

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
BACHARELADO EM QUÍMICA**

**GIACOMO ALBERTI  
JANAINA MAGATÃO  
RAFAELA PRISCILA COSTA DELMASSA**

**BIOSSORÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE EXTRATOS  
VEGETAIS POR *Saccharomyces cerevisiae*: ISOTERMAS E  
DIGESTÃO *IN VITRO***

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CURITIBA  
2019**

**GIACOMO ALBERTI  
JANAINA MAGATÃO  
RAFAELA PRISCILA COSTA DELMASSA**

**BIOSSORÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE EXTRATOS  
VEGETAIS POR *Saccharomyces cerevisiae*: ISOTERMAS E  
DIGESTÃO *IN VITRO***

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Bacharelado em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBi - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

CURITIBA  
2019

GIACOMO ALBERTI  
JANAINA MAGATÃO  
RAFAELA PRISCILA COSTA DELMASSA

**BIOSSORÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE EXTRATOS  
VEGETAIS POR *Saccharomyces cerevisiae*: ISOTERMAS E  
DIGESTÃO *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

**Membro 1** – Profa. Dra. Giselle Maria Maciel

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**Membro 2** – Ms. Débora Gonçalves Bortolini

Universidade Federal do Paraná

**Orientador** – Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**Coordenador de Curso** – Prof. Dr. Luiz Marcos de Lira Faria

Curitiba, 24 de junho de 2019.

## RESUMO

ALBERTI, Giacomo; MAGATÃO, Janaina; DELMASSA, Rafaela Priscila Costa. **Biossorção de compostos bioativos de extratos vegetais por *Saccharomyces cerevisiae*: isotermas e digestão *in vitro***. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Os chás são a segunda bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para a água. Além de conter compostos tais como os flavonoides, lignanas, ácido gálico e outros ácidos fenólicos de interesse industrial, são considerados uma importante fonte de antioxidantes, sendo seus compostos bioativos associados com a redução da incidência de câncer, doenças cardiovasculares e coronárias. A biossorção de compostos fenólicos e antioxidantes dos extratos de chás em *Saccharomyces cerevisiae* representa uma alternativa viável para o reaproveitamento do maior subproduto da indústria cervejeira e para a valorização por meio da transformação em itens com valor agregado, além do potencial da *S. cerevisiae* atuar como “*delivery system*” no sistema digestivo humano, possibilitando maior bioacessibilidade dos compostos bioativos dos extratos vegetais. O presente trabalho teve por objetivo investigar tal potencial do uso de *Saccharomyces cerevisiae* como biossorvente para os compostos fenólicos e antioxidantes de amostras de chá preto, de hibisco e camomila. A avaliação da biossorção por biomassas de leveduras *S. cerevisiae* modificadas por tratamentos químicos, foi realizada com base no estudo de isotermas, análise da interação e caracterização dos CFT e antioxidantes com o material biossorvente e os extratos e suspensões de levedura foram submetidos à simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, para cálculo da bioacessibilidade dos compostos. Para o chá preto, o melhor ajuste de dados foi descrito pelo modelo de Temkin, considerando uma diminuição no calor de adsorção com a cobertura do soluto dos sítios de ligação do adsorvente. Para o chá de hibisco, o mecanismo foi melhor descrito por Freundlich, caracterizando um processo favorável e heterogêneo. Já para o chá de camomila, a isoterma que apresentou o melhor mecanismo foi a de Dubinin-Radushkevich que indica que a biossorção é um processo de natureza física. O estudo de digestão *in vitro* demonstrou que a biossorção é capaz de aumentar a bioacessibilidade de compostos bioativos presentes nos extratos dos chás após biossorção, comprovando a eficiência da *S. cerevisiae* como “*delivery system*” dos compostos analisados.

**Palavras-chave:** Bioacessibilidade, compostos fenólicos, antioxidantes, *delivery system*, *Saccharomyces cerevisiae*, digestão *in vitro*.

## ABSTRACT

ALBERTI, Giacomo; MAGATÃO, Janaina; DELMASSA, Rafaela Priscila Costa. **Biosorption of bioactive compounds from plant extracts by *Saccharomyces cerevisiae*: isotherms and *in vitro* digestion.** Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Teas are the second most consumed beverage in the world, losing only to water. Besides containing compounds such as flavonoids, lignans, gallic acid and other phenolic acids of industrial interest, they are considered an important source of antioxidants, and their bioactive compounds are associated with the reduction of the incidence of cancer, cardiovascular and coronary diseases. The biosorption of phenolic and antioxidant compounds of tea extracts in *Saccharomyces cerevisiae* represents a viable alternative for the reuse of the largest by-product of the brewing industry and for the valorization through the transformation into items with added value, besides the potential of *S. cerevisiae* to act as a "delivery system" in the human digestive system, enabling greater bioaccessibility of bioactive compounds of plant extracts. The present work aimed to investigate such potential of the use of *Saccharomyces cerevisiae* as a biosorbent for the phenolic and antioxidant compounds of black tea, hibiscus and chamomile samples. The evaluation of biomass biosorption of *S. cerevisiae* yeasts modified by chemical treatments was performed based on the study of isotherms, analysis of the interaction and characterization of CFT and antioxidants with the biosorbent material and yeast extracts and suspensions were submitted to simulation of gastrointestinal digestion *in vitro*, to calculate the bioaccessibility of the compounds. For black tea, the best data adjustment was described by Temkin's model, considering a decrease in the adsorption heat with the coverage of the solute at the adsorbent binding sites. For hibiscus tea, the mechanism was best described by Freundlich, characterizing a favorable and heterogeneous process. For chamomile tea, the isotherm that presented the best mechanism was Dubinin-Radushkevich's, which indicates that biosorption is a physical process. The *in vitro* digestion study demonstrated that biosorption is capable of increasing the bioaccessibility of bioactive compounds present in tea extracts after biosorption, proving the efficiency of *S. cerevisiae* as a "delivery system" of the analyzed compounds.

**Palavras-chave:** Bioaccessibility, phenolic compounds, antioxidants, delivery system, *Saccharomyces cerevisiae*, *in vitro* digestion.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Camellia sinensis</i> .....	13
<b>Figura 2.</b> <i>Hibiscus sabdariffa</i> .....	15
<b>Figura 3.</b> Planta popularmente conhecida como Camomila.....	16
<b>Figura 4.</b> Estruturas de catequinas presentes em chás.....	19
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de adsorção.....	20
<b>Figura 6.</b> Gráfico do modelo da isoterma de Temkin.....	44
<b>Figura 7.</b> Gráfico do modelo da Isoterma de Dubinin-Radushkevich.....	45
<b>Figura 8.</b> Gráfico do Modelo da Isoterma de Freundlich.....	46
<b>Figura 9.</b> Gráfico do Modelo da Isoterma de Langmuir.....	47
<b>Figura 10.</b> Gráfico do modelo da isoterma de Freundlich.....	50
<b>Figura 11.</b> Gráfico do modelo da isoterma de Temkin.....	51
<b>Figura 12.</b> Gráfico do modelo da Isoterma de Dubinin-Radushkevich.....	52
<b>Figura 13.</b> Gráfico do modelo da Isoterma de Dubinin-Radushkevich.....	55
<b>Figura 14.</b> Gráfico do modelo da isoterma de Temkin.....	56
<b>Figura 15:</b> Eletromicrografia de varredura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após modificação ácida, com aumento de 1000x.....	65
<b>Figura 16:</b> Eletromicrografia de varredura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após modificação ácida, com aumento de 3000x.....	66
<b>Figura 17:</b> Eletromicrografia de varredura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com modificação ácida, após bioadsorção com chá de Camomila, aumento de 1000x.....	66
<b>Figura 18:</b> Eletromicrografia de varredura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com modificação ácida, após bioadsorção com chá de Camomila, aumento de 3000x.....	67
<b>Figura 19:</b> Eletromicrografia de varredura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com modificação básica com aumento de 1000x.....	67
<b>Figura 20:</b> Eletromicrografia de varredura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com modificação básica com aumento de 1000x.....	68
<b>Figura 21:</b> Eletromicrografia de varredura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com modificação básica, após bioadsorção com chá preto, aumento de 1000x.....	68
<b>Figura 22:</b> Eletromicrografia de varredura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com modificação básica, após bioadsorção com chá de hibisco, aumento de 3000x.....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Concentração de Compostos Fenólicos Totais e Flavonoides expressos em equivalente de ácido gálico e catequina, respectivamente, nos chás preto, hibisco e camomila.....	18
<b>Tabela 2.</b> Modelos de isotermas de adsorção e seus parâmetros.....	41
<b>Tabela 3.</b> Concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de chá preto antes, C, e após a adsorção, $C_e$ , e a quantidade adsorvida no equilíbrio, $q_e$ .....	42
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros das isotermas de Langmuir, Freundlich e Temkin para bioadsorção de compostos fenólicos de chá preto em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> modificada ou não.....	42
<b>Tabela 5.</b> Concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de chá de hibisco antes, C, e após a adsorção, $C_e$ , e a quantidade adsorvida no equilíbrio, $q_e$ .....	48
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros das isotermas de Langmuir, Freundlich e Temkin para bioadsorção de compostos fenólicos de chá de hibisco em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> modificada ou não.....	48
<b>Tabela 7.</b> Concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de chá de camomila antes, C, e após a adsorção, $C_e$ , e a quantidade adsorvida no equilíbrio, $q_e$ .....	53
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros das isotermas de Langmuir, Freundlich e Temkin para bioadsorção de compostos fenólicos de chá de camomila em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> modificada ou não.....	54
<b>Tabela 9.</b> Valores de $q_e$ para a bioadsorção do chá preto em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> natural e modificada.....	58
<b>Tabela 10.</b> Remoção de compostos fenólicos do extrato de chá preto de acordo com as 3 amostras de levedura.....	59
<b>Tabela 11.</b> Bioacessibilidade dos compostos bioativos do chá preto após processo de digestão <i>in vitro</i> .....	59
<b>Tabela 12.</b> Valores de $q_e$ para a bioadsorção do chá de hibisco em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> natural e modificada.....	60

<b>Tabela 13.</b> Remoção de compostos fenólicos do extrato de hibisco de acordo com as 3 amostras de levedura.....	61
<b>Tabela 14.</b> Quadro comparativo de valores de bioacessibilidade calculados para o hibisco.....	61
<b>Tabela 15.</b> Valores de $q_e$ para a biossorção do chá de camomila em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> natural e modificada.....	63
<b>Tabela 16.</b> Remoção de compostos fenólicos do extrato de Camomila de acordo com as 3 amostras de levedura.....	63
<b>Tabela 17.</b> Bioacessibilidade dos compostos bioativos do chá de camomila, após processo de digestão <i>in vitro</i> .....	63



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	8
2	JUSTIFICATIVA .....	10
3	OBJETIVOS .....	11
3.1	Objetivo Geral .....	11
3.2	Objetivos específicos .....	11
4	REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
4.1	Aspectos proeminentes do Chá .....	12
4.1.1	Chá Preto.....	13
4.1.2	Chá de Hibisco.....	14
4.1.3	Chá de Camomila .....	16
4.2	Compostos fenólicos.....	17
4.2.1	Catequinas.....	18
4.2.2	Antioxidantes .....	19
4.3	Adsorção e biossorção.....	20
4.4	Materiais biossorventes .....	22
4.4.1	Utilização da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como biossorvente.....	23
4.4.2	Técnicas de Caracterização do Material Biossorvente .....	24
4.5	Cinética de biossorção.....	25
4.6	Isotermas de biossorção .....	26
4.7	Digestão <i>in vitro</i> .....	31
5	METODOLOGIA.....	32
5.1	Reagentes.....	32
5.2	Matéria-prima .....	32
5.3	Preparo das amostras de chá e levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
5.3.1	Obtenção dos extratos.....	33
5.3.2	Preparo das amostras de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
5.3.2.1	Modificações do material biossorvente .....	33
5.3.2.2	Modificação Ácida e Modificação Básica .....	34
5.4	Isotermas de biossorção .....	34
5.5	Bioacessibilidade e digestão <i>in vitro</i> .....	35
5.6	Quantificação e identificação dos compostos bioativos das matrizes vegetais por diferentes técnicas analíticas.....	36

5.6.1	Determinação dos compostos fenólicos totais.....	36
5.6.2	Determinação dos flavonoides totais .....	37
5.6.3	Atividade Antioxidante .....	37
5.6.3.1	Atividade sequestrante do radical livre DPPH• .....	37
5.6.3.2	Atividade sequestrante de radical ABTS•+ .....	38
5.7	Caracterização das leveduras antes e após bioissorção .....	39
5.7.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-EDS) .....	39
5.8	Análises estatísticas.....	39
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1	<b>Cinética e isotermas de adsorção</b> .....	40
6.1.1	Chá Preto.....	41
6.1.2	Chá de Hibisco.....	47
6.1.3	Chá de Camomila .....	52
6.2	Digestão <i>in vitro</i> e bioacessibilidade .....	56
6.2.1	Chá Preto.....	58
6.2.2	Chá de Hibisco.....	60
6.2.3	Chá de Camomila .....	62
6.4	Caracterização por MEV-EDS.....	64
7	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73

## 1 INTRODUÇÃO

O chá é a bebida mais popular consumida no mundo perdendo apenas para a água (COYLE et al, 2008). O chá propriamente dito é o nome dado à bebida preparada pela fermentação de folhas da planta *Camellia sinensis*, originária da Ásia. Desse modo, todo chá é uma infusão, mas nem toda infusão é considerada um chá, e, portanto, as únicas bebidas que se enquadram como chás são: o chá verde, o chá preto, o chá amarelo, o chá azul (Oolong) e o darktea. Porém, o nome “chá” popularmente está associado a qualquer bebida feita com água fervente e vegetal. No Brasil, a legislação vigente não especifica uma, mas cita várias espécies comumente utilizadas, e qual parte da planta deve ser utilizada para a produção. A RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005 não contempla em sua lista, plantas tidas como fitoterápicas, mas fixa uma qualidade mínima para o comércio destas bebidas (ANVISA, 2005).

O chá é considerado uma importante fonte alimentar de antioxidantes, incluindo vários compostos fenólicos. Contém flavonoides, lignanas, ácido gálico e outros ácidos fenólicos (CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006). Os compostos bioativos do chá têm atraído muita atenção como potenciais agentes benéficos, pois seu consumo tem sido associado à redução da incidência de câncer, doenças cardiovasculares e coronárias (CHEN; LIN, 2015; DA SILVA PINTO, 2013; VERTOLI et al, 2013).

Sabe-se que durante o processo de digestão, os componentes funcionais podem ser degradados, ou transformados em compostos que apresentam diferentes atividades biológicas, e somente os não degradados estarão biodisponíveis para absorção no organismo, ou seja, a quantidade destes compostos presentes em uma matriz não reflete o conteúdo total disponível para metabolização pelo corpo humano. Por isso, a importância de se realizar estudos como a digestão *in vitro*, que simula as condições fisiológicas do processo digestivo humano. Para realização destes testes, é necessária uma tecnologia eficaz que proteja os componentes do chá durante a digestão, e também, melhore e preserve suas propriedades antioxidantes.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* representam o segundo maior subproduto da produção cervejeira e ganham atenção na indústria de alimentos principalmente por conter um alto valor nutritivo: a biomassa é composta predominantemente por proteínas (35 a 60% em massa seca) e pode ser reutilizada para produzir concentrados e isolados proteicos sem perder suas propriedades funcionais e nutricionais (RUBIO et al, 2017), além de serem facilmente aceitas pelo público quando aplicadas em alimentos. Concentrados proteicos de levedura, por exemplo, são encontrados na forma de pós, flocos ou comprimidos, que podem ser misturados com alimentos sólidos ou líquidos (FERREIRA et al, 2010).

A biossorção usando *Saccharomyces cerevisiae* possibilita, portanto, o reaproveitamento da biomassa que possui um grande potencial nutricional, mesmo após sua inviabilização no processo fermentativo na produção de cerveja. Sendo assim, os subprodutos gerados podem ser transformados em novos itens com alto valor. Portanto, esse trabalho objetiva: (i) investigar o potencial uso de *Saccharomyces cerevisiae* como biossorvente para carrear até o intestino compostos fenólicos de extratos de chá de camomila, hibisco e chá preto; (ii) enriquecer a biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* com compostos bioativos dos chás, por meio da biossorção; (iii) realizar o estudo de digestão simulada *in vitro* e verificar a influência das condições gastrointestinais na bioacessibilidade dos compostos fenólicos. Para tal, os compostos fenólicos totais (CFT) dos chás serão biossorvidos por *Saccharomyces cerevisiae* modificadas por tratamentos químicos. A avaliação da biossorção foi feita com base no estudo de isotermas e análise da interação com o material biossorvente. O material biossorvente foi caracterizado utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os extratos e suspensões de levedura foram submetidos à simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*.

## 2 JUSTIFICATIVA

A biossorção é uma técnica seletiva, efetiva, ecologicamente correta e de baixo custo (ARIEF et al, 2008) que possibilita a remoção, a recuperação de materiais em solução aquosa e o reaproveitamento dos materiais biológicos e subprodutos. Tais vantagens tornam válida a investigação da biossorção utilizando diferentes matérias biossorventes, que possam atuar benéficamente em relação à saúde e nutrição humana.

Neste contexto, foi estudada a biossorção de compostos fenólicos do chá preto, chá de hibisco e chá de camomila em *Saccharomyces cerevisiae*, levedura que representa o segundo maior subproduto da produção cervejeira.

Estudos de compostos fenólicos ou biocompostos tem aumentado de forma significativa já que seu papel relacionado a questões de saúde humana tem sido reconhecido, possibilitando um aumento da procura para produzir alimentos "funcionais" ou "nutracêuticos". Muitos compostos fenólicos possuem capacidade antioxidante (KHAN; MUKHTAR, 2007; LIU; HUANG, 2014) e seus efeitos estão relacionados na atuação contra espécies reativas envolvidas no envelhecimento e de doenças crônicas, autoimunes, inflamatórias, coronárias e degenerativas (ERLUND, 2004; GERMAN; WALZEM, 2000; SEIFRIED et al, 2007).

Apesar do conhecimento que essas biomoléculas possuam atividade antioxidante e que desempenham um importante papel da homeostase humana, ainda é incerto o quanto desta atividade antioxidante mantêm-se após a digestão.

Desse modo, a biossorção possibilita o reaproveitamento de biomassa com grandes potenciais nutricionais além de incorporar compostos bioativos de fonte barata e sustentável em alimentos e reutilizados como aditivos em substitutos ou novos ingredientes de grande interesse industrial, podendo atuar como "delivery system" no processo digestivo. A simplicidade, a vantagem econômica e o potencial na elaboração de novos produtos fazem do processo biossortivo uma técnica promissora para a indústria e com muitos potenciais a serem explorados, incentivando o estudo desse trabalho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho fundamenta-se no estudo da bioadsorção de compostos bioativos de extratos vegetais dos chás preto, hibisco e camomila em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* descartadas do processo cervejeiro, como uma estratégia para proteger a capacidade antioxidante e aumentar a bioacessibilidade dos compostos bioativos durante uma digestão gastrointestinal *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Extrair e quantificar os compostos fenólicos e antioxidantes dos chás preto, hibisco e camomila;
- Modificar a levedura por meio de dois tratamentos diferentes: ácido e básico, e verificar a influência de cada tratamento sobre as propriedades da *Saccharomyces cerevisiae* como bioadsorvente;
  - Realizar o estudo de isotermas a partir de modelos de adsorção;
  - Quantificar os extratos (puros e bioadsorvidos) por meio de métodos colorimétricos;
- Caracterizar o material bioadsorvente (com e sem tratamento, antes e depois da bioadsorção) por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Simular uma digestão gastrointestinal *in vitro*;

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 Aspectos proeminentes do Chá

A segunda bebida mais consumida no mundo depois da água, o chá tem sua história iniciada na China há mais de cinco mil anos e proliferou por todo o mundo, onde continua a ser, ainda hoje, muito apreciado.

O chá propriamente dito é o nome dado à bebida preparada pela fermentação de folhas da planta *Camellia sinensis*, originária da Ásia. Dessa forma, todo chá é uma infusão, mas nem toda infusão é considerada um chá, e, portanto, as únicas bebidas que se enquadram como chás são: o chá verde, o chá preto, o chá branco, o chá amarelo, o chá azul (Oolong) e o darktea. Porém, o nome “chá” popularmente está associado a qualquer bebida feita com água fervente e vegetal. Os demais termos que podem se confundir com os chás, são as infusões e blends. Infusões são todas as outras bebidas que não são preparadas a partir da *Camellia sinensis*, como por exemplo, cidreira, (*Melissa officinalis*), camomila (*Matricaria chamomilla*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), maçã (*Malus domestica*) e gengibre (*Zingiber officinale*). Blends são todos os que não forem considerados um chá de origem/puro.

Os chás podem ser classificados de acordo com a forma de colheita e como a planta foi processada, tratada e oxidada. Sua composição química pode variar quanto à espécie, idade das folhas, estação, clima (umidade, temperatura, latitude) e condições de cultivo (solo, água, minerais, fertilizantes, entre outros) (JAYASEKERA et al, 2011; SCOTTI et al, 2007). Essas diferenças na matéria-prima refletem no sabor, cor e, possivelmente, nos teores de flavonoides (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

O chá é considerado uma importante fonte alimentar de antioxidantes, incluindo polifenóis. Contém flavonoides, lignanas, ácido gálico e outros ácidos fenólicos (CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006). Os compostos fenólicos da classe dos flavan-3-óis, (catequinas, em especial, epigallocatequina e epicatequina) são os principais componentes químicos terapêuticos da planta *C. sinensis*.

Os compostos bioativos do chá têm atraído muita atenção como potenciais agentes benéficos, pois seu consumo tem sido associado à redução da incidência de câncer, doenças cardiovasculares e coronárias (CHEN; LIN, 2015; DA SILVA PINTO, 2013; VERTOLI et al, 2013).

#### 4.1.1 Chá Preto

Os chás produzidos a partir de folhas de *Camellia sinensis* (Figura 1) são classificados em três categorias conforme o processo de fabricação: fermentado (preto), não fermentado (verde) e o semifermentado (oolong) (TANAKA; KOUNO, 2003). No mundo, são produzidas anualmente cerca de três bilhões de toneladas de chá, sendo 78% preto, 20% verde e 2% semifermentado (KHAN; MUKHTAR, 2007).



**Figura 1.** *Camellia sinensis*

**Fonte:** Google Imagens

O Chá preto é feito com as folhas mais velhas e passa por um processo de fermentação maior. Por isso, ele possui ação antioxidante bem menor do que os outros dois chás e muita cafeína, que irá contribuir para a perda de peso. Os processos para a sua produção são: drenagem interna sem rotação, rotação, fermentação, secagem fina.

Há quatro etapas principais para a preparação do chá preto: (I) Desidratação das folhas e caules frescos, as folhas são secas reduzindo-se o seu conteúdo de umidade, até que o seu peso seja 55% do peso da folha original. (II) Mistura das folhas e caules já secos (durante a mistura ocorre o aumento do aroma



característico), (III) fermentação (o sabor e a coloração específicos do chá preto são acentuados nessa etapa) e (IV) secagem através de evaporação de toda a água presente nas folhas e caules utilizados para a preparação do mesmo.

Esta bebida se destaca por conter grandes quantidades de cafeína, substância que ajuda no emagrecimento, aumentando a queima de gorduras. Ele também possui ação antioxidante, melhora o humor, protege o coração e reduz os riscos de desenvolvimento de doenças cerebrais degenerativas.

Possui em sua composição polifenóis, um nome coletivo para compostos derivados do ácido cinâmico, dentre os quais, um dos grupos é denominado de flavonoides. Em *C. sinensis*, esses flavonoides constituem cerca de 10-25% da massa seca (MS) de folhas jovens e brotos, sendo denominados de catequinas (flavan-3-ols) (HAMPTON, 1992), classificadas em subgrupos. As catequinas são oxidadas enzimaticamente, gerando uma mistura complexa de polifenóis, constituída de teaflavinas, teasinensinas e tearubiginas (TANAKA; KOUNO, 2003). Além dos polifenóis, apresentam em sua composição outros compostos orgânicos como aminoácidos (13- 15% da MS), metilxantinas (8-11% da MS), carboidratos (15% da MS), proteínas (1% da MS), compostos voláteis (<0,1% da MS) e elementos minerais (10% da MS) (GRAHAM, 1992).

#### **4.1.2 Chá de Hibisco**

O *Hibiscus sabdariffa*, Figura 2, está presente em várias regiões da América apesar de ser nativo dos continentes africano e asiático (VIZZOTTO, PEREIRA, 2008). Muito se tem estudado a respeito de propriedades desta planta, como diurético, antimicrobiano, anti-hipertensor, antitumoral, e antioxidante, pois foram encontradas substâncias como antocianinas e ácido ascórbico conferindo essa propriedade, que é do interesse deste trabalho. A infusão feita com a parte do cálice da planta também possui elevados níveis de flavonoides, que como as antocianinas combatem radicais livres, que são grandes causadores de danos nas células (VIZZOTTO, PEREIRA, 2008).



**Figura 2.** *Hibiscus sabdariffa*

**Fonte:** Google Imagens

Dentre outras propriedades, o *H. sabdariffa* também possui a capacidade de ajudar no emagrecimento, e num cenário onde a grande parcela da população brasileira é considerada acima do peso, existe um fator de impacto considerável nos estudos que dizem respeito a isso. O hibisco também ocupa a terceira posição no ranking das formas de emagrecimento mais utilizadas, quando se procura métodos rápidos, sem nenhum ou com pouco esforço, e sem buscar ajuda de profissionais especializados. Constatou-se que 12% das mulheres acima dos 30 anos utilizam o hibisco como forma de combate a obesidade (DA CUNHA, 2018).

Existem estudos sobre propriedades de plantas, e o hibisco já é consagrado por suas propriedades. Também há estudos sobre atividade direta do hibisco como antioxidante, utilizando a folha liofilizada, diluída em água (CURI, 2014) no combate de radicais de oxigênio, que são extremamente reativos e danosos ao organismo humano. Essa atividade se deve a diversos tipos de compostos presentes na planta, alguns dos quais, são do interesse deste trabalho, sendo que quantidades maiores são encontradas na flor, quando liofilizada, em comparação com outras partes da planta (NEHRING, 2015).

Desta forma, o hibisco se mostra uma excelente opção como fonte de compostos de interesse para a saúde, e para estudos, agregando valor a um subproduto cervejeiro gerando um novo produto que pode ser comercializado, e, sobretudo, saudável.

### 4.1.3 Chá de Camomila

Diferentes nomes científicos são encontrados para a camomila, sendo o mais usual *Matricaria chamomilla* L. (MCKAY, BLUMBERG, 2006; HARBOURNE et al, 2009; SINGH et al, 2011), podendo ser encontrado também como *Chamomilla recutita* L. ou *Matricaria recutita* L. *Rauschert* (MCKAY, BLUMBERG, 2006; NOVÁKOVÁ et al, 2010; SINGH et al, 2011; RAAL et al, 2012).

É uma planta herbácea, anual, aromática e medicinal, muito ramificada, cuja altura varia de 30 a 60 cm (DALLA COSTA, 2001) (Figura 3). Nativa da Europa e Ásia Ocidental (MCKAY, BLUMBERG, 2006; HARBOURNE et al, 2009), no Brasil foi introduzida no sul do país pelos imigrantes europeus há mais de 100 anos (DALLA COSTA, 2001).



**Figura 3.** Planta popularmente conhecida como Camomila

**Fonte:** Google Imagens

É utilizada em uma grande variedade de produtos. Sendo uma das plantas mais cultivadas no mundo com fins medicinais, sua produção anual correspondente a vários milhares de toneladas (SRIVASTAVA et al, 2010; RAAL et al, 2012). Como fitoterápico, a camomila tem suas principais aplicações como antiespasmódica, antiflogística, sedativa, antialérgica, vermífuga e emenagoga (BUSTAMANTE, 1987 por DALLA COSTA, 2001). Consumida durante a refeição, como chá, pode contribuir para a prevenção da progressão de hiperglicemia e complicações diabéticas (SRIVASTAVA et al, 2010; RAAL et al, 2012). E é

recomendada no alívio de diversos distúrbios gastrointestinais como flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, anorexia, náusea e vômitos (MORAIS et al, 2009; SRIVASTAVA, GUPTA, 2009; SRIVASTAVA et al, 2010; SINGH et al, 2011). O óleo essencial da camomila tem ação anti-inflamatória e calmante, é benéfico no tratamento de cólica gástrica, gastrites, gengivites, inflamações do trato respiratório, faringites e laringites. É usado em inflamações do útero, reto e hemorroidas (SALAMON, 1992b).

Cerca de 120 constituintes químicos foram identificados na camomila como metabólitos secundários, incluindo 28 terpenóides, 36 flavonoides e 52 compostos adicionais com potencial atividade farmacológica. O bisabolol e o camazuleno têm demonstrado possuírem as propriedades mais bioativas (SALAMON, 1992b).

## **4.2 Compostos fenólicos**

Os fenólicos constituem uma ampla classe de compostos na natureza, podendo ser encontrados em vegetais, frutas e também em produtos industrializados. Eles podem ser classificados em 3 grandes grupos: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza (ANGELO, JORGE, 2007). Nos poucos distribuídos na natureza encontram-se os fenóis simples, aldeídos derivados de ácidos benzóicos e óleos essenciais em geral. Os polímeros, em tecidos vegetais não se apresentam na forma livre, como taninos e ligninas. Nos largamente distribuídos na natureza encontram-se os fenólicos, de interesse do presente trabalho, como flavonóis e antocianinas, que possuem atividade antioxidante. Esses compostos agem como antioxidantes, pois são capazes de inibir ou retardar a oxidação de diversas moléculas dos alimentos, mantendo suas propriedades.

Nos chás, sua presença depende principalmente do nível de oxidação a que a folha foi submetida. A Tabela 1 apresenta os teores de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos chá preto, hibisco e camomila.

**Tabela 1:** Concentração de Compostos Fenólicos Totais e Flavonoides expressos em equivalente de ácido gálico e catequina, respectivamente, nos chás preto, hibisco e camomila.

<b>Chá</b>	<b>CFT/(mg GAE L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Flavonoides/(mg CAE L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Preto</b>	935 – 2500	530
<b>Hibisco</b>	670 – 676	177 – 210
<b>Camomila</b>	102 – 399	53 – 95

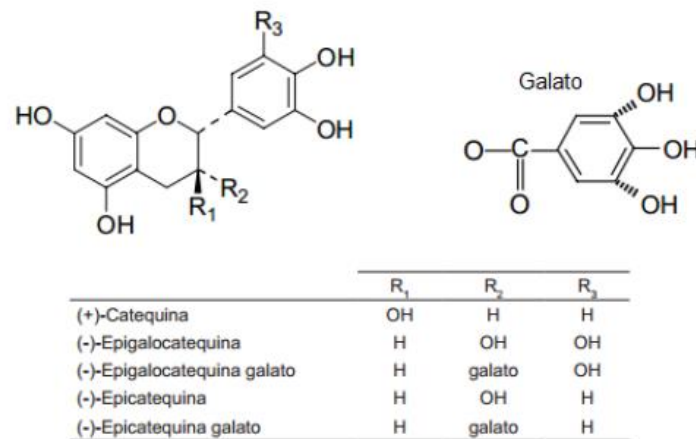
Essa classe de compostos é formada por diferentes grupos benzênicos, tendo por substituintes grupamentos hidroxilas, e pode ser classificada em flavonoides e não flavonoides.

A estrutura dos flavonoides é formada por 15 átomos de carbono dispostos em dois anéis benzênicos ligados por um grupo pirano e sua representação é C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub> (MAMEDE; PASTORE, 2004). São encontrados principalmente na forma de catequinas, flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianinas e isoflavonas tendo como principais fontes vinho, café, maçã e o chá. Sua ação antioxidante se deve aos hidrogênios dos grupos hidroxila adjacentes, as duplas ligações dos anéis e a dupla ligação das carbonilas (MAMEDE; PASTORE, 2004).

Destacam-se, dentre os não flavonoides, os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico (SILVA et al., 2010). A atividade antioxidante está relacionada com a presença de grupos –CO<sub>2</sub>H próximos ao grupo fenil, bem como a posição das hidroxilas.

#### **4.2.1 Catequinas**

As catequinas, incolores e hidrossolúveis, são um conjunto de compostos fenólicos presentes principalmente nas folhas de chá. Suas estruturas principais estão apresentadas na Figura 4 e suas propriedades antioxidantes podem ser descritas pela presença dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes, localizados em diferentes posições do anel, das duplas ligações do anel benzênico e da dupla ligação da função C=O (SILVA et al., 2010).



**Figura 4.** Estruturas de catequinas presentes em chás.

**Fonte:** adaptado de MATSUBARA, RODRIGUEZ-AMAYA (2006).

Através do processamento das folhas estas sofrem oxidação, o que contribui para o desenvolvimento da cor e sabor da bebida. Esse processo se dá pela ação das enzimas presentes nos vacúolos das células, que são liberadas após as folhas serem trituradas e deixadas expostas ao ar (MATSUBARA, RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). O conteúdo de catequinas pode variar de acordo com o clima, a safra, o modo de cultivo ou a idade da folha.

Estudos comprovam que a ingestão de altas doses de catequinas facilita a perda de gordura corporal e auxiliam no gasto energético quando associada à prática regular de exercícios físicos (LAMARÃO, FIALHO, 2009).

#### 4.2.2 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias capazes de impedir a formação de radicais livres ou impedir a sua propagação. Seu mecanismo constitui da doação de hidrogênio, tornando a molécula estável e impedindo ou retardando o efeito da oxidação (ACHKAR et al., 2013). Os antioxidantes podem ser classificados de duas formas, os primários, que interrompem a cadeia de reação por doação de elétrons ou hidrogênio para os radicais, e os secundários, que retardam a etapa de iniciação de autooxidação por mecanismos variados (ANGELO, JORGE, 2007).

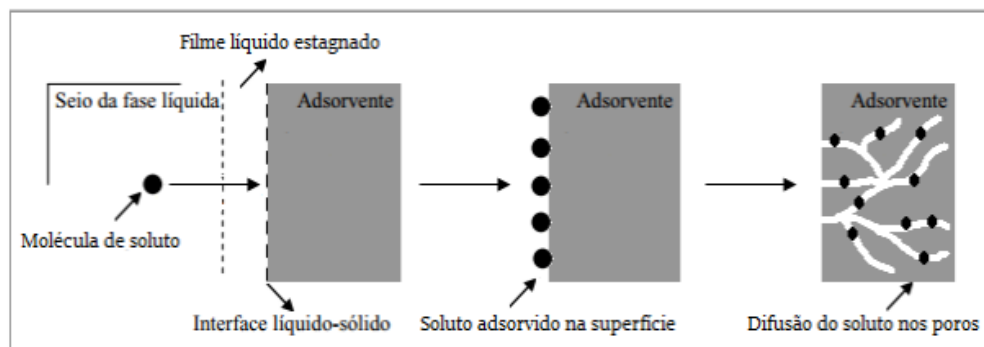
Antioxidantes fenólicos são capazes de inibir a formação de radicais livres através do sequestro de radicais e algumas vezes atuam como quelantes de metais, agindo tanto na iniciação quanto na propagação do processo oxidativo. Os compostos fenólicos são então eficazes na prevenção da oxidação lipídica. Mesmo assim, poucos são recomendados para uso alimentício, devido ao seu grau de toxicidade (SOARES, 2002).

O estresse oxidativo pode causar uma série de doenças degenerativas, como câncer, esclerose múltipla e mal de Parkinson. Estudos revelam que uma dieta rica em compostos fenólicos pode retardar esse processo, diminuindo os efeitos da idade e as doenças a ela ligadas (HAMINIUK et al., 2012).

### 4.3 Adsorção e biossorção

A adsorção é um processo físico-químico de transferência de massa, onde um ou mais constituintes de uma fase gasosa ou líquida (adsorbato) são transferidos para a superfície de uma fase sólida (adsorvente) (RUTHVEN, 1984).

Segundo Borba et al. (2012), o primeiro mecanismo de transferência de massa durante a adsorção é a difusão do soluto de uma fase fluida para a superfície do material adsorvente, ou seja, o transporte através do filme líquido estagnado entre a fase líquida e a interface líquido-sólido. Em sequência, ocorre a adsorção do soluto na superfície do adsorvente e, por último, a difusão do soluto nos poros do material utilizado para a adsorção (Figura 5).



**Figura 5.** Mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de adsorção.

**Fonte:** Adaptada de Borba et al. (2012)

Como os componentes adsorvidos se concentram sobre a superfície externa, quanto maior for esta superfície, mais favorável será a adsorção. Sendo assim, geralmente os materiais utilizados como adsorventes são compostos por partículas porosas (BORBA, 2006).

Dentre um dos aspectos básicos de classificação da adsorção estão as forças envolvidas no processo, que podem variar desde puramente física (adsorção física: fisiossorção) até as de natureza química (adsorção química: quimiossorção). Ligações fracas como de Van der Waals, são características de ligações físicas, onde a energia liberada é relativamente baixa e o equilíbrio é atingido rapidamente. Ligações mais fortes que envolvem troca ou partilha de elétrons entre as moléculas são características de ligações químicas, que liberam energia da mesma ordem de grandeza dos calores de reação, e geralmente são irreversíveis. Outro aspecto diferenciável é a especificidade, a adsorção química é altamente específica, ocorrendo apenas nas moléculas que são capazes de se ligar ao sítio ativo, já a adsorção física é inespecífica (RUTHVEN, 1984; NASCIMENTO et al., 2014).

São vários os fatores que influenciam o processo de adsorção, tais como: a área superficial, as propriedades do adsorvente e do adsorbato (tamanho do poro, densidade, hidrofobicidade...), a temperatura do sistema, natureza do solvente e o pH do meio (COONEY, 1999).

Quando um sorbato interage com uma superfície sólida de uma matriz biológica (biossorvente) tem-se um processo de biossorção. Entende-se por matriz biológica toda matéria orgânica de origem vegetal, animal ou microbiana, incluindo os materiais procedentes de suas transformações naturais ou artificiais, provenientes da natureza, cultivadas, matérias-primas para um produto comercializável ou até residual, gerada como subproduto de outros processos (GADD, 1999; SOUSA, et al, 2007).

Os biossorventes podem ser utilizados na sua forma natural ou podem passar por modificações químicas ou físicas. Tais modificações são realizadas para melhorar o potencial adsortivo do material e para obter melhor estabilidade da biomassa, precavendo problemas como a lixiviação dos compostos orgânicos da solução (MESEGUER et al, 2016). Os métodos físicos incluem tratamento a vácuo, liofilização, aquecimento, autoclavagem e rompimento mecânico. Os métodos químicos incluem tratamentos com reagentes orgânicos ou inorgânicos (WANG; CHEN, 2006; NGAH; HANAFIAH, 2008). Os tratamentos físicos geralmente são



mais simples e baratos, porém, se mostram menos eficazes do que as modificações químicas (PARK; YUN; PARK, 2010).

Além das características do material biológico, assim como na adsorção química e física, diversos fatores podem influenciar no processo de bioadsorção, como pH, temperatura, concentração, tempo de contato e dosagem de bioadsorvente.

A técnica de bioadsorção é seletiva, efetiva em baixas concentrações e uma grande variedade de bioadsorventes vêm sendo descoberta e estudada, com intuito de tornar o processo mais eficaz, de baixo custo e com reduzida geração de resíduos, economicamente e ecologicamente correto (ARIEF et al, 2008).

A adsorção de compostos bioativos de alimentos foi, inicialmente, realizada em resinas com o intuito de reaproveitar os antioxidantes eliminados durante a fabricação de bebidas, mas sem interesse alimentício no adsorvente. Stafussa et al. (2016) foram os pioneiros a elucidarem a bioadsorção de antocianinas extraídas de bagaços de diferentes tipos de uva (Tannat, Merlot, Cabernet Sauvignon e Bordeaux) em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com o propósito de enriquecer a biomassa. Além de apresentar uma alternativa promissora para a indústria farmacêutica e/ou alimentícia, o estudo evidenciou mais uma potencial aplicação para a bioadsorção.

#### **4.4 Materiais bioadsorventes**

São vários os materiais bioadsorventes disponíveis, e diferentes fatores devem ser levados em conta na hora da sua escolha. Em geral, um bioadsorvente ideal deve possuir certas características como: disponibilidade, alta capacidade de ligação de metal, não toxicidade, passível de regeneração/recuperação e capacidade de ser utilizado em grande escala (WANG; CHEN, 2009).

Materiais alternativos têm sido muito procurados pelas indústrias, a fim de proporcionarem eficiência necessária, com pouco processamento, baixo custo e que sejam facilmente encontrados na natureza (BAILEY et al, 1999).

Para fins de bioadsorção, diferentes biomassas vivas e não vivas foram relatadas, como biomassa de algas, fungos (até mesmo nas formas filamentosas,

como as leveduras unicelulares, líquens), bactérias, resíduos agrícolas, entre outros (GADD, 2009; MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

Estudos demonstram que o uso da biomassa morta é mais aplicável, pois reduz a complexidade em relação a armazenamento, não necessita de meios próprios de crescimento nem de nutrientes, descarta preocupação com toxicidade e tem fácil reutilização, já processos bioacumulativos utilizando biomassa viva apresentam processos metabólicos não apropriados para a bio sorção. (GADD, 2009; PARK; YUN; PARK, 2010).

#### **4.4.1 Utilização da *Saccharomyces cerevisiae* como bio sorvente**

Devido a várias vantagens a biomassa fúngica tem sido tópico para muitos estudos (AHMAD, et al. 2005). Entre os fungos, as leveduras são as mais exploradas cientificamente, devido ao fato de serem organismos eucarióticos de mais fácil manipulação (FERREIRA, et al. 2007).

Dentre as leveduras estão a *Saccharomyces cerevisiae*, fungos unicelulares eucarióticos, conhecidos por serem uma boa fonte de proteínas, como também de vitaminas do complexo B, ácidos nucléicos, vitaminas e minerais, incluindo uma forma biologicamente ativa de cromo, conhecido como fator de tolerância a glicose (FERREIRA, 2010). A *Saccharomyces cerevisiae* representa o segundo maior resíduo gerado nas indústrias cervejeiras, ficando atrás apenas dos resíduos sólidos gerados a partir do aproveitamento do conteúdo dos grãos de malte (SANTOS; RIBEIRO, 2005). Seu uso ainda é bastante limitado, tendo vista tamanho potencial, sendo utilizado principalmente para a fabricação de ração animal (FERREIRA, 2010).

O uso de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* como bio sorvente se torna atrativo devido sua disponibilidade, sem uso, em grandes quantidades nas indústrias e por ser considerado seguro e de fácil aceitação pelo público quando utilizada em aplicações nutricionais (JILANI et al., 2015).

Jilani et al. (2015) demonstraram que a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* bio sorvida oferece um aumento da bio acessibilidade de compostos fenólicos, aumentando suas atividades antioxidantes. Sendo assim, a

*Saccharomyces cerevisiae* pode atuar como “*delivery system*” de compostos bioativos no sistema gastrointestinal, como mostrado em estudos laboratoriais (STAFUSSA et al, 2016. RUBIO et al, 2017).

#### 4.4.2 Técnicas de Caracterização do Material Biossorvente

Para se obter informações sobre as ligações ocorridas, a eficiência e efeitos da biossorção são utilizadas várias ferramentas analíticas sofisticadas, tais como espectroscopia de absorção de infravermelho ou espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (IR ou FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de raios X dispersiva de energia (EDS), análise de difração de raios X (XRD), espectroscopia de ressonância magnética de elétrons (ESR), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS), espectroscopia de absorção de raios X (XAS), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) (PARK; YUN; PARK, 2010).

No quadro1 está apresentado um pequeno sumário das técnicas e seus empregos na análise da biossorção.

**Quadro 1.** Técnicas de análise utilizadas em pesquisas de biossorção.

<b>Técnicas de análise</b>	<b>Observações</b>
Espectroscopia de absorção atômica (AAS)	Determinar a concentração de metal na fase aquosa
Plasma Indutivamente acoplado (ICP)	Determinar a concentração de metal na fase aquosa
UV-Vis espectrofotômetro	Determinar a concentração de metal ou corante na fase aquosa, medindo a intensidade da cor
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Confirmação visual da morfologia da superfície do biossorvente
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	Confirmação visual da morfologia interna da biomassa, principalmente células
Sistema de energia de Raio X dispersiva (EDS)	Análise de elementos e caracterização química de metais ligados ao biossorvente
Difração de Raio X (DRX)	Estrutura cristalográfica e composição química do metal ligado ao biossorvente
Espectroscopia de ressonância de spin eletrônico (ESR)	Determinar os sítios ativos do biossorvente

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Determinar os sítios ativos do bioissorvente
Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	Determinar os sítios ativos do bioissorvente
Titulação potenciométrica	Determinar os sítios ativos do bioissorvente e suas quantidades
Espectroscopia eletrônica de raio X (EEX)	Determinar o estado de oxidação do metal ligado ao bioissorvente e seus efeitos sobre o ligante
Espectroscopia de absorção de raio X (EAX)	Determinar a oxidação do metal ligado ao bioissorvente e seu ambiente de coordenação
Análise termogravimétrica (TGA)	Caracterizar a estabilidade térmica do bioissorvente
Colorimetria diferencial de varredura (CDV)	Caracterizar a estabilidade térmica do bioissorvente

Fonte: Adaptado de PARK, YUN, PARK, 2010

#### 4.5 Cinética de bioissorção

Os modelos cinéticos são essenciais para descobrir a eficácia e condição ótima da bioissorção, além de identificar e avaliar os mecanismos de bioissorção de diferentes compostos na etapa de controle de velocidade.

Os modelos cinéticos têm como finalidade relacionar a concentração do adsorvato com o tempo de agitação. A concentração do adsorvato em solução decresce com o tempo, até atingir um valor constante, ou seja, até que seja alcançado o equilíbrio dinâmico entre a quantidade do adsorvato com a quantidade que está sendo dessorvida. O tempo necessário para alcançar este estágio é chamado tempo de equilíbrio e a quantidade do material adsorvido retido neste tempo reflete a capacidade de adsorção no equilíbrio em condições estabelecidas. A massa de adsorvato retido por unidade de massa de matéria adsorvente ( $qt$ ) no tempo  $t$  ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), é calculada por meio de um balanço de massa de acordo com a Equação 1 (DABROWSKI, 2001).

$$qt = \frac{(C_0 - C_t)}{m} V \quad [\text{Eq. 1}]$$

Sendo,

$C_0$ : concentração inicial de adsorvato ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ );

$C_t$ : concentração de adsorvato no tempo  $t$  ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ );

$V$ : volume da batelada (L);

$m$ : massa do material adsorvente (g).

De acordo com a literatura, os modelos cinéticos mais utilizados são o de pseudo-primeira ordem, proposto por Lagergren (1898) e pseudo-segunda ordem, proposto por Ho e Mckay (1999). Esses modelos são baseados na ordem de reação química e assumem que a taxa de sorção é proporcional ao número de sítios livres de ligação na superfície do material bioissorvente. O modelo é, geralmente, escolhido com base no valor dos coeficientes de determinação, mas, em geral, a maioria dos processos é melhor ajustada pelo modelo de pseudo-segunda ordem (MICHALAK et al, 2013). Nos estudos de adsorção de compostos bioativos, os modelos cinéticos também são realizados anteriormente a aplicação das isothermas.

#### **4.6 Isothermas de bioissorção**

Modelos de adsorção são, geralmente, representados por funções a determinadas temperaturas: as isothermas. A isoterma de adsorção é a relação de equilíbrio entre a concentração na fase fluida e a concentração nas partículas adsorventes a uma dada temperatura (MCCABE et al, 1993). Elas indicam a capacidade de adsorção de um adsorvente, a relação entre a quantidade adsorvida por unidade de massa de bioissorvente e a concentração de equilíbrio do soluto na solução, a uma mesma temperatura e sob condição de equilíbrio. As isothermas fornecem a informação da distribuição do soluto entre as fases líquida e sólida em várias concentrações de equilíbrio (MICHALAK et al, 2013; RANGABHASHIYAM et al., 2014). Para gases, a concentração é dada em porcentagem molar (pressão parcial), para líquidos, a concentração é expressa, geralmente, em unidades de massa e a concentração do adsorvido nos sólidos é dada como massa adsorvida por unidade de massa do adsorvente.

Através dos testes de cinética são determinados o tempo ótimo de contato e os melhores parâmetros operacionais que são usados para o estudo das isothermas. Ao agitar uma massa de material bioissorvente com volumes de solução com concentrações crescentes de soluto, em uma determinada temperatura, as amostras terão o seu equilíbrio atingido após um período de tempo. Nesta situação,

o soluto terá uma distribuição definida entre as fases sólida e líquida. A partir desse procedimento, é possível construir isotermas de adsorção, relacionando a capacidade de sorção do sólido com a concentração residual do soluto a uma dada temperatura (MICHALAK et al, 2013).

Alguns dos modelos de isotermas de dois parâmetros mais utilizados para modelar o processo de adsorção, têm sido Langmuir, Freundlich, Temkin e Dubinin-Radushkevich (CHEN, 2015).

A isoterma de Langmuir, proposta em 1916, é um método com desenvolvimento puramente teórico para a descrição de uma adsorção, sendo o modelo mais simples e utilizado nas pesquisas. Sua teoria considera a formação de uma monocamada de adsorvato no exterior da superfície bioissorvente e representa a distribuição de equilíbrio do bioissorvato entre as fases sólida e líquida. Esse modelo se baseia nas seguintes hipóteses: o recobrimento de adsorvato não passa de uma monocamada; a energia de adsorção é constante e não depende do grau de ocupação dos sítios da superfície e nem da presença ou ausência de outras entidades adsorvidas nos sítios vizinhos; o bioissorvente é estruturalmente homogêneo; todos os sítios de ligação são idênticos e energeticamente equivalentes; e as forças de ligações intermoleculares diminuem rapidamente com o afastamento das moléculas (RANGABHASHIYAM et al, 2014). A Isoterma Langmuir é representada pela Equação 2:

$$q_{eq} = \frac{q_0 K_L C_{eq}}{1 + K_L C_{eq}} \quad [\text{Eq. 2}]$$

A isoterma de Langmuir pode ser linearizada, obtendo-se a Equação 3:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_0 K_L} + \frac{C_e}{q_0} \quad [\text{Eq. 3}]$$

Em que,  $C_{eq}$  ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) é a concentração de equilíbrio na fase fluida e  $q_{eq}$  ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a quantidade adsorvida no equilíbrio por unidade de massa de adsorvente. O parâmetro  $q_0$  (limite de saturação  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) está relacionado com a capacidade máxima de adsorção e  $K_L$  (constante de Langmuir) ( $\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) é a razão entre a constante cinética de adsorção e constante cinética de dessorção.

Outro parâmetro importante do modelo isotérmico de Langmuir é o termo " $R_L$ ", que é uma constante adimensional e chamado de fator de separação ou parâmetro de equilíbrio, e é representada pela Equação 4:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_o} \quad [\text{Eq. 4}]$$

Onde,  $C_o$  ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) expressa concentração inicial adsorvido em solução aquosa,  $K_L$  ( $\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) é a constante de Langmuir. O parâmetro  $R_L$  dá importantes sinais sobre a compatibilidade de adsorção para o par adsorvente-adsorvato selecionado (BERA et al, 2013). Há quatro possibilidades para o valor de  $R_L$  valor:

No caso de  $0 < R_L < 1$ , a adsorção é favorável.

No caso de  $R_L > 1$ , a adsorção é desfavorável.

$R_L = 1$  indica linearidade de adsorção.

No caso de  $R_L = 0$ , a adsorção é irreversível.

Freundlich propôs o modelo em 1906, sua equação é semi-empírica, baseada em dados experimentais e levando em consideração fatores determinados pela característica do adsorvato. Este modelo empírico pode ser aplicado a sistemas não ideais, em superfícies heterogêneas e adsorção em multicamada. O modelo considera que a superfície seja heterogênea, ao passo que aplica uma distribuição exponencial para caracterizar os vários tipos de sítios de adsorção, os quais possuem diferentes energias adsortivas. As constantes do modelo indicam o grau de linearidade e de não-linearidade do processo (FREUNDLICH, 1906). A Equação 5 descreve a isoterma de Freundlich:

$$q_{eq} = K_F C_{eq}^{1/n} \quad [\text{Eq. 5}]$$

Sendo que a forma linearizada da isoterma de Freundlich é expressa pela Equação 6:

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad [\text{Eq. 6}]$$

Onde  $K_F$  ( $L \cdot g^{-1}$ ) 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  $1 < n < 10$ .

As isotermas de Temkin, proposta em 1940, são caracterizadas por considerar os efeitos das interações indiretas entre as moléculas de adsorvato. Este modelo segue o princípio de que o processo de adsorção é caracterizado por uma distribuição uniforme da energia de ligação, até um máximo, e o calor de adsorção de todas as moléculas da camada diminui linearmente, não exponencialmente, com o grau de cobertura, devido às interações adsorvente-adsorvato (TEMKIN; PYZHEV, 1940). A isoterma de Temkin é dada pela Equação 7:

$$q_e = \frac{RT}{b} [\ln(A C_e)] \quad [\text{Eq. 7}]$$

A Equação 7 pode ser expressa na sua forma linear, obtendo-se a Equação 8:

$$q_e = B \ln A + B \ln C_e \quad [\text{Eq. 8}]$$

Tal que,  $B=RT/b$ ,  $T$  é a temperatura absoluta (K) e  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ). A constante adimensional  $B$  está relacionada com o calor de adsorção. De acordo com a Equação 8, um gráfico de  $q_e$  versus  $\ln C_e$  permite a determinação das constantes  $A$  e  $B$  da isoterma (FARAH et al, 2007).

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

Semelhante a equação de Temkin, este modelo é pouco aplicado a sistemas em fase líquida em razão de não considerar aspectos que compõem a complexidade dos equilíbrios neste meio, como pH, equilíbrios iônicos e interações soluto-solvente (FEBRIANTO et al, 2009).



A isoterma de Dubinin-Radushkevich pode ser representada pela Equação 9:

$$q_e = q_s \exp(\beta \varepsilon^2) \quad [\text{Eq. 9}]$$

A forma linear da isoterma pode ser expressa de acordo com a Equação 10:

$$\ln q_e = \ln q_s - \beta \varepsilon^2 \quad [\text{Eq. 10}]$$

Onde  $q_s$  representa a capacidade máxima teórica ( $\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $\beta$  é a constante de modelo Dubinin-Radushkevich (D-R) [ $\text{mol}^2(\text{kJ}^2)^{-1}$ ],  $\varepsilon$  é o potencial Polanyi, que pode ser calculado pela Equação 11 (ABDELWAHAB; AMIN, 2013):

$$\varepsilon = RT \ln\left(1 + \frac{1}{c_e}\right) \quad [\text{Eq. 11}]$$

Onde  $R$  é a constante universal dos gases ideais ( $8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura da solução absoluta (298,15 K) (CHOY et al, 1999).

Um gráfico de  $\ln q$  versus  $\varepsilon^2$  é usado para estimar  $q_s$  e a constante  $\beta$ . A constante  $\beta$  representa a energia livre de adsorção ( $E$ ) e é calculada utilizando a Equação 12 (HAMAYUN et al., 2014):

$$E = \frac{1}{\sqrt{-2\beta}} \quad [\text{Eq. 12}]$$

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  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  a adsorção é um processo químico e quando  $E < 8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  esse processo é físico (MACIEL et al, 2013).

#### 4.7 Digestão *in vitro*

A digestão é um processo complexo realizado pelo nosso organismo, que envolve várias etapas, sendo de difícil estudo *in vivo*. Para isso, têm sido desenvolvidos diferentes métodos de digestão *in vitro*, que permitem estudar mudanças estruturais, digestibilidade alimentar e liberação de componentes alimentares e fármacos sob condições simuladas. Além das vantagens de ser mais rápido, de mais baixo custo, menos trabalhoso e de não ter restrições éticas (MINEKUS et al, 2014).

Métodos de digestão *in vitro* simulam a fase de ingestão (oral), gástrica, do intestino delgado e, ocasionalmente, a fermentação intestinal. Com o intuito de mimetizar as condições da digestão gastrointestinal *in vivo*, levam em conta a presença de enzimas digestivas e suas concentrações, pH, tempo de digestão, e concentrações salinas, entre outros fatores (MINEKUS et al., 2014).

Entretanto, os resultados obtidos para digestibilidade e bioacessibilidade com os modelos *in vitro* são muitas vezes distintos dos que se obtêm com modelos *in vivo*, principalmente devido às dificuldades em simular com precisão os processos físico-químicos e fisiológicos altamente complexos que ocorrem no nosso organismo (HUR et al., 2011), sendo necessário ainda, levar em conta que a bioacessibilidade efetiva de diferentes antioxidantes não é claramente definida. Muitos são digeridos na forma ativa, enquanto outros precisam ser metabolizados para se tornarem biologicamente ativos ou inativos. Sem contar que, a co-ingestão de outros nutrientes e fatores endógenos também podem afetar a bioacessibilidade em relação à dose ingerida (MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Reagentes

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

### 5.2 Matéria-prima

Para realização do trabalho foram utilizadas 3 amostras de diferentes tipos de chás: hibisco, camomila e chá preto. As quais foram obtidas em comércio local na cidade de Curitiba/PR, armazenadas em sacos plásticos e ao abrigo da luz, para evitar possível degradação das matérias-primas.

### 5.3 Preparo das amostras de chá e levedura *Saccharomyces cerevisiae*

### **5.3.1 Obtenção dos extratos**

Os extratos das amostras de chás foram preparados através de uma extração sólido-líquido com uma solução de etanol 40% numa proporção soluto/solvente 1:20, a uma temperatura de 25°C, e agitados em um shaker a 130 rpm, por 120 minutos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Um total de aproximadamente 1 g de cada amostra foi extraída com 100 mL de solução. Após esse período, as amostras foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, a fim de separar a parte sólida e o extrato etanólico líquido. O extrato (sobrenadante) rico em compostos foi reservado para análises posteriores. (ZIELINSKI et al., 2014).

### **5.3.2 Preparo das amostras de levedura *Saccharomyces cerevisiae***

A biomassa de leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* foram coletadas na cervejaria Asgard, em Curitiba (Paraná, Brasil). As leveduras foram lavadas diariamente, durante aproximadamente duas semanas com água, para remoção de possíveis resíduos de açúcar de malte e resíduos de lúpulo, e, lavadas por mais sete dias com água destilada. Após a lavagem, o material bioissorvente foi liofilizado durante 48h, embalado e congelado até a realização dos experimentos.

#### **5.3.2.1 Modificações do material bioissorvente**

Visando o aumento da capacidade bioissorvente, modificações químicas foram realizadas na levedura com o objetivo de alterar os grupos funcionais presentes na superfície do bioissorvente, alterando assim a forma como se dá a bioissorção.

### 5.3.2.2 Modificação Ácida e Modificação Básica

Para os tratamentos ácido e básico, foram suspensos, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, 5 g de levedura seca em 500 mL de ácido sulfúrico  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e 5 g de levedura seca em 500 mL de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente (MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009). As misturas foram agitadas, a 125 rpm e temperatura ambiente, em um shaker, por 24 horas. Finalizados os tratamentos, as suspensões foram filtradas a vácuo, utilizando-se filtro quantitativo. A biomassa retida nos filtros foi coletada, seca por liofilização por 48 horas e armazenadas em temperatura de  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 5.4 Isotermas de bioissorção

As amostras de leveduras (modificadas ou não) foram utilizadas nos ensaios de isotermas de bioissorção. Inicialmente, um volume de 12,5 mL do extrato das amostras, com diferentes concentrações conhecidas, foi misturado com 50 mg de cada uma das leveduras (modificadas ou não). As amostras foram agitadas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , a 150 rpm e pelo tempo de equilíbrio estimado de 3 horas. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas e armazenadas para posteriores análises.

A temperatura adotada,  $25^\circ\text{C}$ , de acordo com a literatura (Jilani, 2015), não possui melhor aproveitamento tanto quanto em temperaturas mais elevadas ( $45^\circ\text{C}$ ). Porém, o experimento foi realizado em temperatura ambiente, visto que, a quantidade adsorvida em  $45^\circ\text{C}$ , torna-se insignificante quando comparada ao alto custo energético em se manter a temperatura elevada.

Foram utilizados os modelos de Langmuir (1916), Freundlich (1906), Temkin e Pyzhev (1940) e Dubinin-Radushkevich (1947), para descrever e avaliar o comportamento do processo de bioissorção dos compostos fenólicos totais e flavonoides no material biológico.

## 5.5 Bioacessibilidade e digestão *in vitro*

Após os testes e resultados, uma digestão foi simulada com o material resultante do processo da bioissorção, para avaliar a acessibilidade dos compostos no intestino, avaliar a eficiência do bioissorvente como protetor evitando degradação dos compostos de interesse no processo digestivo, e, avaliar a eficiência do bioissorvente como carreador, deixando estes compostos intactos e disponíveis para serem absorvidos no intestino.

O procedimento foi realizado como descrito por Koehnlein et al. (2016), com algumas modificações. Foram utilizadas quatro amostras diferentes no experimento: extrato antes da bioissorção, extrato após bioissorção, levedura antes da bioissorção e levedura após bioissorção. As leveduras foram suspensas com etanol a 40% (v/v). Para redução de interferências ou provável contribuição de constituintes não-antioxidantes na capacidade antioxidante total, foi preparado um branco com etanol 40%.

As amostras foram submetidas a um modelo *in vitro* simulando a digestão gástrica e intestinal. O pH de todas as amostras foi ajustado para 2,0 por adição de HCL  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Posteriormente, para cada 5 mL de amostra, foi adicionado 15 mL de fluido gástrico simulado (preparado com pepsina  $3,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  em solução de NaCl  $0,03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Em seguida as amostras foram para agitação a 150 rpm, durante 120 minutos e  $37^\circ\text{C}$  em proteção da luz. Passado esse tempo, a digestão com pepsina (gástrica) foi interrompida – continuando apenas com a digestão intestinal. O pH das amostras da etapa intestinal foi ajustado para 6,0 com  $\text{NaHCO}_3$   $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , para simular o ambiente intestinal. Após a adição de 2,5 mL de NaCl  $120 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e 2,5 mL de KCl  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , foi adicionado 15 mL de fluido intestinal recentemente preparado (preparado por dissolução de 0,05 g de pancreatina e 0,3 g de sais biliares para cada 35 mL solução de  $\text{NaHCO}_3$   $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A mistura final foi agitada durante 60 minutos, sob as mesmas condições de incubação. Finalizada a digestão, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes recolhidos no final do processo foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até a realização das análises de CFT e capacidade antioxidante.

As porcentagens de bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais e os valores das atividades antioxidantes serão calculadas em cada amostra (chá

preto, chá de camomila e chá de hibisco) pela Equação 13, onde  $B_F$  é o valor da fração bioacessível de cada método (após digestão intestinal);  $T_C$  é o conteúdo inicial de cada análise antes da digestão (LUCAS-GONZÁLEZ et al., 2018; VELDE et al., 2018).

$$\text{Bioacessibilidade}(\%) = \frac{B_F}{T_C} \times 100 \quad [\text{Eq. 13}]$$

## 5.6 Quantificação e identificação dos compostos bioativos das matrizes vegetais por diferentes técnicas analíticas

### 5.6.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais presentes nas amostras foi estimado por ensaio colorimétrico seguindo o método proposto por Singleton e Rossi (1965), com modificações. Ele consiste na reação de oxirredução entre o ácido gálico e o molibdênio, sendo este reduzido, produzindo a coloração azul do meio. Desse modo, é considerado um método indireto de determinação dos compostos fenólicos presentes na amostra. Os fenóis presentes na amostra são oxidados, resultando na formação de  $O^{2-}$ , que reage com os ácidos formando compostos de coloração azul e que absorvem comprimentos de onda de 765 nm.

O preparo das amostras foi realizado sem a presença de luz, para que não houvesse degradação dos reagentes e dos compostos. Em tubos, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de extrato das amostras, 2.370  $\mu\text{L}$  de água destilada e 150  $\mu\text{L}$  de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), esperando-se 3 minutos e em seguida adicionados 450  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio (15%). O branco para calibração no espectrofotômetro foi preparado seguindo o mesmo procedimento, entretanto, ao invés de 30  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, foram utilizados 30  $\mu\text{L}$  da solução extratora, no caso, etanol 40%. Passado o tempo de duas horas de reação, no escuro e em temperatura ambiente, foi feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 765 nm. Os resultados, em absorbância, foram substituídos na equação linear, Equação 14,

obtida pela curva padrão de ácido gálico, construída na faixa de 40-500 mg de ácido gálico por litro, e foram, então, expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), (mg AG g<sup>-1</sup> de amostra em base seca).

$$y = 0,0014x - 0,0073 \quad \text{Eq. [14]}$$

### 5.6.2 Determinação dos flavonoides totais

Para a determinação da concentração de flavonoides totais foi utilizado um espectrofotômetro em 510 nm. Em tubos de ensaio foram adicionados 300 µL de extrato das amostras, 1.830 µL de água destilada e 90 µL de nitrito de sódio (5%), após 6 minutos foram misturados 180 µL de cloreto de alumínio hexahidratado (10%). As amostras permaneceram em repouso por 5 minutos e finalmente foi adicionado 600 µL de hidróxido de sódio 1 M. Catequina (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão.

Os resultados, em absorbância, foram substituídos na equação linear (Equação 15) obtida pela curva padrão de catequina construída na faixa de 50 a 800 mg de catequina por litro, e foram, então, expressos em equivalentes de catequina, (mg EC g<sup>-1</sup> de amostra em base seca) (MEYERS et al, 2003).

$$y = 0,0029x - 0,0529 \quad \text{Eq. [15]}$$

### 5.6.3 Atividade Antioxidante

#### 5.6.3.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH•

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995).



O preparo das amostras foi realizado sem a presença de luz, para que não houvesse degradação dos reagentes e dos compostos. De cada amostra foi retirado uma alíquota de 300 µL que foram adicionados a 1050 µL da solução de DPPH e a 1650 µL de etanol P.A. Após meia hora de reação, no escuro e em temperatura ambiente, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro em 517 nm. Os resultados, em absorvância, foram substituídos na equação linear, Equação 16, obtida pela curva padrão de Trolox e foram expressos em mmol de equivalente de Trolox por litro (mmol ET/L).

$$y = -0,0018x + 0,7870 \quad \text{Eq. [16]}$$

### 5.6.3.2 Atividade sequestrante de radical ABTS•+

A determinação da atividade antioxidante pela formação do radical ABTS•+ foi realizada conforme o método proposto por Thaipong et al. (2006), com modificações. O radical ABTS•+ foi formado pela reação de 7 mM de 2,2´azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) (Sigma-Aldrich) com 2,45 mM de persulfato de potássio (Sigma-Aldrich). E, então, esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante 16 horas. Uma vez formado, o radical ABTS•+ foi diluído em água até obter uma medida de absorvância de 0,7 (± 0,02) em comprimento de onda de 734 nm em espectrofotômetro. De cada amostra foi retirado uma alíquota de 30 µL e adicionado 3 mL do radical ABTS•+. A reação ocorreu por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, realizou-se a leitura a 734 nm. Para o branco foi utilizado etanol ao invés do radical ABTS•+. Os valores das atividades antioxidantes também foram expressos por meio de uma curva analítica utilizando Trolox como padrão (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0 – 1000 µmol de Trolox L<sup>-1</sup>. Os resultados, em absorvância, foram substituídos na equação linear (Equação 17) obtida pela curva padrão de Trolox e foram expressos em mmol equivalente de Trolox por litro (mmol ET/L).

$$y = -0,0003x + 0,6293 \quad \text{Eq. [17]}$$

## **5.7 Caracterização das leveduras antes e após bioissorção**

Com a levedura liofilizada (modificada ou não) foram feitos testes de caracterização, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS), com a amostra de levedura após o processo de bioissorção.

### **5.7.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-EDS)**

As amostras das leveduras modificadas ou não e após o processo de bioissorção foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva. As amostras foram metalizadas, com uma liga de Ouro/Paládio sob condições de vácuo.

Através da Microscopia Eletrônica de Varredura foram produzidas imagens microscópicas das amostras, auxiliando assim a elucidação do processo de bioissorção dos compostos bioativos nas amostras de leveduras. E com o auxílio da Espectroscopia de Energia Dispersiva, foi feita a caracterização de elementos químicos presentes nas amostras por mapeamento. Este tipo de Equipamento é especialmente indicado para a análise química de microestruturas, podendo identificar a composição química de partículas a partir de 5 microns de tamanho.

## **5.8 Análises estatísticas**

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O tratamento estatístico dos resultados obtidos ao longo do trabalho foram analisados utilizando o software computacional Microsoft Office Excel 2010®.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Cinética e isotermas de adsorção

Para a maioria dos sistemas de adsorvente-adsorbato, as cinéticas de adsorção são, frequentemente, descritas por modelos de pseudo-primeira ordem (LAGERGREN, 1998) e de pseudo-segunda ordem (HO et al., 1996).

De acordo com Rubio et al (2014), através da análise cinética verificou-se que o modelo de pseudo-segunda ordem descreveu melhor a sorção do processo estudado, fornecendo um alto valor de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) em relação ao modelo de pseudo-primeira ordem.

Jilani et al (2015) constatou através da análise cinética o tempo de equilíbrio necessário para essa biossorção. O tempo de equilíbrio foi de quase 3 horas. Tempos de equilíbrio semelhantes (2-3 h) foram obtidos na literatura para a recuperação de polifenóis (Chassagne, Guilloux-Benatier, Alexandre, & Voilley, 2005).

Portanto, para este trabalho, o tempo estimado de equilíbrio da adsorção, foi de 3 horas em 25°C.

Já as isotermas de adsorção são utilizadas principalmente para descrever a relação entre a quantidade de soluto adsorvido pelo adsorbato e a concentração de soluto na solução de equilíbrio. São úteis para aperfeiçoar o uso de biossorventes, estimando a quantidade de biossorvente necessária para captar uma determinada concentração de soluto da solução e prever a distribuição dos locais de adsorção e as partículas adsorvidas na superfície biossorvente. (MACIEL et al, 2013).

Neste trabalho, fez-se a análise das isotermas de Langmuir, Freundlich, Temkin e D-R (Tabela 2) para descrever a interação entre os compostos fenólicos presentes nas matrizes vegetais estudadas e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (modificadas ou não).

**Tabela 2.** Modelos de isotermas de adsorção e seus parâmetros

Isoterma	Equação	
Langmuir	$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_0 K_L} + \frac{C_e}{q_0}$	Eq. [3]
Freundlich	$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e$	Eq. [6]
Temkin	$q_e = B \ln A + B \ln C_e$	Eq. [8]
Dubinin-Radushkevich	$\ln q_e = \ln q_s - \beta \varepsilon^2$	Eq. [10]

### 6.1.1 Chá Preto

Para cada levedura, modificada (ácida e básica) ou não, foram analisados os quatro modelos de isotermas e determinado a qual melhor os dados se adequam.

Na Tabela 3 estão apresentados a concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de chá antes, C (mg L<sup>-1</sup>), a concentração de compostos fenólicos totais após a adsorção nas leveduras modificadas ou não, Ce (mg L<sup>-1</sup>), e a quantidade adsorvida no equilíbrio por unidade de massa de adsorvente, qe (mg g<sup>-1</sup>). Para a determinação de todos os valores mencionados na Tabela 3 fez-se uso da curva de calibração de ácido gálico, apresentada na Equação 14.

**Tabela 3.** Concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de chá antes, C, e após a adsorção, Ce, e a quantidade adsorvida no equilíbrio, qe.

Concentração de extrato (%)	Natural			Ácida		Básica	
	C (mg L <sup>-1</sup> )	Ce (mg L <sup>-1</sup> )	qe (mg g <sup>-1</sup> )	Ce (mg L <sup>-1</sup> )	qe (mg g <sup>-1</sup> )	Ce (mg L <sup>-1</sup> )	qe (mg g <sup>-1</sup> )
70	423,71	365,67	14,51	363,00	15,18	302,93	30,20
60	334,69	282,52	13,04	286,24	12,11	235,88	24,70
50	304,48	251,98	13,13	260,64	10,96	206,12	24,59
40	235,76	188,36	11,85	193,14	10,65	148,43	21,83
30	187,26	144,50	10,69	152,76	8,63	119,55	16,93

Observa-se uma diminuição da concentração de compostos fenólicos da amostra controle para a que entrou em contato com ambas as leveduras (modificada ou não). Sendo assim, conclui-se que houve adsorção por parte da biomassa.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3, pôde-se fazer a construção das isotermas de Langmuir, Freundlich, Temkin e Dubinin-Radushkevich. Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos através dos modelos estudados, os quais os dados foram ajustados com o intuito de verificar as interações entre os compostos fenólicos totais e a levedura modificada ou não esgotada do processamento da cerveja.

**Tabela 4.** Parâmetros das isotermas de Langmuir, Freundlich e Temkin para biossorção de compostos fenólicos de chá preto em *Saccharomyces cerevisiae* modificada ou não.

	Natural	Ácida	Básica
<b>Langmuir</b>			
$q_0$ (mg g <sup>-1</sup> )	18,6220	28,7356	52,6316
$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	0,0092	0,0027	0,0042
$R_L$	0,2292	0,5013	0,4393
$R^2$	0,9936	0,7876	0,9126
<b>Freundlich</b>			
$K_F$ (L g <sup>-1</sup> )	2,2211	0,4729	1,2667
N	3,1476	1,7265	1,8070
1/n	0,3177	0,5792	0,5534
$R^2$	0,9795	0,9122	0,9301
<b>Temkin</b>			
$B$ (J mol <sup>-1</sup> )	625,9328	371,9437	195,5830
$A$ (L g <sup>-1</sup> )	0,1039	0,0234	0,0004
$R^2$	0,9792	0,8820	0,9398
<b>D-R</b>			
$q_s$ (mg g <sup>-1</sup> )	14,6934	14,8857	30,9261
$\beta$ (mol <sup>2</sup> kJ <sup>-2</sup> )	1137,40	2156,00	1395,30
$E$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	0,0210	0,0152	0,0189
$R^2$	0,9407	0,8251	0,9321

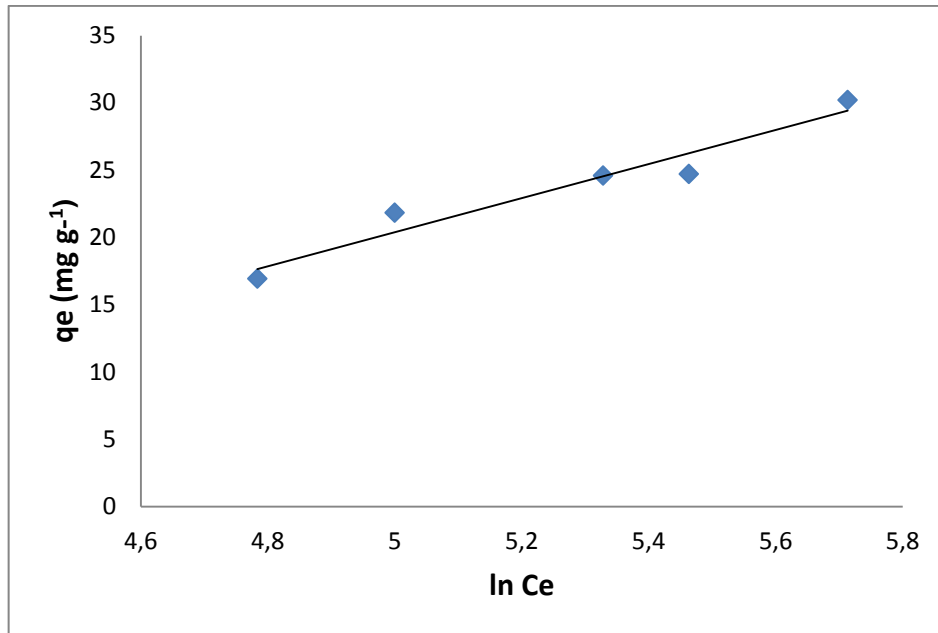
Nota:  $q_0$  = capacidade de cobertura máxima em monocamada (mg·g<sup>-1</sup>);  $K_L$  = constante de Langmuir (L·mg<sup>-1</sup>);  $R_L$  = fator de separação ou parâmetro de equilíbrio;  $K_F$  = constante de Freundlich (L·g<sup>-1</sup>); n = intensidade de adsorção; A = constante de ligação de equilíbrio (L·g<sup>-1</sup>); B = constante de Temkin

( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $q_s$  = capacidade de saturação teórica ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ );  $E$  = energia livre ( $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )  $\beta$  = constante da isoterma de Dubinin-Radushkevich [ $\text{mol}^2 \cdot (\text{KJ}^2)^{-1}$ ];.

Modificações químicas, ácida e básica, foram realizadas neste trabalho visando o aumento da capacidade biossorbitiva da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Portanto, a partir dos dados da Tabela 3, observa-se que a levedura que apresentou maior quantidade de biossorção (maior valor de  $q_e$ ) foi a levedura com modificação básica devido a uma possível interação mais eficiente, entre a levedura, e o perfil dos compostos característicos da planta.

Sendo assim, nas etapas seguintes deste trabalho, em relação ao chá preto, utilizou-se somente a levedura básica como parâmetro para discussão dos demais resultados, visto que ela apresentou maior quantidade de biossorção em relação as demais leveduras.

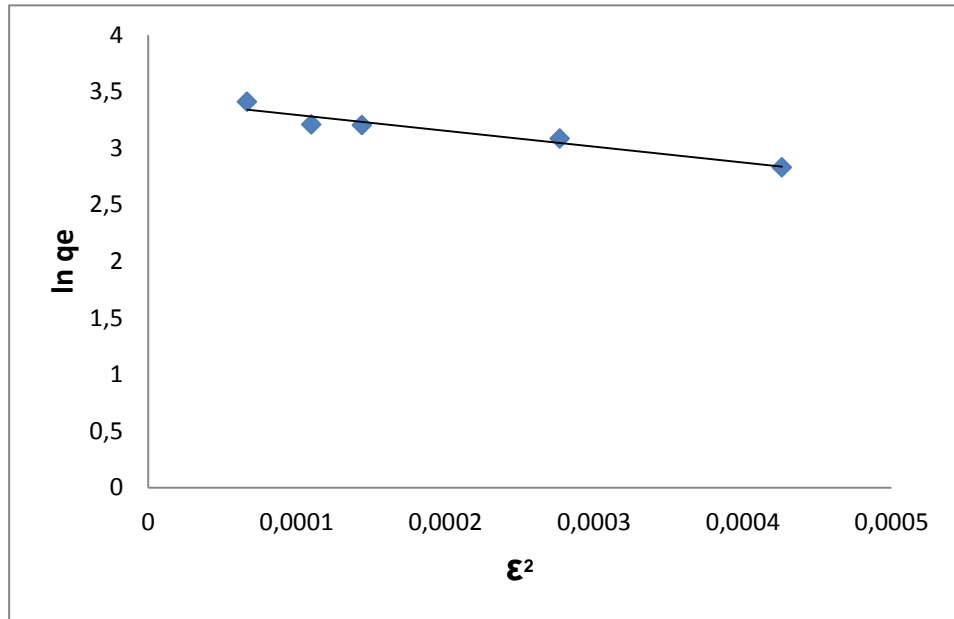
De acordo com a Tabela 4, o modelo que expressou maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi o modelo de Temkin, sendo, portanto, o melhor ajuste para os dados experimentais de biossorção para a levedura modificada básica. A isoterma de Temkin é um modelo antigo que descreve a adsorção de hidrogênio sobre eletrodos de platina no interior das soluções ácidas (FOO; HAMEED, 2010). Segundo Kumar et al. (2010), as isotermas de Temkin indicam que o calor de adsorção das moléculas na camada diminui linearmente com a cobertura da superfície do adsorvente devido às interações existentes entre o adsorvente e o adsorvato e que a adsorção é caracterizada por uma distribuição uniforme de energias de ligação, até uma energia de ligação máxima. Através da relação linear entre  $q_e$  versus  $\ln C_e$ , as constantes A (constante isotérmica de ligação de equilíbrio ( $\text{L g}^{-1}$ )) e B (constante isotérmica de Temkin ( $\text{J mol}^{-1}$ )) foram obtidas, de acordo com o gráfico apresentado na Figura 6.



**Figura 6.** Gráfico do modelo da isoterma de Temkin.

De acordo com os parâmetros obtidos da isoterma de Temkin, pode-se afirmar que o calor de adsorção é relativamente alto, com valor encontrado de  $B = 195,58$  J/mol, indicando interação entre o adsorvente e o adsorvato.

O segundo maior coeficiente de determinação foi obtido através da isoterma de Dubinin-Radushkevich. De acordo com Maciel et al. (2013), o modelo de isoterma de D-R é aplicado com o intuito principal de avaliar o tipo de interação entre o sorbato e biossorvente. A representação do gráfico  $\varepsilon^2$  versus  $\ln q_e$  pode ser observada na Figura 7. A partir do coeficiente angular e linear do gráfico, respectivamente, foram determinadas as constantes  $\beta$  e  $q_s$ .



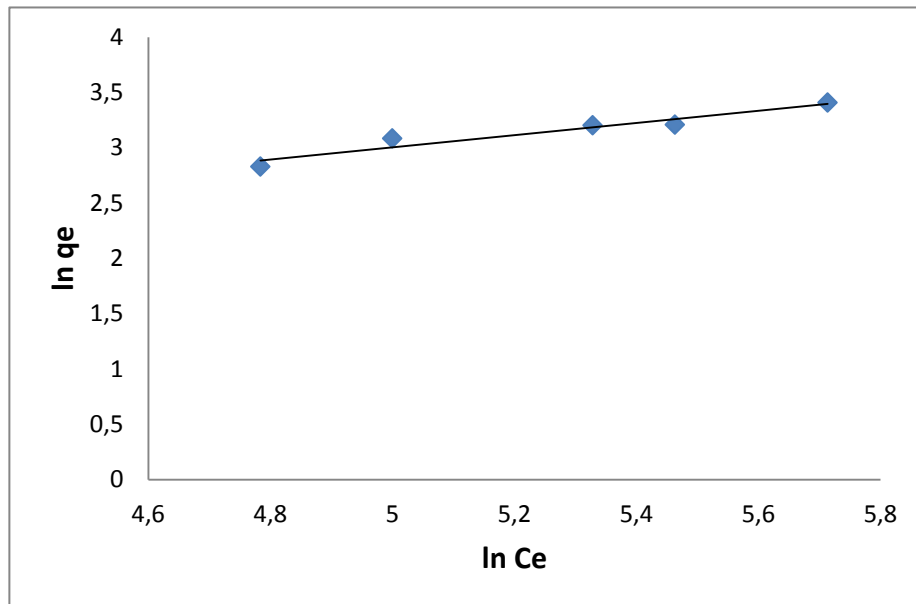
**Figura 7.** Gráfico do modelo da Isoterma de Dubinin-Radushkevich

A forma de avaliar se a adsorção tem natureza química ou física é através da constante  $E$  ( $\text{KJ mol}^{-1}$ ) do modelo. Se os valores de  $E$  forem menores que  $8 \text{ KJ mol}^{-1}$ , predominam-se as forças físicas, baseadas em interações de Van der Waals, rápidas e reversíveis. Porém, quando os valores se situam entre  $8$  e  $16 \text{ KJ mol}^{-1}$ , afirma-se que predominam as forças químicas, as quais ocorrem pela transferência de elétrons entre o sólido e a molécula adsorvida (RAFATULLAH et al., 2009; DABROWSKI, 2001). Através do parâmetro  $E$  (energia livre de adsorção), pode-se dizer que o mecanismo tem caráter físico, visto que o valor encontrado foi menor que  $8 \text{ KJ mol}^{-1}$  ( $0,0189 \text{ KJ mol}^{-1}$ ) e tal mecanismo físico pode ser fortemente influenciado pela superfície porosa da biomassa.

Em seguida, a Isoterma de Freundlich. Tal modelo considera que a adsorção ocorre em multicamadas e descreve a adsorção em superfícies altamente heterogêneas (FREUNDLICH, 1906). O gráfico do modelo de Freundlich,  $\ln C_e$  versus  $\ln q_e$ , está representado através da Figura 8 e a partir dele se obtém os parâmetros  $K_F$  e  $n$ . A constante de Freundlich ( $K_F$ ) indica a capacidade de biossorção do biossorvente e a constante  $n$ , o estado de afinidade de biossorção do biossorvente com o sorbato (GOHARI et al., 2013). Para o valor da constante  $n$  no modelo de Freundlich, foram obtidos valores dentro da faixa de  $0 < n < 10$ , indicando que a adsorção é favorável (JAMPANI et al., 2014). Para a constante  $1/n$  foram

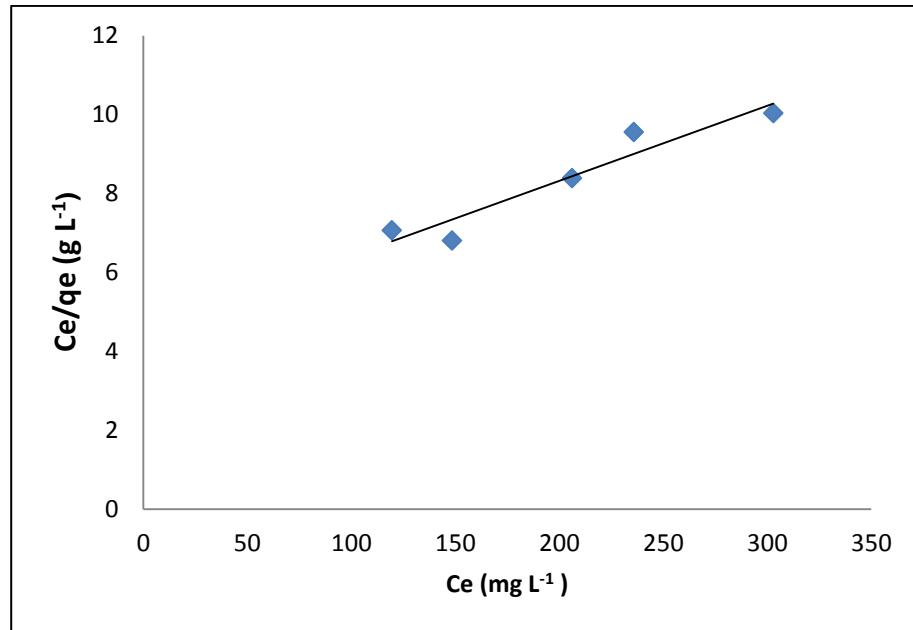


obtidos os valores de 0,5534 para o extrato de chá preto, verificando-se assim que os valores estão variando entre 0 e 1, demonstram a heterogeneidade da superfície (YOUSEF *et al.*, 2011).



**Figura 8.** Gráfico do Modelo da Isoterma de Freundlich

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). O modelo de Langmuir apresentou os menores valores de  $R^2$  com relação aos outros modelos. Esse modelo assume que a adsorção ocorre em monocamada, sendo que a adsorção apenas pode ocorrer em um número (fixo) finito de locais localizados definidos, que são idênticos e equivalentes (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2006). As constantes  $q_0$  (capacidade de cobertura máxima em monocamada ( $\text{mg.g}^{-1}$ )) e  $K_L$  (constante da isoterma de Langmuir ( $\text{L.mg}^{-1}$ )), são determinadas a partir do coeficiente angular e coeficiente linear do gráfico  $C_e$  versus  $C_e/q_e$  (Figura 9).



**Figura 9.** Gráfico do Modelo da Isoterma de Langmuir

Uma das características essenciais da isoterma de adsorção de Langmuir pode ser expressa em termos de uma constante de separação ( $R_L$ ), sendo que seu valor indica se o tipo da isoterma é irreversível ( $R_L = 0$ ), favorável ( $0 < R_L < 1$ ), linear ( $R_L = 1$ ) ou desfavorável ( $R_L > 1$ ) (MOHAN *et al.*, 2002). O valor obtido de  $R_L$  para o extrato foi de 0,4393 sugerindo que a biossorção de fenólicos pela *Saccharomyces cerevisiae* ocorre de maneira favorável.

### 6.1.2 Chá de Hibisco

Para cada levedura, modificada (ácida e básica) ou não, foram analisados os quatro modelos de isotermas e determinado a qual melhor os dados obtidos experimentalmente se adequam.

Na Tabela 5 estão apresentados a concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de chá antes,  $C$  (mg L<sup>-1</sup>), a concentração de compostos fenólicos totais após a adsorção nas leveduras modificadas ou não,  $C_e$  (mg L<sup>-1</sup>), e a quantidade adsorvida no equilíbrio por unidade de massa de adsorvente,  $q_e$  (mg g<sup>-1</sup>). Para a determinação de todos os valores mencionados na

Tabela 5 fez-se uso da curva de calibração de ácido gálico, apresentada na Equação 14.

**Tabela 5.** Concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de chá antes, C, e após a adsorção, Ce, e a quantidade adsorvida no equilíbrio, qe.

Concentração de extrato (%)	Natural			Ácida		Básica	
	C (mg L <sup>-1</sup> )	Ce (mg L <sup>-1</sup> )	qe (mg g <sup>-1</sup> )	Ce (mg L <sup>-1</sup> )	qe (mg g <sup>-1</sup> )	Ce (mg L <sup>-1</sup> )	qe (mg g <sup>-1</sup> )
100	204,82	143,91	9,15	147,48	8,61	128,91	11,40
85	169,06	129,73	5,91	133,64	5,32	111,36	8,66
70	133,31	86,82	6,98	100,45	4,93	88,36	6,75
50	85,63	59,48	3,93	84,55	0,16	55,30	4,55
40	61,80	38,21	3,54	54,94	1,03	43,58	2,74

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5, pôde-se fazer a construção das isotermas de Langmuir, Freundlich, Temkin e Dubinin-Radushkevich. Na Tabela 6 estão apresentados os parâmetros e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos através dos modelos estudados, os quais os dados foram ajustados com o intuito de verificar as interações entre os compostos fenólicos totais e a levedura modificada ou não.

**Tabela 6.** Parâmetros das isotermas de Langmuir, Freundlich e Temkin para biossorção de compostos fenólicos de chá de hibisco em *Saccharomyces cerevisiae* modificada ou não.

	Natural	Ácida	Básica
<b>Langmuir</b>			
$q_0$ (mg g <sup>-1</sup> )	31,850	15,3374	3,0731
$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	0,0116	0,0830	0,1497
$R_L$	0,374	0,0755	0,04928
$R^2$	0,0561	0,1215	0,5347
<b>Freundlich</b>			
$K_F$ (L g <sup>-1</sup> )	0,0627	0,0775	0,2718
N	30,7281	0,7331	2,1834

1/n	1,3734	1,364	0,5458
R <sup>2</sup>	0,9383	0,5996	0,9682
<b>Temkin</b>			
B (J mol <sup>-1</sup> )	307,5076	295,428	1211,25
A (L g <sup>-1</sup> )	8,4400	0,1320	0,0280
R <sup>2</sup>	0,8953	0,7028	0,9543
<b>D-R</b>			
q <sub>s</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	13,8087	13,9127	2,6356
β (mol <sup>2</sup> kJ <sup>-2</sup> )	33,63	25,086	107,95
E (kJ mol <sup>-1</sup> )	0,1219	0,1412	0,068
R <sup>2</sup>	0,9145	0,4531	0,9454

Nota: q<sub>0</sub> = capacidade de cobertura máxima em monocamada (mg·g<sup>-1</sup>); K<sub>L</sub> = constante de Langmuir (L·mg<sup>-1</sup>); R<sub>L</sub> = fator de separação ou parâmetro de equilíbrio; K<sub>F</sub> = constante de Freundlich (L·g<sup>-1</sup>); n = intensidade de adsorção; A = constante de ligação de equilíbrio (L·g<sup>-1</sup>); B = constante de Temkin (J·mol<sup>-1</sup>), q<sub>s</sub> = capacidade de saturação teórica (mg·g<sup>-1</sup>); E = energia livre (KJ·mol<sup>-1</sup>) β = constante da isoterma de Dubinin-Radushkevich [mol<sup>2</sup>. (KJ<sup>2</sup>)<sup>-1</sup>];.

Para o extrato de hibisco, a amostra de *Saccharomyces cerevisiae* com modificação básica foi a que apresentou os melhores resultados. Foi obtido os maiores valores de R<sup>2</sup>, ou seja, os dados se adequam melhor aos modelos, e também apresentou maior capacidade sortiva (q<sub>e</sub>).

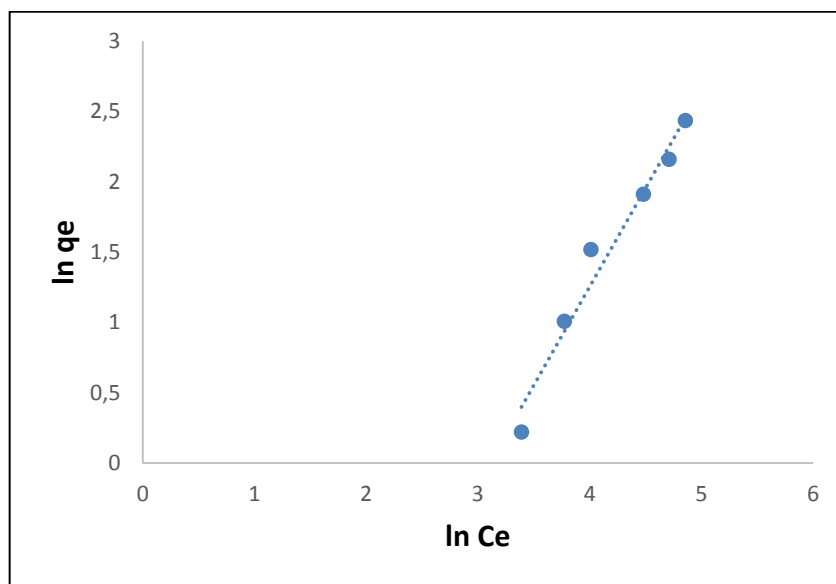
Sendo assim, nas etapas seguintes utilizou-se somente a levedura básica como parâmetro para discussão dos demais resultados, visto sua maior eficiência demonstrada.

Desprezando a adsorção que ocorreu no vidro durante o processo, podemos concluir que houve adsorção, pois nota-se uma diminuição significativa das concentrações no decorrer do experimento. A modificação teve seu papel no estudo de como varia a adsorção nas amostras de levedura, viu-se que para o hibisco a amostra de *S. cerevisiae* modificada com base apresentou uma melhora na capacidade sortiva em relação a levedura *in natura*, ao passo que a modificada com ácido diminui em capacidade sortiva. Sendo assim, no estudo da digestão gastrointestinal, foi usado a levedura básica como referência.

Na literatura, os valores de CFT para o *Hibiscus sabdariffa* ficam na faixa de 1835 EAG 100 g<sup>-1</sup> (NEHRING, 2015), utilizando-se acetona 80% como

solvente, muito próximo ao que foi encontrado, de 2048 EAG  $100 \text{ g}^{-1}$ . Por se tratar de uma matriz vegetal, valores de concentrações estão sempre sujeitas a diversas variações, podendo ser por causa da região onde a planta cresceu, parte da planta utilizada, metodologia da extração e solvente, que no caso deste trabalho foi feita com etanol 40%, etc.

O modelo que expressou maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi o modelo de Freundlich, sendo, portanto, o melhor ajuste para os dados experimentais de biossorção para a levedura com modificação básica. Este modelo propõe uma adsorção em multicamada, com diferentes energias adsortivas. Através da relação linear entre  $\ln q_e$  versus  $\ln C_e$ , as constantes  $K_F$  e  $n$  puderam ser determinadas empiricamente de acordo com a Figura 10.

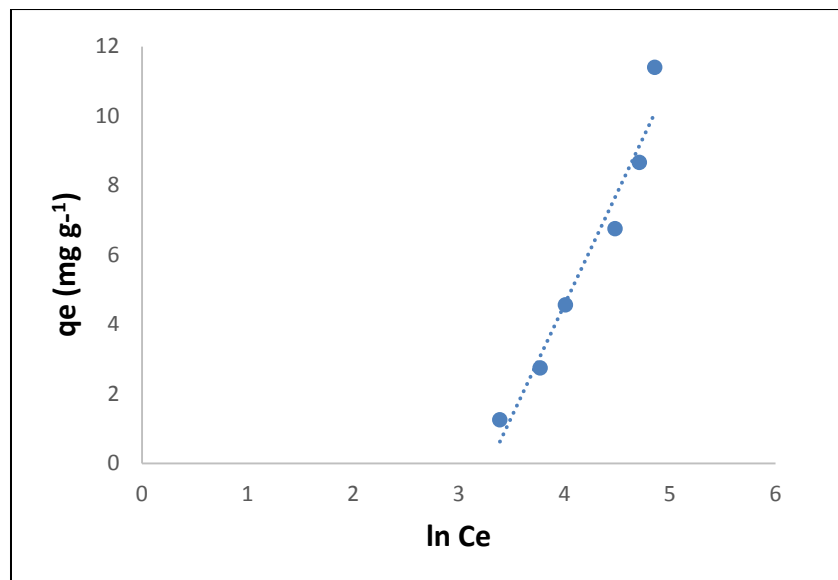


**Figura 10.** Gráfico do modelo da isoterma de Freundlich.

Freundlich propôs que a superfície é heterogênea e sítios ativos possuem afinidades diferentes, possuindo também energias diferentes. A constante indica capacidade de sorção e está relacionada com a energia média de sorção, e “n” é um valor empírico que se relaciona com intensidade da adsorção, sendo os valores de n muito próximos para as amostras naturais e ácida, e mais alto para a básica. Logo, esta irregularidade na superfície da amostra básica pode diretamente afetar sua capacidade sortiva, e conseqüentemente os resultados.

O modelo de Langmuir mesmo não se adequando tão bem, fornece uma informação importante sobre o processo biossorbitivo, o valor de  $R_L$ , esta entre 0 e 1, indica que o processo é favorável. Porém o valor de  $R_L$  começa maior nos pontos mais diluídos das isotermas, e vai diminuindo, indicando que a adsorção se torna cada vez menos favorável, até o ponto próximo a 0,05 onde a concentração do extrato é 100%.

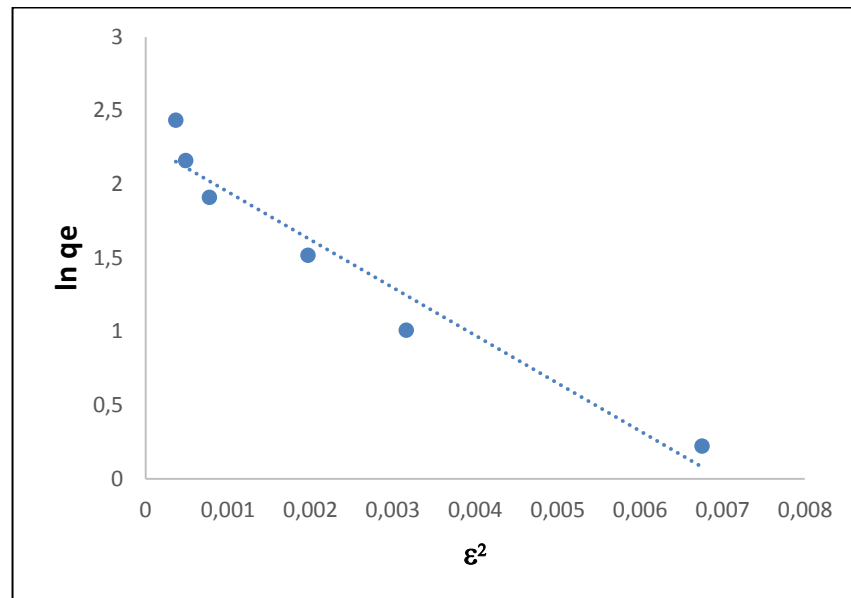
Já modelo de Temkin, obteve um  $R^2$  de 0,9543, como mostra a figura 11:



**Figura 11.** Gráfico do modelo da isoterma de Temkin.

Este modelo mostra através da constante B, que ligada a energia de adsorção, que elas são próximas e baixas para as leveduras natural e ácida, sendo uma fisiossorção, que pode ocorrer em multicamadas, e maior para a básica, outro fator que confirma uma adsorção menos favorável nesta amostra. A interação formada entre os compostos adsorvidos e as amostras de menor energia são mais fracas, o que é um ponto positivo, pois para a aplicação desejada, os compostos devem ser dessorvidos perto do intestino, liberando os compostos para absorção, protegidos do processo digestivo que pode degradar grande parte das moléculas, fazendo com que o potencial biológico possa ser reduzido, e sua função, inutilizada.

E finalmente o modelo de Dubinin-Raduschkevich, que é aplicado para caracterizar o mecanismo de adsorção como físico ou químico. A energia livre da adsorção na levedura básica foi a menor, sendo bem abaixo da natural e ácida, que obtiveram resultados muito próximos, Por isso pode ter apresentado maior capacidade sortiva  $q_e$ . Contraditoriamente, este modelo ainda mostra que a menor capacidade sortiva teórica, foi a da levedura básica perto de  $2,6 \text{ mg g}^{-1}$ , sendo o tratamento básico muito agressivo, pode tanto danificar os sítios ativos existentes, quanto promover novos, com interações diferentes entre adsorbato e adsorvente ,das que existem com a parede celular da levedura que não sofre modificação. Contudo obteve um bom ajuste linear, conforme a figura 12.



**Figura 12.** Gráfico do modelo da Isoterma de Dubinin-Radushkevich

### 6.1.3 Chá de Camomila

Para cada levedura, modificada (ácida e básica) ou não, foram analisados os quatro modelos de isotermas e determinado a qual melhor os dados obtidos experimentalmente se adequam.

As modificações químicas, ácida e básica, foram realizadas neste trabalho visando o aumento da capacidade biossorbitiva da levedura *Sacharomyces cerevisiae*.

Na Tabela 7 estão apresentados a concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de chá antes, C (mg L<sup>-1</sup>), a concentração de compostos fenólicos totais após a adsorção nas leveduras modificadas ou não, Ce (mg L<sup>-1</sup>), e a quantidade adsorvida no equilíbrio por unidade de massa de adsorvente, qe (mg g<sup>-1</sup>). Para a determinação de todos os valores mencionados na Tabela 7 fez-se uso da curva de calibração de ácido gálico, apresentada na Equação 14.

Observa-se uma diminuição da concentração de compostos fenólicos da amostra controle para a que entrou em contato com ambas as leveduras (modificada ou não). Sendo assim, conclui-se que houve adsorção por parte do microrganismo.

**Tabela 7.** Concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de chá antes, C, e após a adsorção, Ce, e a quantidade adsorvida no equilíbrio, qe.

Concentração de extrato (%)	Natural			Ácida		Básica	
	C (mg L <sup>-1</sup> )	Ce (mg L <sup>-1</sup> )	qe (mg g <sup>-1</sup> )	Ce (mg L <sup>-1</sup> )	qe (mg g <sup>-1</sup> )	Ce (mg L <sup>-1</sup> )	qe (mg g <sup>-1</sup> )
100	263,93	178,96	12,76	150,57	17,02	171,29	13,91
85	224,33	146,57	11,68	124,93	14,92	141,18	12,48
70	184,74	120,54	9,64	99,79	12,75	111,50	11,00
50	131,96	91,21	6,12	76,00	8,40	84,79	7,08
40	105,57	80,50	3,76	64,00	6,24	74,88	4,61

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, pôde-se fazer a construção das isotermas de Langmuir, Freundlich, Temkin e Dubinin-Radushkevich. Na Tabela 8 estão apresentados os parâmetros e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) obtidos através dos modelos estudados, os quais os dados foram ajustados com o intuito de verificar as interações entre os compostos fenólicos totais e a levedura modificada ou não.



**Tabela 8.** Parâmetros das isotermas de Langmuir, Freundlich e Temkin para biossorção de compostos fenólicos de chá de camomila em *Saccharomyces cerevisiae* modificada ou não.

	Natural	Ácida	Básica
<b>Langmuir</b>			
$q_0$ (mg g <sup>-1</sup> )	-15,6006	-74,0741	-45,045
$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	-0,00276	-0,00132	-0,00149
$R_L$	1,974	1,2472	1,3430
$R^2$	0,4811	0,2760	0,2086
<b>Freundlich</b>			
$K_F$ (L g <sup>-1</sup> )	0,005453	19,42576	0,028308
$N$	0,6560	0,8533	0,8157
$1/n$	1,5243	1,1719	1,2259
$R^2$	0,9218	0,9628	0,9169
<b>Temkin</b>			
$B$ (J mol <sup>-1</sup> )	212,8107	194,2953	229,7543
$A$ (L g <sup>-1</sup> )	0,017806	0,025822	0,022328
$R^2$	0,9738	0,9923	0,9723
<b>D-R</b>			
$q_s$ (mg g <sup>-1</sup> )	18,4876	20,97015	18,2251
$\beta$ (mol <sup>2</sup> kJ <sup>-2</sup> )	1671,30	835,29	1171,00
$E$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	0,017296	0,024466	0,020664
$R^2$	0,9941	0,9964	0,9914

Nota:  $q_0$  = capacidade de cobertura máxima em monocamada (mg·g<sup>-1</sup>);  $K_L$  = constante de Langmuir (L·mg<sup>-1</sup>);  $R_L$  = fator de separação ou parâmetro de equilíbrio;  $K_F$  = constante de Freundlich (L·g<sup>-1</sup>);  $n$  = intensidade de adsorção;  $A$  = constante de ligação de equilíbrio (L·g<sup>-1</sup>);  $B$  = constante de Temkin (J·mol<sup>-1</sup>),  $q_s$  = capacidade de saturação teórica (mg·g<sup>-1</sup>);  $E$  = energia livre (KJ·mol<sup>-1</sup>)  $\beta$  = constante da isoterma de Dubinin-Radushkevich [mol<sup>2</sup>. (KJ<sup>2</sup>)<sup>-1</sup>];.

A partir da análise dos dados da Tabela 7, observa-se que a levedura que apresentou maior quantidade de biossorção (maior valor de  $q_e$ ) foi a levedura com modificação ácida.

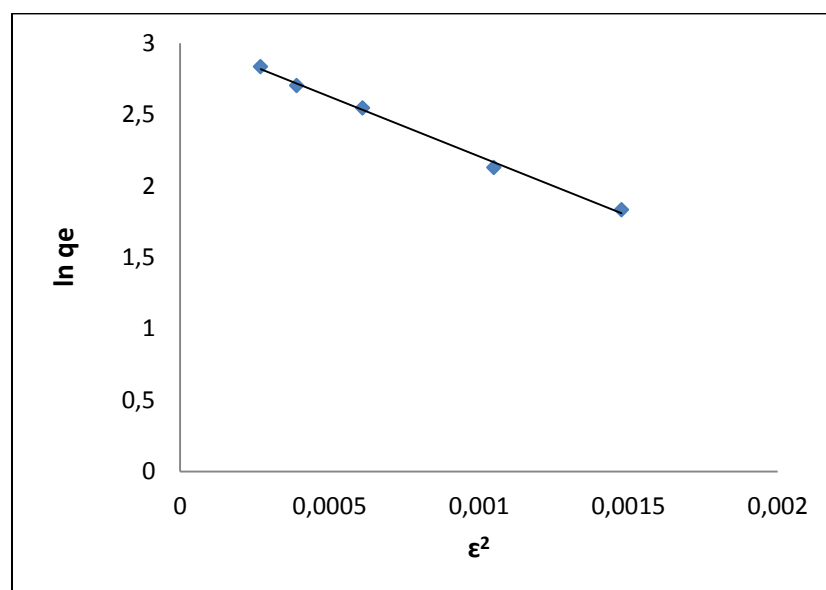
Sendo assim, nas etapas seguintes deste trabalho, em relação ao chá de camomila, utilizou-se somente a levedura ácida como parâmetro para discussão dos demais resultados, visto sua maior eficiência demonstrada.

De acordo com a Tabela 8, os dados obtidos no processo de bioadsorção do extrato de camomila com *S. cerevisiae* não se adequam ao modelo de isoterma de Langmuir, já sendo excluído pela análise estatística, tendo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) muito abaixo de 1.

O modelo de isoterma de Freundlich, que considera que a adsorção ocorre em multicamadas e descreve a adsorção em superfícies altamente heterogêneas (FREUNDLICH, 1906), apesar de apresentar valor de  $R^2$  satisfatório, não pode ter os dados ajustados na análise em questão, pois apresenta que o estado de afinidade de bioadsorção do bioadsorvente com o sorbato é desfavorável,  $n < 1$  (GOHARI *et al.*, 2013).

Ainda de acordo com a Tabela 8, o modelo que expressou maior valor para  $R^2$  foi o modelo de Dubinin-Radushkevich, que é aplicado com o intuito principal de avaliar o tipo de interação entre o sorbato e bioadsorvente (MACIEL *et al.*, 2013). A representação do gráfico  $\epsilon^2$  versus  $\ln q_e$  é observado na Figura 13. A partir do coeficiente angular e linear do gráfico, respectivamente, foram determinadas as constantes  $\beta$  e  $q_s$ .

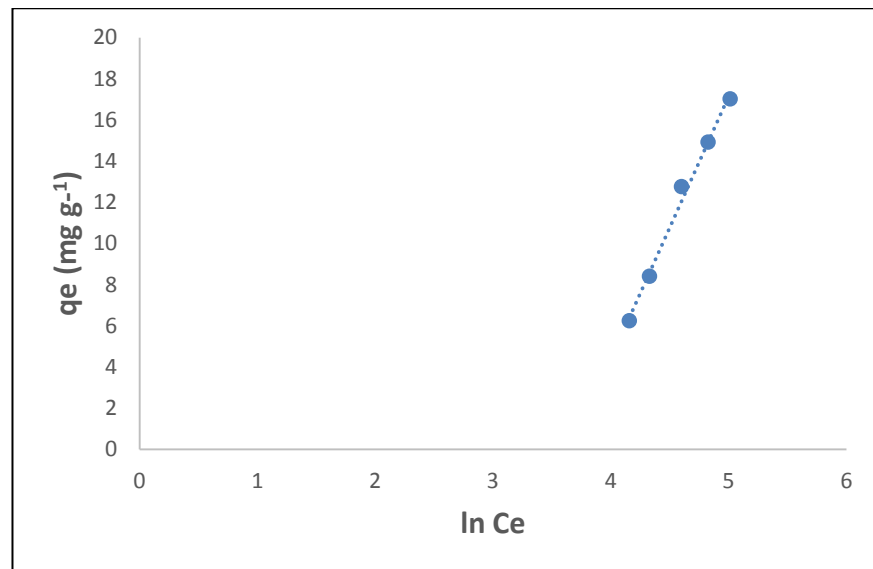
Através do valor da constante  $E$  ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ), pode-se avaliar se a adsorção tem natureza química ou física. Como o valor de  $E$  encontrado foi menor que  $8 \text{ KJ mol}^{-1}$ , predominam-se as forças físicas, baseadas em interações de Van der Waals, rápidas e reversíveis (RAFATULLAH *et al.*, 2009; DABROWSKI, 2001).



**Figura 13.** Gráfico do modelo da Isoterma de Dubinin-Radushkevich

O segundo maior coeficiente de determinação foi obtido através do ajuste à isoterma de Temkin, que, de acordo com Kumar et al. (2010), indicam que o calor de adsorção das moléculas na camada diminui linearmente com a cobertura da superfície do adsorvente devido às interações existentes entre o adsorvente e o adsorvato e que a adsorção é caracterizada por uma distribuição uniforme de energias de ligação, até uma energia de ligação máxima.

Através da relação linear entre  $q_e$  versus  $\ln C_e$ , as constantes A (constante isotérmica de ligação de equilíbrio ( $L g^{-1}$ )) e B (constante isotérmica de Temkin ( $J mol^{-1}$ )) foram obtidas, de acordo com o gráfico apresentado na Figura 14.



**Figura 14.** Gráfico do modelo da isoterma de Temkin.

## 6.2 Digestão *in vitro* e bioacessibilidade

A quantificação da biodisponibilidade e bioacessibilidade de um composto é um processo complexo. No sentido de poder quantificar estes dois parâmetros, foram desenvolvidos modelos de digestão *in vitro* que simulam, de uma forma mais ou menos simplificada, o processo digestivo na boca, estômago e intestino delgado (FERREIRA, C. M. M., 2014).

A etapa oral da digestão simulada *in vitro* foi inicialmente proposta como parte dos estudos do trabalho, entretanto, de acordo com Alminger et al. (2014) a etapa oral da digestão é importante ao avaliar alimentos ricos em carboidratos e não interfere na absorção de compostos bioativos, assim, foi realizada a simulação somente das etapas gástrica e intestinal.

Para a etapa da simulação gastrointestinal utilizou-se a levedura que apresentou melhor bioadsorção para cada amostra vegetal, extrato puro, sem diluição, levando em conta o maior valor de quantidade adsorvida no equilíbrio por unidade de massa de adsorvente, o qe. Para cada amostra de chá foram analisadas as atividades fenólicas e antioxidantes antes do processo digestivo, após a digestão gástrica e após a digestão intestinal.

Os resultados foram quantificados com uso das curvas de calibrações descritas na metodologia e, com eles, tornou-se possível a análise simulada da digestão que ocorre no nosso organismo.

Através dos resultados obtidos pelo processo de digestão *in vitro*, levando em conta a etapa inicial e a etapa intestinal, onde os compostos bioativos seriam metabolizados, calculou-se o valor da bioacessibilidade dos mesmos, após passar pelo processo da bioadsorção na levedura.

O conteúdo e a forma como se encontram os compostos bioativos nas matrizes vegetais afetam diretamente a sua bioacessibilidade o que faz com que haja interferentes relacionados ao seu cálculo. Alguns principais interferentes que podem ter gerado variâncias nesse trabalho estão citados a seguir.

Como os compostos fenólicos estão relacionados ao sistema de defesa das plantas, sua produção varia de acordo com a informação genética de cada vegetal e, uma quantidade superior destes compostos é encontrada nas cascas e sementes dos vegetais, sendo muitas vezes desprezados (VAN DER SLUIS et al., 2001; MOURE et al., 2001). Fatores externos, como condições climáticas, técnicas de cultivo, exposição à radiação solar e, época da colheita também exercem influência na distribuição dos compostos fenólicos das matrizes vegetais (VAN DER SLUIS et al., 2001; DU PONT et al., 2001). As condições de secagem e armazenagem também podem influenciar na quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras utilizadas.

Levando em conta a utilização da *S. cerevisiae* como bioadsorvente, em muitos casos, os valores obtidos para bioacessibilidade foram maiores que 100%, o

que indica que a bioadsorção se mostrou eficaz no processo, significando que a levedura funcionou eficientemente como “*delivery system*” dos compostos estudados.

Em alguns casos, os valores obtidos para bioacessibilidade foram maiores que 100% indicando que, durante a digestão, as propriedades não só foram preservadas, como também aumentadas. Isso pode ocorrer devido à interação entre as moléculas e a superfície do material biológico, mantendo e somando-se os valores (principalmente da atividade antioxidante) do adsorbato e adsorvente, não degradando tanto as moléculas em si, quanto a parede celular da levedura. Também pode haver interferência devido a formação de compostos que podem ser formados durante o processo, quando a matriz biológica entra em contato com os reagentes da digestão simulada, bem como problemas com particulados sólidos que podem não ter sido separados durante a centrifugação, isso infere diretamente na absorvância, alterando assim os resultados. Lembrando que estes valores podem ser ainda maiores no organismo humano, devido a metabólitos formados pela microbiota intestinal do ser humano, esta etapa fermentativa não foi levada em conta (VIEIRA, 2016).

### 6.2.1 Chá Preto

Os valores obtidos para a quantidade adsorvida no equilíbrio por unidade de massa de adsorvente estão apresentados na Tabela 9. A levedura básica foi a que apresentou melhor desempenho como bioadsorvente para os compostos bioativos do chá preto, sendo utilizada para a análise da digestão *in vitro*

**Tabela 9.** Valores de  $q_e$  para a bioadsorção do chá preto em *Saccharomyces cerevisiae* natural e modificada.

Bioadsorvente	$q_e$ (mg/g)
Levedura natural (não modificada)	14,51
Levedura básica	30,20
Levedura ácida	15,18

Outro parâmetro calculado, para confirmar qual levedura se comportou como melhor bioissorvente, foi a porcentagem de remoção para cada amostra de levedura (Tabela 10).

**Tabela 10.** Remoção de compostos fenólicos do extrato de chá preto de acordo com as 3 amostras de levedura.

<b>Amostra</b>	<b>% remoção</b>
Natural	13,70
Ácida	14,33
Básica	28,51

Após a bioissorção do chá preto houve diminuição da concentração de compostos fenólicos nas infusões, por outro lado, as suspensões de *S. cerevisiae* foram enriquecidas. A esse respeito, alguns autores mostraram uma habilidade particular de *S. cerevisiae* em reter flavanóis e seus derivados em vinhos, especialmente catequina e epicatequina (Razmkhab et al., 2002; Rizzo et al., 2006).

Os valores obtidos para a bioacessibilidade, calculados através da equação 13, estão descritos na Tabela 11.

**Tabela 11.** Bioacessibilidade dos compostos bioativos do chá preto após processo de digestão *in vitro*.

	<b>BIOACESSIBILIDADE %</b>			
	<b>CFT</b>	<b>FLAVONOIDES</b>	<b>ABTS</b>	<b>DPPH</b>
<b>LEVEDURA PURA</b>	127,34	93,45	68,35	16,35
<b>LEVEDURA BIOSSORVIDA</b>	168,17	98,12	95,73	47,82
<b>EXTRATO PURO</b>	29,23	19,99	44,74	24,69
<b>EXTRATO BIOSSORVIDO</b>	36,19	23,99	47,32	28,82

Nota: CFT = compostos fenólicos totais; ABTS = atividade antioxidante pela formação do radical ABTS<sup>•+</sup>; DPPH = atividade antioxidante pelo método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Pôde-se verificar que a levedura que passou pela adsorção apresentou um aumento muito significativo de bioacessibilidade nos quatro parâmetros estudados. Observa-se que essa levedura aumenta a bioacessibilidade dos antioxidantes do chá, com altas porcentagens de recuperação. Um estudo conduzido por Nogueira et al. (2008) indicaram que as digestões gástricas do vinho tinto apresentaram capacidade antioxidante 100-1000 vezes maior do que os equivalentes não digeridos. A liberação de moléculas bioativas da matriz durante a digestão seria a primeira explicação dessa melhora, uma vez que apenas os polifenóis que se tornam bioacessíveis estão potencialmente disponíveis e são capazes de exercer seus efeitos benéficos. Examinando os resultados, a bioadsorção parece preservar crucialmente a capacidade antioxidante de chás após digestão gastrointestinal *in vitro* em infusões e suspensões. Já o extrato bioadsorvido apresentou valores maiores (nos quatro parâmetros) que o extrato puro, uma possível justificativa para esses valores seria um possível resquício de levedura no extrato bioadsorvido.

### 6.2.2 Chá de Hibisco

Os valores obtidos para a quantidade adsorvida no equilíbrio por unidade de massa de adsorvente estão apresentados na tabela 12.

**Tabela 12.** Valores de  $q_e$  para a bioadsorção do chá de hibisco em *Saccharomyces cerevisiae* natural e modificada.

Bioadsorvente	$q_e$ (mg/g)
Levedura natural (não modificada)	9,51
Levedura básica	11,40
Levedura ácida	8,61

De acordo com a Tabela 13, foi calculado a remoção para cada amostra de levedura.

**Tabela 13.** Remoção de compostos fenólicos do extrato de hibisco de acordo com as 3 amostras de levedura.

Amostra	% remoção
Natural	29,7
Ácida	30,0
Básica	37,1

Mais um dado que comprova que a amostra básica obteve os melhores resultados na bioissorção.

A partir da etapa digestiva, foi calculado a bioacessibilidade dos compostos, para a amostra de hibisco, segundo a tabela 14.

**Tabela 14.** Quadro comparativo de valores de bioacessibilidade calculados para o hibisco.

	BIOACESSIBILIDADE %			
	CFT	FLAVONOIDES	ABTS	DPPH
<b>EXTRATO PURO</b>	36,6	17,8	27,8	106,8
<b>EXTRATO BIOSSORVIDO</b>	59,5	17,1	26,4	155,0
<b>LEVEDURA PURA</b>	11,1	2,8	77,3	52,3
<b>LEVEDURA BIOSSORVIDA</b>	29,3	66,7	95,4	121,4

Nota: CFT = compostos fenólicos totais; ABTS = atividade antioxidante pela formação do radical ABTS•+; DPPH = atividade antioxidante pelo método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Pôde-se verificar que a levedura que passou pela adsorção apresentou um aumento muito significativo de bioacessibilidade nos quatro parâmetros estudados. A quantidade de fenólicos totais que chega biodisponível ao intestino é 18,2% maior, e a de flavonoides 63,9% maior. Em termos de efeito benéfico ao corpo humano, isso causaria grande impacto numa população com consumo frequente do material obtido. A atividade antioxidante também foi mais preservada com o material bioissorvido, 18,1% para ABTS e 69,1% para DPPH, indicando que



este último é mais sensível, ou pode ter maior afinidade com os compostos presentes na amostra de hibisco.

Estes valores são interessantes, pois este aumento em porcentagem reflete um aumento maior em quantidade, já que os parâmetros medidos foram sempre superiores nas amostras de levedura que passaram pela biossorção, sendo mais significativa a diferença entre a levedura biossorvida e natural, para os parâmetros de atividade antioxidante ABTS e DPPH.

Da mesma forma, os dados obtidos para os extratos, não provam serem maiores em quantidade, pois apesar de o extrato após a biossorção ter uma biodisponibilidade maior, os valores iniciais são menores. Sendo assim, em quantidade bruta, mesmo tendo uma bioacessibilidade maior, a quantidade de compostos que chegou intacta no final do experimento foi maior para o extrato puro. O mesmo ocorre com a atividade antioxidante DPPH, onde apesar de uma maior bioacessibilidade, a quantidade total que está biodisponível é menor.

Para flavonoides e a metodologia de atividade antioxidante ABTS, não houve variação significativa de resultado para os extratos, de forma que porcentagem degradada durante o processo se manteve praticamente a mesma. As variações medidas nos extratos nos parâmetros CFT e atividade antioxidante DPPH, podem advir de erros na execução da metodologia, ou interferência na amostra, por particulados suspensos ou algum composto formado durante o processo que possa interferir na absorvância.

### **6.2.3 Chá de Camomila**

Para o chá de camomila, os valores obtidos para a quantidade adsorvida no equilíbrio por unidade de massa de adsorvente estão apresentados na tabela 15. A levedura ácida foi a que apresentou melhor desempenho como biossorvente para os compostos bioativos da camomila, sendo utilizada para a análise da digestão *in vitro*

**Tabela 15.** Valores de *qe* para a biossorção do chá de camomila em *Saccharomyces cerevisiae* natural e modificada.

<b>Biossorvente</b>	<b><i>qe</i> (mg/g)</b>
Levedura natural (não modificada)	12,76
Levedura básica	13,91
Levedura ácida	17,02

Outro parâmetro calculado, para confirmar qual levedura se comportou como melhor biossorvente, foi a porcentagem de remoção para cada amostra de levedura (Tabela 16).

**Tabela 16.** Remoção de compostos fenólicos do extrato de Camomila de acordo com as 3 amostras de levedura.

<b>Amostra</b>	<b>% remoção</b>
Natural	32,19
Ácida	42,95
Básica	35,10

Os valores obtidos para a bioacessibilidade, calculados através da equação 13, estão descritos na tabela 17.

**Tabela 17.** Bioacessibilidade dos compostos bioativos do chá de camomila, após processo de digestão *in vitro*.

	<b>BIOACESSIBILIDADE %</b>			
	<b>CFT</b>	<b>FLAVONOIDES</b>	<b>ABTS</b>	<b>DPPH</b>
<b>LEVEDURA PURA</b>	35,27	8,30	16,29	25,67
<b>LEVEDURA BIOSSORVIDA</b>	49,94	17,14	55,07	50,32
<b>EXTRATO BIOSORVIDO</b>	33,90	8,77	3,98	21,17
<b>EXTRATO PURO</b>	37,52	18,37	5,76	30,60

Nota: CFT = compostos fenólicos totais; ABTS = atividade antioxidante pela formação do radical ABTS•+; DDPH = atividade antioxidante pelo método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

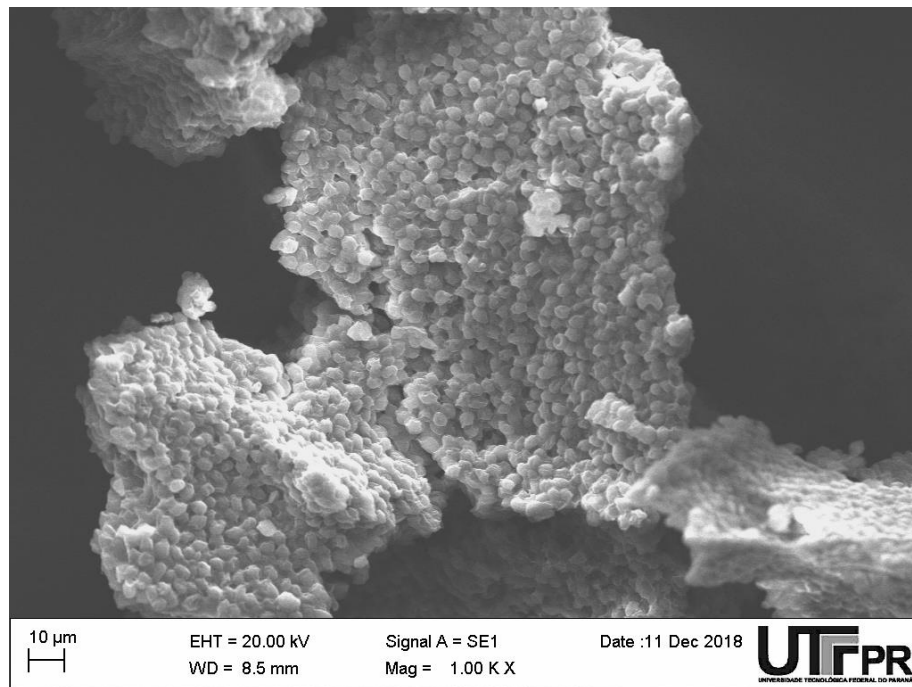
Conforme apresentado na Tabela 17, os percentuais de bioacessibilidade tanto dos compostos fenólicos, quanto dos antioxidantes, aumentaram na levedura bioissorvida e diminuíram no extrato bioissorvido, representando a eficácia do método empregado. Parte dos compostos bioativos que estavam presentes no extrato foram bioissorvidos pela levedura. E, esta funcionou como carreadora de tais compostos afinal, a porcentagem de polifenóis e antioxidantes que chegou até o intestino foi maior com a levedura do que no extrato puro.

Apesar de constatada a eficiência da *Saccharomyces cerevisiae* como “*delivery system*”, os valores encontrados foram baixos, isso pode estar relacionado com erros operacionais, com diferenças na amostra mas, principalmente, pelo chá de Camomila se mostrar um chá com baixos índices de compostos bioativos.

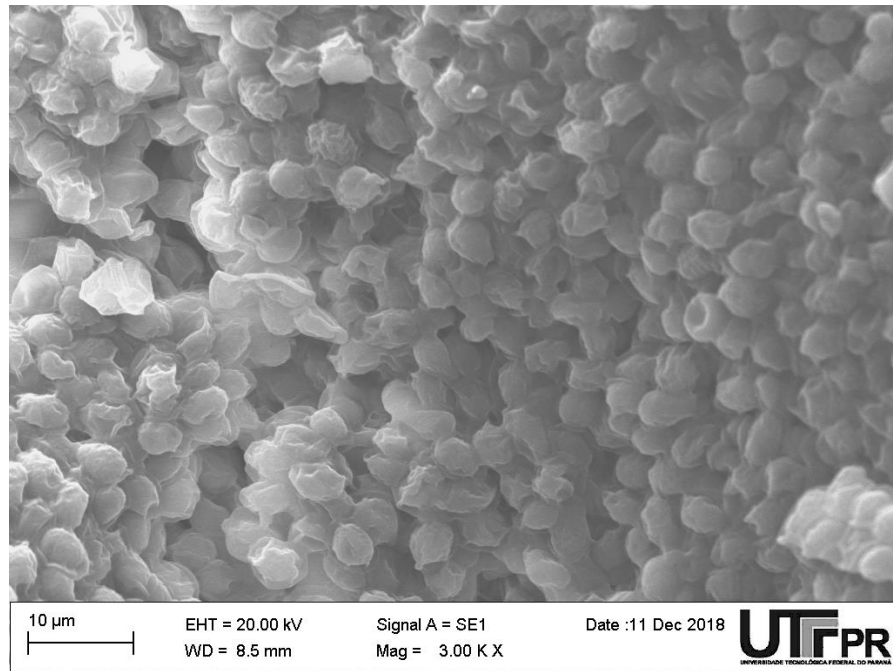
#### 6.4 Caracterização por MEV-EDS

Para uma análise de caracterização do material, foi utilizada a técnica MEV (microscopia eletrônica de varredura) acoplada ao EDS (espectroscopia de energia dispersiva). A microscopia foi utilizada para analisar as fotos com zoom não alcançado em qualquer microscopia. A dimensão de uma célula de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* varia de 4 a 8 micrômetros em comprimento, e em largura de 7 a 12 micrômetros, assim sendo é possível enxergar com nitidez uma célula, porém é difícil inferir com certeza, as modificações que ocorrem em sua parede celular. Esta técnica foi utilizada a título de curiosidade sobre como se dá o processo adsorptivo, entretanto, mesmo com a imagem ampliada várias vezes, difícil enxergar diferenças significativas entre as amostras antes e após ocorrer a bioissorção. Todas as imagens subsequentes são de autoria própria, e foram feitas a partir do equipamento MEV-EDS da UTFPR campus Curitiba – sede Centro.

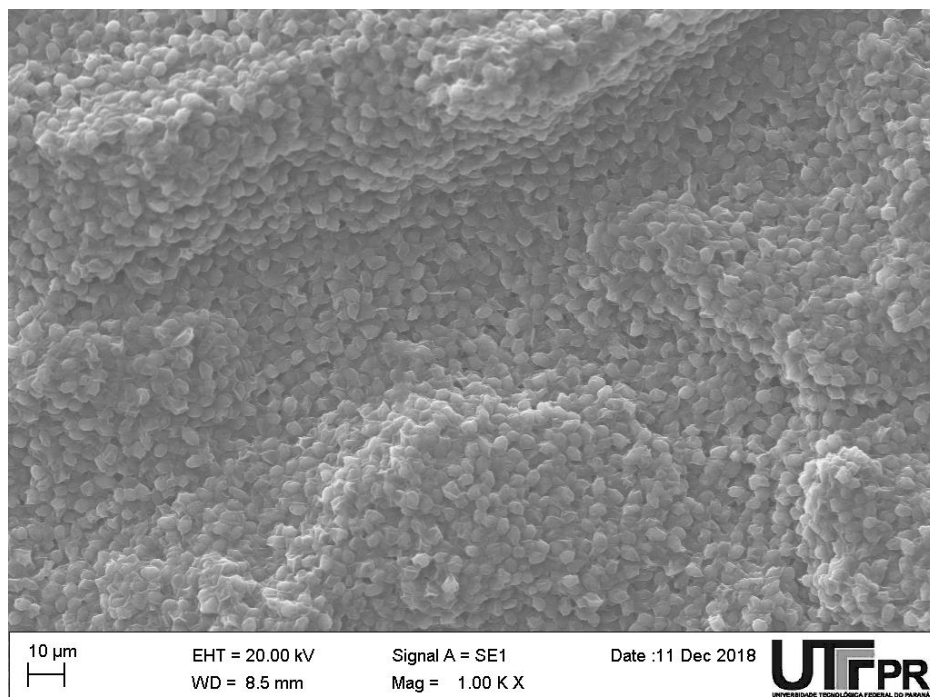
As imagens obtidas da levedura modificada ácida antes e após o processo de bioadsorção com o extrato de Camomila, com aumento de 1000 e 3000 vezes, estão apresentadas nas Figuras 15, 16, 17 e 18. As imagens obtidas da levedura modificada basicamente estão representadas nas Figuras 19 e 20, com o mesmo aumento e, as imagens da levedura básica bioadsorvida com o chá de Hibisco e o chá preto estão representadas nas Figuras 21 e 22, com aumento de 1000 e 3000 vezes, respectivamente, por apresentarem melhor visualização.



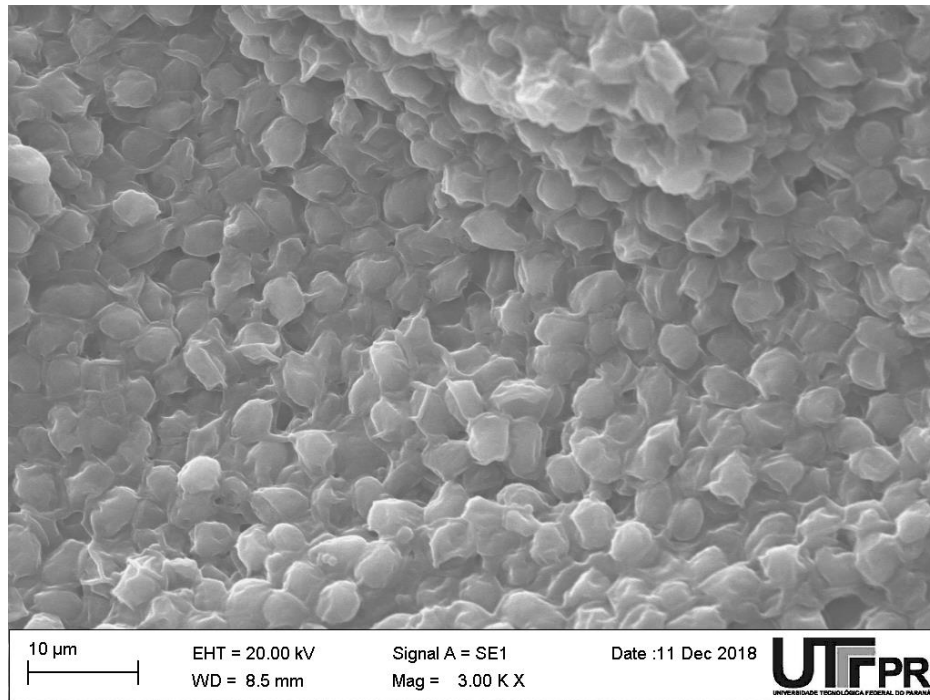
**Figura 15:** Eletromicrografia de varredura da *Saccharomyces cerevisiae* após modificação ácida, com aumento de 1000x.



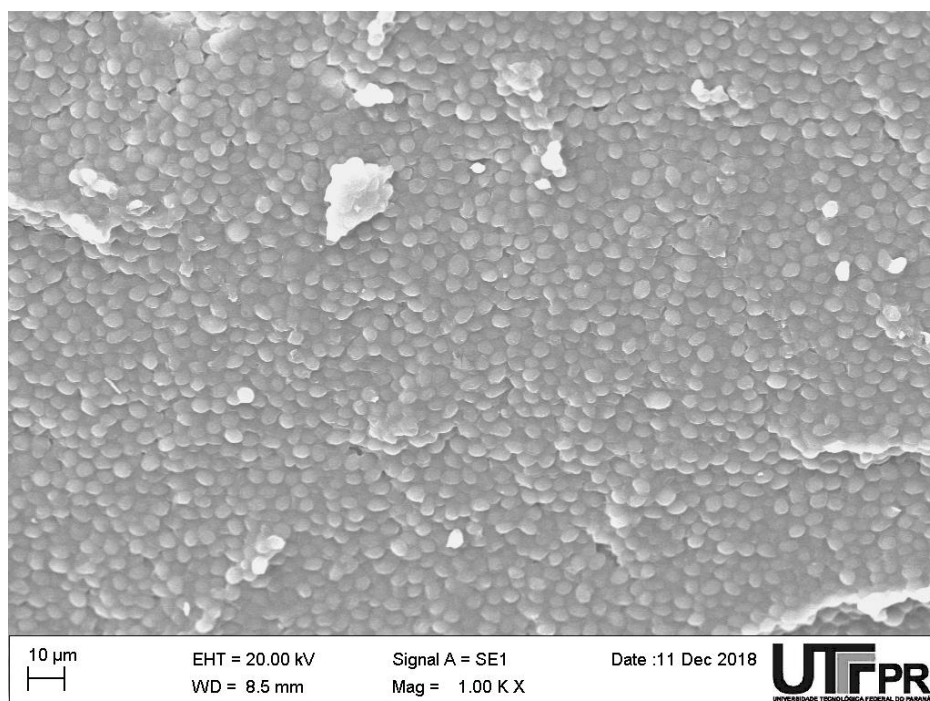
**Figura 16:** Eletromicrografia de varredura da *Saccharomyces cerevisiae* após modificação ácida, com aumento de 3000x.



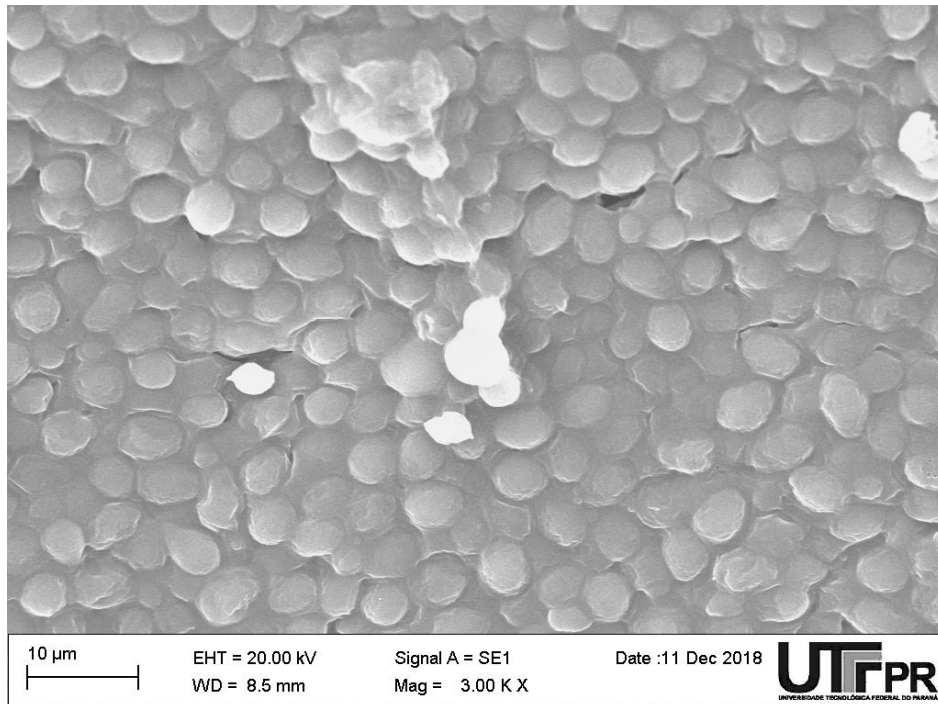
**Figura 17:** Eletromicrografia de varredura da *Saccharomyces cerevisiae* com modificação ácida, após bioadsorção com chá de Camomila, aumento de 1000x.



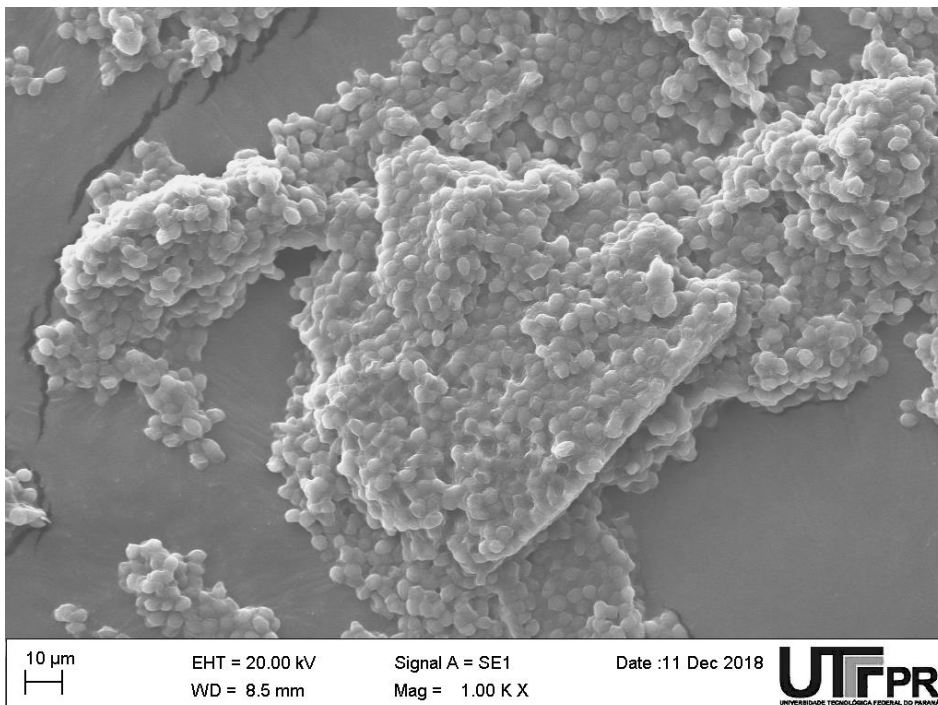
**Figura 18:** Eletromicrografia de varredura da *Saccharomyces cerevisiae* com modificação ácida, após biossorção com chá de Camomila, aumento de 3000x.



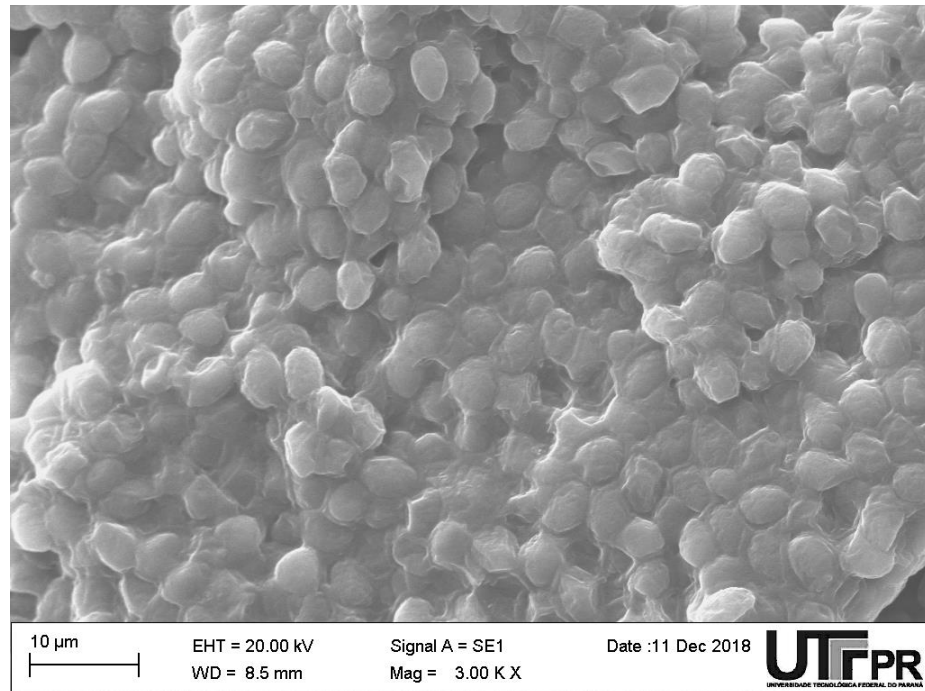
**Figura 19:** Eletromicrografia de varredura da *Saccharomyces cerevisiae* com modificação básica com aumento de 1000x.



**Figura 20:** Eletromicrografia de varredura da *Saccharomyces cerevisiae* com modificação básica com aumento de 1000x.



**Figura 21:** Eletromicrografia de varredura da *Saccharomyces cerevisiae* com modificação básica, após bioadsorção com chá preto, aumento de 1000x.



**Figura 22:** Eletromicrografia de varredura da *Saccharomyces cerevisiae* com modificação básica, após biossorção com chá de hibisco, aumento de 3000x.

Analisando as imagens, não é possível observar alterações significativas na estrutura da levedura, independente da modificação e do chá adsorvido.

Como interações ocorridas entre as moléculas adsorvidas e a levedura não são visualizadas em MEV, indica que a adsorção ocorrida não modifica a estrutura do microrganismo, sendo uma ligação apenas superficial com pouca ou nenhuma interação biológica entre as amostras. Isto se torna indicativo de possibilidade de uma recuperação desses compostos.

Já segundo a espectrometria de energia dispersiva, os principais elementos encontrados na levedura ácida, antes da biossorção (Figuras 15 e 16) foram N, O, P, Cl e K, provenientes apenas da própria levedura, podendo ser da parede celular, ou da parte interna da célula. Após a biossorção com chá de camomila (Figuras 17 e 18) os principais elementos encontrados foram C, O, P e K, onde o carbono, sendo um dos mais importantes elementos em compostos orgânicos, antes não havia sido acusado. Isto indica que é proveniente de componentes que antes estavam presentes no extrato, e passaram a estar na levedura.



Para a levedura básica, (Figuras 19 e 20) s principais elementos encontrados foram C, O, Na, P e K, sendo o Na proveniente da solução utilizada para modificação da amostra de levedura. Já após a biossorção, tanto com chá de Hibisco como com chá Preto, os principais elementos encontrados foram N, O, P e K. A amostra que é utilizada na análise de EDS, por ser muito pequena, pode não representar com muita assertividade, a amostra total, mesmo sendo um método apenas qualitativo. Isso explica o motivo de carbono não ser acusado em algumas amostras, sendo que ele compõe grande parte da parede celular da levedura.

## 7 CONCLUSÃO

A modificação química de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* se mostrou um eficiente modo de aprimorar as capacidades bioabsorptivas do material biológico, visto que as leveduras tratadas com ácido e base apresentaram as maiores capacidades de sorção. A levedura básica forneceu um aumento de 108,13% e 19,84% na capacidade de sorção dos CFT para os chás preto e hibisco, respectivamente. Já a levedura ácida apresentou uma capacidade de sorção dos CFT de 33,39% maior para o chá de camomila, ambas comparadas à levedura sem modificação.

Utilizando as isotermas pode-se perceber que o processo de bioabsorção dos compostos fenólicos do chá preto em levedura básica foi melhor descrito pelo modelo de Temkin, considerando uma diminuição no calor de adsorção com a cobertura do soluto dos sítios de ligação do adsorvente. Para o chá de hibisco, o mecanismo de bioabsorção da levedura alcalina foi melhor descrito por Freundlich, caracterizando um processo favorável e heterogêneo. Para o chá de camomila, a isoterma que apresentou o melhor mecanismo foi a isoterma de D-R que inferiu-se que a bioabsorção é um processo de natureza física.

A digestão *in vitro* dos extratos dos chás preto, hibisco e camomila, mostrou que a bioabsorção aumentou a bioacessibilidade e foi capaz de proteger a capacidade antioxidante total. A bioacessibilidade dos antioxidantes bioabsorvidos em levedura alcalinizada foi 192,48% maior para o chá preto e 132,12% maior para o chá de hibisco, em relação à levedura controle. Já para o chá de camomila, a bioacessibilidade dos antioxidantes bioabsorvidos em levedura ácida foi 96,03% maior.

Através da microscopia eletrônica, analisaram-se as estruturas do microrganismo, compreendendo que o processo realizado não as alterou, o que indica que a adsorção ocorre de maneira superficial em monocamada.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que é possível adsorver os compostos fenólicos provenientes de *Camellia sinensis*, *Hibiscus sabdariffa* e *Matricaria chamomilla* L. em *Saccharomyces cerevisiae*. A bioabsorção é uma maneira promissora de recuperar resíduos com importância nutricional na dieta humana e a biomassa enriquecida produzida após o processo é um novo

transportador de antioxidantes, capaz de protegê-los e distribuí-los. Este estudo abre novas perspectivas para o estudo de concentrados proteicos enriquecidos como novidade interessante para aplicações industriais.

## REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, O; AMIN, N. K. Adsorption of phenol from aqueous solutions by Luffacylindrica fibers: Kinetics, isotherm and thermodynamic studies. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 39, p. 215–223, 2013.

ACHKAR, Marina T. et al. Propriedade Antioxidante de Compostos Fenólicos: Importância na Dieta e na Conservação de Alimentos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 11, n. 2, p. 398-406, 2013

AHMAD, I.; ZAFAR, S.; AHAMAD, F. Heavy metal biosorption potencial os *Aspergillus* and *Rizopus* sp. Isolated from wastewater treated soil, *Journal of applied Sciences and Environmental Management*, v.9, n.1, p.123-126,2005.

ALMINGER, M. et al; In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility, 2014.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_181\\_2006\\_.pdf/2820acab-2175-45ae-939e-c4c92d9d9dd0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_181_2006_.pdf/2820acab-2175-45ae-939e-c4c92d9d9dd0)> acesso em 27 de Maio de 2019

ARIEF, V. O.; TRILESTARI, K.; SUNARSO, J.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Recent progress on biosorption of heavy metals from liquids using low cost biosorbents: Characterization, biosorption parameters and mechanism studies. *Clean – Soil, Air, Water*, v. 36, p. 937-962, 2008.

BAILEY, S. E.; OLIN, T. J.; BRICKA, R. M.; ADRIAN, D. D. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research*, v. 33, n. 11, 1999.

BERA, A.; KUMAR, T.; OJHA, K.; MANDAL, A. Adsorption of surfactants on sand surface in enhanced oil recovery: isotherms, kinetics and thermodynamic studies. *Applied Surface Science*, v. 284, p. 87–99, 2013.

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

BORBA, C. E.; GUIRARDELLO, R.; SILVA, E. A.; VEIT, M. T.; TAVARES, C. R. G. Removal of nickel(II) ions from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: Experimental and theoretical breakthrough curves. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 184–191, 2006.

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

CABRERA, C.; ARTACHO, C.; GIMÉNEZ, R. Beneficial effects of green tea – A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79–99, 2006.

CHASSAGNE, D., GUILLOUX-BENATIER, M., ALEXANDRE, H., & VOILLEY, A.(2005). Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry*, 91, 39–44.

CHEN, K.; LYU, H.; HAO, S.; LUO, G.; ZHANG, S.; CHEN, J. Separation of phenolic compounds with modified adsorption resin from aqueous phase products of hydrothermal liquefaction of rice straw. *Bioresource Technology*, v. 182, p. 160–168, 2015.

CHEN, Z.-M.; LIN, Z. Tea and human health: Biomedical functions of tea active components and current issues. *Journal of Zhejiang University. Science B*, 16, 87–102, 2015.

CHOY, K. K. H.; MCKAY, G.; PORTER, J. F. Sorption of acid dyes from effluents using activated carbon. *Resources. Conservation and Recycling*, v. 27, p. 57–71, 1999.

COONEY, D. O. *Adsorption Design for Wastewater Treatment*. Florida: CRC Press, 1999.

COYLE, C. H.; PHILIPS, B. J.; MORRISROE, S. N.; CHANCELLOR, M. B.; YOSHIMURA, N. Antioxidant effects of green tea and its polyphenols on bladder cells. *Life Sciences*, 83, 12–18, 2008.

CURI, B. G. et al. P-o68G-Capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio in vitro do hibisco liofilizado. *ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION*, v. 2, 2014.

DA CUNHA, Jersica Martins et al. Os efeitos do Hibisco (hibiscos sabdariffa) no emagrecimento<sup>1</sup>. *ANAIS SIMPAC*, v. 8, n. 1, 2018.

DA SILVA PINTO, M. Tea: A new perspective on health benefits. *Food Research International*, 53, 558–567, 2013.

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

DALLA COSTA M. A. 2001. Processo de produção agrícola da cultura da camomila no município de Mandirituba, PR, Curitiba, 63p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

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

DUPONT, M. S.; et al. Effect of Variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 48, p. 3957-3964, 2001.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, v. 24, p. 851–874, 2004.

FARAH, J. Y.; EL-GENDY, N. S.; FARAHAT, L. A. Biosorption of Astrazone Blue basic dye from an aqueous solution using dried biomass of Baker's yeast. *Journal of Hazardous Materials*, v. 148, p. 402–408, 2007.

FEBRIANTO, J.; KOSASIH, A. N.; SUNARSO, J.; JU, I. H.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: a summary of recent studies, *Journal of Hazardous Materials*. v. 162, p. 616–645, 2009.

FERREIRA, C. M. M.; SIMULAÇÃO in vitro DO PROCESSO DIGESTIVO DE PATULINA EM SUMOS DE FRUTA. Dissertação Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, 2014.

FERREIRA, E. A. B.; RESCK, D. V. S.; GOMES, A. C.; RAMOS, M. L. G. Dinâmica do carbono da biomassa microbiana em cinco épocas do ano em diferentes sistemas de manejo do solo no Cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. V. 31, 2007.

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

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

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

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

GERMAN, J. B.; WALZEM, R. L. The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition*, v. 20, p. 561–693, 2000.

GOHARI, M.; HOSSEINI, S. N.; SHARIFNIA, S.; KHATAMI, M. 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, p. 637–645, 2013.

GRAHAM, H.N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, San Diego, v.21, n.3, p.334-350, 1992.

HAMAYUN, M.; MAHMOOD, T.; NAEEM, A.; MUSKA, M.; DIN, S. U.; WASEEM, M. Equilibrium and kinetics studies of arsenate adsorption by FePO<sub>4</sub>. *Chemosphere*, v. 99, p. 207–215, 2014.

HAMINIUK, Charles W. I. et al, Phenolic Compounds in Fruits – An Overview. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 47, p. 2023-2044, 2012.

HAMPTON, M.E. Production of black tea. In: WILLSON, K.C.; CLIFFORD, M.N. (Eds.). *Tea cultivation to consumption*. London: Chapman & Hall, 1992. p.459-510.

HARBOURNE, N., Jacquier, J. C., O'Riordan, D. Optimisation of the extraction and processing conditions of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) for incorporation into a beverage. *Food Chemistry*, v. 115, 2009.

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

HO, Y. S.; WASE, D. A. J.; FORSTER, C. F. Kinetic studies of competitive heavy metal adsorption by sphagnum moss peat. *Environmental Technology*, v. 17, n. 1, p. 71-77, 1996.

HUR, S. J. et al. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 125, 2011.

JAMPANI, C.; NAIK, A.; 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.

JAYASEKERA, S. et al. Variation in antioxidant potential and total polyphenol content of fresh and fully-fermented Sri Lankan tea. *Food Chemistry*, v.125, p.536-41, 2011.

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

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, v. 81, p. 519–533, 2007.

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.

KUMAR, P. S. et al. 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.

LAGERGREN, S. Zurtheorie der sogenannten adsorption gel osterstoffe Sven K. *Vetenskapsakad. Handlingar*, v. 24, p. 1-39, 1898.

LAMARÃO, Renata C; FIALHO E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. *Revista de Nutrição, Campinas*, v, 22, p.257-269, 2009.



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

LIU, S.; HUANG, H. Assessments of antioxidant effect of black tea extract and its rationals by erythrocyte haemolysis assay, plasma oxidation assay and cellular antioxidant activity (CAA) assay. *Journal of Functional Foods*, 2014.

LUCAS-GONZÁLEZ, R., VIUDA-MARTOS, M., ÁLVAREZ, J. A. P., FERNANDEZLÓPEZ, J. Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, v. 256, p. 252–258, 2018.

MACIEL, G. M.; SOUZA, C. G. M.; ARAUJO, C. A. V.; BONA, E.; HAMINIUK, C. W. I.; CASTOLDI, R.; BRACHT, 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.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos Fenólicos do Vinho: Estrutura e Ação Anti-oxidante. *B. Ceppa, Curitiba*, v. 22, p. 233-252, 2004.

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

MATHIALAGAN, T.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 2, p. 549–558, 2009.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, p.401-07, 2006.

MCCABE W. L.; SMITH J. C.; HARRIOTT P. *Unit operations of chemical engineering*. 5. ed. McGraw-Hill, Inc. 1993.

MCKAY, L. D.; BLUMBERG, B. J. A review of the bioactivity and potencial health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, London, v. 20, Aug. 2006.

MESEGUER, V. F.; ORTUNO, J. F.; AGUILAR, M. I.; PINZÓN-BEDOYA, M. L.; LLORÉNS, M.; SÁEZ, J.; PÉREZ-MARÍN, A. B. Biosorption of cadmium (II) from aqueous solutions by natural and modified non-living leaves of *Posidonia oceanica*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016.

MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P.; LIU, R. H. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 6887–6892, 2003.

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

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*, v. 4, 2014.

MOHAN, S. V; RAO, N. C.; KARTHIKEYAN, J. Adsorptive removal of direct azo dye from aqueous phase onto coal based sorbents: a kinetic and mechanistic study. *Journal of Hazardous Materials*, v. 90, p. 189–204, 2002.

MORAIS, S. M., Cavalcanti, E. S. B., Costa, S. M. O., Aguiar, L. A. (2009). Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(1B), 315-320.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; VIDAL, C. B.; MELO, D. Q.; RAULINO, G. S. C. Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014.

NEHRING, Priscila et al. avaliação da capacidade antioxidante in vitro e determinação de compostos fenólicos totais em diferentes sistemas de extração em amostras de hibisco (*hibiscus sabdariffa*). In: *Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos*. 2015.

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

NOGUER, M., CERESO, A. B., RENTZSCH, M., WINTERHALTER, P., TRONCOSO, A. M., & GARCIA-PARRILLA, M. C. (2008). Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8879–8884.

NOVÁKOVÁ, L., Vildová, A., Mateus, J. P., Gonçalves, T., Solich, P. (2010). Development and application of UHPLC–MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. *Talanta*, 82, 1271-1280.

PARK, D.; YUN, Y.; PARK, J. M. The Past , Present , and Future Trends of Biosorption. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 15, p. 86–102, 2010.

RAAL, A., Orav, A., Pussa, T., Valner, C., Malmiste, B., Arak, E. (2012). Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in comercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. *Food Chemistry*, 131, 632-638.

RAFATULLAH, M.; SULAIMAN, O.; HASHIM, R.; AHMAD, R. Adsorption of copper (II), chromium (III), nickel (II) and lead (II) ions from aqueous solutions by meranti sawdust. *Journal of Hazardous Materials*, v.170, p. 969–977, 2009.

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

RUBIO, F.T.V. et al. Biossorção de compostos fenólicos de bagaços de uva em *saccharomycescerevisiae*: mecanismos do processo e bioacessibilidade; Dissertação de Mestrado; Campo Mourão, 2017.

RAZMKHAB, S., LOPEZ-TOLEDANO, A., ORTEGA, J. M., MAYEN, M., MERIDA, J., & MEDINA, M. (2002). Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7432–7437.

RIZZO, M., VENTRICE, D., VARONE, M. A., SIDARI, R., & CARIDI, A. (2006). HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 46–55.

RUTHVEN D. M. Principles of Adsorption and Adsorption Process. John Wiley & Sons: New York, 1984.

SALAMON, I. Chamomile producion in Czecho-Slovakia. *Focus on Herbs*, v. 10, n. 2, p. 5- 8,1992 b.

SANTOS, M. S.; RIBEIRO, F. M. Cervejas e refrigerantes. São Paulo: CETESB. p.58, 2005. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.2, p.153-66, 2007.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 18, p. 567–579, 2007.

SILVA, Marília L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SINGH, O., Khanem, Z., Misra, N., Srivastava, M. K. Chamomile (*Matricaria recutita* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews*, v. 5(9), 2011.

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

SOARES, Sergio E. Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. *Revista de Nutrição, Campinas*, v, 15, p. 71-81, 2002.

SOUSA CM, Silva HRE, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *QuimNova30*: 351-355.

SRIVASTAVA, J. K., Gupta, S. (2009). Extraction, Characterization, Stability and Biological Activity of Flavonoids Isolated from Chamomile Flowers. *Molecular & Cellular Pharmacology*, 1(3), 138-147.

SRIVASTAVA, J. K., Shankar, E., Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Molecular Medicine Reports*, 3(6), 895-901.

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

TANAKA, T.; KOUNO, I. Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. *Food Science and Technology Research*, Tsukuba, v.9, n.2, p.128-133, 2003.

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

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HAWKINS, D. Comparison of ABTS , DPPH , FRAP , and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 669–675, 2006.

VAN DER SLUIS A.A., DEKKER M., DE JAGER A., JONGEN W.M.F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidant in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3606-3613, 2001.

VELDE, F. V.; PIROVANI, M. E., DRAGO, S. R. Bioaccessibility analysis of anthocianins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. *Food Composition and Analysis*, v. 72, p. 22-31, 2018.

VERTOLI, U.; DAVIS, P. A.; DAL MASO, L.; MAIOLINO, G.; NASO, A.; PLEBANI, M.; CALÒ, L. A. Daily green tea extract supplementation reduces prothrombotic and inflammatory states in dialysis patients. *Journal of Functional Foods*, 5, 1366–1371, 2013.

VIEIRA, Isabel Pinto. Digestão in vitro e fermentação colônica de compostos fenólicos presentes no pão de goiaba. 2016.

VIJAYARAGHAVAN, K.; PADMESH, T. V. N.; PALANIVELU, K.; VELAN, M. Biosorption of nickel(II) ions onto *Sargassum wightii*: application of two parameter and three parameter isotherm models, *Journal of Hazardous Materials*, v. 133, p. 304–308, 2006.

VIZZOTTO, Márcia; PEREIRA, Marina Couto. Hibisco: do uso ornamental ao medicinal. Publicado em: *Diário da Manhã*, em, v. 4, n. 10, 2008.

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

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

YOUSEF, R. I.; EL-ESWED, B.; AL-MUHTASEB, A. H. Adsorption characteristics of natural zeolites as solid adsorbents for phenol removal from aqueous solutions: Kinetics, mechanism, and thermodynamics studies. *Chemical Engineering Journal*, v. 171, p. 1143–1149, 2011.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. H. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *FoodResearchInternational*, v. 60, p. 246–254, 2014.