras de resíduo de bagaço de uva são provenientes do processo de produção de vinhos na região de Toledo, PR. Foram estudados bagaços de uva do tipo *Merlot e Tannat*, representativas da espécie *Vitis vinífera*. As amostras de bagaço foram lavadas com água corrente em abundância. Em seguida, o bagaço de uva foi submetido à secagem em estufa a 40 °C, até massa constante, e posterior moagem em moinho de facas, na UFPR. Após essa etapa, as amostras foram embaladas a vácuo e acondicionadas em geladeira, ao abrigo da luz.

### 4.2 PREPARO DO BIOSSORVENTE

A biomassa residual de *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida a partir da fermentação alcoólica da produção da cerveja do tipo *Pilsen*, da micro cervejaria Bier Hoff, em Curitiba. O material orgânico foi lavado com água destilada até que a

levedura não apresentasse mais capacidade fermentativa. A biomassa foi, então, armazenada em ultrafreezer, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas e posteriormente, submetida à liofilização por 72 horas. Terminada a liofilização, o material foi armazenado em embalagens de polietileno, na ausência de luz e no congelador.

#### 4.3 PREPARO DO EXTRATO HIDRO-ALCOOLICO DE BAGAÇO DE UVA

Muitos estudos têm evidenciado que os compostos fenólicos são mais bem extraídos com solventes orgânicos, assim como solventes acidificados como metanol, etanol, acetona e acetato de etila, combinados ou não com água (HAMINIUK et al., 2012)

Para o extrato, foram pesados em erlenmeyers de 250 mL 1 g de bagaço de uva previamente seco para 25 mL de etanol 40%. Após a homogeneização, a mistura seguiu para o agitador orbital, por 3 horas a 120 rpm, a  $25^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a 5000 rpm.

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS SOLÚVEIS (CFT) ATRAVÉS DO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Foram utilizados 5 mL de água destilada, adicionados de 100  $\mu\text{L}$  de extrato hidro-alcoolico de bagaço de uva e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura foi acondicionada no escuro, por 30 minutos. O conteúdo fenólico total foi determinado em triplicata, através da medição da absorbância em 765 nm utilizando um espectrofotômetro de UV-Vis (SINGLETON, ROSSI, 1965). Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE/L), com base na curva de calibração (Apêndice B). O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) para essa curva foi igual a 0,9995.

##### 4.4.1 Quantificação de Flavonoides

A determinação de flavonoides foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Dewanto et al. (2002) e JIA et al, 1999. A técnica baseia-se na formação de um complexo amarelo entre o flavonoide e o alumínio.

Foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  do extrato alcoólico do bagaço de uva, 1250  $\mu\text{L}$  de etanol 40%, 75 $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  5%. Após 6 minutos, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  10%, passados 5 minutos adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1  $\text{mol L}^{-1}$  e completou-se o volume de solução para 2500  $\mu\text{L}$  com água destilada. A solução final é foi lida em espectrofotômetro de UV/Vis em 510 nm.

Os resultados foram expressos como equivalentes de catequina (EC) por grama de amostra, com base na curva de calibração (Apêndice B). O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) obtido para essa curva foi de 0,9943.

## 4.5 EXPERIMENTOS DE BIOSSORÇÃO

### 4.5.1 Determinação da Cinética de Biossorção

O teste cinético foi realizado no intuito de elucidar os mecanismos pelos quais a adsorção ocorre (HO, 2006), na determinação da taxa de adsorção (DO, 1998) além da determinação do tempo de contato necessário para que o sistema atingisse o equilíbrio, ou seja, descrever o comportamento da variação da taxa de adsorção entre a levedura e os flavonóides do Bagaço de Uva.

Como descrito por Stafussa (2015), para a realização da cinética de biossorção foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mg da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (peso seco) e 12,5 mL de solução do extrato hidro - alcoólico do bagaço de uva. Os erlenmeyers ficaram sob agitação de 130 rpm e 25°C. As amostras foram retiradas em intervalos regulares de 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 6 horas para análise da concentração de flavonoides em solução. Antes da quantificação de flavonoides, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 30 minutos. A concentração de flavonoides adsorvidos ( $q_t$ ), em  $\text{mg g}^{-1}$ , foi determinada por balanço de massa conforme a Equação 10. Onde,  $C_0$  e  $C_t$  são as concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de flavonoides antes e depois da biossorção, respectivamente,  $V$  é o volume de fase aquosa (L) e  $M$  é a massa (g) da biomassa (*Saccharomyces cerevisiae*).

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)}{M} \cdot V \quad (10)$$

A modelagem cinética dos dados experimentais foi realizada seguindo os modelos matemáticos de pseudo - segunda ordem e difusão intrapartícula.

#### 4.5.2 Estudo das Isotermas de Biossorção

Os ensaios para a determinação das Isotermas de sorção foram realizados nos mesmos padrões dos experimentos cinéticos, no entanto variando a concentração dos extratos no tempo de equilíbrio.

Foram colocados em erlenmeyers com 50 mg de levedura em 12,5 mL de solução de extrato do BU em diferentes concentrações, com a agitação de 130 rpm, a 25 °C por 240 min (o tempo de equilíbrio que foi determinado a partir da dos ensaios cinéticos). Foram utilizados os Modelos de Langmuir, Freundlich, Temkin e Dubinin – Radushkevich conforme as Equações 4, 5, 6 e 7 (seção 3.7.2), para descrever e avaliar o comportamento do processo de adsorção dos flavonoides em *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 4.6 ANÁLISES DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras de levedura antes e após o processo de biossorção foram realizadas no Microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss / EVO MA 15 equipado com: detectores de elétrons secundários (SE) de alto vácuo (HV) e de pressão variável (VP) e de elétrons retroespalhados (BSE); detector EDS Oxford X-Max de 20 mm<sup>2</sup>; detector WDS Oxford IncaWave 500 com cristal adicional para análise de nitrogênio; vaporizador de ouro e carbono para recobrimento de amostras não condutoras, sob um aumento de 9000 vezes. Essas análises foram realizadas no Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais - CMCM da UTFPR. As amostras foram metalizadas, sendo pulverizadas com uma liga de Ouro/Paládio sob condições de vácuo, e após, foram produzidas imagens microscópicas das amostras.

#### 4.7 ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR/ATR)

Com o intuito de possibilitar comparações entre os grupamentos funcionais de cada amostra, a análise de MIR/ATR foi realizada com os extratos de bagaço de uva, levedura sem tratamento (controle) e levedura adsorvida de compostos bioativos (produto da biossorção). Para aquisição dos espectros foi utilizado um espectrômetro da Bomem-Hartmann & Braun, equipado com o acessório de ATR (attenuated total reflectance) de diamante.

Antes da análise de cada amostra foi realizado um espectro de *background* do ar, sendo o mesmo utilizado para descontar a influência dos componentes do ar no espectro. Os espectros serão obtidos na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.8 ANÁLISES POR CROMATOGRÁFICA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE - DAD) E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A análise de cromatografia líquida foi baseada na metodologia de Haminiuk et al. (2012), com modificações. Os extratos foram filtrados em um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ , em seguida 50  $\mu\text{L}$  serão injetados em um equipamento de modelo Agilent 1260 Infinity, com um detector de arranjo de diodos.

A separação foi realizada utilizando uma coluna C18, 4.6 mm x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Acclaim 120) a  $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . A fase móvel era composta de um solvente A (1.0% ácido fosfórico, v/v) e um Solvente B (metanol). O gradiente aplicado foi: 5 – 15% B por 2 min; 15 – 25% B por 5 min; 25 – 30% B por 10 min; 30 – 35% B por 15 min; 35 – 50% por 25 min; 50 – 60% B por 30 min; 60 – 80% B por 35 min; 80 – 100% B por 45 min, seguido da lavagem e acondicionamento da coluna. A vazão será de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , sendo a corrida monitorada em 280 nm, 320 nm e 370 nm. A quantificação foi realizada usando a curva de calibração de 5 padrões (catequina, rutina, ácido gálico, miricitina e quercitina). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A validação do método cromatográfico seguiu o guia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para validação de métodos bioanalíticos (RE nº 899

de 2003). Os parâmetros avaliados: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e recuperação. Para a validação, foram utilizadas soluções de 5 padrões diferentes e um mix.

#### 4.9 EXPERIMENTOS DE DIGESTÃO *IN VITRO* DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

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. A levedura seca foi suspensa com etanol a 40% (v/v). Também foi preparado um branco com etanol 40% para reduzir interferências ou uma provável contribuição de constituintes não-antioxidantes na capacidade antioxidante total.

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, foram adicionados 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 de 2 horas, a digestão com pepsina foi interrompida mantendo as amostras em banho de gelo durante 10 minutos. Então, o pH das amostras foi ajustado para 6,0 com NaHCO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, simulando a condição 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>, foram adicionados 30 mL de fluido intestinal fresco (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 flavonoides (JILANI et al., 2015). Os resultados foram expressos em concentração de flavonoides presentes nas amostras, em comparação com as amostras controle.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CFT e FLAVONOIDES

As informações sobre a quantificação de compostos fenólicos (CFT) totais e flavonoides totais estão dispostas na Tabela 1.

**Tabela 1: Relação entre CFT e flavonoides nas espécies *Merlot* e *Tannat***

Amostra	CFT (mg GAE g <sup>-1</sup> )	CFT (mg GAE L <sup>-1</sup> )	Flavonoides (mg CE g <sup>-1</sup> )	Flavonoides (mg CE L <sup>-1</sup> )	%Flavonoides*
Merlot	7444.44 ±	930.56 ±	1822,07 ±	227,71 ±	24.47
	328.12 <sup>a</sup>	40.93 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>	59.79 <sup>a</sup>	
Tannat	8477.78 ±	1059.45±	3629,19 ±	453,64 ±	42.81
	304.31 <sup>b</sup>	38.03 <sup>b</sup>	0.02 <sup>b</sup>	9.77 <sup>b</sup>	

**CFT = Compostos Fenólicos Totais, em mg de Equivalente de Ácido Gálico (mg EAG) por unidade de massa de bagaço de uva**

**Flavonoides = Quantidade de flavonoides totais, em mg de Equivalente de Catequina (mg EC) por unidade de massa de bagaço de uva**

**Os valores em cada coluna com diferentes letras sobrescritos são significativamente diferentes (p <0,05).**

**\*Porcentagem de flavonoides totais nas variedades de bagaço de uva utilizadas nos estudos.**

Do total de CFT presentes no BU da variedade *Merlot*, cerca de 24,5% correspondem aos flavonoides totais e para a variedade *Tannat*, esse valor fica próximo de 43%. Iora et al., 2014 realizou estudos sobre a composição fenólica de 3 variedades, entre elas *Merlot* e *Tannat*, e encontrou concentrações de compostos fenólicos cerca de 100 vezes menor do que foi encontrado no presente estudo, mostrando que a extração de compostos fenólicos foi eficiente. Alguns fatores influenciam na diferença da composição e teor de compostos fenólicos, por isso, muitas vezes não há uma concentração padrão para comparação. Há diversos fatores que podem influenciar na concentração de flavonoides no bagaço de uva, tais como a variedade, espécie, estação, condições do solo e clima (YANG, MARTINSON, LIU, 2009) o que dificulta a comparação destas concentrações com demais estudos. Segundo a literatura, se, quando coletado o resíduo, havia mais polpa do que cascas e sementes, o bagaço seco terá menor quantidade de flavonoides, por serem preponderantes nas cascas e sementes (MONTEALEGRE et al., 2006)

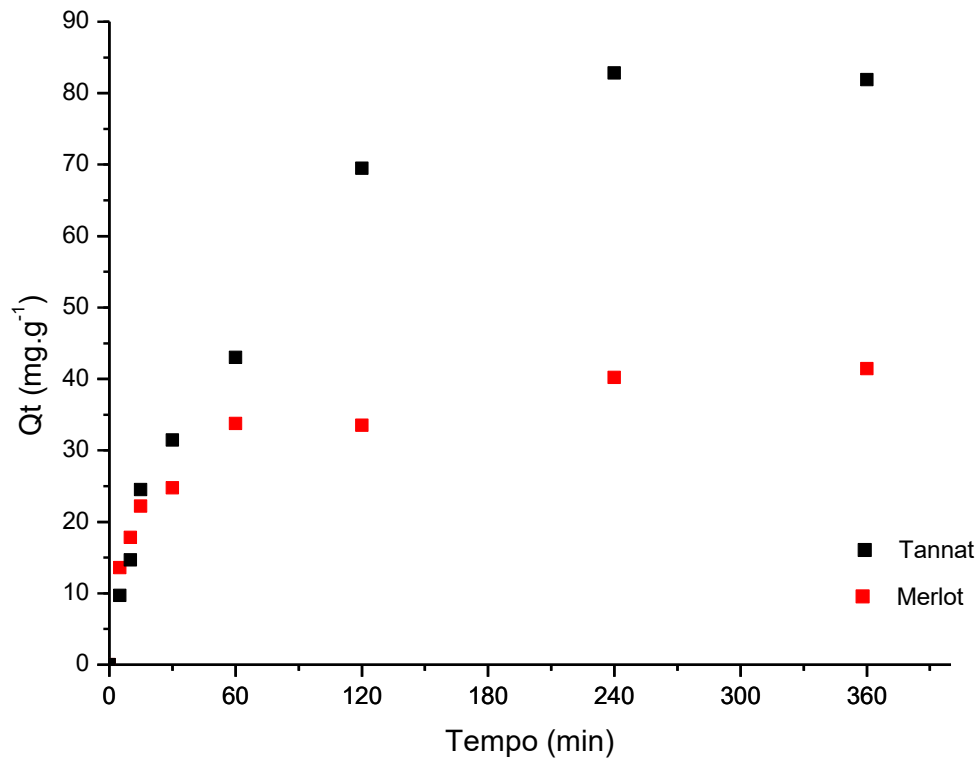


Em uma análise de compostos fenólicos, o método de extração influencia diretamente na eficiência do processo, no qual qualquer alteração, no pH, temperatura, tipo de solvente, número de passos para a extração, razão solvente/sólido e tamanho da partícula do sólido, por exemplo, altera a concentração destas substâncias na amostra analisada (ESCRIBANO-BAILÓN, SANTOS-BUELGA, 2003).

## 5.2 CINÉTICA DE BIOSSORÇÃO

A descrição da cinética da biossorção demonstra a taxa de ligação de soluto na superfície dos biossorbentes, através de mecanismos complexos (PARK et al., 2010). Nos ensaios cinéticos, um dos intuitos foi encontrar o tempo de equilíbrio de biossorção, ou seja, o tempo, a partir do qual, a taxa de biossorção se torna constante. Com isso, um gráfico  $Q_t$  (quantidade máxima de flavonoides retida na levedura, em  $\text{mg g}^{-1}$ ) versus tempo (minutos) foi construído (Figura 8), e, portanto, determinou-se o tempo de equilíbrio de 240 minutos (4 horas).

**Figura 8: - Cinética de adsorção de flavonoides pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (50 mg de massa do adsorvente; 293,15K de temperatura; 120 rpm de agitação; volume total de solução de 12,5 mL e com tempo de contato máximo de 240 minutos)**



**Nota:  $Q_t$  = massa de flavonoides adsorvida do tempo de equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$ )**

O tempo de equilíbrio obtido por Jilani et al. (2015) e Jilani, Cilla, Barberá e Hamdi (2016) no estudo da bioadsorção de compostos fenólicos de chás e folhas verdes de oliveira foi de 3 horas, semelhante ao resultado obtido por Stafussa et al., 2016, no estudo da bioadsorção de antocianinas em *Saccharomyces cerevisiae*. RUBIO (2017) estudou a adsorção de compostos fenólicos de bagaço de uva das variedades *Cabernet Sauvignon* e *Bordeaux* em *Saccharomyces cerevisiae* modificada quimicamente, obtendo tempo de equilíbrio cinético de 2 horas, assim como Stafussa et al., 2016. O presente estudo está em concordância com a literatura citada, apesar do tempo obtido ser ligeiramente maior. Esse fato pode indicar que o acesso dos flavonoides aos sítios de ligação da levedura foi dificultado. Fato que pode estar associado ao mecanismo de difusão intrapartícula.

Os dados cinéticos foram ajustados segundo os modelos matemáticos de Pseudo-Segunda Ordem e Difusão Intrapartícula.

O modelo de Pseudo - segunda Ordem se baseia na ordem da reação, assumindo que a taxa de sorção é proporcional ao número de sítios livres de ligação na superfície do material bioadsorvente (AKSU, 2001).

Na Tabela 2 encontram-se os valores dos parâmetros obtidos para os 2 modelos cinéticos testados.

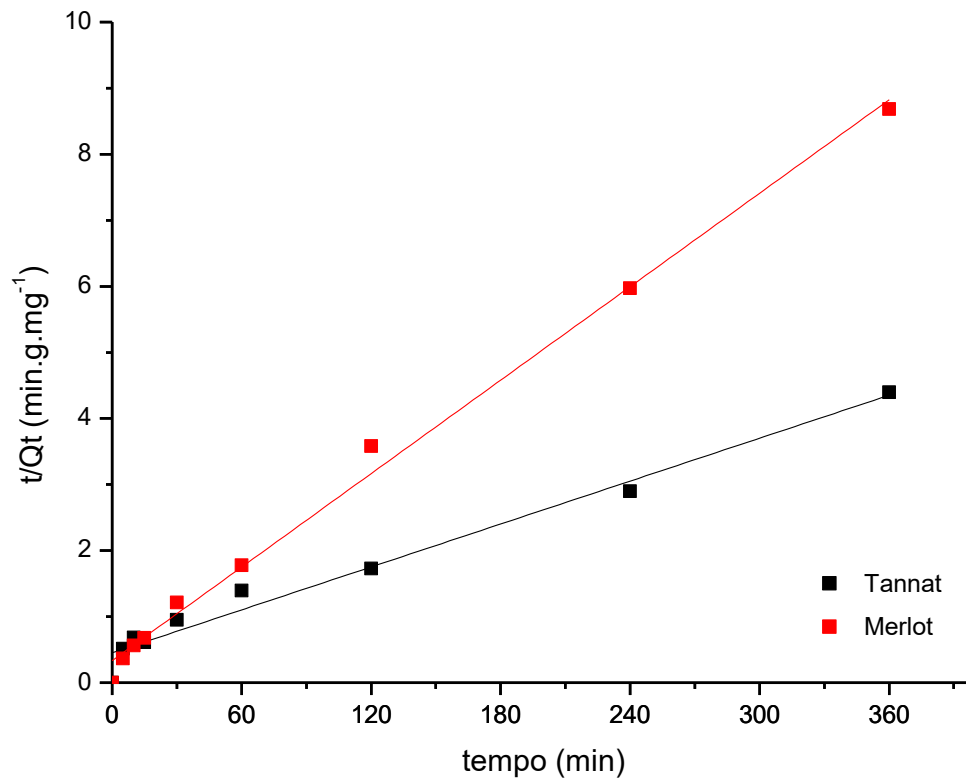
**Tabela 2: Comparativo dos parâmetros cinéticos avaliados dos Modelos Pseudo - Segunda Ordem e Difusão Intrapartícula, para as variedades *Merlot* e *Tannat***

Modelo	Parâmetro	<i>Merlot</i>	<i>Tannat</i>
Pseudo 2ª Ordem	$k_2 \times 10^3$ (g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	4,49	16,72
	$Q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	42,92	96,15
	$Q_{exp}$ (mg g <sup>-1</sup> )	40,20	82,80
	R <sup>2</sup>	0,9968	0,9914
Difusão Intrapartícula	$K_{dif}$ (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-1/2</sup> )	3,48 (Estágio I) 1,01 (Estágio II)	4,67
	C (mg g <sup>-1</sup> )	6,74 (Estágio I) 23,06 (Estágio II)	5,024
	R <sup>2</sup>	0,9666 (Estágio I) 0,8246 (Estágio II)	0,9335
	% de Bioadsorção	30,71	33,64

Onde:  $K_2$  = constante de adsorção de Pseudo-Segunda ordem (g mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>);  $Q_e$  = capacidade máxima de adsorção (mg g<sup>-1</sup>);  $K_{dif}$  = contante do modelo de Difusão Intrapartícula (mg g<sup>-1</sup> min<sup>-1/2</sup>); C = adsorção da camada limite (mg g<sup>-1</sup>)

Para a cinética de Pseudo – segunda ordem (Figura 9), nota-se que para a variedade *Tannat*, a capacidade de adsorção calculada ficou mais distante do valor obtido experimentalmente, indicando que para essa variedade o tempo empregado na bioadsorção pode ser maior do que 4 horas apenas. As diferenças dos valores das quantidades bioadsorvidas podem ser devido a capacidade de ligação a um sítio sobre a macromolécula ligante, podendo influenciar diferentes locais de ligação na mesma macromolécula. Além disso, pode ser pelo fato de que a adsorção ocorre em múltiplas camadas, com uma distribuição não uniforme de calor de adsorção e afinidades sobre a superfície heterogênea (FOO; HAMEED, 2010).

**Figura 9: Ajuste do modelo de Pseudo - segunda ordem para os testes de bioadsorção de flavonoides em *Saccharomyces cerevisiae***



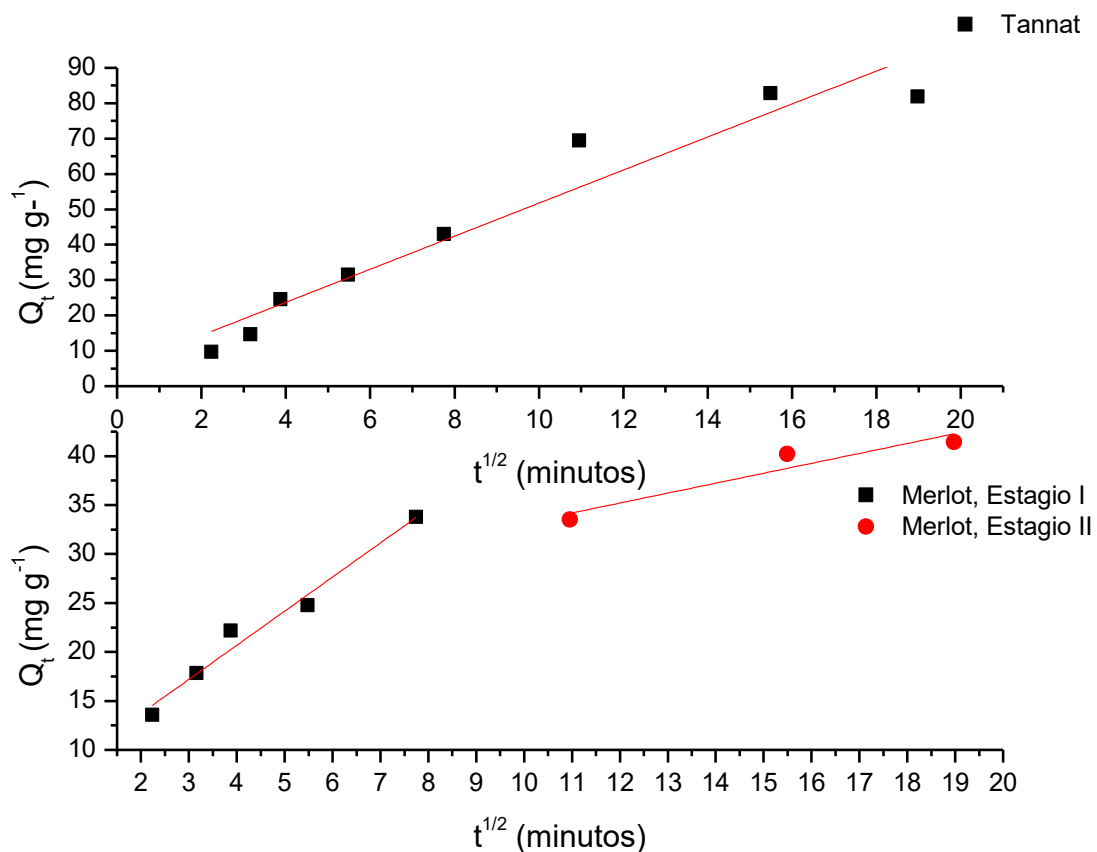
**Nota:**  $t/Q_t$  = relação entre tempo e quantidade de flavonoides adsorvidos (min g mg<sup>-1</sup>)

Outros estudos de bioadsorção envolvendo a biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* também reportam comportamento cinético equivalente (GAEDHI et al., 2013; STAFUSSA et al., 2016; CHEN; WANG, 2016; KHAKPOUR et al., 2014).

Quando a difusão intrapartícula está envolvida na adsorção, o gráfico  $Q_e$  versus  $t^{1/2}$  resulta em uma relação linear. Na Figura 10, observa-se que o gráfico para a variedade *Merlot* apresenta multilinearidade, ocorrendo em 2 estágios, sugerindo que a difusão intrapartícula é significativa, já que o efeito da camada limite (valor de C) é alto no estágio II quando comparado ao valor do estágio I, havendo, portanto, mais de um fator que afeta a adsorção e podem estar operando simultaneamente (Basibuyuk, 2003; Özcan e Özcan, 2004).

Dilarri (2017) estudou a adsorção de corantes têxteis em quitosana e *Saccharomyces cerevisiae*, e observou o mesmo comportamento quando a adsorção ocorreu na levedura.

**Figura 10:** Ajuste do ensaio cinético para o Modelo de Difusão Intrapartícula para as variedades *Merlot* e *Tannat*, na bioadsorção em *Saccharomyces cerevisiae*



**Nota:**  $Q_t$  = massa de flavonoides adsorvidos no tempo de equilíbrio (mg g<sup>-1</sup>)

Quando o gráfico de difusão intrapartícula possui mais de uma região linear, então o processo de adsorção é controlado por um mecanismo multi-etapas (TRAN et al., 2017), como foi observado. Além disso, quando as curvas plotadas passam pela origem, a difusão intrapartícula controla o processo (MCKAY, POOTS, 1980), o que não é percebido em nenhum caso, ou seja, o processo de difusão intrapartícula ocorre, mas não é ele quem comanda a adsorção.

### 5.3 ISOTERMAS DE BIODSORÇÃO

As isotermas são utilizadas para descrever o comportamento da adsorção frente à variação da concentração do soluto. Esses processos podem ser modelados por equações matemáticas na tentativa de traduzir o mecanismo de adsorção (VIJAYARAGHAVAN, YUN, 2008). Neste trabalho, foram usadas as modelagens não lineares de Langmuir, Freundlich, Temkin e Dubinin-Radushkevich. Os parâmetros analisados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3: Parâmetros das Isotermas de Freundlich, Temkin e Dubinin – Radushkevich para as espécies *Merlot* e *Tannat***

Modelo	Parâmetro	<i>Merlot</i>	<i>Tannat</i>
Langmuir	$Q_{m\acute{a}x}$ (mg g <sup>-1</sup> )	13,50	217,66
	$k_L$ (L g <sup>-1</sup> )	0,18	$5,30 \times 10^{-4}$
	$R_L$	0,29	$8,69 \times 10^{-4}$
	$R^2$	0,97	0,90
Freundlich	$k_F$ (L g <sup>-1</sup> )	4,89	0,19
	N	0,23	0,88
	$R^2$	0,95	0,91
Temkin	$A_t \times 10^{-12}$ (L mg <sup>-1</sup> )	0,31	0,37
	$B_t \times 10^7$ (J mol <sup>-1</sup> )	1,81	1,96
	$R^2$	0,98	0,95
Dubinin - Radushkevich	$q_{DR}$ (mg g <sup>-1</sup> )	59,94	297,76
	$k_{DR}$ (mol <sup>2</sup> kJ <sup>2</sup> )	0,011	0,011
	E (kJ mol <sup>-1</sup> )	7,10	6,50
	$R^2$	0,99	0,99

**Nota:**  $Q_{m\acute{a}x}$  (mg g<sup>-1</sup>)  $k_L$  (L g<sup>-1</sup>)  $R_L$   $k_F$  = constante de Freundlich (L g<sup>-1</sup>); n = grau de heterogeneidade;  $A_t$  = constante de equilíbrio da ligação (L mg<sup>-1</sup>);  $B_t$  = calor de adsorção (J mol<sup>-1</sup>);  $q_s$  = capacidade máxima teórica de adsorção (mg g<sup>-1</sup>);  $\beta$  = constante de Dubinin - Radushkevich (mol<sup>2</sup> (kJ)<sup>-2</sup>); E = energia livre de sorção (kJ mol<sup>-1</sup>);

### 5.3.1 Isoterma de Langmuir

A isoterma de adsorção de Langmuir, originalmente desenvolvida para descrever adsorção de sólido em fase gasosa sobre carvão ativado, tem sido tradicionalmente utilizada para quantificar e contrastar o desempenho de diferentes biossorventes (LANGMUIR, 1916). Segundo esse modelo a adsorção acontece em uma superfície uniforme, simples e infinita e não porosa. À medida em que mais moléculas são adsorvidas, há uma distribuição uniforme formando uma monocamada que recobre toda a superfície.

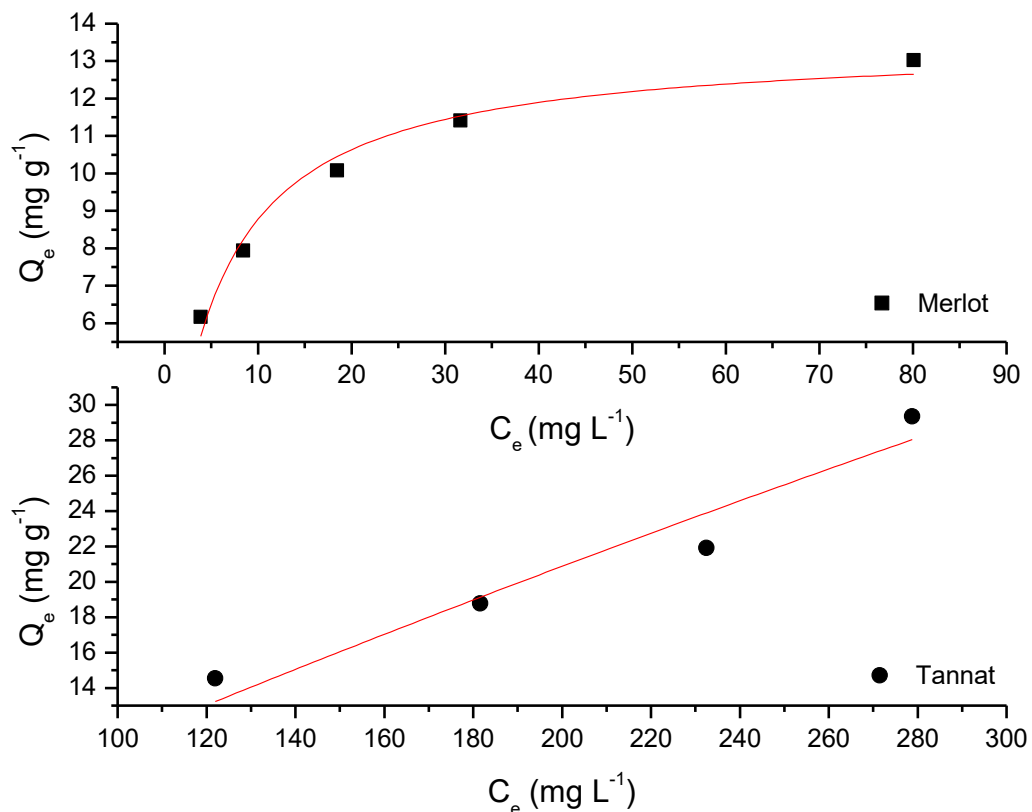
Através do parâmetro  $R_L$  é possível prever teoricamente se a adsorção é favorável ou não. Como os valores desse parâmetro para as duas variedades encontram-se entre 0 e 1, a adsorção tem, inicialmente, característica favorável, tendo como capacidade de adsorção teórica ( $Q_{m\acute{a}x}$ ) os valores de 13,50 mg g<sup>-1</sup> para a variedade *Merlot* e 217,66 mg g<sup>-1</sup> para variedade *Tannat*.

O parâmetro  $k_L$  do modelo de Langmuir, expressa a afinidade entre o adsorvente e adsorvato, sendo o valor de 0,18 L g<sup>-1</sup> para a variedade *Merlot*. Esse parâmetro encontra-se em concordância com o trabalho de Rafael (2016), que

estudou a adsorção de corante têxtil em bagaço de malte, e encontrou o valor de  $10,13 \text{ L g}^{-1}$  para esse mesmo parâmetro.

Ao compararmos as Figuras 11 e 6 (seção 3.7.1) é possível perceber que a adsorção da variedade *Merlot*, segundo o modelo de Langmuir, apresenta uma adsorção do tipo favorável.

**Figura 11: Ajuste para a Isoterma de Langmuir para as variedades *Merlot* e *Tannat***



**Nota:**  $Q_e$  = massa de flavonoides adsorvidos no tempo de equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$ );  
 $C_e$  = concentração de flavonoides do tempo de equilíbrio ( $\text{mg L}^{-1}$ )

Já o bagaço Tannat apresenta um coeficiente de determinação igual a 0,9042, sugerindo que os dados para essa amostra não são adequadamente ajustados por esse modelo. Isso é perceptível na Figura 11, pois o gráfico tem características de uma adsorção não favorável, por esse motivo, o valor das capacidades de adsorção teórica e experimental (Tabela 2) apresentam valores discrepantes.

### 5.3.2 Isoterma de Freundlich

A isoterma de Freundlich é a primeira relação conhecida descrevendo a adsorção não ideal e reversível, sendo não restrita à formação de monocamada (FREUNDLICH, 1906). Esse modelo considera que os sítios ativos de adsorção possuem afinidades diferentes para o adsorvato, ou seja, a adsorção ocorre em uma superfície heterogênea e os primeiros locais a serem ocupados são os sítios de adsorção de maior energia (LIMA, 2017).

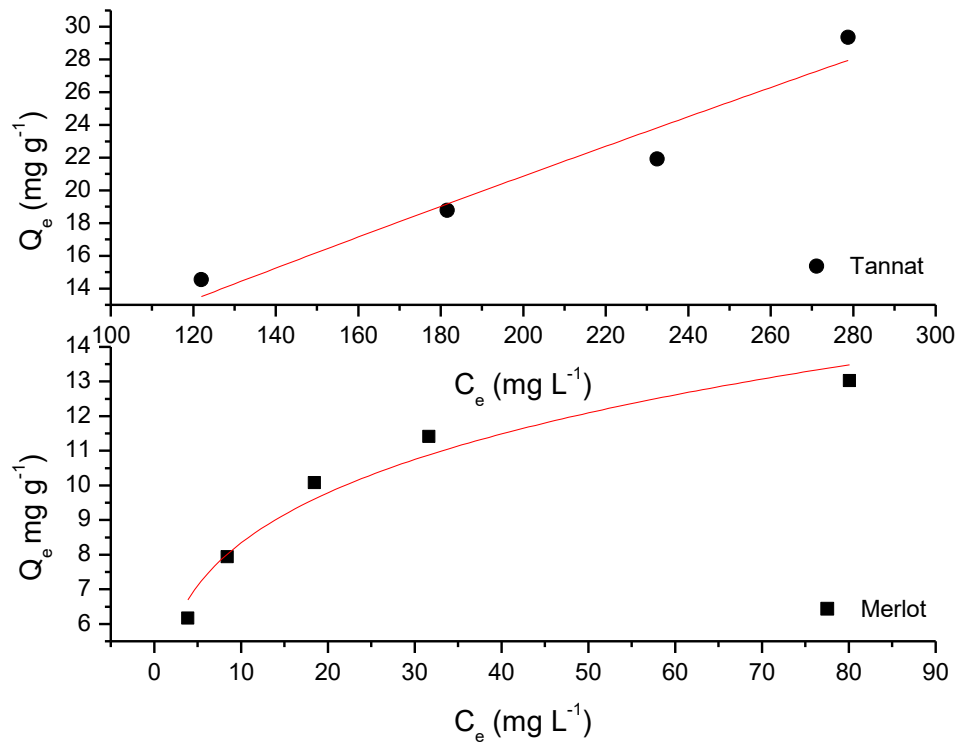
A constante de Freundlich ( $K_F$ ) indica a capacidade de biossorção do biossorvente (GOHARI et al., 2013) e está relacionada com a energia média de adsorção (LIMA, 2017). Na Figura 12 tem-se o gráfico da Isoterma de Freundlich para as variedades *Merlot* e *Tannat*.

O parâmetro “n” é um parâmetro empírico, relacionado com a intensidade da adsorção e grau de heterogeneidade da superfície do adsorvente e a solução. A adsorção será favorável quando esse parâmetro compreender valores menores que 1 (JAMPANI et al., 2014; TRAN et al., 2017), assim sendo, a adsorção para os dois bagaços é favorável (0,23 para o bagaço *Merlot* e 0,88 para o bagaço *Tannat*).

Stafussa et al., 2016 no seu estudo de biossorção de antocianinas em *Saccharomyces cerevisiae* encontrou valores de  $K_F$  iguais a  $0,10 \text{ L g}^{-1}$  e  $0,25 \text{ L g}^{-1}$ , para as variedades *Bordaux* e *Tannat*, respectivamente, indo de encontro aos valores obtidos no presente trabalho.

**Figura 12: Ajuste para a Isoterma de Freundlich para as variedades *Merlot* e *Tannat***





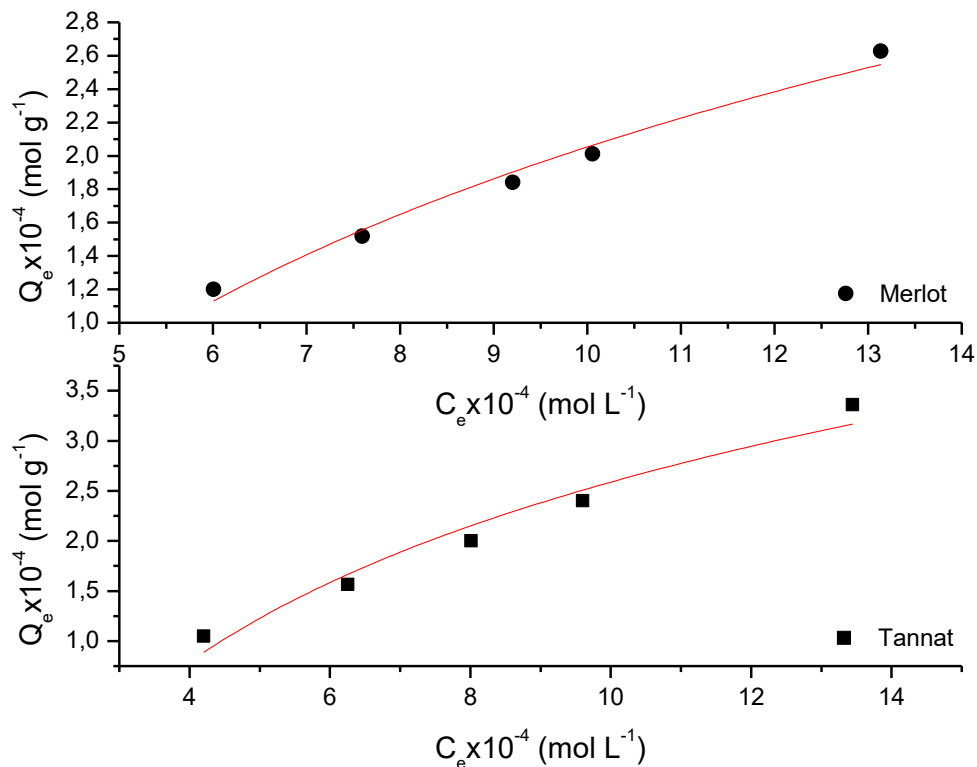
**Nota:**  $Q_t$  = massa de flavonoides adsorvidos no tempo de equilíbrio (mg g<sup>-1</sup>)

#### 5.3.4 Isoterma de Temkin

A isoterma de Temkin é um modelo antigo que descreve a adsorção de hidrogênio sobre eletrodos de platina no interior das soluções ácidas (FOO; HAMEED, 2010). Esse modelo considera os efeitos das interações indiretas adsorbato – adsorbato no processo de adsorção. Temkin observou experimentalmente que os calores de adsorção geralmente diminuem com o aumento da adsorção sobre a superfície do sólido. Deste modo, Temkin derivou um modelo assumindo que o calor de adsorção de todas as moléculas na camada diminui linearmente com a cobertura da superfície do adsorvente (CHEN et al., 2008).

De acordo com os parâmetros obtidos da isoterma de Temkin, pode-se afirmar que o calor de adsorção é baixo (valores de  $B_t$ , 1,81 J mol<sup>-1</sup> para o bagaço *Merlot* e 1,96 J mol<sup>-1</sup> para o bagaço *Tannat*), indicando fraca interação entre o adsorvente e o adsorbato (JNR e SPIFF, 2005), mesmo o coeficiente de determinação do bagaço *Merlot* sendo de 0,9777 (Figura 14).

**Figura 13: Ajuste para a Isoterma de Temkin para as variedades *Merlot* e *Tannat***



**Nota:**  $Q_e$  = massa de flavonoides adsorvidos no tempo de equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$ );  
 $C_e$  = concentração de flavonoides do tempo de equilíbrio ( $\text{mg L}^{-1}$ )

Segundo LIMA (2017), valores positivos de  $B_t$  indicam que a adsorção de flavonoides na biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* é um processo exotérmico, ou seja, há liberação de energia durante a adsorção.

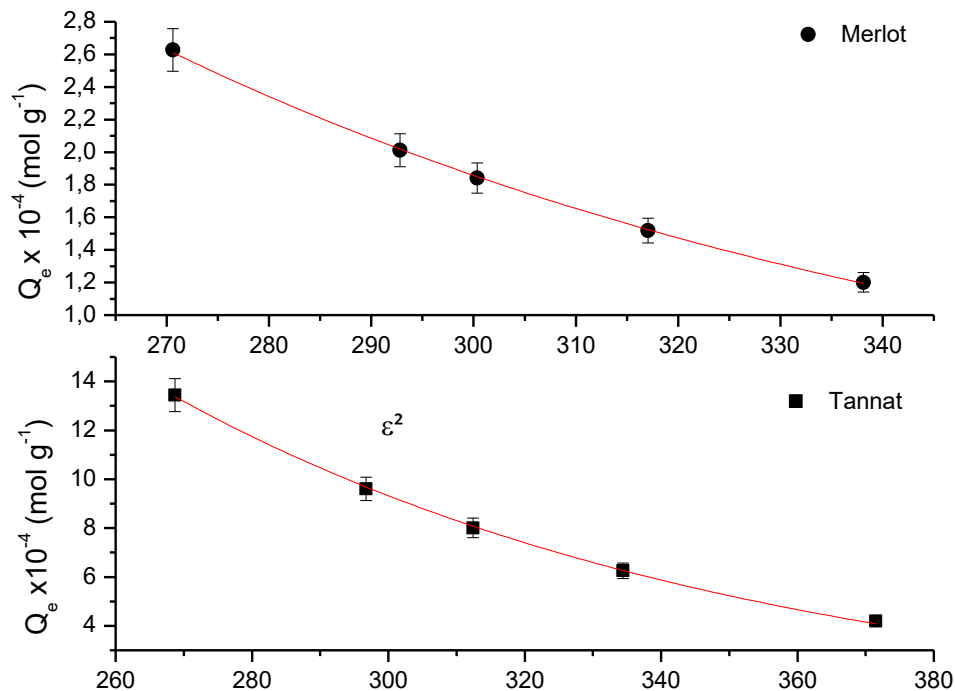
### 5.3.5 Isoterma de Dubinin – Radushkevich

A Isoterma de Dubinin - Radushkevich é aplicada para caracterizar o mecanismo de adsorção (físico ou químico) (FÁVERE et al., 2010). É mais geral que a adsorção de Langmuir, uma vez que ela não assume uma superfície homogênea ou um potencial de adsorção constante. Esse modelo assume a existência de um potencial de adsorção, sendo que a energia livre de adsorção está relacionada ao grau de preenchimento dos poros (FOO, HAMEED, 2010).

Através da Tabela 3, Figura 15 e dos valores do parâmetro E (energia livre de adsorção), pode se dizer que o mecanismo tem caráter físico, visto que esses valores são menores que 8kJ (6,74kJ para os dois bagaços de uva)

(DUBININ; RADUSHKEVICH, 1947; MACIEL et al, 2013), sugerindo que a biomassa de levedura possui uma superfície porosa (Rubio et al, 2017).

**Figura 14: Ajuste da Isoterma de Dubinin Radushkevich para o bagaço Tannat**



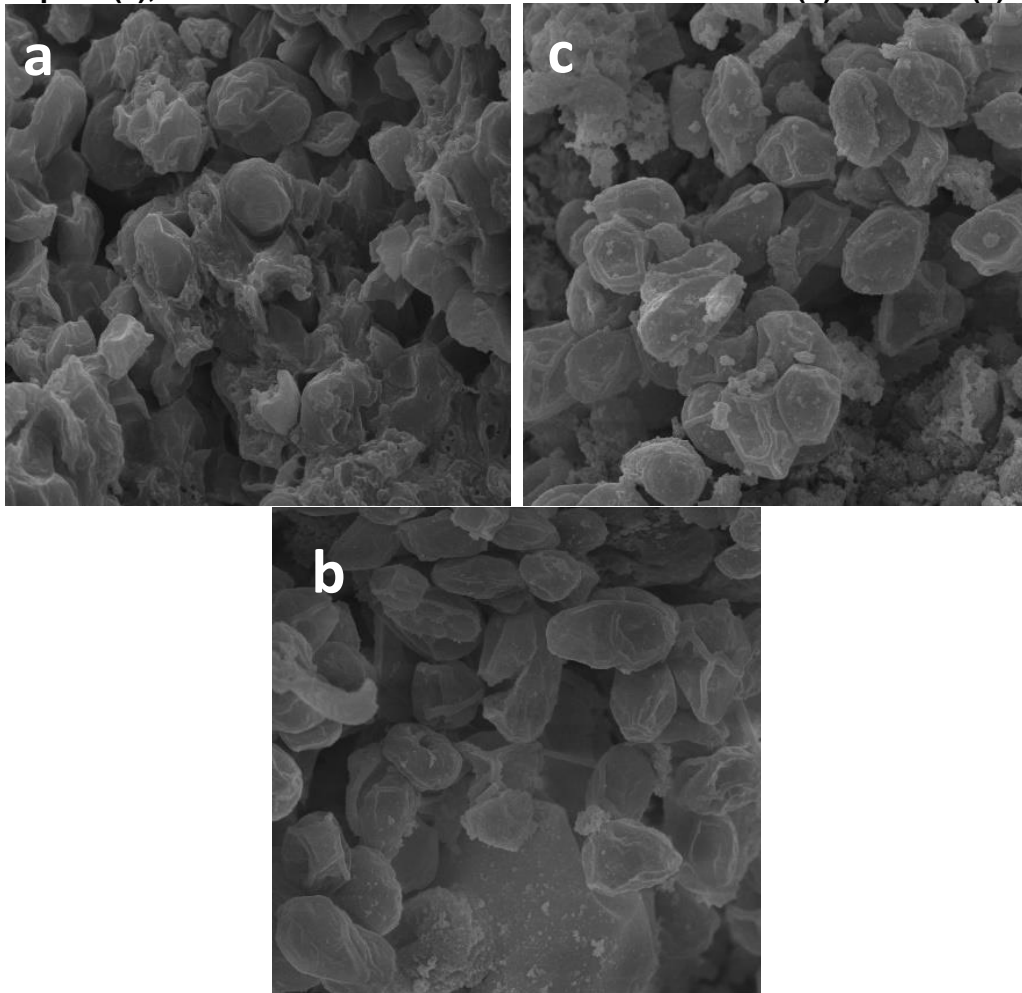
**Nota:**  $Q_e$  = massa de flavonoides adsorvidos no tempo de equilíbrio (mg  $g^{-1}$ );  
 $\epsilon$  = potencial de Polanyi

Forças de Van der Waals ou forças eletrostáticas podem estar agindo entre as moléculas do adsorbato e os átomos que compõem a superfície do adsorvente. Resultando em baixos calores de adsorção. Valores parecidos foram encontrados por Rubio et al., 2017 e Stafussa et al., 2017 em estudos de adsorção em *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras de levedura liofilizadas antes e após a biossorção foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura para a avaliação das mudanças na morfologia do biossorvente após o processo de biossorção. A Figura 16 mostra as micrografias da levedura antes e após a biossorção com extrato de bagaço de uva das variedades *Merlot* e *Tannat*.

Figura 15: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura para a amostra de levedura pura (a), bioissorvida com extrato da variedade *Merlot* (b) e *Tannat* (c)



A Figura 16a mostra aglomerados de células de *S. cerevisiae* na sua forma pura e liofilizada. Nota-se que as células estão diminuídas, desidratadas e danificadas. Esse fato poder ter relação com as repetidas utilizações na indústria da cerveja, com as lavagens anteriores à liofilização e até mesmo com a própria liofilização. Essas observações também foram feitas por Rubio (2017), embora mais acentuadas devido à transformação química do bioissorvente. Este tipo de morfologia pode favorecer a retenção das moléculas de flavonoides presentes nos extratos, pois a rugosidade das células favorece o mecanismo físico de adsorção (RAFAEL, 2016; CAN, JIANLONG, 2008).

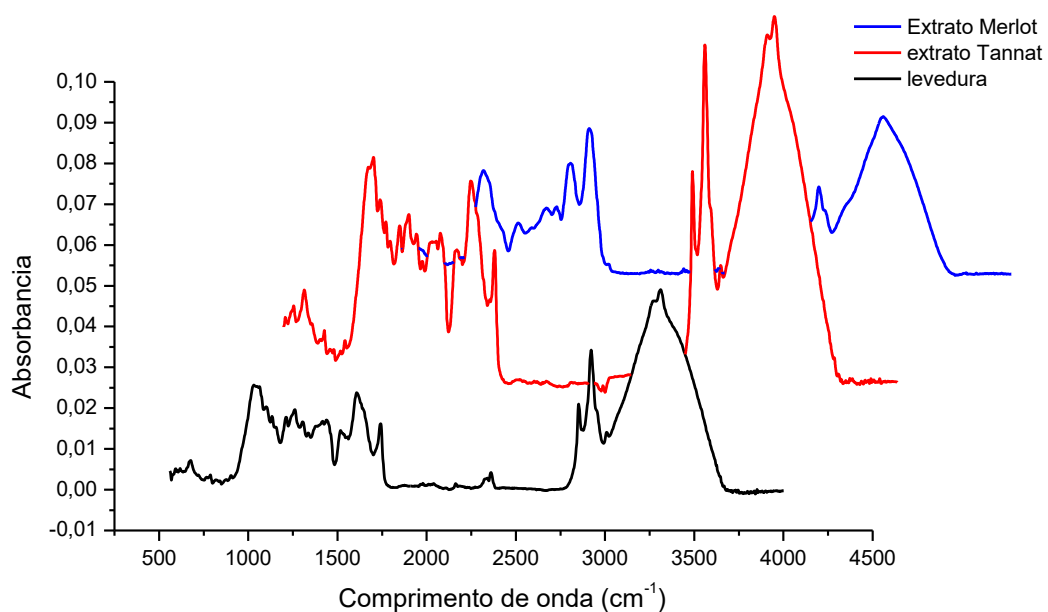
As células bioisorvidas (Figuras 16b e 16c) tem formado elipsoide, aspecto aumentado, ovalado e com superfície mais lisa do que a levedura não bioissorvida, com pequenas partículas aderidas à sua superfície, sugerindo novamente que a bioissorção foi realizada com sucesso.

## 5.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRATERMELHO MÉDIO COM REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR/ATR)

Com a técnica de FTIR/ATR é possível identificar os grupos funcionais das amostras e verificar se a bioadsorção acrescentou compostos, deslocou ou reforçou bandas.

Uma grande variedade de macromoléculas compõe a parede celular dos fungos, principalmente proteínas, lipídeos, quitinas, glicanas, mananas e outros polissacarídeos. Estas estruturas macromoleculares complexas apresentam sítios de ligação potenciais para muitas moléculas orgânicas e inorgânicas diferentes (FOMINA; GADD, 2014), elas podem ser verificadas na Figura 17, onde é apresentado o espectro de absorção de infravermelho médio, para as amostras de levedura e bagaços de uva secos, na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 16: Espectro de Infravermelho Médio para as amostras puras de levedura liofilizada e bagaços de uva secos**



Segundo a literatura, os polissacarídeos da levedura e das amostras de bagaço de uva podem ser visualizados acerca da região de 1000  $\text{cm}^{-1}$ , região na qual as  $\beta$ -glicanas e mananas apresentam maior absorção (GALICHET et al., 2001). Além disso, picos em 1039  $\text{cm}^{-1}$  podem corresponder ao estiramento C-O-H de álcoois primários e secundários, respectivamente, o que evidencia a presença de

carboidratos residuais originários do processo de fermentação alcoólica (AGNOL, 2014).

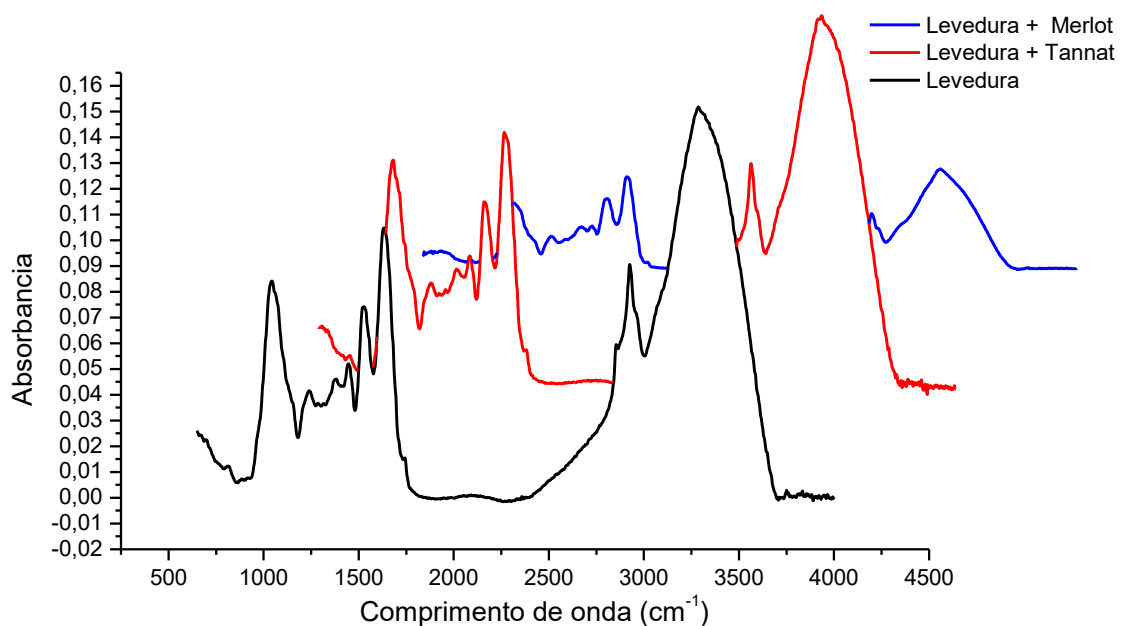
Os picos detectados na região entre  $1700\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  ( $1632\text{ cm}^{-1}$ ,  $1532\text{ cm}^{-1}$ ,  $1519\text{ cm}^{-1}$  e  $1441\text{ cm}^{-1}$ ) indicam a presença de bandas de amida I e II, principalmente a partir de ligações peptídicas de proteínas (estiramento C=O e deformação N-H) (ZHANG et al., 2010; BURATTINI et al., 2008), sendo também a região espectral característica de compostos fenólicos (HEREDIA - GUERRERO et al., 2014), na Figura 17 é possível perceber essas bandas quando analisamos os espectros dos bagaços de uva e vemos que a região espectral ao redor de  $1700\text{ cm}^{-1}$  é bastante intensa. A absorção de infravermelho no intervalo espectral entre  $1500\text{ cm}^{-1}$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  contém vibrações de ácidos graxos e proteínas. Os picos a  $1449\text{ cm}^{-1}$  e  $1385\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídos à deformação C-H do grupo funcional  $-\text{CH}_2$  e à presença de bandas amida III ou sulfamida, respectivamente (STUART, 2004).

As bandas detectadas em  $2929\text{ cm}^{-1}$  e  $2848\text{ cm}^{-1}$  estão na região da absorção de cadeias lipídicas acil ( $3050\text{ cm}^{-1}$  –  $2800\text{ cm}^{-1}$ ) e correspondem ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos metil e metileno (AMI et al., 2014; AGNOL, 2014; FASOLI et al, 2016; LUPOLI et al., 2015). Esse estiramento é bastante pronunciado na amostra do bagaço Tannat, se repetindo na bioabsorção do mesmo extrato em levedura, quando sua intensidade se equipara à amostra pura.

Antes do processo de bioabsorção (Figura 17), a levedura apresentou uma banda forte em  $3285\text{ cm}^{-1}$ , que foi magnificada após a bioabsorção e corresponde à presença de grupos amino (N-H de proteínas) e a deformação axial de hidroxilas de carboidratos, (frequentemente detectadas na região de  $3500\text{ cm}^{-1}$  –  $3200\text{ cm}^{-1}$ ) (BURATTINI et al., 2008).

Quando comparamos as Figuras 17 e 18, percebe-se que a variedade *Tannat* acrescentou mais fenólicos à levedura do que a variedade *Merlot*, fato que pode ter relação com a concentração de fenólicos/flavonoides e açúcares ser maior na variedade *Tannat*, facilitando o processo de enriquecimento da matriz fúngica.

**Figura 17: Espectro de Infravermelho Médio para as amostras de levedura liofilizada e levedura enriquecida com o extrato dos bagaços de uva das variedades *Merlot* e *Tannat***



## 5.6 CLAE – DAD/UV-VIS

A CLAE é uma técnica importante de separação física efetuada na fase líquida, em que uma mistura de compostos pode ser facilmente e rapidamente separada. A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, é a principal técnica utilizada para a separação de compostos fenólicos em matrizes alimentares, em que a fase estacionária é menos polar do que a fase móvel (STAFUSSA et al., 2015).

Neste estudo os comprimentos de onda monitorados foram de 280 nm, 320 nm e 370 nm, pois são nesses comprimentos de onda que os padrões possuem melhor separação (BESSADA et al., 2016). Com isso, prosseguiu-se com a validação do método.

### 5.6.1 Validação do Método

Para a validação do método, tomou-se como base as diretrizes da resolução nº 899 da ANVISA (2003) para métodos bioanalíticos. A validação garante que os métodos analíticos atendam às exigências de ferramentas analíticas, por meio de

dados experimentais. Assim, o método deve possuir seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão e intervalos de concentração adequados às análises a serem realizadas.

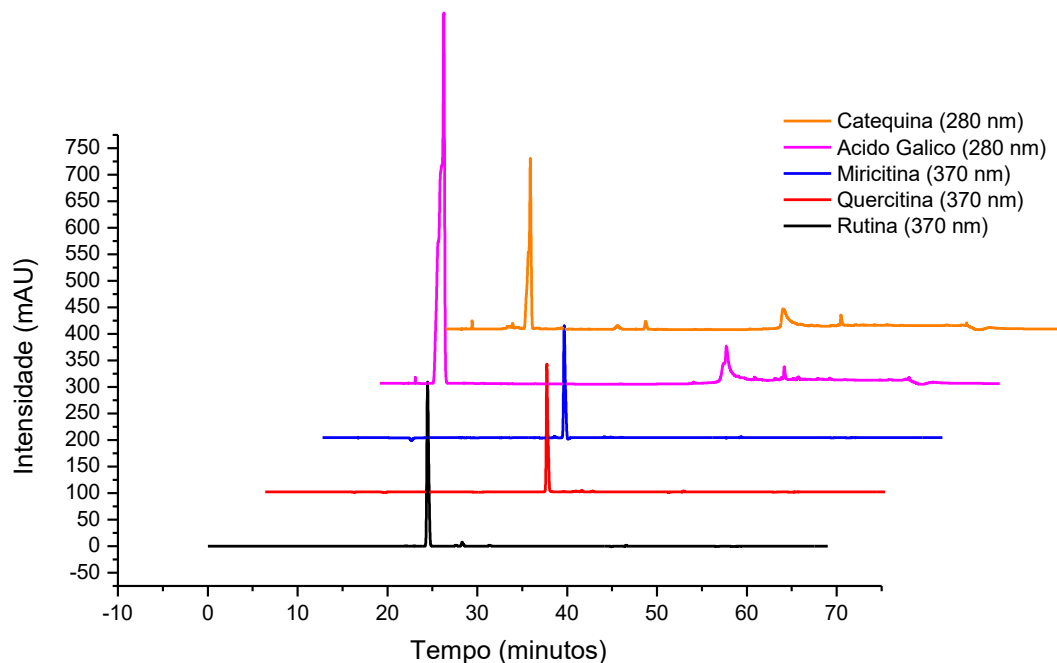
### 5.6.1.1 Especificidade

De acordo com a RE nº 899 da ANVISA, especificidade é a capacidade do método bioanalítico em discriminar e quantificar o analito de interesse na matriz biológica em meio a interferências, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou interferentes da matriz.

No cromatograma (Figura 19) tem-se a corrida dos padrões, em separado, na concentração de 10 ppm. É possível perceber que, nenhum dos padrões se sobrepõe, ou seja, todos eles possuem tempo de retenção diferentes.

Dos 5 padrões o Ácido gálico e a Catequina são lidos em 280 nm enquanto que a Miricitina, Rutina e Quercitina são lidos em 320 nm e 370 nm, sendo que para a análise dos dados, escolheu-se o comprimento de onda de 370 nm, devido à maior especificidade. Da Rosa et al., encontrou tempos semelhantes de retenção para o ácido gálico e catequina (6,65 min e 9,95min), utilizando um método de separação muito parecido com o deste trabalho.

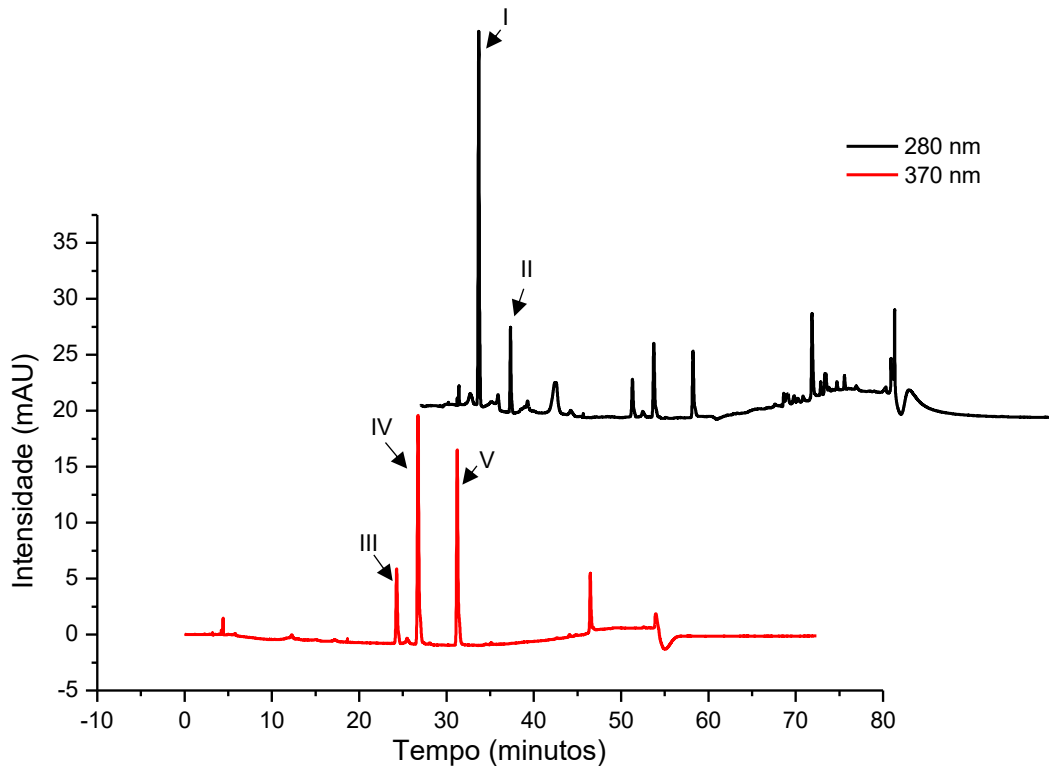
**Figura 18: Cromatograma dos padrões, na concentração de 10 ppm**





Dando continuidade ao teste, foi realizada a corrida de um MIX dos padrões (Figura 20), confirmando o resultado anterior, ou seja, nenhum dos padrões se sobrepõe ou interferem no pico de outros.

**Figura 19: Cromatograma do MIX dos padrões, na concentração de 10ppm, em 280 e 370 nm**



**Nota: I = Ácido Gálico (6,7 min); II = Catequina (10,4 min); III = Rutina (24,2 min); IV = Miricitina (26,8 min); V = Quercitina (31,3 min)**

#### 5.6.1.2 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação nos diz a menor concentração que é possível quantificar o analito. Para isso, construiu-se uma curva analítica dos 5 padrões, com concentrações variadas.

O LQ foi determinado através das curvas de regressão e não somente através do método teórico, sendo os dois comparados posteriormente. Seus dados constam no Apêndice C.

#### 5.1.1.1 Limite de Detecção (LD)

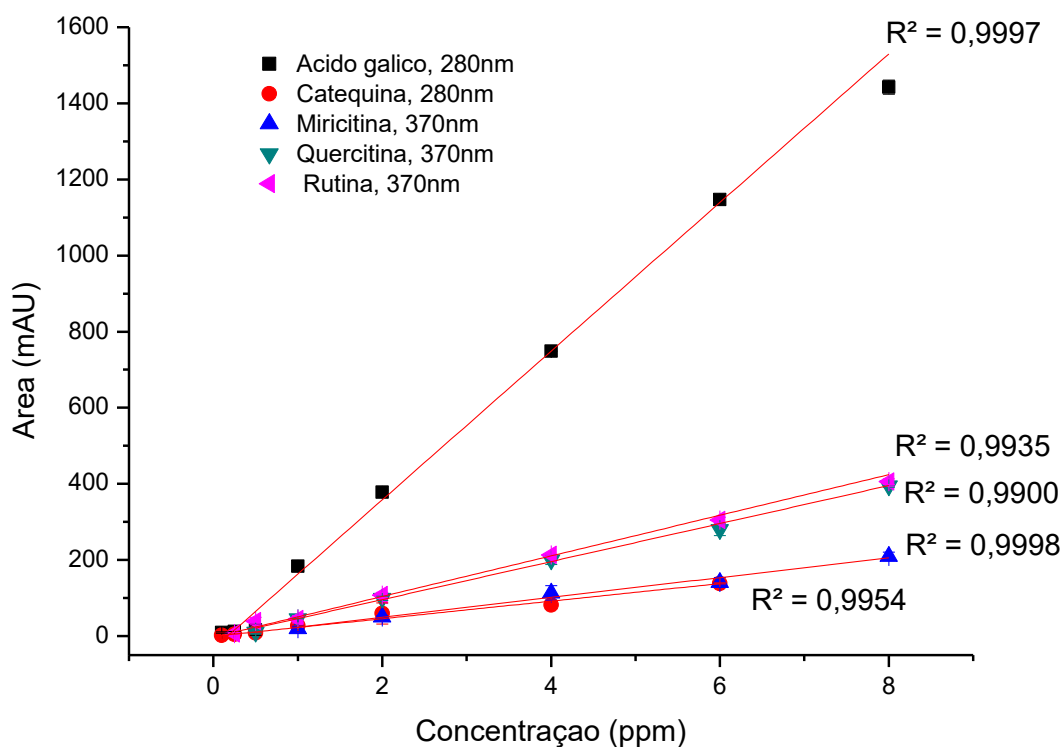
O LD é utilizado para determinar qual a concentração mínima detectável pelo equipamento, não sendo necessariamente a concentração mínima para quantificação, seus dados constam no Apêndice C.

#### 5.6.1.4 Linearidade

Através do método de regressão linear foi possível obter a equação que estabelece a correlação entre as áreas dos picos cromatográficos e as concentrações dos padrões utilizados (Figura 21). Tais valores se mostraram satisfatórios, dado que a RE n° 899 preconiza o valor mínimo de 0,98.

Na Figura 21, tem-se as curvas analíticas dos 5 padrões, que foram utilizadas na determinação do Limite de Detecção, Limite de Quantificação, coeficiente de determinação e precisão, cujos dados constam no Apêndice C. Todos os compostos possuem comportamento linear na faixa de estudo, sendo o menor coeficiente igual a 0,9900 para a Quercitina e o maior igual a 0,9998 para a Miricitina.

**Figura 20: Grafico da curva analítica dos 5 padrões utilizados**



#### 5.6.1.5 Precisão e Exatidão

Seguindo a resolução da ANVISA, a precisão foi determinada por meio do coeficiente de variação (desvio padrão dos valores dividido pela média), não se admitindo valores maiores que 15%. Já a exatidão foi expressa por meio da média das concentrações experimentais obtidas dividida pela concentração teórica, os dados constam no Apêndice C. Em quase todos os padrões (com exceção da Quercitina) pelo menos um dos pontos obteve precisão maior que 15%, no entanto esse resultado não interferiu na exatidão do método.

### 5.6.2 Análise de CLAE – DAD/UV-Vis dos Extratos

O extrato hidroalcoólico puro e os extratos que passaram pelo processo de bioissorção por 4 horas foram analisados por cromatografia, cujos cromatogramas pode ser visto nas Figuras 21 e 22.

Apesar de serem buscados os 5 padrões, somente a Catequina foi encontrada nas amostras. Pezzini (2017) analisou a presença ou ausência de 12 padrões fenólicos em sucos de uva, incluindo os 5 padrões utilizados nesse trabalho, e encontrou somente 6 deles, sendo a catequina o único padrão em comum. Isso mostra que os resultados encontrados vão de encontro com a literatura.

Para ambas variedades de bagaço a área e consequentemente a concentração de catequina diminui significativamente após a bioissorção, sugerindo que a parte restante esteja na levedura. Os dados dos picos podem ser visualizados na Tabela 4.

**Tabela 4: Dados dos tempos de retenção, área dos picos e concentração de catequina encontrados nas corridas das amostras puras e bioisorvidas, em HPLC - DAD**

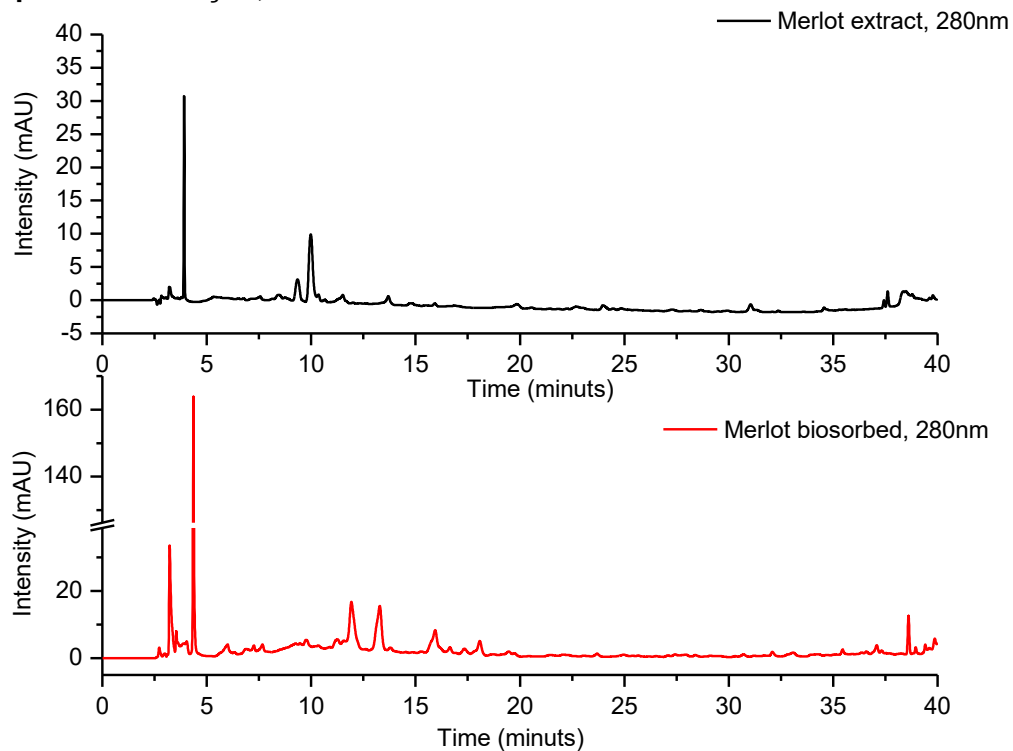
Parâmetros	Extratos			
	<i>Merlot</i>	<i>Merlot</i> Bioissorvido	<i>Tannat</i>	<i>Tannat</i> Bioissorvido
tR (min)	10,69	10,34	11,90	10,77
Área (mAU)	87,02	72,91	310,23	155,78
Concentração <sup>1</sup> (mg de Catequina L <sup>-1</sup> )	3,79	3,18	13,46	6,77

$$^1y = 23,08x - 0,55$$

Nos cromatogramas das variedades *Merlot* e *Tannat* (Figura 22 e Figura 23), pode-se perceber a alteração de alguns picos, mesmo não sendo os analisados. Esses se somatizaram ou diminuíram sua área, indicando alterações no extrato, por

consequência da bioissorção. Isso já era esperado, já que tanto os extratos quanto a levedura são amostras complexas, que quando interagem podem gerar novas estruturas, alterando o perfil cromatográfico. O mesmo resultado foi percebido quando analisamos a levedura pura e bioissorvida por FTIR/ATR e em Microscopia Eletrônica de Varredura.

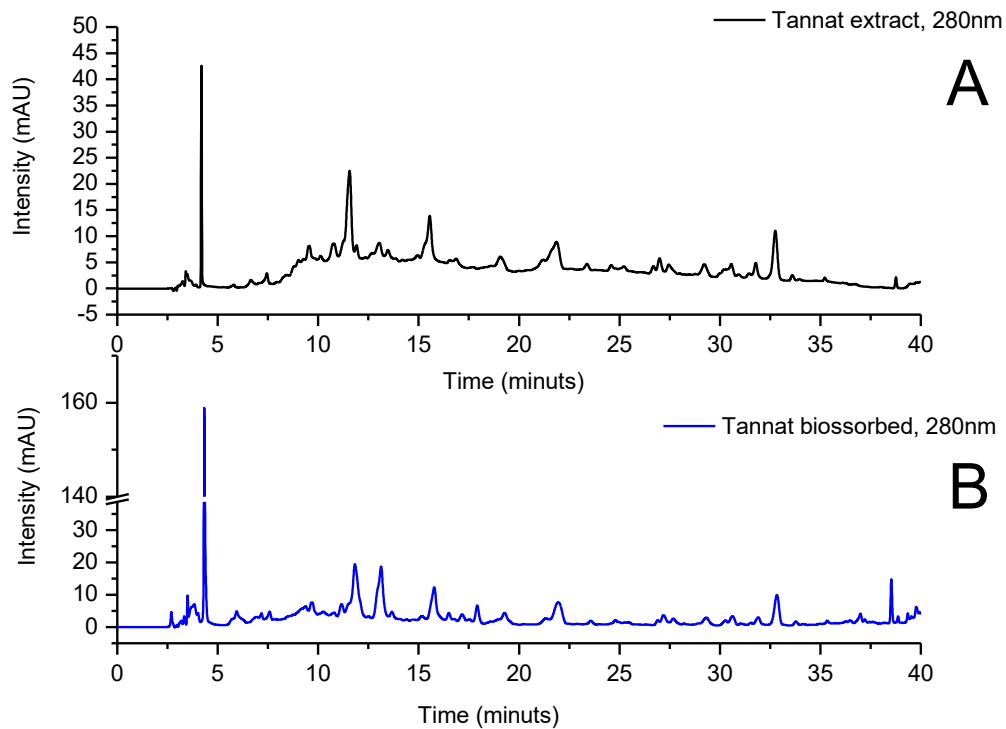
**Figura 21: Cromatograma da comparação entre o extrato bagaço da variedade *Merlot* antes e após a bioissorção, em 280nm**



Ainda nas Figuras 22 e 23, na região de eluição da Catequina (próximo de 10 minutos) percebe-se a diminuição do pico após a bioissorção (Figuras 22b e 23b), resultado que vai de encontro aos objetivos, pois isso indica que a bioissorção foi eficiente. A porcentagem de redução das áreas se aproxima de 16% para a variedade *Merlot*, enquanto que para a variedade *Tannat* esse valor chega a próximo de 50%.

Após a bioissorção, a levedura enriquecida poderá ser utilizada em novas formulações alimentares, já que possui alto teor de fibras devido à presença da levedura e compostos bioativos devido à bioissorção de flavonoides do bagaço de uva (BENDER et al., 2016).

**Figura 22: Cromatograma da comparação entre o extrato bagaço da variedade *Tannat* antes e após a bioissorção, em 280nm**



## 5.7 DIGESTÃO IN VITRO

Nesta etapa foram avaliados os comportamentos das diferentes amostras (extrato puro, extrato bioissorvido, levedura pura e levedura bioissorvida) frente à digestão gastrointestinal simulada, cujos dados constam na Tabela 5.

**Tabela 5: Flavonoides totais presentes nas amostras após a digestão gastrointestinal**

VARIEDADE	AMOSTRA	ANTES DA	ETAPA	ETAPA
		DIGESTÃO	GÁSTRICA	INTESTINAL
		(mg EC L <sup>-1</sup> )	(mg EC L <sup>-1</sup> )	(mg EC L <sup>-1</sup> )
<b>MERLOT</b>	<b>Extrato puro</b>	2006,03	1301,38	957,93
	<b>Extrato bioissorvido</b>	108,10	93,59	80,46
	<b>Levedura controle</b>	44,29	69,71	86,02
	<b>Levedura bioissorvida</b>	86,51	72,45	79,76
<b>TANNAT</b>	<b>Extrato puro</b>	1233,45	655,45	454,79
	<b>Extrato bioissorvido</b>	71,89	102,34	132,83
	<b>Levedura controle</b>	34,93	108,24	195,93
	<b>Levedura bioissorvida</b>	86,20	68,55	146,48

A digestão *in vitro* busca simular a interação entre as enzimas, pH e tempo de reação nas amostras enriquecidas e avaliar a estabilidade, degradação ou até mesmo a absorção desses compostos pelo organismo.

Para tanto, foram simuladas as duas principais etapas da digestão: etapa gástrica e intestinal.

Sabe-se que os principais compostos fenólicos devem ser extraídos durante a etapa gástrica, sendo o pH do estômago um dos principais fatores que afetam essa condição (MAZZA, 1987; AHMAD-QASEM, et al., 2014; CORREA – BETANZO et al., 2014). No entanto, esse fato não foi observado para todas as amostras. De modo geral, observou-se uma perda significativa de flavonoides nas amostras, sendo que as únicas três amostras que apresentaram acréscimo em seu valor foram a levedura controle para ambas amostras e o extrato biossorvido da variedade Tannat. Essa perda de fenólicos pode ser consequência das condições químicas que prevalecem durante a digestão do pâncreas, ou seja, pH em torno de 2 ou 3 (SILBERBERG et al., 2006). Esse fato já foi observado anteriormente, onde foi relacionado que a digestão *in vitro*, em particular a digestão pancreática, causou uma diminuição dos valores de antocianina e resveratrol em vinho tinto, uva vermelha, romãs, morangos e framboesas (PÉREZ-VICENTE, GIL-IZQUIERDO, GARCÍA-VIGUERA, 2002; GIL-IZQUIERDO et al., 2002).

Os compostos fenólicos são fortemente sensíveis a condições alcalinas, como as encontradas no intestino e secreções de sais biliares, podendo causar interações nas estruturas químicas resultando em novos compostos, com diferentes atividades biológicas (BERMUDEZ – SOTO et al., 2007). Isso foi observado para as duas variedades de bagaço, principalmente para as amostras da variedade Tannat, onde a concentração de flavonoides totais chegou a duplicar seu valor.

Na fase intestinal, observa-se uma menor estabilidade dos compostos, que pode ter relação com o alto pH desta etapa (MINEKUS et al., 2014), o que faz com que os mesmos sejam absorvidos mais facilmente (PINTO et al., 2011).

O mecanismo de absorção gastrointestinal de compostos fenólicos não é completamente conhecido, sendo um ponto importante a ser considerado a permanência dos flavonoides no intestino, resultando em benefícios importantes, tais como a inibição da proliferação de células anormais (SILBERBERG et al., 2006).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do extrato hidroalcoólico do bagaço de uva das variedades *Merlot* e *Tannat* foi possível obter uma estimativa da quantidade de compostos fenólicos totais e flavonoides existentes. O bagaço da variedade *Tannat* foi o que apresentou maior concentração de fenólicos e flavonoides, este último correspondendo a cerca de 42%. Esse fato comprova e agrega valor a esse subproduto, fazendo com que o mesmo retorne à indústria.

Os dados dos testes cinéticos apontam tempo de equilíbrio de 4 horas, sendo teoricamente descritos pelo modelo de pseudo - segunda ordem, sendo que a amostra do extrato do bagaço de uva da variedade *Tannat* apresentou a maior capacidade de bioadsorção. A variedade *Merlot* apresentou bons resultados para a cinética de difusão intrapartícula, obtendo-se 2 estágios.

Através das isotermas de bioadsorção, buscou-se entender como a bioadsorção ocorre e qual o mecanismo que a define. Com isso, após o ajuste dos 4 modelos de isotermas obteve-se que o processo tem caráter físico, ocorrendo principalmente por interações de van der Waals, sendo que o modelo de melhor ajuste linear foi o de Dubinin-Raduchkevich.

Diferentes grupos funcionais foram identificados por MIR – ATR nas células de levedura antes e após a bioadsorção. Grupos carboxila, amino/hidroxila e amida foram os principais grupos envolvidos. Quando as amostras foram avaliadas em cromatografia líquida, notou-se diversas modificações com a bioadsorção, no entanto pôde-se identificar somente um dos 5 padrões que foram utilizados, a catequina. Após a bioadsorção, esse padrão apresentou redução no pico de 16% e 50% para as amostras *Merlot* e *Tannat*, respectivamente, indicando a efetividade da bioadsorção.

Com a digestão in vitro, foi possível verificar que a levedura protegeu os compostos bioativos da digestão gastrointestinal, sendo a degradação das amostras bioadsorvidas pequena, quando comparada à degradação dos extratos brutos.

Desta forma, a biomassa *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com flavonoides pode ser um ingrediente antioxidante promissor para os produtos das indústrias de alimentos e farmacêutica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITEC, Agencia Embrapa de Informação Tecnológica. Arvore do Conhecimento – Uva de Mesa. Disponível em [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva\\_de\\_mesa/arvore/CONT000gn526ovr02wx5ok0liq1mq5ur5v0h.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_de_mesa/arvore/CONT000gn526ovr02wx5ok0liq1mq5ur5v0h.html). Acesso em 27 de julho de 2017.

AGRONEGÓCIO: Pesquisa indica uso de resíduo de uva. **Correio Riograndense**, Caxias do Sul, 1996, ed. 4907, 2004. Disponível em: <http://www6.viars.com.br/esteditora/correio/4907/right.htm>. Acesso em 10 fev. 2005.

AHMAD, R.; KUMAR, R. Adsorptive removal of congo red dye from aqueous solution using bael shell carbon. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 257, n. 5, p. 1628- 1633, 2010.

AHMAD-QASEM, Margarita H. et al. Influence of olive leaf processing on the bioaccessibility of bioactive polyphenols. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 26, p. 6190-6198, 2014.

AINSWORTH, P., IBANOGLU, Ş., PLUNKETT, A. IBANOGLU, E., STOJCESKA, V. Effect of brewers spent grain addition and screw speed on the selected physical and nutritional properties of an extruded snack. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 702–709, 2007.

AKSU, Z. Equilibrium and kinetic modeling of cadmium (II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature. **Separation and Purification Technology**, v.21, n.3, p.285–294, 2001.

ALBERTI, E.; BELTRON, P. S.; GIL, A. M. Applications of NMR to food science. **Annual Reports on NMR Spectroscopy**. 2002, 109-148

ÁLVAREZ, E., RODIÑO-JANEIRO, B. K., JEREZ, M., UCIEDA-SOMOZA, R., NÚÑEZ, M. J., GONZÁLEZ-JUANATEY, J. R. Procyanidins from grape pomace are suitable inhibitors of human endothelial NADPH oxidase. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, p. 1386– 96. 2012

AMARANTE, J. O. A. Vinhos: do Brasil e do mundo, para conhecer e beber, São Paulo: **Summus Editorial**, 1983. 157p.

AMI, D.; POSTERI, R.; MEREGHETTI, P.; PORRO, D.; DOGLIA, S.M.; BRANDUARDI, P. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Biotechnology Biofuels**, v. 7, 1-14, 2014.

ANDIA, J. P. M. Remoção de Boro de Águas e Efluentes de Petróleo por Adsorção. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos). Departamento de Engenharia de Materiais do Centro Técnico Científica. PUC-Rio, 2009.



ANTOLOVICH M, PRENZLER P, PATSALIDES E, MCDONALD S, ROBARDS K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**. V.127, p.183-198. 2002

AKAR, T.; TUNALI, S. - Biosorption performance of *Botrytis cinerea* fungal by-products for removal of Cd (II) and Cu (II) ions from aqueous solutions. **Minerals Engineering**. vol. 18, no 11, p. 1099-1109, 2005.

ARAB, Lenore; LIU, Weiqing; ELASHOFF, David. Green and black tea consumption and risk of stroke: a meta-analysis. **Stroke**, v. 40, n. 5, p. 1786-1792, 2009.

ARAÚJO, R. R. L. - Modelagem do processo de bioadsorção de chumbo utilizando a macrófita aquática *Eichhornia crassipes*. 2011.124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ARCHELA, E.; ANTONIA, L. H. D. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. 2013. Seminário: **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2013

ARNAO, M.B. Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food & Technology**. London. v.11. p.419- 421. 2000.

ASADI, S., AHMADIANI, A., ESMAEILI, M. A., SONBOLI, A., ANSARI, N., & KHODAGHOLI, F. 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.

Associação Brasileira da Indústria da cerveja. CERVBRASIL. Anuário 2015. Disponível em [http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO\\_CB\\_2015\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf)

Associação Brasileira da Indústria da cerveja. CERVBRASIL. Anuário 2015. Disponível em [http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130\\_CervBrasil-Anuario2016\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130_CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf)

AZIZ, N. A. A., WONG, L. M., BHAT, R., CHENG, L. H. Evaluation of processed green and ripe mango peel and pulp flours (*Mangifera indica* var. *Chokanan*) in terms of chemical composition, antioxidant compounds and functional Properties. **Journal of Science Food of Agriculture**, v.92, n.92, p.557–563, 2012.

BAGCHI, D., SEN, C. K., RAY, S. D., DAS, D. K., BAGCHI, M., PREUSS, H. G., JOE, A. V. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523-524, p. 87–97. 2003.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agro-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. O emprego de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de feromônio. **Química Nova**. v.27. n.3. p.421-431. 2004.

BARCIA, M. T.; PERTUZATTI, P. B.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GODOY, H. T.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. 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

BARNABÉ, D. **Produção de vinho de uvas dos cultivares Niágara Rosada e Bordô: análises físico-químicas, sensorial e recuperação de etanol a partir do bagaço**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 2006. 106f

BARROS, A.R.B. **Remoção de íons metálicos em água utilizando diversos adsorventes**. Florianópolis, 2001. 89p. Dissertação (Mestrado) – Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina. 2001.

BARROS, M. A. S. D. **Avaliação do Mecanismo de Troca Iônica de Cromo em Sistemas Zeolíticos**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – PR, Brasil, 167 p, 2003

BASIBUYUK, M.; FORSTER, C.F. An examination of the adsorption characteristics of a basic dye (Maxilon Red BL-N) on to live activated sludge system. **Process Biochemistry**, v.38, n.9, p.1311-1316, 2003.

BEHLING, E. B. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentação e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENDER, Ana Betine Beutinger et al. Obtention and characterization of grape skin flour and its use in an extruded snack. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Reducing of Ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BENZIE I., STRAIN J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.15-27.1999

BERMÚDEZ-SOTO, M.-J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.-A.; GARCÍA-CONESA, M.-T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. **Food chemistry**, v. 102, n. 3, p. 865-874, 2007.

BESSADA, S. et al. Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb. f.: An underexploited and highly disseminated species. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 45-51, 2016.

BHAGWAT, S.; HAYTOWITZ, D. B.; HOLDEN, J. M. USDA database for the flavonoid content of selected foods, Release 3.1. **US Department of Agriculture**: Beltsville, MD, USA, 2014.

BIER HOFF, Processo de Fabricação. 2016. Disponível em: <http://www.bierhoff.com.br/2013/processo-de-fabricacao/> Acesso 06 de julho de 2017.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. et al. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 16, p. 5195-5200, 2004.

BORTOLI, D. A. S.; SANTOS, F.; STOCCO, N. M.; ORELLI, A.; TOM, A.; NEME, F. F.; NASCIMENTO, D. D. Leveduras e produção de cervejas – revisão. **Bioenergia em revista**, n. 1, p. 45-58, 2013.

BRASIL. Instrução normativa n. 49, de 1º de novembro de 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://www.ivegetal.com.br/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Referenciada/INSTRU%C3%87%C3%83O%20NORMATIVA%20N%C2%BA%2049%20DE%201%C2%BA%20DE%20NOVEMBRO%20DE%202011.htm> . Acesso em 01 de junho de 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE no 899**. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 29 de maio de 2003

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional Significance. **Nutrition Reviews**. V 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRUNO, G.; SPARAPANO, L. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.71, n.4, p. 210-229. 2007

BURATTINI, E. et al. A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Vibrational Spectroscopy**, v. 47, n. 2, p. 139-147, 2008.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379– 389, 2003.

- CAN, Chen; JIANLONG, Wang. Investigating the interaction mechanism between zinc and *Saccharomyces cerevisiae* using combined SEM-EDX and XAFS. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 293-299, 2008.
- CAPRIO, F.; ALTIMARI, P.; UCCELLETTI, D.; PAGNANELLI, F. Mechanistic modelling of copper biosorption by wild type and engineered *Saccharomyces cerevisiae* biomasses. **Chemical Engineering Journal**, v. 244, p. 561–568, 2014.
- CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2ª parte – a fermentação. **Revista Analytica**, n. 26, 2007.
- CASTILLOS, M. B. M. **Desenvolvimento E Caracterização De Vinhos Tintos A Partir De Uvas Cultivadas No Noroeste Paulista**. Dissertação de Mestrado. São Paulo. 2012
- CATALUÑA, E. **As uvas e os vinhos**, Rio de Janeiro: Editora Globo, 1988. 207p.
- CETIN-KARACA, H., & NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. **Food Bioscience**. V. 11. P. 8 – 16. 2015.
- CHEN, Z., Ma, W., HAN, M., Biosorption of nickel and copper onto treated alga (*Undaria pinnatifida*): Application of isotherm and kinetic models. **Journal of Hazardous Materials**, v. 155, p. 327. 2008
- CHEN, C.; WANG, J. Uranium removal by novel graphene oxide-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* gel beads. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 162-163, p. 134-145, 2016.
- CILLA, A., PERALES, S., LAGARDA, M. J., BARBERÁ, R., CLEMENTE, G., FARRÉ, R. Influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 24. P. 87 – 94. 2011.
- COELHO, L. M.; WOSIACKI, G. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.3, p.582- 588, 2010.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. CETESB. **Cervejas e Refrigerantes**. Governo do Estado de São Paulo. 2005.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p. 241-256, 2009.

CORREA-BETANZO, J. et al. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 165, p. 522-531, 2014.

CUTLER, Gretchen J. et al. Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. **International journal of cancer**, v. 123, n. 3, p. 664-671, 2008.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução BRANDELLI, A.; RIOS, A. O.; CARVALHO, A. L. O.; OLIVEIRA, F. C.; NUNES, I.; HERTZ, P. F. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DA ROSA ALMEIDA, Aline et al. Bioactive compounds from brewer's spent grain: phenolic compounds, fatty acids and in vitro antioxidant capacity. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 3, 2017.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura**. Aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre. 2007. Disponível em: <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia/microscopia.pdf>

DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p.33-40, 2004

DEWANTO V., WU X., ADOM K. K, LIU R. H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50. P. 3010-3014. 2002

Dilarri, Guilherme Estudo da interação adsorptiva entre *Saccharomyces cerevisiae*, quitosana e corantes têxteis / Guilherme Dilarri. - Rio Claro, 2017

DO, Duong D. et al. Adsorption analysis: equilibria and kinetics. London: Imperial college press, 1998.

DOSHI, P., ADSULE, P., BANERJEE, K., & OULKAR, D. Phenolic compounds, antioxidant activity and insulin tropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L) byproducts. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1–10. 2013

DUBININ, M.M.; RADUSHKEVICH, L.V. Equation of the Characteristic Curve of Activated Charcoal Proceedings of the Academy of Sciences. **Physical Chemistry Section**, v. 55, p. 331-333. 1947

EMBRAPA. **Cevada em números**. EMBRAPA TRIGO/Socioeconomia, abril, 2014

ESCRIBANO-BAILÓN, M. T., SANTOS-BUELGA, C. Polyphenol extraction from foods. *Methods in Polyphenol Analysis*. **Cambridge**: The Royal Society of Chemistry, 2003. 383 p.

FALONE, S. Z.; VIEIRA, E. M. - Adsorção/dessorção do explosivo tetril em turfa e em argissolo vermelho amarelo. **Química Nova**, vol. 27, nº 6, 849-854; 2004.

FÁVERE, V. T., RIELLA, H. G., ROSA, S. Cloreto de N- (2-hidroxil) propil-3-trimetil amônio quitosana como adsorvente de corantes reativos em solução aquosa. **Química Nova**. v.33. p.1476– 1481. 2010.

FAO. FAOSTAT. 2016. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em janeiro de 2016.

FASOLI, Marianna et al. Pectins, hemicelluloses and celluloses show specific dynamics in the internal and external surfaces of grape berry skin during ripening. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 6, p. 1332-1349, 2016.

FEBRIANTO, Jonathan et al. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: a summary of recent studies. **Journal of hazardous materials**, v. 162, n. 2-3, p. 616-645, 2009.

FERNANDES, R. **Adsorventes alternativos para remoção de fenol em solução aquosa**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005. 78 f.

FERREIRA, I.M.P.L.V.O, PINHO, O, VIEIRA, E, TAVARELA, J.G, (2010). Brewer`s *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Food Science & Technology**, v. 21, p. 77-84.

FERREIRA, I.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J. G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**. V. 21. p. 77-84. 2010

FONTANA, Ariel R.; ANTONIOLLI, Andrea; BOTTINI, Rubén. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 38, p. 8987-9003, 2013.

FOO, K. Y; HAMEED, B.H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, v.156, p. 2–10, 2010.

FURLAN, C. M.; SANTOS, K. P.; SEDANO-PARTIDA, M. D.; MOTTA, L. B.; SANTOS, D. Y. A. C. SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. BERRY, P. E.; EE, B. W. V.;

SALATINO, A. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of Croton (*Euphorbiaceae*). **Brazilian Journal of Botany** V. 38. P 693 – 702). 2015

GAEDHIA, M., SHAAKER, H., BARAZESHA, B., KARIMIA, F., GHEZELBASHI, G. *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, 361 2013.

GALICHET, A. et al. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **FEMS microbiology letters**, v. 197, n. 2, p. 179-186, 2001.

GAWLIK-DZIKI, Urszula et al. The effect of simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 137-143, 2009.

GEANKOPLIS, C.J. Transport process and separation process principles. **Prentice Hall Professional Technical**, v. p.760 – 776, 2003

GIL, A. M.; BELTRON, P. S.; HILLS, B. P. Applications of NMR to Food Science **Annual Reports in NMR Spectroscopy**. 1996

GIL-IZQUIERDO, Angel; ZAFRILLA, Pilar; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 2, p. 155-159, 2002.

GONÇALVES, A. E. de S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2008.

GHORBANI, F. et al. Application of response surface methodology for optimization of cadmium biosorption in an aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Engineering Journal**, v. 370 145, p. 267-275, 2008.

GOHARI, Masoumeh et al. Enhancement of metal ion adsorption capacity of *Saccharomyces cerevisiae*'s cells by using disruption method. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 4, p. 637-645, 2013.

GUERRA A.; ETIENNE-MESMIN L.; LIVRELLI V.; DENIS S.; BLANQUET-DIOT S.; ALRIC M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Cell, Trends in Biotechnology**. V. 30. P. 591-600. 2012

GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. Documentos / Embrapa Uva e Vinho, ISSN 1516-8107;48. 2009. Disponível em

<http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>. Acesso em 01 de junho de 2016.

HAMINIUK, C. W. I., MACIEL, G. M., PLATA-OVIEDO, S. V. Phenolic compounds in fruits – an overview. *International Journal of Food Science & Technology*. V. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.

HEREDIA-GUERRERO, José A. et al. Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Frontiers in plant science*, v. 5, 2014.

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

HO, Yuh-Shan. Review of second-order models for adsorption systems. *Journal of hazardous materials*, v. 136, n. 3, p. 681-689, 2006.

HO, Y. S.; MCKAY, Gordon. A comparison of chemisorption kinetic models applied to pollutant removal on various sorbents. *Process safety and environmental protection*, v. 76, n. 4, p. 332-340, 1998.

HO, Yuh-Shan; MCKAY, Gordon. Sorption of dye from aqueous solution by peat. *Chemical engineering journal*, v. 70, n. 2, p. 115-124, 1998.

HOGAN, S., CANNING, C., SUN, S., SUN, X., ZHOU, K. Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, v. 58, p. 11250–6. 2010

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*. V. 37. p. 937.1999

HOLLMAN, Peter CH; GEELLEN, Anouk; KROMHOUT, Daan. Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *The Journal of nutrition*, v. 140, n. 3, p. 600-604, 2010.

HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J., PRIOR, R. High-throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, v. 50, p. 4437-4444. 2002

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUIGE, N.J (2006). **Brewery by-products and effluents**. In F.G Priest, & G.G. Stewart (Eds.), *Handbook of brewing* p. 656-713). Boca Raton: CRC Press.



JAMPANI, Chandrasekhar; NAIK, Aduja; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Purification of anthocyanins from jamun (*Syzygium cumini* L.) employing adsorption. **Separation and Purification Technology**, v. 125, p. 170-178, 2014.

IORA, Sandra RF et al. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. **International journal of food science & technology**, v. 50, n. 1, p. 62-69, 2015.

JARA-PALACIOS, M. J., HERNANZ, D., CIFUENTES-GOMEZ, T., ESCUDERO-GILETE, M. L., HEREDIA, F. J., SPENCER, J. P. E. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**. V. 183. P. 78 – 82. 2015

JIA, Z.; TANG, M.; WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, 555-559. 1999

JILANI, H.; CILLA, A.; BARBERÁ, R.; HAMDI, M. Biosorption of green and black tea polyphenols into *Saccharomyces cerevisiae* improves their bioaccessibility. **Journal of Functional Foods**. V. 17. p. 11–21. 2015.

JNR, M. H; SPIFF, A. I. Equilibrium sorption study of  $Al^{3+}$ ,  $Co^{2+}$  and  $Ag^{+}$  in aqueous solutions by fluted pumpkin (*Telfairia Occidentalis* HOOK f) waste biomass. **Acta Chim. Slov**, v. 52, p. 174-181, 2005.

JÚNIOR, A. A. C. **Microencapsulação de fisetina em células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) através de choque osmótico**. 2014. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

KARRI, Rama Rao; SAHU, J. N.; JAYAKUMAR, N. S. Optimal isotherm parameters for phenol adsorption from aqueous solutions onto coconut shell based activated carbon: Error analysis of linear and non-linear methods. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 80, p. 472-487, 2017.

KARTHIKEYAN, K., BAI, B. R. S., DEVARAJ, S. N. Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. **Internacional Journal of Cardiology**, v. 115, p. 326–33. 2007.

KATZ, E. D. **High Performance Liquid Chromatography: principles and methods in biotechnology**. New York: John Wiley, 1996. 522p.

KAUSHIK, P., MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International**. V.35. p.127-141. 2009.

KHAKPOUR, H.; YOUNESI, H. MOHAMMADHOSSEINI, M. Two-stage biosorption of selenium from aqueous solution using dried biomass of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 532-542, 2014.

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.

KTENIOUDAKI et al. Sensory properties and aromatic composition of baked snacks containing brewer's spent grain. **Journal of Cereal Science**, v.57, p.384-390, 2013.

KUMAR, P.S.; RAMALINGAM, S.; SENTHAMARAI, C.; NIRANJANAA, M.; VIJAYALAKSHMI, P.; SIVANESAN, S. Adsorption of dye from aqueous solution by cashew nut shell: Studies on equilibrium isotherm, kinetics and thermodynamics of interactions. **Desalination**, v. 261, p.52-60, 2010.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. **Journal of the American chemical society**, v. 38, n. 11, p. 2221-2295, 1916.

LAJILI, S., AZOUAOU, S. A., TURKI, M., MULLER, C. D., & BOURAOUI, A. 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.

LAVARDA, F. L. - Estudo do potencial de biossorção dos íons Cd(II), Cu(II) e Zn(II) pela macrófita *Eichhornia crassipes*. 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

LEE, S.-J., LEE, S. Y., CHUNG, M.-S., & HUR, S. J. Development of novel in vitro human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. **Journal of Functional Foods**. V. 22. P. 113 – 121. 2016

LETENNEUR, Luc et al. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. **American journal of epidemiology**, v. 165, n. 12, p. 1364-1371, 2007.

LIMA, A. de. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação de compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 2008. 219 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIMA, S. N. P. Caracterização das fibras de buriti e sua aplicabilidade como adsorvente de metais e corantes. Dissertação de Mestrado. 2017

LIN, D.; LOPEZ-SANCHEZ P, L.; R, L. Z.). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 113-119. 2013

LOPEZ, M. R. R., DIAZ, O. P., PEREZ, B. L. A., TOVAR, J., NICANOR, B. A. Fiber concentrate from orange (*Citrus sinensis* L.) bagasse: Characterization and application as bakery product ingredient. **International journal of molecular sciences**. v.12, n.4, p.2174-2186, 2011.

LUPOI, Jason S. et al. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 871-906, 2015.

MACIEL, G. M.; SOUZA, C. G. M. de; ARAÚJO, C. A. V. de; BONA, E.; HAMINIUK, C. W. I.; CASTOLDI, R.; BRACHTA, A.; PERALTA, R. M. 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

McKay G, Poots VJP (1980). Kinetics and diffusion processes in colour removal from effluent using wood as an adsorbent. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 30(1): 279–292.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113p.

MAZZA, G.; BROUILLARD, Raymond. Color stability and structural transformations of cyanidin 3, 5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 422-426, 1987.

MC, K., SJ, K. DS, K., YD, J., SJ, P., HS, L., JY, U.; SH. H. Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF- $\kappa$ B in lipopolysaccharide stimulated mouse peritoneal macrophages. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, p. 525–532, 2013.

MELLO, L. M. R. de. Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015. **Portal Embrapa**, Brasília, 12 fev. 2016. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>>. Acesso em: 21 out. 2016.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**. Baffins Lane Chichester. V.15. p. 127-130. 2001.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 577 – 599, 2000.

MEYER, V. R. **Practical high-Performance Liquid Chromatography**. 2ed. Chichester: John Wiley, 1993. 373p

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MINK, Pamela J. et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women—. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 3, p. 895-909, 2007.

MITTER, E. K., SANTOS, G. C., ALMEIDA, E. J. R., et al. Analysis of acid Alizarin Violet N Dye Removal Using Sugarcane bagasse as adsorbent. **Water, Air and Soil Pollution**. v.223. n.2. P.765-770. 2012.

MONTEIRO, A.S.S. **Incorporação de argilas e nanopartículas sílica em substratos têxteis**. Tese de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2011.

MONTEALEGRE, R. R., PECES, R. R., VOZMEDIANO, J. L. C., GASCUEÑA, J. M., ROMERO, E. G. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 687-693, 2006

MOREIRA, E. A. M.; SHAMI, N. J. I. E. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p.227-236, 2004.

MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n.8, p3408-3412, 2000.

MURSU, Jaakko et al. Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. **British journal of nutrition**, v. 100, n. 4, p. 890-895, 2008.

MURSU, Jaakko et al. Intake of flavonoids and risk of cancer in Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. **International journal of cancer**, v. 123, n. 3, p. 660-663, 2008.

NASCIMENTO, R. F. DO, LIMA, A. C. A. DE, VIDAL, C. B. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza. P. 256. 2014.

NAUMANN A. A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. **Analyst**. P. 1215-1223. 2009.

NANDI, B. K.; GOSWAMI, A.; PURKAIT, M. K. Adsorption characteristics of brilliant green dye on kaolin. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 387-395, 2009.

NGUYEN, M. L.; JUANG, R. S. Modification of crosslinked chitosan beads with histidine and 403 *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced Ni(II) biosorption. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 56, p. 96-102, 2015.

NOGUEIRA M, NASCIMENTO R. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2007, João Pessoa, PB. **Anais do Congresso: Adsorção de fenol e nitrofenóis em solução aquosa usando bagaço da casca de coco como adsorvente.**

NURK, Eha et al. Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 1, p. 120-127, 2008.

OLIVEIRA, A. P. **Avaliação da Influência dos macronutrientes na bioacumulação do chumbo pela *Eichhornia crassipes*.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), 2012.

OLIVEIRA, S. P. D. Remoção do corante azul reativo 5G utilizando o adsorvente comercial. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.** UNIOESTE/Campus de Toledo, Toledo, 2013

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. São Paulo. v.32. n. 3. p.689-702. 2009.

OETTERER, M. **Tecnologia De Obtenção Da Cerveja.** Universidade De São Paulo. Escola Superior De Agricultura Luiz De Queiroz. 2015

OURA, E. Biomass from Carbohydrates. In: Rehm, H.J.; Reed, G. **Biotechnology: a multivolume comprehensive treatise.** Weimeim: Verlang Chemie. cap.1, v.3, p.3-41, 1995.

ÖZCAN, A.S.; ÖZCAN, A. Adsorption of acid dyes from aqueous solutions onto acidactivated bentonite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.276, n.1, p.39-46, 2004.

ÖZTÜRK, S. et al. Effects of brewers' spent grains on the quality and dietary fibre content of cookies. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, p. 23-27, 2002.

ÖZVURAL, E.B. et al. Utilization of brewer's spent grain in the production of Frankfurters. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.1093-1099, 2009.

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

PARRY, J. W., LI, H., LIU, J.-R., ZHOU, K., ZHANG, L., RE, S. Antioxidant Activity, Antiproliferation of Colon Cancer Cells, and Chemical Composition of Grape Pomace. **Food Nutritional Science**, v. 02, p. 530–540. 2011

PELISSARI, F. M.; MAHECHA, M. M. A.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of the flour and starch of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **Starch/Stärke**. v. 64, n. 5, p. 382–391, 2012.

PÉREZ-VICENTE, Antonio; GIL-IZQUIERDO, Angel; GARCÍA-VIGUERA, Cristina. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2308-2312, 2002.

Pezzini, Vânia Produção de extratos enriquecidos com flavonoides a partir de coprodutos da elaboração de suco de uva. Dissertação de Mestrado. 2017.

PICÓ, Y. Análise Química dos Alimentos. **Elsevier Brasil**. 368p. 2016.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035–1042, 2000

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science and Technology**. V 17. N 11. p. 579–590. 2006

PINTO, J. et al. Absorption and metabolism of olive oil secoiridoids in the small intestine. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 11, p. 1607-1618, 2011.

RAFAEL, H. M. **Biossorção Do Corante Têxtil Preto Reafix Super 2r Com Bagaço De Malte**. Instituto Politécnico De Bragança. Dissertação. Disponível em: [https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/13174/1/tese\\_portugal.FinalMEV\\_impress%C3%A3o\\_docx.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/13174/1/tese_portugal.FinalMEV_impress%C3%A3o_docx.pdf) acesso em 07 de julho de 2017.

REDLICH, O. J. D. L.; PETERSON, D. L. A useful adsorption isotherm. **Journal of Physical Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1024-1024, 1959.

RIZZON, L. A. Sistema de produção de vinho tinto. **Embrapa Uva e Vinho**. 2006. Disponível em <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinho/SistemaProducaoVinhoTinto/recebimento.htm>. Acesso em 24 de agosto de 2016.

RIZZON, L. A.; AGNOL, I. D. **Vinho Tinto**. Embrapa Informação Tecnológica. 2007. Coleção Agroindústria Familiar. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58590/1/RIZZON-VinhoTinto-2007.pdf>. Acesso em 03 de maio de 2016

RIZZON, L.A.; MANFROI, L. Sistema de produção de vinho tinto: Fermentação. Sistemas de Produção - **EMBRAPA Uva e Vinho** - CNPUV. Bento Gonçalves, 2006.

RIZZON, L.A.; MENEGUZZO, J.; MANFROI, L. Planejamento e instalação de uma cantina para elaboração de vinho tinto. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**. 75p. 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/VinhoTinto/fermentacao.htm>>. Acesso em 29 de maio de 2016

ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E. S. S.; GENOVESE, M. I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**. v. 44. p. 897-901. 2011.

ROGINSKI, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry, Kidlington**. v.92, n. 2, p.235-254, 2005.

SABER-SAMANDARI, S.; HEYDARIPOUR, J. Onion membrane: An efficient adsorbent for decoloring of wastewater. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 13, p. 16, 2015.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, London, v.8, n. 3, p.121-137, 2002.

SANTOS, J. R. A dos. GUSMÃO, N. B., GOUVEIA, E. R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v.12. n.1. p.75-80. 2010.

SAURA-CALIXTO, F., SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**. v. 101, p. 492-501, 2007.

SCOLA, G., CONTE, D., SPADA, P. W. D.-S., DANI, C., VANDERLINDE, R., FUNCHAL, C., SALVADOR, M. Flavan-3-ol compounds from wine wastes with in vitro and in vivo antioxidant activity. **Nutrients**, v. 2, p. 1048–59. 2010

SCOLA, G., KAPPEL, V., MOREIRA, J., DAL-PIZZOL, F., SALVADOR, M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of winery wastes seeds of *Vitis labrusca*. **Ciência Rural**, v. 4, p. 1233–1238. 2010

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC, 2004. 558p.

SILBERBERG, Mathieu et al. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. **European journal of nutrition**, v. 45, n. 2, p. 88-96, 2006.

SILVA, J. F. **Análise experimental e Simulação do processo de bioadsorção de metais pesados (Pb, Zn e Ni) através da alga marinha Sargassum sp.** 2006. 179 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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

SOGUT, Eda Gokirmak; CALISKAN, Necla. Isotherm and kinetic studies of pb (ii) adsorption on raw and modified diatomite by using non-linear regression method. **Fresenius environmental bulletin**, v. 26, n. 4, p. 2720-2728, 2017.

SOUSA, C. M. D. M.; SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R. VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 351-355, 2007.

STAFUSSA, A.; MACIEL, G. M.; ANTHERO, A. G. S.; SILVA, M. V.; FERREIRA, A. A. Z.; HAMINIUK, C. W. I. Biosorption of anthocyanins from grape pomace extracts by waste yeast: kinetic and isotherm studies. **Journal of Food Engineering**. V. 169. P. 53–60. 2016.

STOJCESKA, V.; AINSWORTH, P. The effect of different enzyme son the quality of high-fibre enriched brewer's spentgrain breads. **Food Chemistry**, v.110, p.865-872, 2008.

STUART, B. H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. **Analytical Techniques in the Sciences (AnTs)**. Wiley, pp. 242, 2004

TAGLIAZUCCHI, Davide et al. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599-606, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: ARTMED, p. 719, 2004.

TAŞAR, Ş.; KAYA, F.; OZER, A. Biosorption of lead (II) ions from aqueous solution by peanut shells: Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1018–1026, 2014.



TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Dissertação. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

TRAN, Hai Nguyen et al. Mistakes and inconsistencies regarding adsorption of contaminants from aqueous solutions: A critical review. **Water Research**, 2017.

TSAO, R.; YANG, Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1018, p. 29 – 40, 2003.

TSENG, R.; WU, C.F.; JUANG, S.R. Liquid-phase adsorption of dyes and phenols using pinewood-based activated carbons. **Carbon**, v.41, n.3, p.487-495, 2003.

URREA-VICTORIA, V., PIRES, J., TORRES, P. B., SANTOS, D. Y. A. C., CHOW, F. **Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas**. Instituto de Biociências. USP. 2016

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, Amsterdam. v. 44. p. 301 – 316. 1997.

VENTURINI, W. G. F. **Tecnologia de bebidas: matéria prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2005.

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

VINHO, M. **Quem é quem na produção mundial de vinho**. Disponível em: <http://mondovinho.blogspot.com.br/2015/10/quem-e-quem-no-ranking-mundial-de.html>. 2015 Acesso em 30 de julho de 2017.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**. Amsterdam. v. 59. p. 203 – 216. 2001.

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

WATERS, D. M., FRITZ, J., TITZE, J., ARENDT, E. K., ZANNINI, E. Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. **European Food Research and Technology**, v.235, p.767–778, 2012.

WENNING M, SCHERER S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. **Applied Microbiology and Biotechnology**. P. 7111-7120. 2013.

WITEK-KROWIAK, A.; SZAFRAN, R. G.; MODELSKI, S. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions onto peanut shell as a low-cost biosorbent, **Desalination**, v. 265, n. 1- 3, p.126-134. 2011.

XIA, E.-Q. DENG, G.-F. GUO, Y.-J.LI, H.-B. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, n.2, p.622-646. 2010

YI, C. SHI, J. KRAMER, J. XUE, S. JIANG, Y. ZHANG, M. MA, Y. POHORLY, J. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. **Food Chemistry**, v.114, n.2, 5/15/, p.570-576. 2009

YANG, X.; AL-DURI, B. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes on activated carbon. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.287, n.1, p.25-34, 2005.

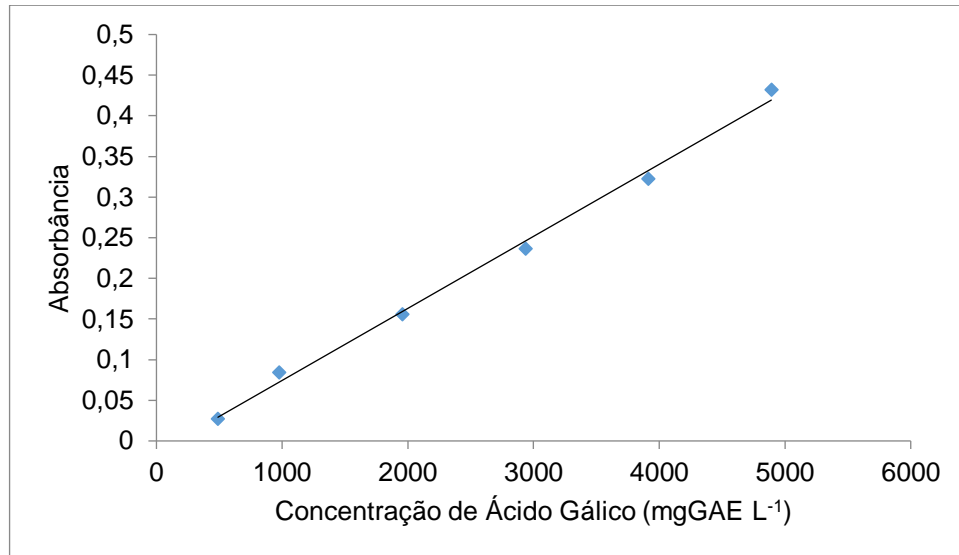
YANG, J., MARTINSON, T. E., LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 332-339, 2009.

ZHANG, Y.; LIU, W.; XU, M.; ZHENG, F.; ZHAO, M. Study of the mechanisms of Cu<sup>2+</sup> biosorption by ethanol/caustic-pretreated baker's yeast biomass. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, p. 1085–1093, 2010.

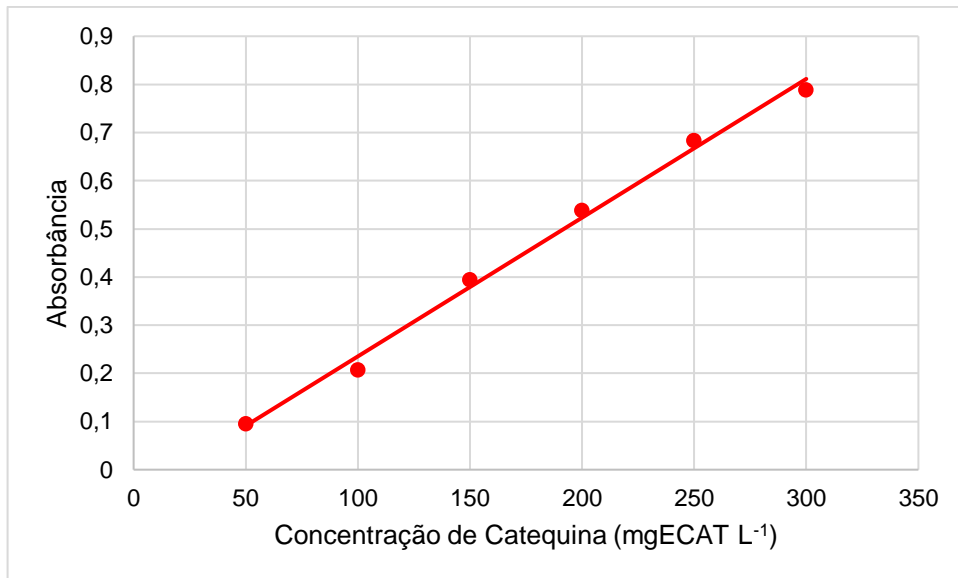
ZELENTSOV, Veacheslav; DATSKO, Tatiana; DVORNIKOVA, Elena. Adsorption Models For Treatment Of Experimental Data On Removal Fluorine From Water By Oxihydroxides of Aluminum. **Roma Journal**, v. 8, p. 209-215, 2012.



**APÊNDICE A - Gráfico da curva de calibração para o cálculo da quantificação dos CFT, em (mgGAE L<sup>-1</sup>)**



**APÊNDICE B - Gráfico da curva de calibração para o cálculo da quantificação de flavonoides totais, em (ECAT L<sup>-1</sup>)**



### APÊNDICE C – Dados da validação do método

Concentração teórica (ppm)	Ácido Gálico			Catequina			Miricitina			Quercitina			Rutina		
	Concentração experimental (ppm)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração experimental (ppm)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração experimental (ppm)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração experimental (ppm)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração experimental (ppm)	Precisão (%)	Exatidão (%)
0,1	<LQ	<LQ	<LQ	0,10	3,82	103,90	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD
0,25	0,24	4,14	95,47	0,22	4,56	90,04	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD
0,5	0,25	89,04	50,08	0,40	4,87	80,08	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,54	24,41	108,36
1,0	1,11	0,80	110,87	1,20	3,13	119,70	<LQ	<LQ	<LQ	1,00	0,15	100,00	0,88	21,71	88,31
2,0	2,10	1,27	105,22	2,58	47,30	129,00	2,00	6,87	100,10	2,07	5,69	103,62	2,06	7,33	102,93
4,0	4,00	0,08	100,00	3,57	11,91	89,23	4,45	16,67	111,26	4,09	5,90	102,25	4,04	0,73	101,13
6,0	6,04	0,46	100,67	6,01	0,92	100,25	5,50	8,94	91,76	5,69	5,65	94,85	5,75	2,65	95,93
8,0	7,55	1,28	94,40	-	-	-	8,13	5,20	101,70	7,98	0,82	99,79	7,65	1,81	95,62