

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIA CRISTINA JOSÉ

**Enriquecimento de biomassa de levedura cervejeira com ácido ascórbico  
por meio de bio-sorção e impregnação a vácuo**

JULIA CRISTINA JOSÉ

**Enriquecimento de biomassa de levedura cervejeira com ácido ascórbico  
por meio de bioadsorção e impregnação a vácuo**

*Versão corrigida*

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro-Trindade

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

J83e José, Julia Cristina  
Enriquecimento de biomassa de levedura  
cervejeira com ácido ascórbico por meio de biossorção  
e impregnação a vácuo / Julia Cristina José ;  
orientadora Carmen Sílvia Fávaro-Trindade. --  
Pirassununga, 2023.  
95 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de  
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade  
de São Paulo.

1. Biossorção. 2. Vitamina C. 3. Saccharomyces  
pastorianus. 4. Encapsulação. 5. Isotermas de  
adsorção. I. Fávaro-Trindade, Carmen Sílvia, orient.  
II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, primeiramente, por ter me permitido chegar até aqui, colocando sempre pessoas incríveis em meu caminho.

À minha família, principalmente aos meus pais, Marco e Ivone, por estarem sempre ao meu lado, acreditando em mim e me incentivando a seguir meus sonhos.

À minha orientadora Carmen, pelos ensinamentos, pelo carinho e por estar sempre presente e disposta a fazer o possível (e o impossível) para ajudar. Sou muito grata por tudo.

Ao técnico Marcelo, por todo o suporte com os experimentos e pela paciência e gentileza de sempre.

Aos apoios financeiros ofertados pelas agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de Financiamento 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2021/12730-0), sem os quais este trabalho não teria se concretizado.

À Universidade de São Paulo (USP-FZEA) e ao Laboratório de Encapsulação e Alimentos Funcionais (LENALIS/ZEA) por toda a estrutura para que fosse possível realizar os experimentos para a confecção deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelo interesse e aceite em participar das discussões para a melhoria deste trabalho.

E claro, aos meus amigos pessoais, aos companheiros de laboratório e a todos que cruzaram meu caminho e me ajudaram, direta ou indiretamente, a superar as dificuldades, tornando os últimos dois anos muito mais leves e felizes.

## RESUMO

**JOSÉ, J. C. Enriquecimento de biomassa de levedura cervejeira com ácido ascórbico por meio de biossorção e impregnação a vácuo.** 2023. 95 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

Visando agregar valor a um subproduto da indústria cervejeira e criar um novo transportador para veiculação de vitamina C, este trabalho propôs a utilização de biomassa de levedura *Saccharomyces pastorianus in natura* e modificada química e termicamente como um veículo para incorporação de vitamina C. Os materiais que apresentaram melhores resultados nos testes iniciais de biossorção foram a levedura *in natura* (LI) e a levedura após modificação alcalina (LA). Sendo assim, estes foram aplicadas para estudo de otimização de biossorção, avaliando as melhores condições para o processo, sendo que a dosagem do biossorvente foi otimizada em 7,5 g/L, o pH da solução de vitamina C foi 3,0, o tempo de contato entre sorvente e sorvato foi de 300 min para LI e 180 min para LA, enquanto a concentração inicial de vitamina C foi de 1000 µg/mL, alcançando uma capacidade de sorção experimental de  $19,11 \pm 0,97$  mg/g e  $18,11 \pm 2,77$  mg/g para LI e LA, respectivamente. Os modelos isotérmicos de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich, Sips e Temkin foram ajustados aos dados experimentais, e Sips foi o que melhor descreveu a biossorção de vitamina C por *Saccharomyces pastorianus*, indicando que fenômenos de natureza química e física ocorrem e contribuem para o processo. As partículas carregadas com vitamina C foram, então, preparadas nas condições otimizadas, visando a caracterização desses biossorventes de levedura *in natura* e alcalina após a biossorção de ácido ascórbico (LI-AA e LA-AA, respectivamente), e avaliação da estabilidade. Assim, os materiais antes e após a biossorção foram avaliados quanto a morfologia, através de Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia Confocal de Varredura a Laser, além da avaliação das conformações moleculares por meio de Espectroscopia de Radiação na região do Infravermelho com Transformada de Fourier, e da medida de potencial zeta, mobilidade eletroforética, umidade e atividade de água. A

estabilidade demonstrou que a concentração de vitamina C encapsulada após 35 dias decai para  $38,83 \pm 1,21$  % e  $35,29 \pm 0,29$  %. A impregnação a vácuo também apresentou resultados muito favoráveis, atingindo capacidade de sorção de  $25,15 \pm 1,01$  mg/g em concentração inicial de 5000 µg/mL, empregando LI. Os modelos isotérmicos também foram aplicados, sendo o de Sips o que obteve os melhores ajustes aos dados experimentais, demonstrando que as interações ocorrentes entre vitamina C e levedura também são de natureza tanto física, quanto química. Assim, com este trabalho, foram produzidos veículos inovadores, eficientes e de baixo custo, além da vantagem de se agregar valor a um subproduto industrial gerado em larga escala no Brasil.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces pastorianus*, vitamina C, isotermas de adsorção, HPLC, liofilização.

## Abstract

JOSÉ, J. C. **Enrichment of brewer's yeast biomass with ascorbic acid by biosorption and vacuum impregnation.** 2023. 95 f. (M.Sc) Dissertation – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2023.

Aiming to add value to a by-product of the brewing industry and to create a new transporter for the delivery of vitamin C, this work proposed the use of yeast biomass *Saccharomyces pastorianus in natura* and chemically and thermally modified as a vehicle for the incorporation of vitamin C. The materials that obtained better results in the initial biosorption tests were yeast *in natura* (LI) and yeast after alkaline modification (LA), therefore, these were applied for the study of biosorption optimization, evaluating the best conditions for the process, and the biosorbent dosage was optimized at 7.5 g/L, the pH of the vitamin C solution was 3.0, the contact time between sorbent and sorbate was 300 min for LI and 180 min for LA, while the initial concentration of vitamin C was 1000 µg/mL, reaching an experimental sorption capacity of  $19.11 \pm 0.97$  mg/g and  $18.11 \pm 2.77$  mg/g for LI and LA, respectively. The isothermal models of Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich, Sips and Temkin were adjusted to the experimental data, and Sips was the one that best described the biosorption of vitamin C by *Saccharomyces pastorianus*, indicating that chemical and physical phenomena occur and contribute to the process. Particles loaded with vitamin C were then prepared under optimized conditions, aiming at the characterization of these *in natura* and alkaline yeast biosorbents after ascorbic acid biosorption (LI-AA and LA-AA, respectively), and stability assessment. Thus, the materials before and after biosorption were evaluated for morphology, through Optical Microscopy, Scanning Electron Microscopy, Confocal Laser Scanning Microscopy, in addition to the evaluation of molecular conformations by means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, and measurement of zeta potential, electrophoretic mobility, moisture and water activity. Stability showed that the concentration of encapsulated vitamin C after 35 days decreases to  $38.83 \pm 1.21\%$  and  $35.29 \pm 0.29\%$ . The vacuum impregnation also showed very favorable results, reaching a sorption capacity of  $25.15 \pm 1.01$  mg/g at an initial

concentration of 5000 µg/mL, using LI. Isothermal models were also applied, with Sips being the one that obtained the best adjustments to the experimental data, demonstrating that the interactions between vitamin C and yeast are both physical and chemical in nature. Thus, with this work, innovative, efficient and low-cost vehicles were produced, in addition to the advantage of adding value to an industrial by-product generated on a large scale in Brazil.

**Keywords:** *Saccharomyces pastorianus*, vitamin C, adsorption isotherms, HPLC, lyophilization.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural do ácido ascórbico.....18
- Figura 2.** Representação da diferença entre microcápsula e microesfera.....20
- Figura 3.** Fluxograma das etapas propostas para a execução do projeto.....31
- Figura 4.** Leveduras durante a etapa de lavagem, sendo (A) 1ª lavagem, (B) 2ª lavagem, (C) 3ª lavagem, (D) 4ª lavagem e (E) 5ª lavagem.....32
- Figura 5.** Procedimentos para produção de ascósporos: (A) levedura cervejeira residual; (B) cultivo de células de levedura em meio YPDA; (C) cultivo em meio com agente estressor; (D) enxague da lâmina após adição do corante verde malaquita; (E) visualização por microscopia óptica.....35
- Figura 6.** Microfotografia de células de levedura cultivada após coloração de Wirtz-Conklin, com aumento de 40x.....43
- Figura 7.** Micrografias comparando (A) célula vegetativa e (B) ascósporos.....44
- Figura 8.** Curva de calibração construída para quantificação de vitamina C...46
- Figura 9.** Perfil cromatográfico (A) da solução de ácido ascórbico, e das amostras após 2 horas de bio-sorção, utilizando os bio-sorventes de levedura (B) *in natura*; (C) plasmolisada; (D) modificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (E) modificada com NaOH e (F) autoclavada.....47
- Figura 10.** Micrografias das células de levedura *in natura* (A) antes e (B) após sorção; plasmolisada (C) antes e (D) após sorção; modificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (E) antes e (F) após sorção; modificada com NaOH (G) antes e (H) após sorção; e autoclavada (I) antes e (J) após sorção.....53
- Figura 11.** Efeito da dosagem dos bio-sorventes, variando a massa entre 10 e 200 mg de levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA) e mantendo o volume de vitamina C constante. n=3.....56
- Figura 12.** Efeito do pH da solução de vitamina C no processo de bio-sorção empregando levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA), utilizando os valores de pH entre 2 e 7. n=3.....57
- Figura 13.** Cinética de bio-sorção de vitamina C empregando levedura *in natura* (LI) variando os tempos entre 30 e 420 min e levedura alcalina (LA) variando os tempos entre 10 e 240 min. n=3.....59

- Figura 14.** Dados experimentais de capacidade de sorção e ajustes dos modelos isotérmicos empregando levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA) para bio-sorção de vitamina C, variando as concentrações iniciais entre 50 e 5000 µg/mL. n=3..... **60**
- Figura 15.** Efeito da dosagem de levedura *in natura* (LI) para impregnação a vácuo, variando a massa entre 10 e 500 mg e mantendo o volume de vitamina C constante. n=3..... **65**
- Figura 16.** Efeito do tempo de vácuo para impregnação de vitamina C utilizando levedura *in natura* (LI), com variação entre 10 e 60 segundos. n=3..... **66**
- Figura 17.** Dados experimentais de capacidade de sorção e ajustes dos modelos isotérmicos empregando levedura *in natura* (LI) para impregnação a vácuo de vitamina C, variando as concentrações iniciais entre 50 e 5000 µg/mL. n=3..... **68**
- Figura 18.** Micrografias de levedura *in natura* (LI), levedura alcalina (LA), levedura *in natura* após bio-sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e levedura alcalina após bio-sorção de ácido ascórbico (LA-AA), com magnificação de 500, 1500 e 3000×..... **71**
- Figura 19.** Micrografias confocal de levedura *in natura* (LI), levedura alcalina (LA), levedura *in natura* após bio-sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e levedura alcalina após bio-sorção de ácido ascórbico (LA-AA)..... **73**
- Figura 20.** Espectros de infravermelho de ácido ascórbico (AA), levedura *in natura* (LI), levedura alcalina (LA), levedura *in natura* após bio-sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e levedura alcalina após bio-sorção de ácido ascórbico (LA-AA)..... **75**
- Figura 21.** Estabilidade das partículas de levedura *in natura* após sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e de levedura alcalina após sorção de ácido ascórbico (LA-AA), em um período entre 0 e 35 dias. n=3..... **81**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Equações não-lineares e parâmetros de alguns dos principais modelos isotérmicos.....**24**
- Tabela 2.** Porcentagem de vitamina C sorvida pelos biossorventes de levedura (*in natura*, plasmolisada, modificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, modificada com NaOH e autoclavada), em diferentes tempos de contato (2, 6 e 24 horas).....**49**
- Tabela 3.** Valores de capacidade de sorção experimental (CS<sub>exp</sub>) e parâmetros isotérmicos empregando levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA) na biossorção de vitamina C.....**61**
- Tabela 4.** Valores de capacidade de sorção experimental (CS<sub>exp</sub>) e parâmetros isotérmicos empregando levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA) na biossorção de vitamina C.....**67**
- Tabela 5.** Valores de potencial zeta e mobilidade eletroforética de levedura *in natura* (LI), levedura alcalina (LA), levedura *in natura* após biossorção de ácido ascórbico (LI-AA) e levedura alcalina após biossorção de ácido ascórbico (LA-AA). n=3.....**77**
- Tabela 6.** Valores de umidade e de atividade de água das partículas de levedura *in natura* após sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e de levedura alcalina após sorção de ácido ascórbico (LA-AA) durante o estudo de estabilidade (de 0 a 35 dias). n=3.....**79**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL.....	17
2.1. Vitamina C.....	17
2.2. Microencapsulação .....	19
2.3. Secagem por liofilização.....	20
2.4. Biossorção .....	21
2.5. Material biossorvente - <i>Saccharomyces pastorianus</i> .....	25
2.6. Células vegetativas e ascósporos de <i>Saccharomyces</i> .....	27
2.7. Tratamentos e pré-tratamentos em biossorventes .....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Material.....	30
4.2. Metodologia.....	30
4.2.1. Preparo dos biossorventes de levedura.....	32
4.2.1.1. Plasmólise.....	33
4.2.1.2. Modificação ácida e básica.....	33
4.2.1.3. Modificação térmica.....	33
4.2.2. Cultivo de levedura para formação de ascósporos.....	34
4.2.3. Estudos de biossorção.....	35
4.2.3.1. Dosagem de biossorvente.....	36
4.2.3.2. Teste de pH de sorção.....	36
4.2.3.3. Cinética de sorção.....	37

4.2.3.4.	Capacidade de sorção.....	37
4.2.4.	Estudos de dessorção.....	38
4.2.5.	Impregnação a vácuo.....	38
4.2.6.	Determinação de ácido ascórbico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	39
4.2.7.	Secagem por liofilização.....	39
4.2.8.	Caracterização dos biossorventes.....	39
4.2.8.1.	Microscopia óptica.....	40
4.2.8.2.	Composição centesimal.....	40
4.2.8.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40
4.2.8.4.	Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	40
4.2.8.5.	Espectroscopia de Radiação na região do Infravermelho com Transformada de Fourier.....	41
4.2.8.6.	Potencial zeta e mobilidade eletroforética .....	42
4.2.8.7.	Umidade e atividade de água.....	42
4.2.9.	Estudo de estabilidade da vitamina C.....	42
4.2.10.	Análise estatística.....	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1.	Cultivo de leveduras para formação de ascósporos.....	43
5.2.	Testes preliminares de biossorção.....	45
5.3.	Microscopia óptica.....	52
5.4.	Estudo de otimização de biossorção.....	55
5.4.1.	Dosagem de biossorvente.....	56
5.4.2.	Teste de pH de sorção.....	57
5.4.3.	Cinética de sorção.....	58

5.4.4. Capacidade de sorção.....	60
5.5. Estudos de dessorção.....	63
5.6. Incorporação a vácuo.....	64
5.7. Caracterização dos biossorventes.....	69
5.7.1. Composição centesimal.....	69
5.7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	70
5.7.3. Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	72
5.7.4. Espectroscopia de Radiação na região do Infravermelho com transformada de Fourier.....	75
5.7.5. Potencial zeta e mobilidade eletroforética.....	77
5.7.6. Umidade e atividade de água.....	78
5.8. Estudo de estabilidade.....	80
6. CONCLUSÕES.....	82
7. REFERÊNCIAS.....	83

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A vitamina C, ou ácido ascórbico, possui uma importante função antioxidante capaz de reduzir o risco de câncer, além de apresentar várias outras funções biológicas, farmacêuticas e dermatológicas, no entanto, trata-se de uma vitamina que não é produzida pelo corpo humano, podendo ser encontrada naturalmente em alimentos como acerola, laranja, limão, brócolis e pimentão (BLOOMER & FISHER-WELLMAN, 2009). Por ser um ótimo agente redutor, a vitamina C é oxidada facilmente, o que provoca sua degradação de maneira mais rápida (CHANG *et al.*, 2010).

Para reduzir estes problemas relacionados à instabilidade da vitamina C, a microencapsulação surge como uma alternativa, pois permite a liberação controlada do bioativo em questão, com a ideia de protegê-lo de condições adversas, aumentando sua vida útil (COMUNIAN & FÁVARO-TRINDADE, 2016).

A biossorção é outra alternativa que vem ganhando destaque recente na área de alimentos (ROSSETTO *et al.*, 2020; STAFUSSA *et al.*, 2016), pois trata-se de uma das técnicas de maior importância em processos de separação e purificação, e que apresenta baixo custo e grande potencial, utilizando-se de resíduos biológicos, como a *Saccharomyces pastorianus*, um subproduto amplamente disponível, de baixo valor agregado e que possui alto valor nutricional (RUSU *et al.*, 2022).

Assim, o uso de leveduras residuais de cervejaria foi pensado como alternativa de veículo para incorporação de vitamina C e, neste contexto, o processo de biossorção auxilia não somente na recuperação do bioativo, como também acaba se tornando uma opção para reaproveitar resíduos com grande potencial em pesquisas científicas.

No entanto, algumas biomassas, principalmente as provenientes de resíduos industriais, podem ter sua capacidade de sorção aumentada após algum tipo de tratamento químico ou físico, visto que estes podem auxiliar na exposição ou modificação de sítios de ligação presentes na composição do material, tornando-os disponíveis para se ligarem com os compostos de interesse (VIJAYARAGHAVAN & YUN, 2008). Diversos trabalhos, inclusive com biomassa de levedura, vêm relatando uma melhora significativa na capacidade de sorção após a realização de pré-tratamentos (ZHANG *et al.*, 2020; RUBIO *et*

*al.*, 2018; JIANLONG, 2002), sendo assim, uma alternativa com grande potencial para facilitar o processo de biossorção de vitamina C por células de *Saccharomyces pastorianus*.

Da mesma forma, também pensando em otimizar o processo de incorporação do ácido ascórbico, a impregnação a vácuo se apresenta como uma alternativa interessante, simples e rápida, que consiste na criação de uma pressão negativa, permitindo que os poros do material se abram, facilitando a incorporação do composto de interesse. Esta técnica vem sendo relatada para encapsulação de curcumina (YOUNG *et al.*, 2017), probióticos e compostos bioativos (SILVA *et al.*, 2023), de enzima pectinametilesterase (GUILLEMIN *et al.*, 2008), mas ainda é pouco explorada para outros bioativos e vitaminas, sendo assim, uma proposta inovadora para incorporação de ácido ascórbico em células de *Saccharomyces pastorianus*.

De acordo com a literatura consultada, também vale ressaltar que faltam trabalhos que proponham o uso de biossorção na área de alimentos, principalmente utilizando *Saccharomyces pastorianus*, ainda pouco aplicada como biossorvente.

Sendo assim, a utilização da técnica de biossorção e de impregnação a vácuo por células de leveduras residuais do gênero *Saccharomyces pastorianus* para encapsulação de vitamina C torna-se relevante e inovadora, contemplando aspectos importantes que visam a reutilização de resíduos com alto apelo nutricional para a proteção e liberação controlada de nutrientes importantes.



## 2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL

### 2.1. Vitamina C

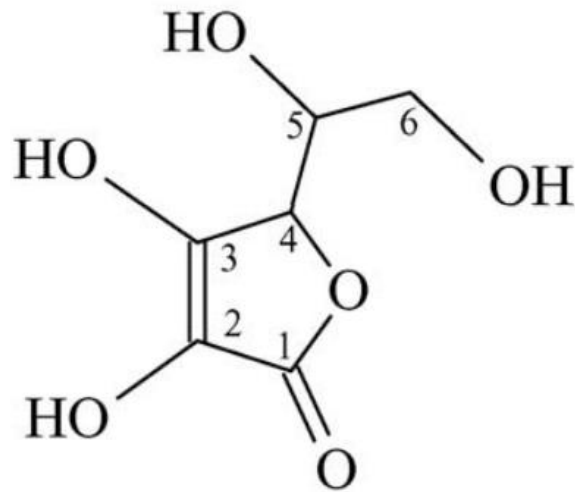
A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é um composto hidrossolúvel presente naturalmente em diversas frutas e hortaliças, no entanto, apesar de essencial, o ácido ascórbico não é sintetizado naturalmente pelo corpo humano, sendo assim, é necessário que sua ingestão seja realizada por fontes exógenas (SPÍNOLA *et al.*, 2013; BLOOMER & FISHER-WELLMAN, 2009), com uma recomendação de, no mínimo, 45 mg/dia, segundo a Organização Mundial da Saúde (FAO WHO, 2004), visto que a deficiência do ácido ascórbico no organismo pode causar problemas.

Um dos problemas causados pela falta de ácido ascórbico no organismo é a doença do escorbuto, cujo nome deu origem ao ácido “ascórbico”, devido à influência deste composto para combater a doença, muito comum no século XVIII, época das grandes expedições marítimas, em que os marinheiros ficavam muito tempo sem a ingestão de frutas e hortaliças (DAVEY *et al.*, 2000; ESTEVINHO *et al.*, 2016).

A importância da vitamina C e os problemas relacionados à sua deficiência ocorrem devido à sua participação no processo de cicatrização, crescimento de tecidos, síntese de colágeno, manutenção dos vasos sanguíneos, absorção de ferro, regulação do sistema nervoso e fortificação do sistema imunológico, além de atuar como cofator de enzimas e também na proteção celular contra radicais livres e neutralização de substâncias carcinogênicas (SZULTKA *et al.*, 2014; SPÍNOLA *et al.*, 2013).

A designação química para a vitamina C ( $C_6H_8O_6$ ) é ácido L-ascórbico, sendo o “L” devido à presença de carbono assimétrico em sua estrutura, e a consequente atividade óptica atribuída ao composto. Ao observar a Figura 1, também é possível notar a presença de grupos funcionais oxigenados em sua estrutura: éster, no carbono 1; enóis, nos carbonos 2 e 3; e álcoois, nos carbonos 5 e 6. Assim, em meio aquoso, devido sua estrutura química, a vitamina C torna-se um composto instável, atuando mais facilmente como agente redutor e, conseqüentemente, sofrendo oxidação (SZULTKA *et al.*, 2014; EITENMILLER & LANDEN, 2008).

**Figura 1.** Fórmula estrutural do ácido ascórbico.



Fonte: ZUMREOGLU-KARAN, 2006.

Assim, além das funções biológicas extremamente importantes, a vitamina C é muito utilizada também na indústria alimentícia, farmacêutica e dermatológica, devido à sua forte ação antioxidante, capaz de combater radicais livres que podem danificar o DNA humano (ABBAS *et al.*, 2012).

Por este motivo, torna-se também uma ótima opção de aditivo alimentar, no entanto, o maior desafio do uso da vitamina C é devido à sua elevada instabilidade ao ar, temperatura, umidade, luz, pressão e pH, sendo considerado o nutriente mais propenso à degradação, que ocorre de ácido ascórbico para ácido dehidroascórbico e, posteriormente para ácido dicetogulônico (sem atividade vitamínica), podendo, assim, promover perdas nutricionais e modificações indesejáveis nos alimentos que o contém (CHANG *et al.*, 2010; DESAI & PARK, 2005; JOHNSTON *et al.*, 2007).

Assim, visando minimizar as desvantagens associadas à vitamina C, a microencapsulação vem sendo considerada uma alternativa viável para conferir maior estabilidade ao composto, permitindo sua liberação controlada (TRINDADE & GROSSO, 2000; COMUNIAN *et al.*, 2013).

## 2.2. Microencapsulação

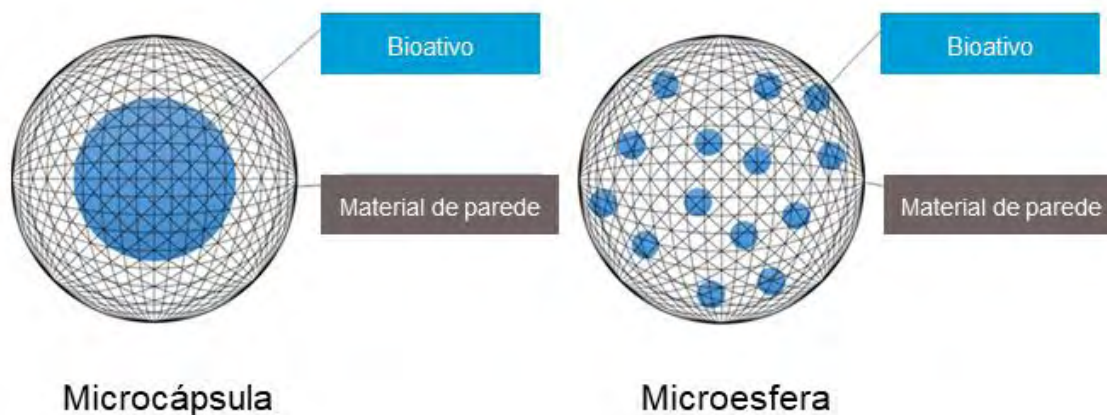
A microencapsulação é uma técnica amplamente utilizada no intuito de aprisionar compostos e protegê-los de condições adversas, como luz, calor, oxigênio e interação com outros compostos, diminuindo perdas nutricionais e prolongando sua vida útil (DESAI & PARK, 2005), permitindo o emprego de aditivos em alimentos de forma que haja maior estabilidade.

Assim, a ideia da microencapsulação é compactar o composto no núcleo do material de parede, que pode ser diversos tipos de polissacarídeos, lipídios e proteínas, por exemplo. Vale destacar que grande parte da aplicação desta técnica é na área alimentícia e, por este motivo, o material de parede não pode interferir na qualidade sensorial do produto, e o mesmo também deve resistir à digestão no sistema digestório, para que haja a proteção efetiva do bioativo (RAY *et al.*, 2016).

O termo “microencapsulação” é o mais utilizado, visto que o tamanho da maior parte das partículas produzidas e exploradas na literatura é comumente de 0,2 a 5.000  $\mu\text{m}$ . Caso tenham menos de 0,2  $\mu\text{m}$ , será formada uma nanocápsula, enquanto acima de 5000  $\mu\text{m}$ , uma macrocápsula (SILVA *et al.*, 2014).

Outra informação que vale ser ressaltada é a diferença entre microcápsulas e microesferas (Figura 2), uma vez que são conceitos morfológicos comumente confundidos. Uma microcápsula só deve ser assim chamada quando o bioativo está compactado no núcleo do material de parede. Quando isso não ocorre, e o bioativo fica na superfície ou disperso no encapsulante, tem-se uma microesfera, onde o bioativo fica protegido, mas não totalmente empacotado como idealmente ocorreria com a formação de uma microcápsula (SILVA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018).

**Figura 2.** Representação da diferença entre microcápsula e microesfera.



Fonte: PEREIRA *et al.*, 2018.

Neste contexto, a técnica de microencapsulação se apresenta como uma alternativa relevante, podendo utilizar diversos métodos para obtenção de materiais encapsulados, tais como: *spray drying*, *spray chilling*, extrusão, leite fluidizado, coarervação e liofilização. Para tal, utiliza-se um material de parede juntamente com o composto a ser protegido (FÁVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

Como já citado, diversos tipos de materiais podem ser utilizados como revestimentos para microencapsulação, no entanto, utilizar resíduos biológicos e buscar aprimorar o processo de enriquecimento por meio de um estudo de biossorção seria um diferencial, ainda pouco relatado na literatura.

### 2.3. Secagem por liofilização

A atomização é uma das técnicas de secagem com grande aplicação na área de alimentos, por apresentar uma boa estabilidade do produto final, sendo muito utilizado em escala industrial (MADENE *et al.*, 2006), no entanto, a corrente de ar quente, que faz com que as partículas sejam desidratadas, pode degradar alguns compostos de interesse que sejam mais sensíveis à temperatura, como a vitamina C, que oxida facilmente em temperaturas mais elevadas (PEREIRA *et al.*, 2018; RAY *et al.*, 2016).

Neste contexto, a liofilização se apresenta como uma alternativa mais favorável, visto que se trata de um método de secagem em que a amostra é inicialmente congelada, e a água presente é removida através da sublimação do gelo, sem que ocorra a transição para o estado líquido. A liofilização é amplamente utilizada para prolongar a vida útil de produtos sensíveis ao calor e à umidade, preservando suas características físicas e químicas (HASE & OSWAL, 2022).

O processo de liofilização ocorre em várias etapas. Primeiro, o material a ser liofilizado é congelado a temperaturas muito baixas, em seguida, o vácuo é aplicado à câmara de liofilização, reduzindo a pressão e permitindo que o gelo presente no material seja sublimado diretamente de sua fase sólida para gasosa. Esse processo ocorre sob condições de baixa temperatura, evitando a formação de gotículas líquidas e preservando a estrutura do material. A sublimação do gelo durante a liofilização acarreta na remoção da umidade, resultando em uma desidratação eficiente do material (JENNING, 1999).

Assim, a liofilização oferece várias vantagens em relação a outros métodos de secagem, como a preservação das propriedades físicas e químicas do material, como forma, estrutura, aroma, sabor e atividade biológica, uma vez que a desidratação ocorre sem a necessidade de aquecimento excessivo (OZKAN *et al.*, 2018; HASE & OSWAL, 2022).

#### **2.4. Biossorção**

A sorção é um mecanismo que pode ser utilizado tanto para absorção quanto para adsorção. Nestas, ocorrem, respectivamente, a incorporação ou a aderência de um composto a um material sorvente, a partir de interações entre os grupos funcionais do biossorvente e do analito, quando estes possuírem afinidade (FOMINA & GADD, 2014).

Neste contexto, o termo “biossorção” se refere ao mecanismo de sorção empregando biomassas provenientes de organismos microbianos, vegetais, animais, ou seus produtos derivados. Tais materiais de origem biológica são favoráveis por serem comumente ricos em sítios ativos variados, que são responsáveis pelo processo de sorção (GADD, 2009).

Uma das pesquisas pioneiras utilizando a biossorção foi publicada por Ullrich & Smith (1951), visando a remoção de contaminantes de esgoto doméstico. A partir disso, a biossorção começou a ganhar destaque, visto que envolve o reaproveitamento de resíduos com baixo valor agregado, sendo assim, uma técnica econômica e ecologicamente favorável (ARIEF *et al.*, 2008), com uma variedade de pesquisas recentes, principalmente para descontaminação de matrizes aquosas (ABILIO *et al.*, 2021; JOSÉ *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2016; MOUBARIK & GRIMI, 2015) mas, também possui grande potencial de aplicação na área de alimentos (ROSSETTO *et al.*, 2020; RUBIO *et al.*, 2018), explorando o emprego da biossorção de bioativos que necessitam de proteção contra fatores externos.

Alguns parâmetros relacionados à biossorção, como a dose do biossorvente, o pH da solução de sorvato, a concentração inicial e o tempo de contato entre sorvente e sorvato devem ser avaliados, uma vez que influenciam diretamente na capacidade de sorção máxima pelo material em questão ( $q_e$ ), expresso em mg/g.

O  $q_e$  é calculado através da relação entre os parâmetros massa do sorvente ( $m$ ), em g, volume do sorvato ( $V$ ), em L, e sua concentração final ( $C_f$ ) e inicial ( $C_0$ ), em mg/L (ou  $\mu\text{m/mL}$ ), conforme mostra a Equação 1 (DABROWSKI, 2001).

$$q_e = \frac{C_0 - C_f}{m} \times V \quad (\text{Equação 1})$$

A partir dos cálculos propostos pela Equação 1, sabe-se a quantidade de sorvato que foi retida, em mg/g de sorvente. Assim, para melhor compreensão dos dados experimentais obtidos através dos estudos de biossorção, também são comumente aplicados modelos matemáticos de cinética e de isotermas de sorção.

A cinética fornece informações sobre a velocidade da reação e os fatores que afetam essa velocidade, relacionando a concentração de sorvente com o tempo de contato entre ele e o sorvato, visto que sua concentração é diminuída até que o equilíbrio dinâmico seja atingido, e isso ocorre quando a quantidade

sorvida é a mesma que está sendo dessorvida, uma vez que os sítios livres de sorção são preenchidos (MICHALAK *et al.*, 2013; DABROWSKI, 2001).

Para compreender melhor os mecanismos envolvidos na cinética de sorção, os dois modelos matemáticos mais aplicados são o de pseudo-primeira (LAGERGREN, 1898) e de pseudo-segunda ordem (HO & MCKAY, 1999), sendo que, no primeiro, é assumido que a quantidade de sítios é proporcional à velocidade da reação, enquanto, no segundo, é proposto que a velocidade de reação é proporcional ao quadrado do número de sítios disponíveis (MICHALAK *et al.*, 2013).

Além dos testes cinéticos, também é importante realizar testes de capacidade máxima de sorção, utilizando concentrações crescentes de sorvato, a fim de avaliar as relações termodinâmicas envolvidas até que o equilíbrio seja atingido, fornecendo informações sobre como ocorre a distribuição do sorvato entre as fases líquida e sólida quando as concentrações são variadas (RANGABHASHIYAM *et al.*, 2014).

Assim, a partir da otimização de parâmetros de dosagem, pH e cinética, é possível construir isotermas de sorção com concentrações iniciais crescentes, relacionando a capacidade máxima do material com a concentração final de sorvato, a uma dada temperatura. Aos dados experimentais de capacidade de sorção são comumente aplicados modelos matemáticos de isotermas, sendo os de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich, Temkin, Sips e Hill, alguns dos mais utilizados (FOO & HAMEED, 2010). A Tabela 1 mostra as equações não-lineares e os respectivos parâmetros correspondentes a cada um dos modelos citados.

**Tabela 1.** Equações não-lineares e parâmetros de alguns dos principais modelos isotérmicos.

Modelo isotérmico	Equação não-linear	Descrição dos parâmetros
<b>Langmuir</b> (LANGMUIR, 1916)	$q_e = \frac{q_m b C_e}{1 + b C_e}$	b = Constante de Langmuir (L/mg)
<b>Freundlich</b> (FREUNDLICH, 1906)	$q_e = K_f C_e^{1/n}$	n = Heterogeneidade da superfície do sorvente (adimensional) K <sub>f</sub> = Afinidade de sorção (L/mg)
<b>D-R (DUBININ &amp; RADUSHKEVICH, 1947)</b>	$q_e = q_{DR} \exp(-B_{DR} \epsilon^2)$	B <sub>DR</sub> = Constante relacionada à energia de sorção (L/mg) ε = Potencial Polanyi
<b>Temkin</b> (TEMKIN & PYZHEV, 1940)	$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln A_T C_e$	R = Constante dos gases (J/mol K) T = Temperatura (K) b <sub>T</sub> = Constante relacionada ao calor de sorção (J/mol) A <sub>T</sub> = Constante de equilíbrio de Temkin (L/mg)
<b>Sips (SIPS, 1948)</b>	$q_e = \frac{q_m (K_S C_e)^n}{1 + (K_S C_e)^n}$	K <sub>S</sub> = Constante relacionada à afinidade de sorção (L/mg)

Fonte: Adaptado FOO & HAMEED, 2010; SAADI *et al.*, 2015.

Os modelos isotérmicos descritos na Tabela 1 são aplicados aos dados experimentais para melhor descrição e entendimento dos fenômenos ocorrentes e da interação entre sorvente e sorvato, visando prever, avaliar, comparar e discutir o desempenho dos biossorventes para otimização da capacidade de sorção (CHEN, 2015).

Isso é possível porque cada modelo possui diferentes parâmetros, assumindo que os processos de sorção podem ocorrer de diferentes formas, como em monocamadas ou multicamadas, em superfícies homogêneas ou heterogêneas, ou com interações predominantemente químicas ou físicas. A maioria destes modelos isotérmicos são aplicados e preveem bem os estudos de sorção envolvendo sistemas de equilíbrio gás-sólido e líquido-sólido (SAADI *et al.*, 2015), como no caso do presente trabalho.



## 2.5. Material bioissorvente - *Saccharomyces pastorianus*

Diversos materiais biológicos apresentam potencial como bioissorventes para retenção de diferentes moléculas, principalmente visando a descontaminação ambiental. Dentre eles, estão: bagaço de cana-de-açúcar (ABILIO *et al.*, 2021), cascas de banana (ANWAR *et al.*, 2010), cascas de arroz (FRANCO *et al.*, 2017), carnaúba (OLIVEIRA *et al.*, 2021), raízes de alface (SOARES *et al.*, 2022) e leveduras (JOSÉ *et al.*, 2019). Estes materiais são vantajosos para realização do processo de bioissorção devido sua alta renovação na natureza e composição biológica rica e diversa, com destaque para as leveduras residuais, cuja aplicação vem sendo amplamente explorada para remoção de contaminantes (DEBS *et al.*, 2019; LABUTO *et al.*, 2018; JOSÉ *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020; VOLESKY & MAY-PHILLIPS, 1995).

No entanto, apesar de trabalhos recentes utilizarem bioissorvente de levedura como alternativa para o enriquecimento da biomassa e visando o aumento da bioacessibilidade de compostos bioativos (MAROLDI *et al.*, 2022; ROSSETTO *et al.*, 2020; STAFUSSA *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2019; JILANI *et al.*, 2016), ainda há a necessidade de mais pesquisas que proponham o uso deste material na área de alimentos, visto que a levedura é uma das opções mais interessantes para aplicação como bioissorvente, pois trata-se de espécie de fungo com alto valor nutricional e amplamente utilizado na indústria, principalmente para a produção de cerveja, pães e etanol.

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (SINDICERV, 2022), o Brasil é o terceiro maior produtor de cervejas em volume do mundo, e o consumo desta bebida aumentou 8% no ano de 2022 em relação a 2020. Desta forma, devido às produções em larga escala, trata-se de um coproduto da indústria amplamente disponível e com baixo valor agregado.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o gênero mais utilizado e apresenta manoproteínas (proteínas com traços de manose) e  $\beta$ -glucana (polissacarídeo) como os componentes mais abundantes (AGUILAR-USCANGA & FRANCOIS, 2003), além de ser fonte de nitrogênio, carboidratos, minerais, lipídeos e vitaminas, que estão presentes em sua em sua composição (AMORIM *et al.*, 2016). A sua membrana plasmática também é capaz de se comportar como lipossomo, fazendo com que este material possa ser utilizado para incorporação

de diversos compostos com afinidades diferentes (SALARI *et al.*, 2015).

A cepa *Saccharomyces pastorianus* é um híbrido interespecies entre a *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente conhecida, e a *Saccharomyces eubayanus*, uma levedura relativamente recente que vem sendo utilizada na indústria cervejeira para fabricação de cervejas do tipo lager, caracterizada por seu sabor suave, cor clara e características de fermentação em baixas temperaturas (STEWART, 2016).

Assim, a levedura *Saccharomyces pastorianus* apresenta aplicação bem similar à *Saccharomyces eubayanus*, mas com características importantes derivadas da *Saccharomyces cerevisiae*, sendo composta por quantidades significativas de carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios, minerais e enzimas, fazendo com que apresente variados sítios, como amina e hidroxila, que podem atuar para incorporação de diferentes compostos (RUSO *et al.*, 2022).

Sendo assim, este híbrido pode apresentar potencial como bioissorvente, visto que é um material abundante, apresenta uma composição rica e diversa e com um ótimo custo-benefício, além de ser um material sustentável, que não agride ao meio ambiente.

Outro ponto importante é que as leveduras *Saccharomyces* são reconhecidas como seguras (“GRAS” – generally recognized as safe) e, assim, podem ser consumidas com segurança quando aplicadas em formulações alimentícias (FERREIRA *et al.*, 2010). Vale destacar que sua utilização é interessante também pelo fato de ainda ser pouco explorada em estudos de bioissorção, visto que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo muito mais aplicada para este fim (MAROLDI *et al.*, 2022; RIBEIRO *et al.*, 2019).

Desta forma, a bioissorção utilizando células de *Saccharomyces pastorianus* pode apresentar uma alternativa promissora como sistema de liberação, visando conservar ingredientes importantes para aplicação em alimentos, como o ácido ascórbico.

## 2.6. Células vegetativas e ascósporos de *Saccharomyces*

As leveduras *Saccharomyces* têm forma de reprodução predominante através de divisão binária ou brotamento, sendo assim, crescem como células únicas na fase vegetativa (JACH & SEREFKO, 2018).

Em contrapartida, dependendo da disponibilidade de nutrientes, as células diploides de levedura podem sair do ciclo mitótico, sofrendo meiose e esporulando. Isso é induzido pelo estresse extrínseco à célula, que ocorre na ausência de nitrogênio e na presença de uma fonte de carbono não fermentável, como o acetato (NEIMAN, 2005). Neste caso, quatro esporos haploides são formados dentro de uma célula-mãe (haploide), cuja membrana plasmática se torna o asco, que envolve os esporos, apresentando uma composição lipídica, com grande potencial tecnológico (ZHANG *et al.*, 2014).

Os esporos possuem, além das camadas de manoproteína e  $\beta$ -glucana, presentes nas células vegetativas, outras duas camadas adicionais, uma de quitina e outra de ditirosina. O diferencial dos ascósporos está justamente na relevância dessas duas camadas externas, exclusivas dos esporos, visto que são capazes de fornecer maior resistência química e física (ZHANG *et al.*, 2014). Ademais, ambas possuem vantagens tecnológicas devido às suas propriedades adsorptivas e à presença de diferentes grupos funcionais que podem auxiliar no processo de biossorção (ZHANG *et al.*, 2014), principalmente a quitina, que já bastante utilizada há décadas para remoção de contaminantes em matrizes aquosas (AOKI *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2007; DEMARCHI *et al.*, 2015; CHEN & HE, 2017), além de várias outras aplicações, como na área médica, alimentícia e de engenharia (LEE *et al.*, 2009).

Apesar de seu potencial como biossorvente devido à composição diferenciada de sua membrana, a literatura não relata a aplicação de ascósporos para proteção de bioativos, apenas para imobilização de enzimas, como  $\beta$ -galactosidase (ZHANG *et al.*, 2014), L-arabinose isomerase (LIU *et al.*, 2019) e creatinase (KONG *et al.*, 2017). Sendo assim, o uso destes esporos se apresenta como uma ideia inovadora e ainda pouco explorada.

## 2.7. Tratamentos e pré-tratamentos em bioissorventes

Algumas biomassas, por se tratarem de resíduos, podem ter passado por processos que impossibilitem o total aproveitamento de seu potencial como bioissorvente, como no caso das leveduras residuais. Assim, pensando em melhorar a capacidade de sorção das biomassas, também podem ser aplicados tratamentos e/ou pré-tratamentos, visto que estes podem aumentar a permeabilidade da membrana, alterar sítios ativos e fazer com que haja sorção de maneira mais favorável (YOUNG *et al.*, 2017).

Alguns dos pré-tratamentos mais empregados são métodos físicos (como aquecimento, rompimento mecânico e autoclavagem) e métodos químicos (empregando reagentes ácidos, alcalinos, ou compostos orgânicos), sendo os químicos os que vêm apresentando resultados mais promissores para bioissorção utilizando leveduras (ZHANG *et al.*, 2020; RUBIO *et al.*, 2018; JIANLONG, 2002). No entanto, a eficiência dos métodos é influenciada também pela composição do sorvato e, por este motivo, é interessante aplicar tais modificações físicas e químicas como pré-tratamentos em bioissorventes, a fim de avaliar e discutir melhor as possíveis interações ocorrentes.

Além destes, a plasmólise também pode ser empregada como um pré-tratamento para células de levedura, buscando aumentar o espaço intracelular a partir da remoção do conteúdo citoplasmático com o uso de soluções hipertônicas, para que o meio externo seja mais concentrado que o interno, e a célula perca água através do processo de osmose. A ideia desta modificação é facilitar a incorporação de compostos de interesse (SALARI *et al.*, 2013). Pesquisas recentes buscam utilizar a plasmólise, principalmente para encapsulação de bioativos (KARAMAN, 2021; YOUNG *et al.*, 2017; DADKHODAZADE *et al.*, 2018).

A impregnação a vácuo é outra alternativa com o propósito de melhorar a incorporação de bioativos e nutrientes, sendo recentemente empregada como um tratamento em células de levedura (YOUNG *et al.*, 2017), visando a transferência hidrodinâmica de massa através da utilização de pressões negativas durante alguns segundos, sem aquecimento, pois isso poderia promover a perda de substâncias sensíveis ao calor, como o ácido ascórbico. O processo ocorre após a liberação da pressão, quando o gás que estava

bloqueado nos poros das células é substituído pela solução contendo o composto a ser incorporado (GUILLEMIN *et al.*, 2008). Sendo assim, trata-se de uma técnica simples e com potencial a ser empregada para alteração da permeabilidade das membranas de células de levedura, permitindo seu enriquecimento de maneira facilitada.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O presente trabalho teve como principal objetivo utilizar leveduras residuais de cervejaria como veículo para incorporação de vitamina C empregando as técnicas de bio sorção e impregnação a vácuo, a fim de agregar valor à levedura, que é um subproduto da indústria, e buscando desenvolver um veículo funcional capaz de preservar as propriedades importantes do ácido ascórbico.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Utilizar leveduras residuais *in natura* e modificadas química e termicamente como veículos para incorporação de vitamina C, para fins de comparação;
- Realizar testes de dosagem de bio sorvente, pH da solução, cinética e capacidade de sorção, para otimização do processo de bio sorção;
- Avaliar a capacidade de desorção de vitamina C pelos bio sorventes;
- Testar a influência do uso da técnica de impregnação a vácuo na capacidade de incorporação de vitamina C por leveduras;
- Caracterizar, por meio de diferentes técnicas, os materiais antes e após a bio sorção de vitamina C;
- Avaliar a estabilidade das partículas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

As leveduras residuais *Saccharomyces pastorianus* foram cedidas pela Cervejaria Hausen Bier – Araras-SP. O ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ) de pureza 99% foi obtido pela Dinâmica Química Contemporânea. Os reagentes utilizados para os pré-tratamentos de plasmólise (NaCl), modificação ácida ( $H_2SO_4$ ) e modificação básica (NaOH) foram adquiridos pela Química Moderna, Êxodo Científica e LSChemicals, respectivamente.

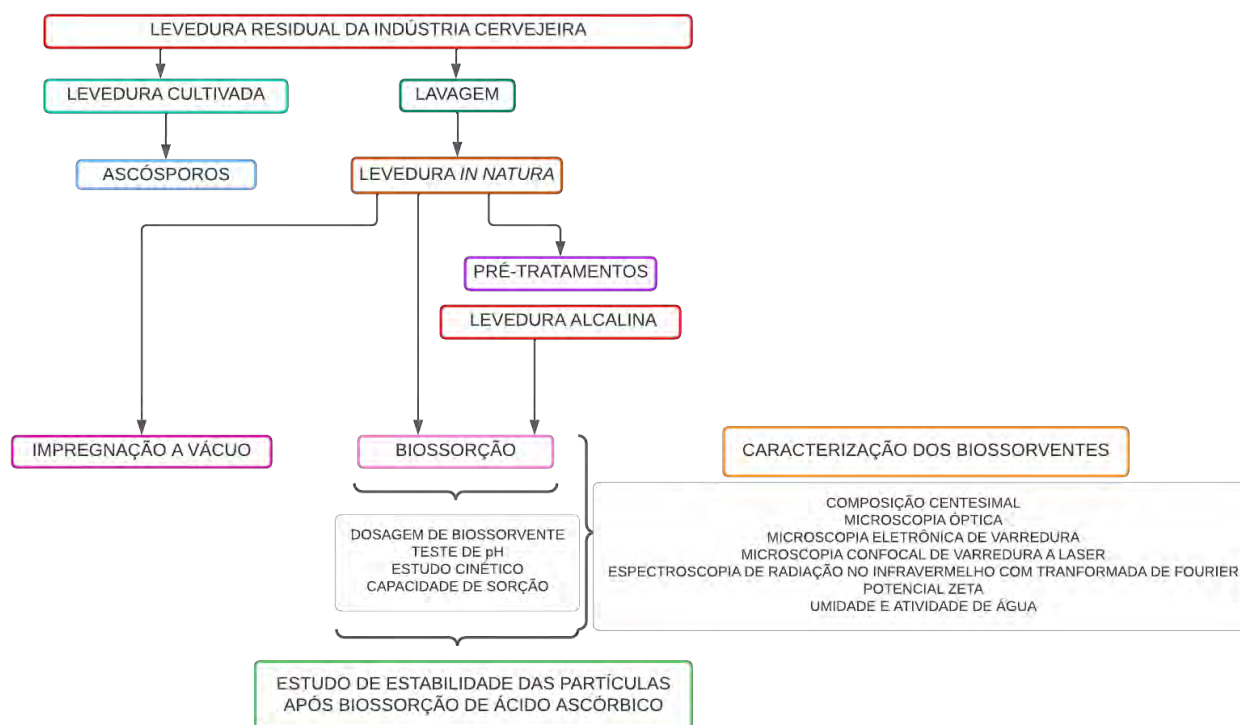
As soluções foram preparadas com água deionizada purificada a partir de um sistema Direct-Q3 (Merck Millipore, Alemanha) e o ácido fórmico utilizado para preparo da fase móvel foi adquirido pela Sigma-Aldrich.

Todos os reagentes utilizados para o cultivo de leveduras e formação de ascósporos, sendo eles: dextrose anidra (glucose –  $C_6H_{12}O_6$ ), acetato de potássio ( $CH_3COOK$ ), corante verde malaquita ( $C_{23}H_{25}ClN_2$ ), corante safranina ( $C_{20}H_{19}ClN_4$ ), ágar ágar e peptona, foram adquiridos pela Dinâmica Química Contemporânea, exceto o extrato de levedura, adquirido da Acumedia.

### 4.2. Metodologia

A Figura 3 sintetiza a progressão das etapas realizadas neste trabalho, a fim de facilitar seu entendimento para a descrição da metodologia nos itens seguintes.

**Figura 3.** Fluxograma das etapas propostas para a execução do trabalho.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Figura 3, a biomassa residual de levedura *Saccharomyces pastorianus* foi o ponto de partida deste estudo. A partir dela, foi feito um teste de cultivo visando a produção de ascósporos que, caso ocorresse satisfatoriamente, também seria um material a ser utilizado como bioadsorvente, no entanto, não houve a produção destas estruturas de resistência.

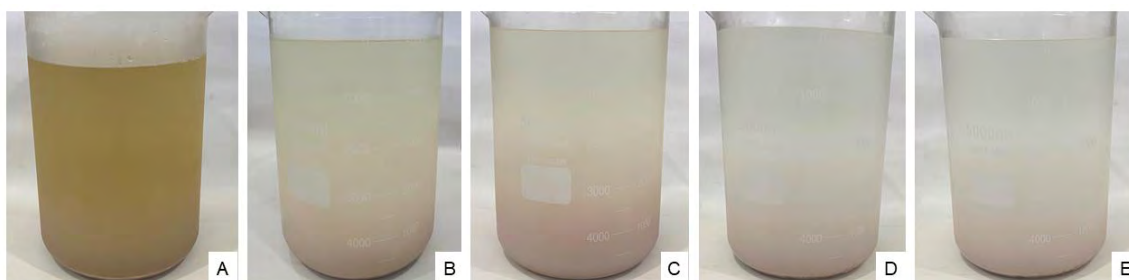
As leveduras restantes foram lavadas e parte delas foi mantida *in natura* e seca por *spray drying*, enquanto a outra parte foi submetida aos pré-tratamentos de plasmólise, modificação ácida, alcalina e térmica, seguidos de secagem por liofilização. Assim, os materiais que apresentaram melhores resultados de sorção de vitamina C nos testes preliminares (levedura *in natura* e levedura alcalina) foram aplicados para os estudos de bioadsorção e, posteriormente, estes bioadsorventes foram caracterizados antes e após a incorporação de ácido ascórbico, além de ter sido feito um estudo de estabilidade destas partículas. A impregnação a vácuo também foi realizada utilizando a

levedura *in natura* para compreensão da influência deste processo para a retenção da vitamina C nas células de levedura.

#### 4.2.1. Preparo dos bioissorventes de levedura

As leveduras cervejeiras residuais foram lavadas 5 vezes com água ultra-pura em um intervalo de 24 horas a cada lavagem, utilizando uma proporção de aproximadamente 1:10 de levedura para água, sendo a biomassa separada da água através de decantação (RUBIO *et al.*, 2018). O procedimento está representado na Figura 4 e foi realizado visando a remoção de impurezas provenientes do malte residual.

**Figura 4.** Leveduras durante a etapa de lavagem, sendo (A) 1ª lavagem, (B) 2ª lavagem, (C) 3ª lavagem, (D) 4ª lavagem e (E) 5ª lavagem.



Fonte: Autoria própria

Posteriormente, as leveduras lavadas foram secas por *spray dryer* (modelo MSD 1.0 LabMaq– Ribeirão Preto-SP, Brasil). As condições operacionais utilizadas foram: diâmetro do bico do atomizador de 1,2 mm, fluxo do líquido de 10 mL/min e temperatura do ar de entrada e saída ( $180$  e  $98 \pm 2$  °C). Parte das leveduras secas foi armazenada para seu uso *in natura*, enquanto o restante foi submetido aos pré-tratamentos de plasmólise e modificações ácida, básica e térmica, cujos procedimentos serão discorridos nos itens seguintes.



#### **4.2.1.1. Plasmólise**

O procedimento de plasmólise foi realizado logo após a lavagem e secagem das levedurais residuais *in natura*, utilizando uma solução NaCl 10%, que foi adicionada junto à biomassa. Esta suspensão foi mantida sob agitação constante por 48 horas em uma incubadora shaker (MA420 Marconi) a 55°C e 180 rpm. Posteriormente, o material foi centrifugado, lavado novamente com água ultra-pura e seco em *spray dryer* (DADKHODAZADE *et al.*, 2018).

#### **4.2.1.2. Modificação ácida e básica**

Devido à capacidade das leveduras interagirem com compostos de afinidades diferentes, propõe-se a modificação tanto ácida quanto básica. Assim, para realização destas modificações químicas do biossorvente, 5 g de levedura seca foi adicionada em frasco Erlenmeyer contendo 500 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,1 mol/L e, em outro frasco foi adicionada a mesma massa de levedura e 500 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L (MATHIALAGAN & VIRARAGHAVAN, 2009). As suspensões foram agitadas em uma incubadora shaker (MA420 Marconi) a temperatura ambiente e 180 rpm durante 24 horas. Finalizados os tratamentos, as suspensões foram centrifugadas e liofilizadas seguindo as condições descritas no item 4.2.7.

#### **4.2.1.3. Modificação térmica**

Para a modificação térmica e consequente inativação das leveduras, após a lavagem, as mesmas foram autoclavadas (Autoclave vertical AV Plus) durante 15 minutos, em temperatura 121 °C (MARCELLINO *et al.*, 2008). Posteriormente, o material foi seco por liofilização, seguindo as condições descritas no item 4.2.7.

#### 4.2.2. Cultivo de levedura para formação de ascósporos

Parte das amostras de leveduras, antes da lavagem (Figura 5A), foi cultivada em meio mimético ao mosto cervejeiro, a partir do preparo de caldo nutritivo YPDA, contendo ágar, peptona, dextrose, extrato de levedura e água ultra-pura, seguindo a proporção descrita por Wickerham, (1951). Para esterilização do meio de cultura, o mesmo foi autoclavado (Autoclave vertical AV Plus) em temperatura de 120 °C, durante 20 minutos.

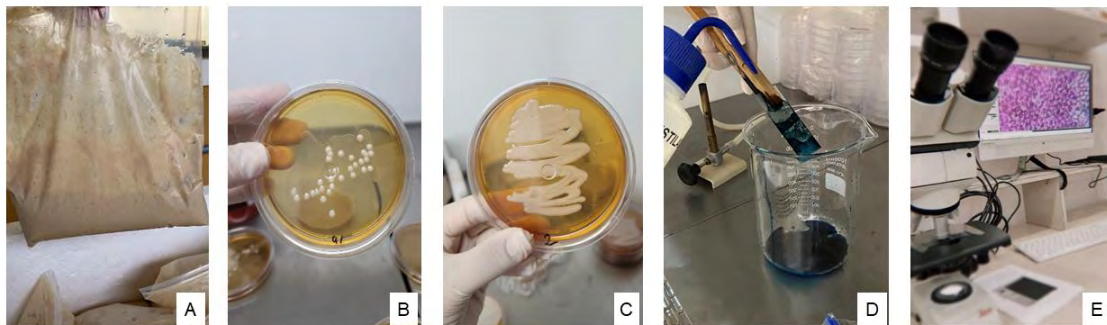
Posteriormente, o caldo foi dividido em placas de Petri, onde foi feita a semeadura das leveduras, espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalsky após a solidificação do caldo. Em seguida, as placas foram encubadas a 35 °C durante 48 horas. A Figura 5B mostra uma das placas após as 48 horas previstas.

A seguir, foi preparado o mesmo meio YPDA, porém, com a adição de 2% de acetato de potássio, que é o agente estressor utilizado para que seja possível ocorrer a formação de ascósporos (ZHANG *et al.*, 2014). O meio também foi autoclavado nas mesmas condições já descritas neste item e, em seguida, foi realizado o plaqueamento utilizando as células previamente cultivadas (Figura 5B). Posteriormente, as placas foram encubadas por 48 horas, em temperatura controlada de 25 °C. A Figura 5C apresenta uma das placas após o período de 48 horas.

A relação entre células vegetativas e ascósporos foi analisada através da coloração com verde malaquita (Wirtz-Conklin) (Figura 5D), a partir do preparo de uma lâmina com a levedura cultivada (Figura 5C) e posterior recobrimento da mesma com corante verde malaquita 5%, até sua evaporação (Figura 5D), com auxílio de um bico de Bunsen. Após lavar a lâmina, foi adicionada à ela a solução do contra-corante safranina por 30 segundos, seguida de enxague novamente.

Em seguida, a lâmina foi observada em microscópio óptico (Figura 5E). Caso tenha havido a formação de ascósporos, a coloração será azulada, enquanto, se não houver, será avermelhada (BREXÓ, 2017).

**Figura 5.** Procedimentos para produção de ascósporos: (A) levedura cervejeira residual; (B) cultivo de células de levedura em meio YPDA; (C) cultivo em meio com agente estressor; (D) enxague da lâmina após adição do corante verde malaquita; (E) visualização por microscopia óptica.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.3. Estudos de biossorção

Para os estudos de sorção de vitamina C utilizando leveduras residuais, os parâmetros de dosagem de biossorvente, pH da solução, tempo de contato e concentração inicial de sorvato foram avaliados, separadamente, em diferentes testes, que serão descritos nos itens seguintes.

Os materiais utilizados para sorção de vitamina C foram selecionados a partir de um teste prévio empregando os cinco biossorventes: *Saccharomyces pastorianus in natura*, plasmolisada, modificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, modificada com NaOH e autoclavada. Os parâmetros foram fixados, utilizando uma concentração de 100 µg/mL de vitamina C em pH 3,0, dosagem de 7,5 g/L (massa de 75 mg de biossorvente para 10 mL de solução de ácido ascórbico), e tempo de contato de 2, 6 e 24 horas, para uma comparação inicial.

Posteriormente, os biossorventes que apresentaram maior capacidade de sorção foram empregados para os testes seguintes, de otimização do processo. Tais experimentos foram todos realizados em bateladas e em triplicatas, utilizando tubos tipo Falcon, em que foram adicionados o biossorvente e a solução contendo a vitamina C com concentração inicial conhecida. A suspensão foi mantida sob agitação constante de 1500 rpm utilizando um agitador Vortex Multi Reax em uma incubadora com temperatura controlada de 25 °C.

Após tempo pré-determinado, as amostras foram coletadas, centrifugadas (Centrifuge 5430 R – Eppendorf), e o sobrenadante foi diluído (quando

necessário) e filtrado em filtros de seringa nylon 13mm x 0,45 $\mu$ m (Allcrom) para posterior quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando um Cromatógrafo Líquido LC-20A Prominence – Shimadzu, nas condições descritas adiante no item 4.2.6.

Vale destacar que, em todos os testes foi feito um controle, apenas com a solução de vitamina C preparada inicialmente. Este controle foi submetido às mesmas condições das demais amostras, a fim de determinar possíveis perdas do nutriente durante os experimentos, e foi comparado com a quantidade de vitamina C presente na solução-padrão logo após o preparo.

#### **4.2.3.1. Dosagem de biossorvente**

Primeiramente, foi realizado um teste para otimizar a dosagem de biossorvente a ser utilizada nos testes posteriores. Para tal, foi proposta uma variação da proporção entre levedura e vitamina C, enquanto os demais parâmetros foram fixados. As dosagens testadas foram de 1,0 a 20,0 gramas de levedura por litro de vitamina C, neste caso, variando a massa de 10 a 200 mg e mantendo o volume da solução de ácido ascórbico em 10 mL em concentração de 100  $\mu$ g/mL. O pH da solução foi ajustado para 3,0 e o tempo de contato foi de 6 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, filtradas e o sobrenadante foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência nas condições descritas no item 4.2.6.

#### **4.2.3.2. Teste de pH de sorção**

Para analisar a influência do valor de pH na sorção de vitamina C por leveduras, foi realizada uma variação de pH (2, 3, 4, 5, 6 e 7) enquanto os demais parâmetros foram fixados. A dosagem utilizada foi a que obteve melhor resultado no teste anterior (item 4.2.3.1), ou seja, 7,5 g/L, enquanto o tempo de contato foi mantido em 6 horas e uma concentração inicial de ácido ascórbico de 100  $\mu$ g/mL. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas, filtradas e o sobrenadante foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência nas condições descritas no item 4.2.6.

#### 4.2.3.3. Cinética de sorção

Após a otimização da dosagem e do pH, o próximo parâmetro avaliado foi a influência do tempo de contato entre levedura e vitamina C. Para tal, a concentração de vitamina utilizada foi a mesma dos testes anteriores (100 µg/mL), em valor de pH previamente otimizado (3,0), bem como a dosagem, que também já foi determinada (7,5 g/L). Os tempos de contato avaliados variaram de 30 a 2880 min. Após os tempos pré-determinados, as amostras foram centrifugadas, filtradas e o sobrenadante foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência nas condições descritas no item 4.2.6 e, aos dados experimentais, foram aplicados modelos cinéticos para compreensão da velocidade de reação e mecanismos envolvidos.

Vale destacar que também foi realizado, durante a cinética de sorção, um estudo de degradação da solução controle de vitamina C após cada tempo analisado, a fim de avaliar se a taxa de degradação é considerável nas condições experimentais propostas.

#### 4.2.3.4. Capacidade de sorção

Para os testes de capacidade de sorção, as proporções de levedura para vitamina C já foram otimizadas (7,5 g/L), bem como o pH da solução (3,0) e o tempo de contato (300 min para levedura *in natura* e 180 min para levedura alcalina). Assim, apenas a quantidade de vitamina C foi variada, utilizando soluções em concentrações crescentes de 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 5000 µg/mL. Ao final do tempo pré-determinado para cada bioissorvente, as amostras foram centrifugadas, diluídas, filtradas e o sobrenadante foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência nas condições descritas no item 4.2.6.

Aos dados de capacidade de sorção, obtidos experimentalmente, foram aplicados diferentes modelos de isotermas de sorção (Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich, Sips e Temkin), a fim de auxiliar na discussão e compreensão de como ocorre o processo de bioissorção de ácido ascórbico por *Saccharomyces pastorianus*.

#### 4.2.4. Estudos de dessorção

Para investigar a reutilização dos biossorventes e a capacidade de liberação do ácido ascórbico, foram realizados estudos de dessorção, em que a levedura pós sorção foi lavada com 5 mL de água ultra-pura acidificada com ácido fórmico (a mesma fase móvel utilizada para separação e quantificação de vitamina C) e mantida sob agitação constante durante 5 min. Em seguida, a suspensão foi colocada em banho ultrassom (UltraCleaner 1400) por mais 5 minutos e, então, as amostras foram centrifugadas. O processo foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes foram juntados e filtrados para determinação de vitamina C que foi dessorvida das células de levedura. A quantificação foi realizada utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência nas condições descritas no item 4.2.6.

#### 4.2.5. Impregnação a vácuo

A fim de melhorar a permeabilidade das células de levedura, foi aplicada a técnica de impregnação a vácuo para o biossorvente de levedura *in natura* utilizando uma seladora (TecMac, TM 100) para avaliar a influência desta técnica simples e rápida na incorporação de vitamina C, utilizando “boilable vacuum bags” a partir de pressão negativa com um vácuo de 99% (YOUNG *et al.*, 2017). As condições foram otimizadas a partir de testes que variavam a dosagem do biossorvente (1,0 a 50,0 gramas de levedura por litro de vitamina C em concentração 100 µg/mL), além da variação do tempo de vácuo (de 10 a 60 segundos) e da concentração inicial de vitamina C em solução (de 50 a 5000 µg/mL). A quantificação de vitamina C remanescente no sobrenadante foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência nas condições descritas no item 4.2.6. Aos dados experimentais de capacidade de sorção foram aplicados os mesmos modelos isotérmicos propostos no item 2.4., a fim de compreender melhor as interações que ocorrem neste processo.

#### **4.2.6. Determinação de ácido ascórbico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

A quantificação de vitamina C remanescente nos sobrenadantes após os ensaios de sorção, dessorção e impregnação a vácuo foi realizada por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando um Cromatógrafo Líquido LC-20A Prominence – Shimadzu, com curva de calibração de 10 a 100 µg/mL, detector por arranjo de diodos em comprimento de onda 245 nm, utilizando coluna analítica em fase reversa C18 (Kinetex 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm). A fase móvel, com eluição isocrática, é composta por água ultra-pura acidificada com ácido fórmico, com fluxo de 0,4 mL/min, volume de injeção de 10 µL e tempo de corrida de 10 minutos. O forno da coluna foi mantido a 35°C, e os dados coletados no software LC Solution, versão 1.21. (SPÍNOLA *et al.*, 2012; TARRARO-TRANI *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

#### **4.2.7. Secagem por liofilização**

Após os pré-tratamentos de modificação ácida, alcalina e térmica, todos os materiais foram secos por meio de liofilização. Após o processo de biossorção de ácido ascórbico, que foi realizado empregando levedura *in natura* e alcalina, os materiais enriquecidos também foram secos através de liofilização.

O equipamento utilizado foi um liofilizador modelo L101 Liotop e bomba de vácuo modelo RC8D – DVP. As condições operacionais foram: pressão de 212 µg/Hg e temperatura de -53 °C, durante um período de 48 horas.

#### **4.2.8. Caracterização dos biossorventes**

Diversas técnicas de caracterização são capazes de elucidar o processo de biossorção de vitamina C em células de leveduras, podendo indicar e facilitar o entendimento sobre as interações existentes entre os sítios de ligação e as alterações que podem ocorrer na parede celular e no interior das leveduras.

##### **4.2.8.1. Microscopia óptica**

A morfologia dos materiais antes e após o enriquecimento foi observada com auxílio de um microscópio óptico (LEICA DM500) com câmera (LEICA ICC50 W) acoplada. Todos os cinco bioSORVENTES utilizados nos testes preliminares (levedura *in natura*, plasmolisada e após modificação ácida, alcalina e térmica), também foram observados a fim de auxiliar o entendimento dos resultados de bioSORÇÃO obtidos inicialmente.

#### **4.2.8.2. Composição centesimal**

A composição centesimal expressa a composição dos materiais em termos de suas porcentagens de componentes principais. Para avaliação da levedura *Saccharomyces pastorianus in natura*, foram realizadas análises para obtenção de matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB) seguindo as metodologias descritas em por Silva; Queiroz (2006). As análises foram realizadas em duplicatas.

#### **4.2.8.3. Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para obtenção de imagens mais detalhadas, de alta resolução e ampliação da superfície dos materiais, recorre-se à técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em que foi utilizado o microscópio TM3000 (Hitachi, Japão) a uma tensão de aceleração de 15 kV. Para observação, as amostras foram fixadas com fita adesiva condutiva dupla face de carbono (Rocha *et al.*, 2012). Os materiais avaliados por esta análise foram levedura *in natura* (LI), levedura alcalina (LA), levedura *in natura* após bioSORÇÃO de ácido ascórbico (LI-AA) e levedura alcalina após bioSORÇÃO de ácido ascórbico (LA-AA).

#### **4.2.8.4. Microscopia Confocal de Varredura a Laser**

A microscopia confocal foi utilizada a fim de compreender a distribuição de vitamina C nas células de *Saccharomyces pastorianus* após o processo de enriquecimento, visto que fornece imagens do interior das células. Para tal, os bioSORVENTES de levedura *in natura* antes (LI) e após bioSORÇÃO de ácido



ascórbico (LI-AA) e de levedura alcalina antes (LA) e após bioadsorção de ácido ascórbico (LA-AA) foram observados utilizando um microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemanha).

As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento descrito por Rubio *et al.*, (2020). Primeiramente, nas lâminas contendo as amostras em pó, foram gotejadas uma gota de água, uma de Calcoflúor White M2R e uma de Vermelho do Nilo (Nile Red). Para a detecção do Calcoflúor, foi utilizado um comprimento de onda de excitação de 405 nm, e a luz emitida foi registrada entre 430 e 480 nm. Já para o Nile Red, o comprimento de onda de excitação foi de 488 nm, e os comprimentos de onda de emissão foram registrados entre 515 e 645 nm.

#### **4.2.8.5. Espectroscopia de Radiação na região do Infravermelho com Transformada de Fourier**

A Espectroscopia de Radiação na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de caracterização utilizada a fim de detectar a absorção em uma região característica e identificar grupos funcionais, tipos de ligação e conformações moleculares, fornecendo informações importantes sobre a composição das amostras (MOVASAGHI *et al.*, 2008). Para tal, foi utilizado o Espectrômetro de FTIR Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Massachusetts, EUA), operado na faixa de 4000 a 550  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e número de scans 16, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) preparadas com cerca de 1 mg de amostra para 100 mg de KBr.

Além das amostras de levedura *in natura* antes (LI) e após bioadsorção de ácido ascórbico (LI-AA) e de levedura alcalina antes (LA) e após bioadsorção de ácido ascórbico (LA-AA), a vitamina C pura também foi avaliada pela técnica de FTIR.

#### **4.2.8.6. Potencial zeta e mobilidade eletroforética**

O potencial zeta mede a magnitude da repulsão ou atração eletrostática das partículas dispersas em um líquido, desempenhando papel fundamental na compreensão da estabilidade dos sistemas. Para a realização de tal medida dos bio sorventes de levedura *in natura* antes (LI) e após bio sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e de levedura alcalina antes (LA) e após bio sorção de ácido ascórbico (LA-AA), foi utilizado um analisador de potencial zeta (Zetasizer ZS 3600, Malvern Instruments, Reino Unido), em um ângulo de detecção de 173° e comprimento de onda de 633 nm. As medições foram realizadas em triplicatas e a 25 °C.

#### **4.2.8.7. Umidade e atividade de água**

Para determinação do conteúdo de água das partículas foi utilizado um analisador de umidade (MB35 - Ohaus, Switzerland), a partir da radiação infravermelha de uma fonte de halogênio. Os resultados foram expressos em porcentagem. Já para a determinação da atividade de água (expressa de 0 a 1), foi utilizado o equipamento AQUALAB (Decagon Devices, Pullman, WA), a uma temperatura de 25 °C. Ambas as técnicas foram utilizadas para acompanhar a umidade e atividade de água dos bio sorventes de levedura *in natura* após sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e de levedura alcalina após sorção de ácido ascórbico (LI-AA) durante cada ponto do estudo de estabilidade, descrito no item a seguir (4.2.9).

#### **4.2.9. Estudo de estabilidade da vitamina C**

Os bio sorventes de levedura *in natura* e com modificação alcalina foram empregados para os testes de estabilidade. Assim, as leveduras enriquecidas foram armazenadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e em temperatura de 25 °C contendo solução saturada de MgCl<sub>2</sub> (umidade relativa de 32,3%), por um período entre 0 e 35 dias, seguindo a metodologia descrita pela A.O.A.C. (1984). Assim, a cada 7 dias, foi realizado o processo de dessorção de vitamina C presente nos bio sorventes de levedura *in natura* após sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e de levedura alcalina após sorção de ácido

ascórbico (LI-AA), conforme descrito no item 4.2.4, para quantificação e compreensão da estabilidade das partículas.

#### **4.2.10. Análise estatística**

O teste t de Student foi utilizado para comparação entre médias. A diferença foi considerada significativa quando o valor de p foi menor que 0,05. A análise foi feita pelo software STATISTICA 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

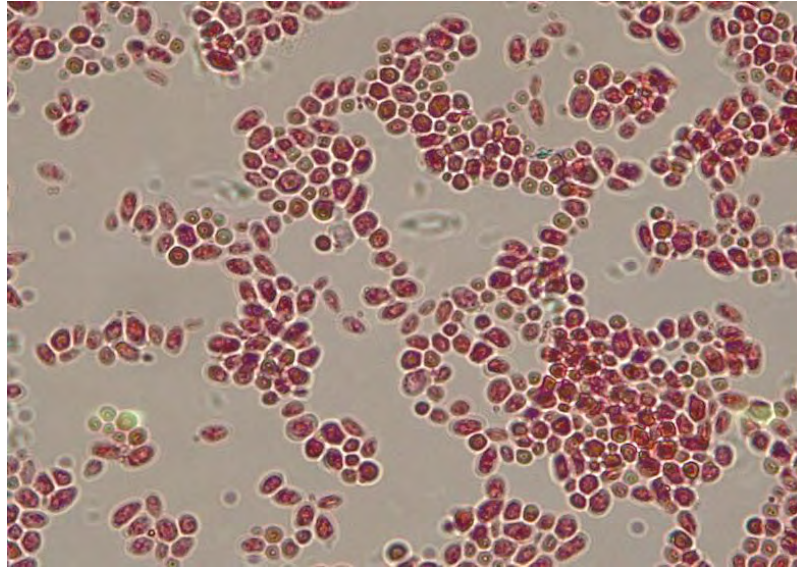
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Cultivo de leveduras para formação de ascósporos**

Segundo ZHANG *et al.*, (2014), esporos de leveduras são estruturas mais resistente que as células vegetativas. Diante disso, a levedura cervejeira residual foi cultivada, visando a formação de ascósporos para aplicação como outro possível material para enriquecimento com vitamina C, sendo uma alternativa que poderia resultar em menor degradação do nutriente em questão.

No entanto, após o cultivo e à exposição das células ao agente estressor (acetato de potássio), foi observado que não houve a formação dos ascósporos. A Figura 6 mostra as células após a coloração de Wirtz-Conklin a partir do microscópio óptico (LEICA DM500) com câmera (LEICA ICC50 W) acoplada, com ampliação de 40 vezes.

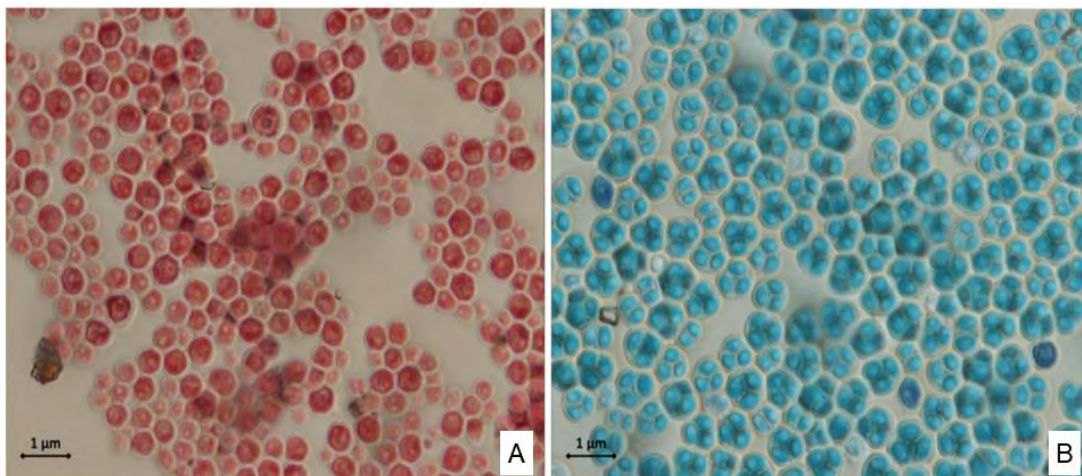
**Figura 6.** Microfotografia de células de levedura cultivada após coloração de Wirtz-Conklin.



Fonte: Aatoria própria.

Segundo Brexó (2017), caso haja formação de ascósporos, os mesmos conseguem incorporar o corante verde malaquita, fazendo com que sejam visualizadas na cor azul, enquanto as células vegetativas só absorvem o contra-corante safranina, sendo visualizados na cor vermelha. A morfologia também auxilia na diferenciação entre células vegetativas e ascósporos, visto que um asco é uma estrutura irregular com os ascósporos em seu interior, enquanto as células vegetativas são mais esféricas (ZHANG *et al.*, 2014; BREXÓ, 2017). A Figura 7 mostra a diferença na coloração e na estrutura das células vegetativas comparada aos ascósporos.

**Figura 7.** Micrografias comparando (A) célula vegetativa e (B) ascósporos.



Fonte: BREXÓ, 2017.

Segundo estudos de Brexó (2017), apenas 10% das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que foram testadas não foram formadoras de ascósporos. No presente trabalho, também não houve a formação dessas estruturas resistentes, como ilustrado e confirmado através das Figuras 6 e 7, no entanto, foi utilizada a levedura *Saccharomyces pastorianus*. Uma possível explicação para que hajam cepas de *Saccharomyces* não produtoras está em sua ploidia, uma vez que, quanto maior a ploidia, maior a probabilidade de formação de ascósporos, visto que essas diferenças na quantidade de material genético dentro da célula podem facilitar a adaptação, expressando características importantes, como no caso de cepas adaptadas para produção de etanol em grandes quantidades (BREXÓ, 2017; VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, 2011).

No entanto, no caso da cervejaria, é mais interessante que haja uma maior diversidade de genes das leveduras, e não uma maior quantidade de genes (que produzem etanol, por exemplo). Por este motivo, não é tão provável que a indústria cervejeira utilize leveduras com capacidade de esporulação.

Desta forma, se tivesse sido utilizada uma cepa de *S. cerevisiae*, ou, caso a fonte de leveduras residuais fosse uma indústria sucroalcooleira, devido à ploidia das células para produção de etanol, talvez houvesse a formação dessas estruturas de resistência.

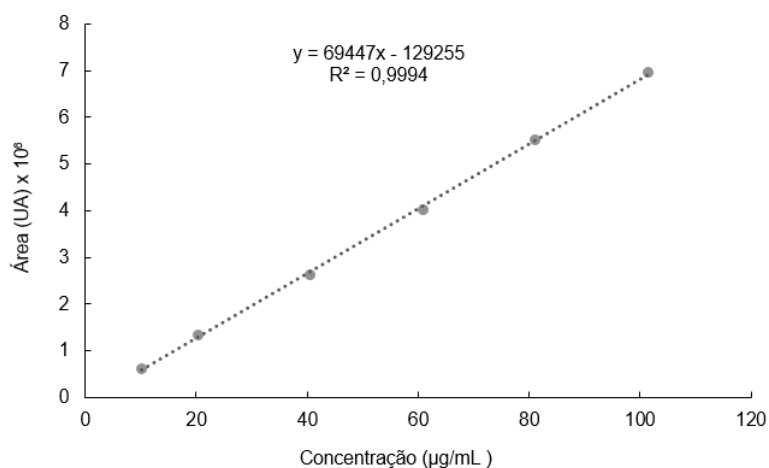
Assim, não foi possível testar a capacidade dos ascósporos provenientes de leveduras residuais cervejeiras para incorporação de ácido ascórbico.

## 5.2. Testes preliminares de bioissorção

Após a síntese e secagem dos materiais bioissorventes *in natura* e modificados, iniciou-se os testes preliminares de bioissorção. A princípio, foi fixada a condição de 7,5 g/L de dosagem do bioissorvente, sendo 75 mg de levedura e 10 mL de solução de vitamina C em concentração inicial de 100 µg/mL e pH 3,0 (mesmo pH da fase móvel utilizada para quantificação em HPLC), e tempo de contato de 2, 6 e 24 horas.

A Figura 8 mostra a curva de vitamina C preparada entre 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$  e as respectivas áreas correspondentes. A curva indicou que houve ótima linearidade, com  $r^2 = 0,9994$  e, assim, a partir dela, foi possível calcular as concentrações de vitamina C remanescente nos sobrenadantes das amostras após os ensaios, relacionando à área dos picos nos cromatogramas.

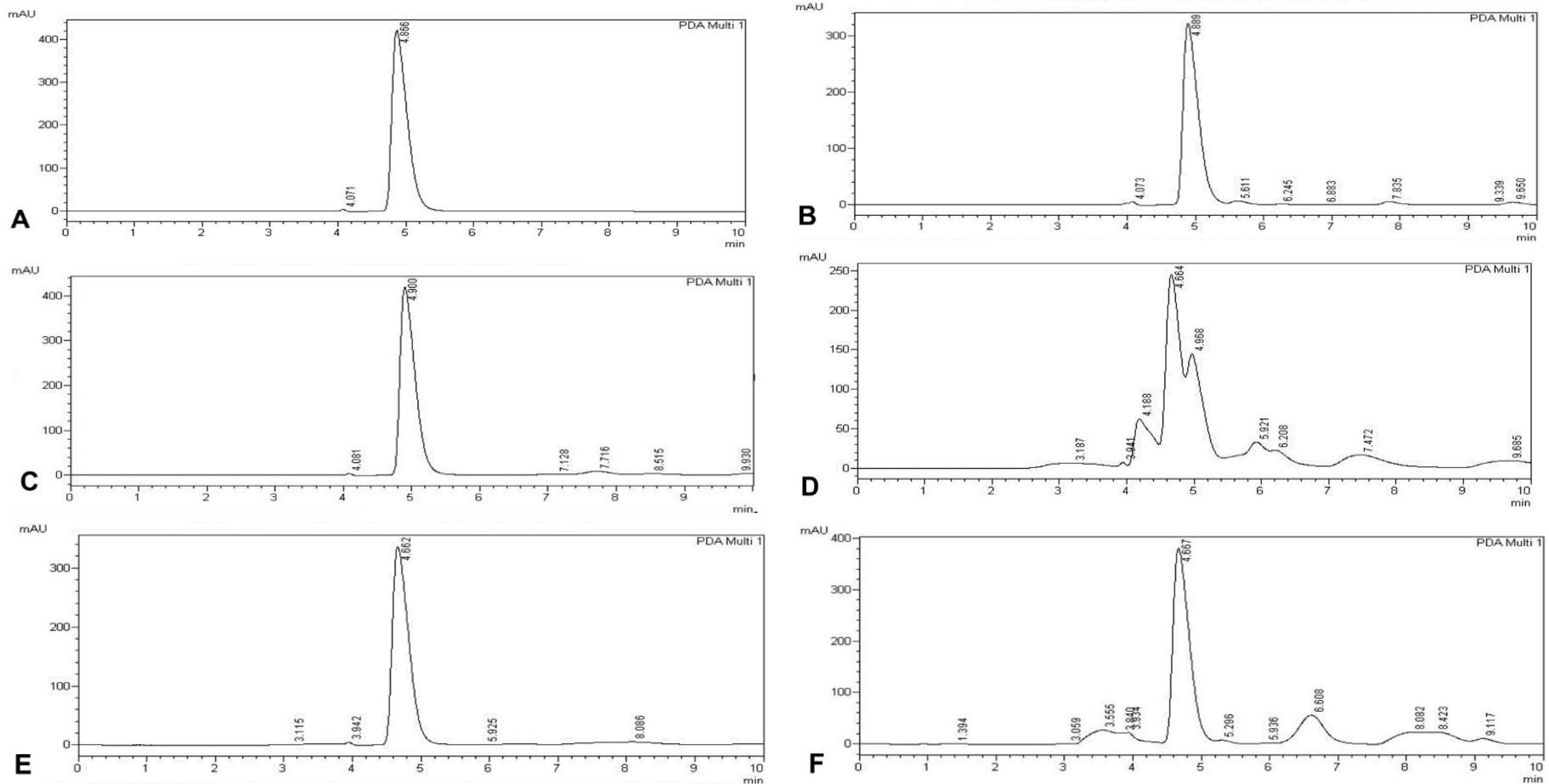
**Figura 8.** Curva de calibração construída para quantificação de vitamina C.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 9 apresenta os cromatogramas obtidos em um teste preliminar de bioadsorção de vitamina C em concentração 100  $\mu\text{g/mL}$  empregando os bioadsorventes de levedura *in natura* e modificada física e quimicamente, a fim de mostrar o perfil cromatográfico correspondente a cada bioadsorvente após 2 horas de contato com o ácido ascórbico.

**Figura 9.** Perfil cromatográfico (A) da solução de ácido ascórbico, e das amostras após 2 horas de bioadsorção, utilizando os bioadsorventes de levedura (B) *in natura*; (C) plasmolisada; (D) modificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (E) modificada com NaOH e (F) autoclavada.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 9A apresenta um cromatograma padrão obtido a partir da solução controle de vitamina C 100 µg/mL após 2 horas de bio sorção. O tempo de retenção do ácido ascórbico ocorre entre 4,6 e 4,9 minutos. Os controles nos demais tempos e a solução logo após o preparo também foram considerados, e demonstraram que a degradação da vitamina foi mínima em 2 e 6 horas, não ultrapassando 1,99% e 2,67%, respectivamente. Já em 24 horas, a degradação foi de 10,28%. Vale lembrar que os experimentos foram conduzidos com proteção da incidência de luz e que, posteriormente, as amostras e os controles foram mantidos em tubos fechados, em incubadora sem contato com a luz e sob temperatura controlada de 25 °C.

Além disso, também foi avaliado o tempo de eluição dos compostos formados pela degradação do ácido ascórbico, a fim de confirmar que o pico cromatográfico obtido era da vitamina não degradada. No entanto, os produtos de degradação têm tempo de retenção de 9 a 11 minutos (SZULTKA *et al.*, 2014), sendo assim, não houve interferência dos mesmos na quantificação de ácido ascórbico. Desta forma, tais constatações demonstraram que os estudos de bio sorção podem ser realizados em tempos mais longos sem perda tão significativa do bioativo nas condições descritas.

Ao avaliar os cromatogramas das amostras após 2 horas de contato entre levedura e vitamina C, nota-se que, a levedura *in natura* (Figura 9B), plasmolisada (Figura 9C) e modificada com NaOH (Figura 9E) apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, sem picos interferentes significativos, o que torna a quantificação de ácido ascórbico facilitada.

De acordo com a Tabela 2, a levedura *in natura* apresentou um aumento gradativo de sorção com o passar do tempo, sendo 4,58% em 2 horas, 12,91% em 6 horas e 25,72% em 24 horas.



**Tabela 2.** Porcentagem de vitamina C sorvida pelos bioSORVENTES de levedura (*in natura*, plasmolisada, modificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, modificada com NaOH e autoclavada), em diferentes tempos de contato (2, 6 e 24 horas).

Biossorvente	Vitamina C sorvida (%)		
	t = 2 h	t = 6 h	t = 24 h
Levedura <i>in natura</i>	4,58 <sup>a</sup> ± 0,24	12,91 <sup>a</sup> ± 0,48	25,72 <sup>a</sup> ± 0,09
Levedura plasmolisada	n.s.	1,95 <sup>b</sup> ± 0,76	8,84 <sup>b</sup> ± 1,91
Levedura com modificação ácida	37,72 <sup>c</sup> ± 1,63	82,01 <sup>c</sup> ± 2,73	100 <sup>c</sup> ± 0,00
Levedura com modificação alcalina	8,07 <sup>a</sup> ± 0,73	100 <sup>d</sup> ± 0,00	100 <sup>c</sup> ± 0,00
Levedura autoclavada	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = não significativo; letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Fonte: Autoria própria.

No entanto, através da Tabela 2, nota-se que a levedura plasmolisada alcançou apenas 8,84% de sorção em 24 horas, enquanto em 2 e 6 horas não obteve sorção significativa.

Desta forma, nota-se que o pré-tratamento de plasmólise não se mostrou efetivo para sorção de ácido ascórbico por células de levedura residual. Isso pode ter ocorrido porque a realização da plasmólise acarreta na remoção do conteúdo citoplasmático e na consequente diminuição da carga do núcleo (KARAMAN, 2021). Assim, alguns outros trabalhos que empregaram a plasmólise como pré-tratamento de células de levedura (PARAMERA *et al.*, 2011; KARAMAN, 2021; YOUNG *et al.*, 2017; SALARI *et al.*, 2013) obtiveram resultados inferiores ou muito semelhantes ao uso dela íntegra, corroborando para a ideia de o citoplasma e as organelas nele presentes são importantes para que haja incorporação do bioativo nas células.

Outra possível explicação é que a plasmólise pode ocasionar a perda de componentes importantes da parede celular, como proteínas e polissacarídeos (SHI *et al.*, 2008; KARAMAN, 2021), além de poder causar a desnaturação de proteínas

por *salting out*, devido ao aumento da força iônica, o que modificaria a permeabilidade celular e interferiria na disponibilidade de grupos funcionais que poderiam atuar como ligantes para sorção de ácido ascórbico.

Em outro trabalho, utilizando leveduras para incorporação de vitamina D (DADKHODAZAD et al., 2018), o uso da plasmólise apresentou resultados mais significativos do que o material íntegro, no entanto, isso pode estar relacionado com o fato dessa molécula ser lipofílica, pois, de acordo com Karaman (2021), a polaridade das moléculas também pode influenciar em sua capacidade de difusão.

Assim, como a vitamina C é polar, provavelmente a plasmólise tende a apresentar resultados distintos pois, em moléculas hidrofílicas, as interações ocorrentes acarretam em uma difusão mais lenta, uma vez que é necessário superar as forças atrativas para se movimentar através do meio, o que não ocorre em moléculas apolares, uma vez que há simetria de cargas, acarretando em menores interações e facilitando a difusão.

Já no caso da levedura com modificação alcalina, ao observar a Tabela 2, nota-se que a sorção em 2 horas não foi tão acentuada (8,84%), demonstrando uma cinética mais lenta, entretanto, a partir de 6 horas a sorção já foi de 100%, uma vez que, ao se analisar o sobrenadante da mistura utilizada no processo de biossorção, não foi detectado o pico correspondente ao ácido ascórbico no cromatograma, o que é um indicativo claro de que houve a sorção completa deste nutriente. Ademais, a partir da determinação do ácido ascórbico na solução controle, foi possível quantificá-lo e concluir que não houve degradação significativa, resultado que corrobora para inferir que a biossorção ocorreu de forma efetiva.

Desta forma, o uso de leveduras após modificação alcalina apresentou resultados promissores, demonstrando ótimo potencial como biossorvente, assim como nos estudos de Rubio *et al.* (2018), que aplicou pré-tratamentos físicos e químicos em células de leveduras residuais para sorção de compostos fenólicos, sendo a modificação básica a que forneceu resultados mais expressivos.

Assim, notou-se que o tratamento alcalino foi capaz de eliminar possíveis grupos funcionais que impediam a levedura *in natura* de interagir com o ácido ascórbico e/ou foi capaz de alterar grupos funcionais que possibilitaram a interação

das células com a vitamina C. Essa inibição possivelmente se deve aos inúmeros processos que este coproduto passa antes de ser descartado, sendo interessante a aplicação de pré-tratamentos que sejam capazes de remover sítios interferentes e expor novamente sítios de ligação disponíveis em sua estrutura, conforme relatam alguns trabalhos (RUBIO *et al.*, 2018; VIJAYARAGHAVAN & YUN, 2008; PARK *et al.*, 2010).

Ao avaliar o perfil cromatográfico da levedura com modificação ácida (Figura 9D), nota-se que há picos interferentes entre 4,4 e 5,3 minutos e com absorvância superior a 100 mAU, o que dificulta a quantificação precisa de ácido ascórbico, cujo tempo de retenção é entre 4,6 e 4,9 minutos. Assim, apesar de apresentar resultados favoráveis de bio-sorção, conforme indica a Tabela 2 (37,72, 82,01 e 100% de sorção em 2, 6 e 24 horas, respectivamente), o uso deste material acaba não oferecendo uma quantificação exata, interferindo na confiabilidade dos resultados.

O mesmo ocorre com a levedura autoclavada (Figura 9F), que na quantificação da vitamina também apresentou picos interferentes no cromatograma, sendo o maior deles exatamente no tempo de retenção do ácido ascórbico (4,6 minutos), com absorvância acima de 20 mAU. Desta forma, o uso deste material não é viável pois, além deste interferente, a sorção foi nula, conforme mostra a Tabela 2. Outros trabalhos relataram que a autoclavagem diminuiu a bio-sorção (RUBIO *et al.*, 2018; MARCELLINO *et al.*, 2008). Para remoção de Sb(III) de matrizes aquosas, Marcellino *et al.* (2008) utilizou leveduras após autoclavagem, e os resultados de sorção foram duas vezes inferiores quando comparado à biomassa com um tratamento térmico mais brando, a 60 °C. Isso ocorreu possivelmente porque a inativação por calor pode ter causado desnaturação proteica ou hidrólise, com possível ruptura celular, de modo a inativar sítios ou criar outros que dificultaram a sorção ou impediram a difusão pela membrana, impossibilitando a interação entre levedura e composto de interesse. Sendo assim, a inativação por autoclave não apresentou resultados promissores para modificação de leveduras e bio-sorção de ácido ascórbico.

Vale destacar que foi feito um controle de cada material com água ultra-pura,

que foi submetido às mesmas condições, a fim de avaliar o tempo de retenção dos interferentes, suas concentrações e se foram desprendidos do material durante o tempo de contato com água sem influência da interação com o ácido ascórbico, o que, de fato, foi confirmado em todos os bioissorventes avaliados.

### 5.3. Microscopia óptica

As microscopias ópticas das células de levedura foram realizadas através de um microscópio óptico (LEICA DM500) com câmera (LEICA ICC50 W) acoplada, utilizando um aumento de 100 x. A Figura 10 apresenta as micrografias obtida dos materiais *in natura* e após os pré-tratamentos, tanto antes, quanto depois do processo de bioissorção.

As Figuras 10A, C, E, G e I apresentam, respectivamente, as micrografias das células de leveduras *in natura*, plasmolisada, modificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; modificada com NaOH e autoclavada, enquanto as Figuras 10B, D, F, H e J apresentam os mesmos materiais após o processo de bioissorção, a fim de avaliar se houve distinção aparente entre as morfologias. No entanto, não foi possível identificar diferenças significativas dos bioissorventes antes e após a sorção, por microscopia óptica, uma vez que a vitamina C não consegue ser observada pela técnica em questão e, aparentemente, a estrutura das células de levedura também não sofreu modificações após a interação com este bioativo.

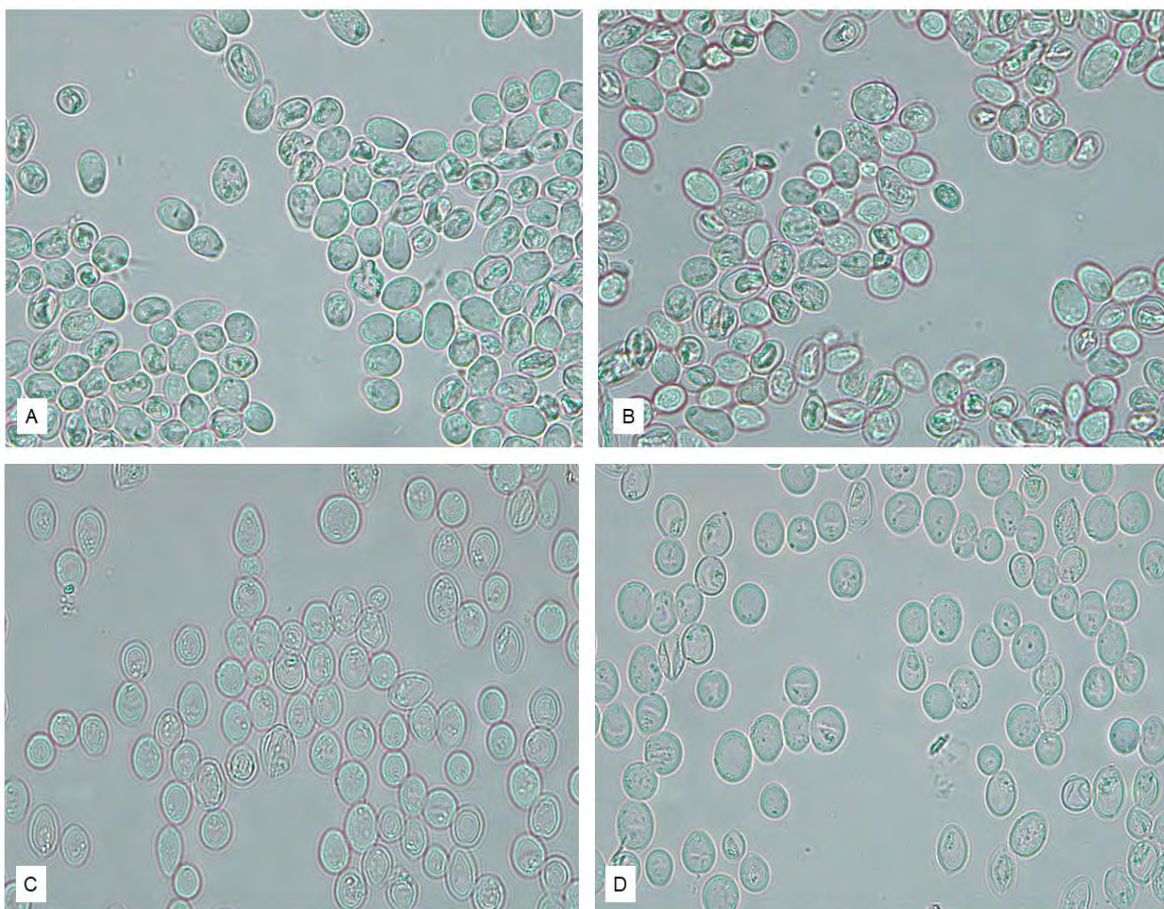
No entanto, pode ser feita uma comparação entre os cinco diferentes bioissorventes. Na Figura 10A, é apresentada a micrografia da levedura após a lavagem, e antes de qualquer tipo de pré-tratamento que pudesse causar algum tipo de alteração em sua estrutura inicial. Por se tratar de um co-produto, que passou por inúmeros processos, as células *in natura* apresentam uma estrutura com formatos predominantemente elipsoidais, sem simetria. Também foi possível notar uma estrutura visível de citoplasma granular, ao observar o aspecto manchado no interior da célula, cercada por uma parede celular espessa.

Assim, devido à esta estrutura rica em possíveis sítios ativos e diferentes componentes presentes na espessa parede celular das células de levedura, esta

biomassa apresenta grande potencial como material encapsulante de diversos bioativos, como relatado por Nakhaee Moghdam *et al.*, (2019).

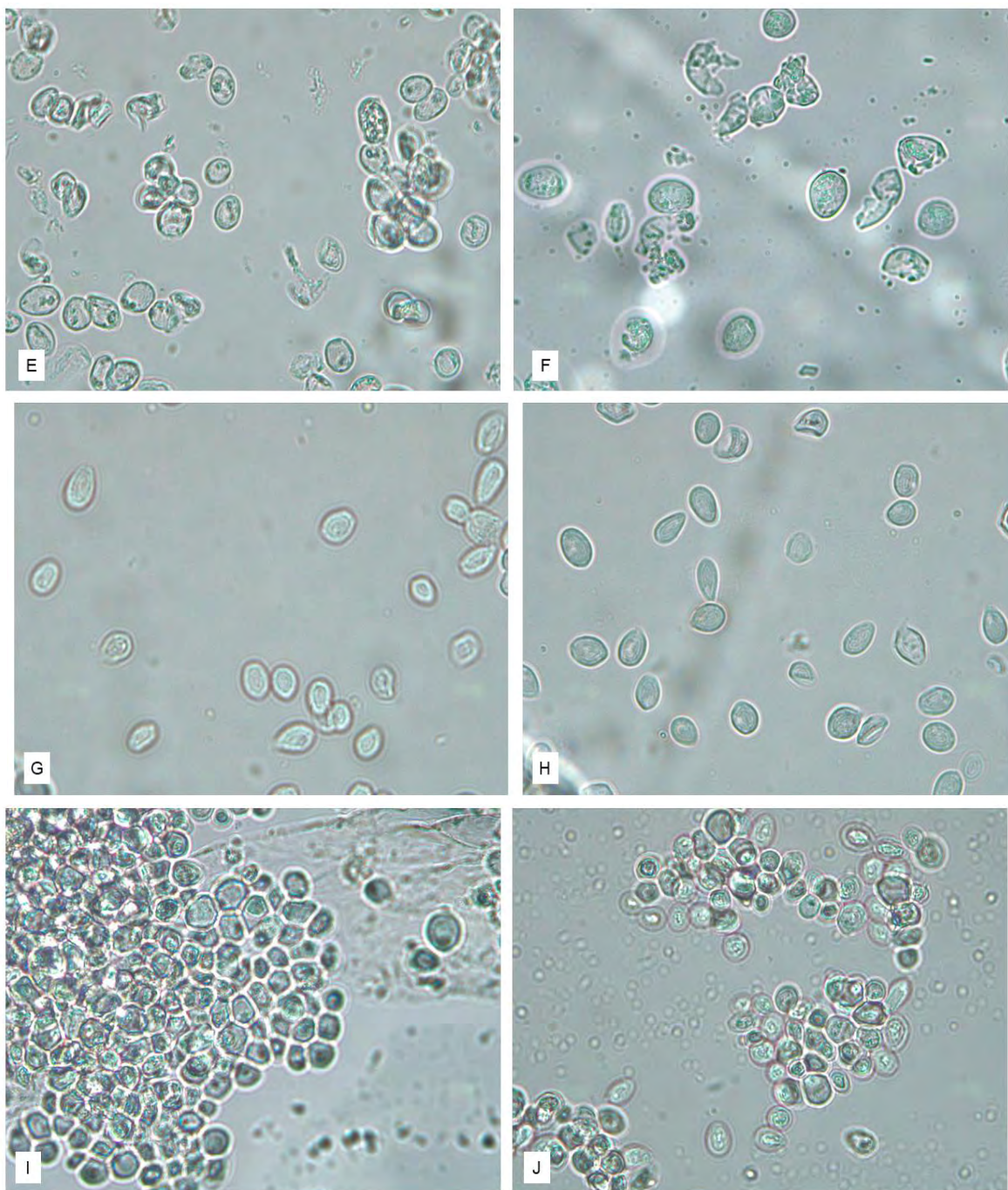
**Figura 10.** Micrografias das células de levedura *in natura* (A) antes e (B) após sorção; plasmolisada (C) antes e (D) após sorção; modificada com  $H_2SO_4$  (E) antes e (F) após sorção; modificada com NaOH (G) antes e (H) após sorção; e autoclavada (I) antes e (J) após sorção.

(continua)



**Figura 10.** Micrografias das células de levedura *in natura* (A) antes e (B) após sorção; plasmolisada (C) antes e (D) após sorção; modificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (E) antes e (F) após sorção; modificada com NaOH (G) antes e (H) após sorção; e autoclavada (I) antes e (J) após sorção.

(continuação)



Fonte: Autoria própria.

A morfologia da levedura plasmolisada (Figura 10C) apresenta diferenças quando comparada à levedura íntegra *in natura* (Figura 10A). De acordo com as observações de Nakhaee Moghadam *et al.*, (2019), isso pode ter ocorrido devido ao fato do pré-tratamento de plasmólise remover parte do material citoplasmático, deixando a célula com uma aparência mais clara em seu interior, sem os grânulos que estão presentes no citoplasma das células íntegras.

Já a Figura 10E, correspondente à levedura com modificação ácida, que apresentou estrutura bem mais irregular e com grânulos, o que pode justificar a presença de picos interferentes para quantificação, como mostra o cromatograma da Figura 9C, indicando que houve ruptura das células, com consequente desprendimento de pedaços ou compostos da levedura após o tratamento ácido.

A micrografia das células de levedura após o pré-tratamento alcalino está apresentada na Figura 10G, e indica estruturas mais ovaladas, mas sem grandes modificações quando comparadas à levedura *in natura* (Figura 10A).

A partir da Figura 10I, foi possível observar que as partículas com a modificação térmica apresentaram maior aglomeração, o que pode ter dificultado as interações entre sorvente e sorvato, resultando em uma sorção nula. Além disso, algumas células apresentaram coloração interna mais escura e manchada que os demais materiais, indicando possíveis alterações no citoplasma da célula, que podem ter interferido nos grupos funcionais disponíveis para interação com o ácido ascórbico, no entanto, por microscopia óptica, não é possível afirmar que o que houve, como, por exemplo, desnaturação proteica ou ruptura celular associada à esta sorção nula.

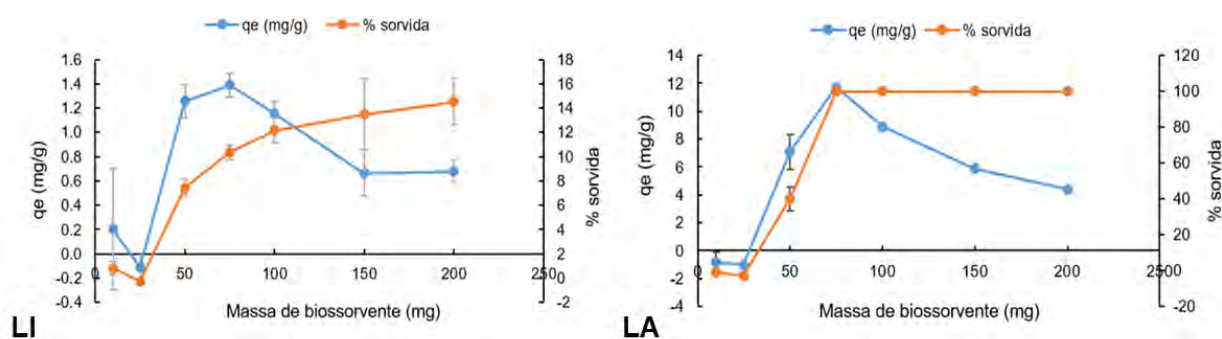
#### **5.4. Estudo de otimização de bioissorção**

Após selecionar os materiais com os melhores resultados no teste preliminar de bioissorção, foi realizado um estudo mais aprofundado de otimização do processo, considerando a dosagem do bioissorvente, o valor pH da solução de vitamina C, o tempo de contato entre sorvente e sorvato e a concentração inicial de ácido ascórbico.

### 5.4.1. Dosagem de bioissorvente

Para iniciar os testes de otimização do processo de bioissorção, primeiramente, foi realizada a dosagem de bioissorvente, empregando levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA). Para tal, o volume de solução de vitamina C foi mantido constante (10 mL), em concentração de 100 µg/mL e pH 3, enquanto a massa de levedura foi alterada, variando de 10 a 200 mg. Os resultados obtidos após 3 horas de tempo de contato estão apresentados na Figura 11.

**Figura 11.** Efeito da dosagem dos bioissorventes, variando a massa entre 10 e 200 mg de levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA) e mantendo o volume de vitamina C constante. n=3.



Fonte: Autoria própria.

A influência da variação da massa de LI e LA na capacidade de sorção ( $q_e$ ) está apresentada na Figura 11, onde é possível notar que a porcentagem de sorção de ácido ascórbico por ambos os materiais aumenta ou permanece constante conforme o incremento da massa do bioissorvente, como o esperado.

No entanto, se a massa utilizada for muito alta, a quantidade de vitamina adsorvida por grama de material diminui, uma vez que, para o cálculo de  $q_e$ , considera-se a massa no denominador da equação, sendo assim, ao aumentá-la, a tendência é de que o valor de capacidade de sorção diminua, ainda que a porcentagem demonstre valores elevados.

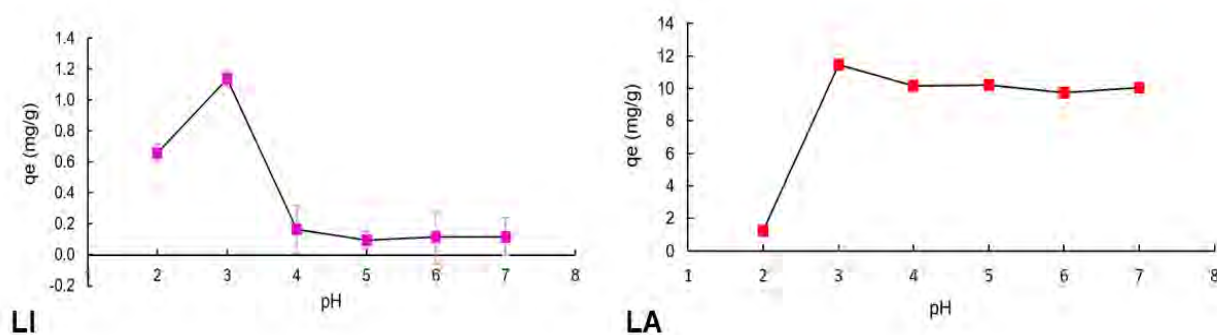


Dessa forma, nota-se que 75 mg foi a massa que obteve resultados mais satisfatórios considerando os dados em mg/g, tanto para LI quanto para LA, sendo assim, não haveria necessidade de usar uma dosagem mais alta com o intuito de atingir resultados mais favoráveis, por isso, é tão importante realizar tal estudo, evitando o uso de mais biossorvente que o necessário.

#### 5.4.2. Teste de pH de sorção

Para avaliar a influência do valor de pH da solução de vitamina C para sua incorporação nas células de levedura *in natura* (LI) e alcalina (LA), o pH foi alterado entre 2 e 7. Optou-se por não se avaliar valores de pH acima de 7, pois, de acordo com SZULTKA *et al.*, (2014), o ácido ascórbico é instável e fica sujeito à degradação em meio alcalino. Os resultados de biossorção, expressos em mg/g, com a variação do pH estão apresentados na Figura 12.

**Figura 12.** Efeito do pH da solução de vitamina C no processo de biossorção empregando levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA), utilizando os valores de pH entre 2 e 7. n=3.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Figura 12, percebe-se que, em pH 3, ocorre o máximo de biossorção de ácido ascórbico por LI, que decai consideravelmente com o incremento do valor de pH.

Atentando à diferença na escala dos gráficos, é possível notar o mesmo comportamento em LA, que ocorre pois a bio sorção por LA é bem superior à de LI nas condições utilizadas, assim como foi comprovado nos testes preliminares e no teste de dosagem dos bio sorventes.

Assim, ambos os materiais apresentaram sorção mais baixa e praticamente constante entre os valores de pH 4 e 7. A maior diferença entre os resultados se deu em pH 2, visto que LA apresentou bio sorção muito baixa, e isso pode ter ocorrido pela interação entre os sítios modificados e as espécies catiônicas formadas em razão do meio muito ácido, podendo acarretar na indisponibilidade de grupos funcionais para interagir com a vitamina C.

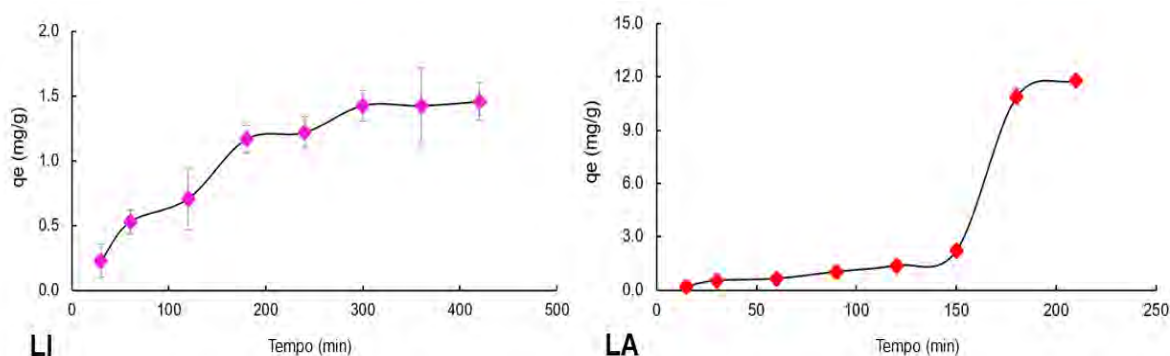
Em pH 3 isso não ocorreu, sendo que ambos os materiais (LI e LA) atingiram os maiores valores de sorção, indicando que foi vantajoso realizar o processo de bio sorção nessa condição de pH, uma vez que garante maior estabilidade da molécula, de acordo com o relatado na literatura (SPÍNOLA *et al.*, 2012; SZULTKA *et al.*, 2014).

#### **5.4.3. Cinética de sorção**

A cinética de sorção foi realizada variando o tempo de contato entre os bio sorventes (LI e LA) e o ácido ascórbico. Os resultados estão apresentados na Figura 13, onde é possível notar que a sorção por LI ocorre a uma taxa quase constante, aumentando gradativamente a cada tempo, até começar a se estabilizar aos 300 min.

Por outro lado, o comportamento de LA para sorção de ácido ascórbico é atípico, com um aumento bastante expressivo entre 150 e 180 minutos (de  $2,21 \pm 0,15$  mg/g para  $10,87 \pm 0,46$  mg/g). Isso pode ter ocorrido porque os sítios ativos foram alterados com a modificação alcalina, causando uma etapa mais lenta, provavelmente uma adsorção intrapartícula, e não apenas um processo físico (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

**Figura 13.** Cinética de bio sorção de vitamina C empregando levedura *in natura* (LI) variando os tempos entre 30 e 420 min e levedura alcalina (LA) variando os tempos entre 10 e 240 min. n=3.



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, a partir da Figura 13, o tempo de equilíbrio para LI foi considerado 300 min, enquanto para LA foi de 180 min, apresentando valores de capacidade de sorção muito diferentes no equilíbrio ( $1,43 \pm 0,12$  mg/g e  $10,87 \pm 0,46$  mg/g, respectivamente para LI e LA), demonstrando o potencial da modificação alcalina na biomassa de levedura para bio sorção de ácido ascórbico.

Além disso, vale destacar que a levedura *Saccharomyces pastorianus* juntamente com a *Saccharomyces cerevisiae* foram estudadas como bio sorventes na remoção de íons cobre e chumbo presentes em matrizes aquosas (AZEVEDO; FERREIRA; SOBRINHO, 2020), e os resultados mostraram que a *Saccharomyces pastorianus* apresentou uma cinética bem mais lenta (90 min) quando comparada à *Saccharomyces cerevisiae* (10 min), indicando que, de fato, as leveduras utilizadas neste trabalho têm uma tendência a necessitar de um maior tempo de bio sorção para apresentar resultados mais satisfatórios, possivelmente devido à indisponibilidade de alguns sítios ativos inicialmente. Vale destacar que, na área de alimentos, ainda não há trabalhos que utilizem a técnica de bio sorção empregando *Saccharomyces pastorianus*, dificultando as discussões acerca deste processo.

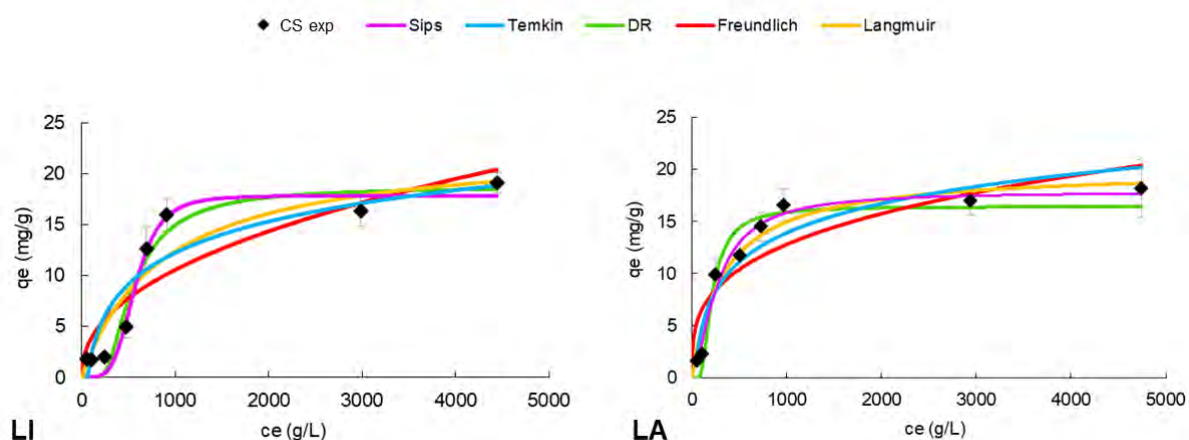
Devido a este comportamento cinético, apesar de terem sido aplicados os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem aos dados experimentais, não houve nenhum ajuste, e, neste caso, quando os modelos não conseguem

determinar a cinética de adsorção, a difusão intrapartícula pode ser um dos fatores determinantes da velocidade, conforme sugere Azevedo *et al*, (2020), sendo assim, é necessário propor um outro modelo que consiga se ajustar aos dados e auxiliar na compreensão do perfil cinético obtido por esses materiais para biossorção de vitamina C.

#### 5.4.4. Capacidade de sorção

A partir do incremento da concentração inicial de vitamina C, o estudo de capacidade de sorção foi realizado, a fim de compreender melhor o processo de sorção e os possíveis motivos pelos quais a cinética apresentou comportamento atípico. A Figura 14 mostra os resultados obtidos experimentalmente para a capacidade de sorção, bem como os modelos isotérmicos que foram aplicados a esses dados, enquanto a Tabela 3 apresenta os parâmetros correspondentes aos ajustes de cada modelo.

**Figura 14.** Dados experimentais de capacidade de sorção e ajustes dos modelos isotérmicos empregando levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA) para biossorção de vitamina C, variando as concentrações iniciais entre 50 e 5000  $\mu\text{g/mL}$ .  $n=3$ .



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 3.** Valores de capacidade de sorção experimental ( $CS_{exp}$ ) e parâmetros isotérmicos empregando levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA) na biossorção de vitamina C.

	LI	LA
<b><math>CS_{exp}</math> (mg/g)</b>	19,11 ± 0,97 <sup>(SD)</sup>	18,11 ± 2,77 <sup>(SD)</sup>
<b>Langmuir</b>		
$q_m$ (mg/g)	22,91 ± 3,55 <sup>(SE)</sup>	19,97 ± 1,34 <sup>(SE)</sup>
$b$ (L/mg)	0,0012 ± 4,96 × 10 <sup>-4</sup> <sup>(SE)</sup>	0,003 ± 7,2 × 10 <sup>-4</sup> <sup>(SE)</sup>
$r^2$	0,8865	0,9568
$\chi^2$	6,58	2,21
<b>Freundlich</b>		
$K_f$ (L/mg)	0,50 ± 0,41 <sup>(SE)</sup>	1,63 ± 0,89 <sup>(SE)</sup>
$n_f$	2,26 ± 0,55 <sup>(SE)</sup>	3,35 ± 0,83 <sup>(SE)</sup>
$r^2$	0,8129	0,8168
$\chi^2$	10,84	9,38
<b>DR</b>		
$q_{DR}$ (mg/g)	18,67 ± 1,18 <sup>(SE)</sup>	16,41 ± 0,78 <sup>(SE)</sup>
$B_{DR}$ (mol <sup>2</sup> /J)	0,036 ± 0,0077 <sup>(SE)</sup>	0,0054 ± 0,0014 <sup>(SE)</sup>
$E$ (kJ/mol)	3,73	9,62
$r^2$	0,9527	0,9542
$\chi^2$	2,88	2,35
<b>Sips</b>		
$q_m$ (mg/g)	17,84 ± 1,11 <sup>(SE)</sup>	17,84 ± 0,96 <sup>(SE)</sup>
$K_s$ (L/mg)	0,002 ± 1,34 × 10 <sup>-4</sup> <sup>(SE)</sup>	0,003 ± 5,34 × 10 <sup>-4</sup> <sup>(SE)</sup>
$n$	4,38 ± 1,29 <sup>(SE)</sup>	1,57 ± 0,28 <sup>(SE)</sup>
$r^2$	0,9533	0,9670
$\chi^2$	2,58	1,38
<b>Temkin</b>		
$b$ (J/mol)	4,42 ± 0,79 <sup>(SE)</sup>	4,04 ± 0,53 <sup>(SE)</sup>
$A$ (L/mg)	0,016 ± 0,007 <sup>(SE)</sup>	0,031 ± 0,013 <sup>(SE)</sup>
$T$ (K)	298,15	298,15
$r^2$	0,8138	0,8895
$\chi^2$	10,28	4,63

Fonte: Autoria própria.

A partir da Figura 14, é possível observar que os perfis das curvas de adsorção foram favoráveis para ambos os materiais, porém, como o ângulo entre a curva e o eixo y é menor para LA, este material apresentou um mecanismo de

sorção ainda mais favorável que LI, o que torna interessante a modificação alcalina da levedura.

De acordo com a Tabela 3, o modelo que melhor ajustou os dados experimentais para ambos os materiais foi o modelo Sips, com o melhor coeficiente de determinação ( $r^2$ ), sendo 0,9533 e 0,9670 para LI e LA, respectivamente. Ao avaliar os erros ( $\chi^2$ ), também é possível notar que o Sips foi o que apresentou os menores erros, sendo 2,58 para LI e 1,38 para LA.

Além disso, a partir dos dados apresentados na Tabela 3, é possível observar que a capacidade de sorção experimental ( $SC_{exp}$ ) foi de  $19,11 \pm 0,97$  mg/g e  $18,11 \pm 2,77$  mg/g para LI e LA, respectivamente, assim como a capacidade teórica obtida através do modelo Sips ( $q_e = 17,84 \pm 1,11$  mg/g para LI e  $17,84 \pm 0,96$  mg/g para LA), demonstrando que o modelo se ajustou satisfatoriamente aos dados experimentais. Esse modelo é uma combinação de Langmuir e Freundlich, ou seja, considera que tanto fenômenos físicos quanto químicos ocorrem e contribuem para o processo de sorção (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Ao analisar os parâmetros do modelo DR, também é possível observar bons ajustes, com  $r^2$  favorável (0,9527 e 0,9542 para LI e LA, respectivamente) e baixo  $\chi^2$  ( $\leq 2,88$ ). Além disso, outro parâmetro interessante a ser discutido é a energia de adsorção ( $E$ ), que abaixo de 8 kJ/mol indica predominância de fisiossorção, enquanto entre 8 e 16 kJ/mol, quimiossorção, conforme relatado por Foo; Hameed, (2010).

Assim, nota-se que a biossorção do ácido ascórbico por LI ocorre predominantemente por meio de fenômenos físicos ( $E = 3,73$ ), podendo incluir a difusão de moléculas adentrando às células, enquanto a biossorção por LA ocorre predominantemente por meio de fenômenos químicos ( $E = 9,62$ ), ou seja, aparentemente, os sítios modificados por meio de substâncias alcalinas fizeram com que as interações entre o ácido ascórbico e a levedura fossem mais intensas, de natureza química. Neste caso, podem ter havido interações na superfície entre LA e ácido ascórbico, por meio de ligações eletrostáticas e de hidrogênio.

A possível natureza química das interações em LA também pode ser observada através dos parâmetros obtidos pelo modelo de Langmuir, que apresenta

ajustes melhores para LA do que para LI. Este modelo considera que as interações são puramente químicas e que cada sítio de sorção adsorve uma única molécula, em superfícies homogêneas, portanto, adsorção ocorre em uma monocamada e em locais específicos do adsorvente (FOO; HAMEED, 2010).

Assim, é possível inferir que as interações entre sorvente e sorvato são possivelmente mais fortes para LA do que para LI, no entanto, parte da vitamina C, em LI, pode ter difundido para o interior das células, enquanto, em LA, as ligações provavelmente ocorreram na superfície. No entanto, apesar das diferenças entre as interações, ambos os materiais demonstraram ser favoráveis para aplicação na biossorção de ácido ascórbico.

### **5.5. Estudos de dessorção**

Os estudos de dessorção foram realizados a fim de avaliar a possível liberação da vitamina C previamente incorporada. Para tal, foi realizado o processo de biossorção nas condições previamente otimizadas e posterior dessorção utilizando água ultra-pura acidificada com ácido fórmico, a mesma fase móvel utilizada para quantificação de vitamina C.

A partir deste teste, os resultados indicaram que, para LI,  $16,93 \pm 0,5$  % da quantidade de ácido ascórbico incorporada às células de levedura foram recuperados com apenas duas lavagens, enquanto, para LA,  $20,22 \pm 1,24$ % da vitamina C foi dessorvida do material, demonstrando que nas condições estudadas para se promover a dessorção, foi ligeiramente mais fácil se desfazer as interações entre a levedura alcalina e o ácido ascórbico, contrariamente ao esperado inicialmente, visto que, a partir do estudo isotérmico, LA demonstrava apresentar mais interações de natureza química, ou seja, comumente mais difíceis de serem quebradas e mais dificilmente reversíveis, quando comparada à LI.

No entanto, essas interações de natureza física provavelmente incluem a difusão da vitamina C para camadas mais profundas das células de LI. Sendo assim, isso implicaria em uma maior dificuldade de dessorção, pois o ativo estaria mais protegido, o que explicaria os resultados de dessorção obtidos.

No entanto, os resultados foram próximos, indicando que a modificação alcalina não alterou bruscamente a estrutura da levedura, sendo que as maiores diferenças nos resultados obtidos foram na cinética e na capacidade de sorção em concentrações mais baixas. Em concentrações mais altas, a capacidade foi praticamente igual ao material *in natura*.

Sendo assim, a baixa disponibilidade dos sítios de sorção de LA, observadas no início do estudo cinético, sugere que este comportamento também pode ter facilitado a reversibilidade destas interações.

### **5.6. Incorporação a vácuo**

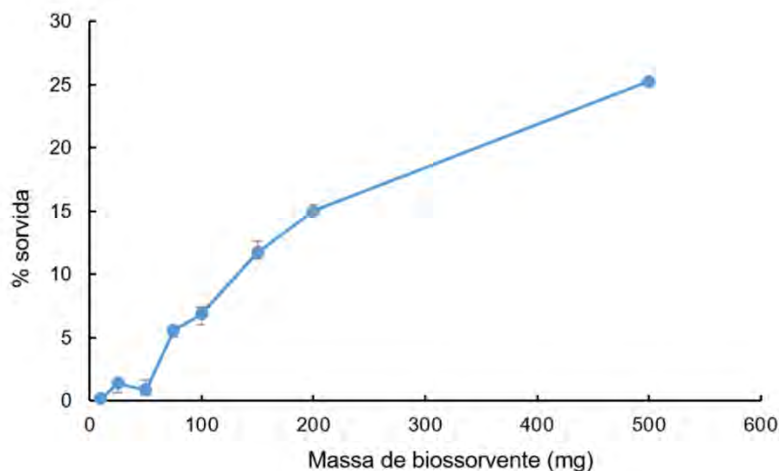
De acordo com Guillemain *et al.*, (2008), a pressão reduzida pode promover a sorção após sua liberação, quando o gás que estava bloqueando os poros das células é substituído pela solução contendo o composto de interesse.

Neste contexto, para avaliar se há influência do vácuo na incorporação de ácido ascórbico em células de levedura, o material *in natura* foi utilizado e, após 10 minutos de biossorção sob agitação constante a 1500 rpm, o mesmo foi selado a vácuo. Sem a utilização do vácuo, apenas com 10 min de tempo de biossorção entre levedura e vitamina C, a incorporação havia sido nula, assim, se houvesse alguma quantidade de ácido ascórbico retido em LI, teria sido em razão da utilização da técnica de impregnação a vácuo.

Para melhor otimização do processo, primeiramente foi avaliada a dosagem de levedura, variando a massa de 10 a 500 mg e mantendo o volume da solução de vitamina C a 10 mL em concentração de 100 ug/mL e pH 3. Os resultados obtidos a partir das variações de massa utilizando 60 s de vácuo estão apresentados na Figura 15.



**Figura 15.** Efeito da dosagem de levedura *in natura* (LI) para impregnação a vácuo, variando a massa entre 10 e 500 mg e mantendo o volume de vitamina C constante. n=3.



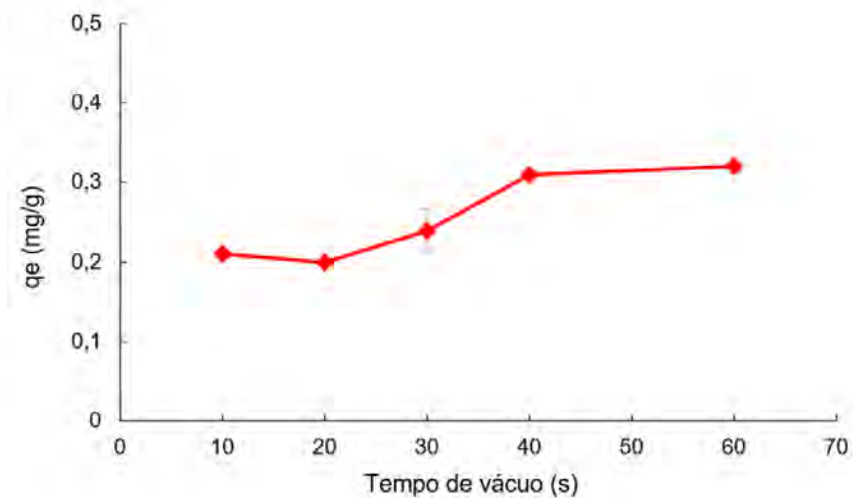
Fonte: Autoria própria.

A partir da Figura 15, nota-se que, com o incremento da massa, a porcentagem de incorporação de vitamina C aumenta consideravelmente até 500 mg, no entanto, ao testar massas superiores, a quantificação se tornava prejudicada, visto que quantidades mais elevadas de levedura interferem nos picos cromatográficos, pois elas liberam compostos que geram picos com tempo de retenção muito próximo ao da vitamina C. Por este motivo, o estudo foi realizado apenas até 500 mg, cuja capacidade de sorção foi 0,49 mg/g e, conforme indica a Figura 15, o percentual alcançou 25,27%. Em massas menores, a quantidade de vitamina incorporada por grama de LI também foi baixa, apresentando valores bem próximos ao considerar os desvios-padrão. Este valor baixo de incorporação pode ter ocorrido devido ao forte caráter hidrofílico da vitamina C, tendendo a ficar na água e não aderir às células de levedura. Assim, avaliando a porcentagem, optou-se por trabalhar com a massa de 500 mg, que apresentou os resultados mais favoráveis.

Posteriormente, foi testado o tempo de vácuo necessário para obter os melhores resultados. Para isso, foi utilizada a massa otimizada de LI (500 mg) e 10 mL de solução de vitamina C a pH 3 e concentração de 100 ug/mL. Após os mesmos

10 minutos de biossorção, o tempo de vácuo foi variado de 10 a 60 segundos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 16.

**Figura 16.** Efeito do tempo de vácuo para impregnação de vitamina C utilizando levedura *in natura* (LI), com variação entre 10 e 60 segundos. n=3.



Fonte: Autoria própria.

A partir da Figura 16, nota-se que a incorporação de ácido ascórbico por LI nas condições pré-determinadas obteve valores de  $q_e$  constantes a partir de 40 s, não sendo necessário utilizar tempos maiores na intenção de aumentar a capacidade de incorporação.

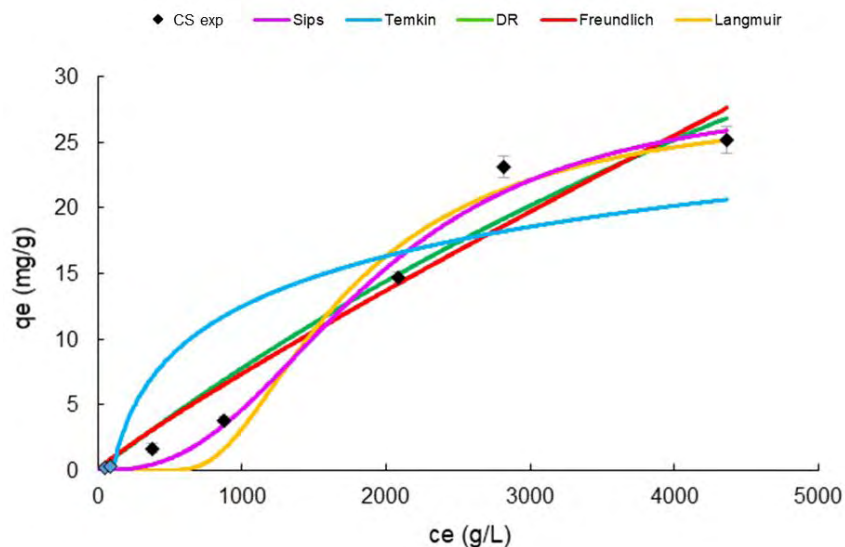
Por fim, após otimização de dosagem do biossorvente (50 g/L, ou seja, 500 mg de LI em 10 mL de solução) e tempo de vácuo (40 s), foi realizado o teste de capacidade de sorção, com o aumento das concentrações de ácido ascórbico, variando de 50 a 5000  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados experimentais, bem como os ajustes obtidos pelos modelos isotérmicos estão apresentados na Figura 17 e os parâmetros obtidos através dos ajustes estão contidos na Tabela 4, a fim de compreender os fenômenos ocorrentes.

**Tabela 4.** Valores de capacidade de sorção experimental ( $CS_{exp}$ ) e parâmetros isotérmicos empregando levedura *in natura* (LI) e levedura alcalina (LA) na biossorção de vitamina C.

<b>LI</b>	
<b><math>CS_{exp}</math> (mg/g)</b>	25,15 ± 1,01 (SD)
<b>Langmuir</b>	
$q_m$ (mg/g)	99,51 ± 81,11 (SE)
$b$ (L/mg)	8,47 10 <sup>-5</sup> ± 8,84 × 10 <sup>-5</sup> (SE)
$r^2$	0,9560
$\chi^2$	5,07
<b>Freundlich</b>	
$K_f$ (L/mg)	0,015 ± 0,019 (SE)
$n_f$	1,11 ± 0,20 (SE)
$r^2$	0,9475
$\chi^2$	6,06
<b>DR</b>	
$q_{DR}$ (mg/g)	28,24 ± 2,10 (SE)
$B_{DR}$ (mol <sup>2</sup> /J)	0,35 ± 0,084 (SE)
$E$ (kJ/mol)	1,19
$r^2$	0,9768
$\chi^2$	2,67
<b>Sips</b>	
$q_m$ (mg/g)	28,91 ± 2,95 (SE)
$K_s$ (L/mg)	5,26 10 <sup>-4</sup> ± 5,97 × 10 <sup>-5</sup> (SE)
$n$	2,58 ± 0,54 (SE)
$r^2$	0,9859
$\chi^2$	1,62
<b>Temkin</b>	
$b$ (J/mol)	5,54 ± 1,21 (SE)
$A$ (L/mg)	0,0095 ± 0,005 (SE)
$T$ (K)	298,15
$r^2$	0,7659
$\chi^2$	26,99

Fonte: Autoria própria

**Figura 17.** Dados experimentais de capacidade de sorção e ajustes dos modelos isotérmicos empregando levedura *in natura* (LI) para impregnação a vácuo de vitamina C, variando as concentrações iniciais entre 50 e 5000 µg/mL. n=3.



Fonte: Autoria própria.

Os dados de capacidade de sorção experimental ( $CS_{exp}$ ) e os ajustes dos modelos isotérmicos, apresentados na Figura 17, foram plotados para avaliar o perfil das isotermas de adsorção, facilitando a compreensão do processo experimental. Assim, foi possível notar que o modelo que apresenta comportamento mais semelhante aos dados experimentais é o de Sips, da mesma forma que ocorreu no estudo de biossorção, o que é condizente, visto que se trata do mesmo adsorvente e mesmo adsorvato, no entanto, poderiam haver mudanças quanto às principais formas de interação entre eles, devido ao processo experimental empregado. Apesar da aplicação do vácuo indicar uma curva experimental diferente da encontrada no estudo de biossorção, o modelo de Sips foi o que melhor se ajustou aos dados, indicando que fenômenos químicos e físicos influenciam no processo, conforme já discutido no item 5.4.4. Os parâmetros relacionados aos ajustes dos modelos isotérmicos, apresentados na Tabela 4, confirmam o melhor ajuste do modelo de Sips, indicando o melhor coeficiente de correlação ( $r^2=0,9859$ ) e o menor erro associado ( $\chi^2=1,62$ ). Além disso, a capacidade de sorção teórica obtida pelo

modelo ( $28,91 \pm 2,95$  mg/g) foi semelhante à experimental ( $25,15 \pm 1,01$  mg/g), levando em consideração os desvios-padrão.

Os demais modelos também apresentaram ajustes aceitáveis, exceto pelo modelo de Temkin, com os valores de  $r^2$  mais baixo (0,7659) e de  $\chi^2$  mais elevado (26,99). O modelo de D-R apresentou valor de  $E = 1,19$ , indicando predominância de fenômenos físicos.

Outro ponto importante a ser destacado é a capacidade máxima de sorção do material ter alcançado 25,15 mg/g em concentrações mais altas (5000 ug/mL), mesmo o ácido ascórbico sendo hidrofílico e apresentando resultados não significativos em concentrações mais baixas. Isso pode ter ocorrido devido à maior disponibilidade do nutriente em solução, que pôde interagir mais facilmente com a levedura.

Com tais resultados, nota-se que LI apresenta grande potencial para ser aplicada para incorporação de ácido ascórbico por impregnação a vácuo, principalmente, em soluções mais concentradas e com uma dosagem maior de bioissorvente.

## **5.7. Caracterização dos bioissorventes**

### **5.7.1. Composição centesimal**

A composição da amostra de levedura *Saccharomyces pastorianus* *natura* foi avaliada, apresentando  $95,01 \pm 0,62$  % de massa seca e  $2,53 \pm 0,11$  % de massa mineral. Além disso, a quantidade de proteína presente na biomassa foi de  $54,65 \pm 0,07$ , demonstrando que a *Saccharomyces pastorianus* tem um alto teor proteico, conforme encontrado na literatura (WU *et al.*, 2021), com maior quantidade de proteínas que a *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, que é o gênero de leveduras mais utilizado (CABALLERO-CÓRDOBA *et al.*, 1997; VAITHANOMSAT *et al.*, 2022).

Também conforme indica a literatura (CABALLERO-CÓRDOBA *et al.*, 1997), as leveduras *Saccharomyces* apresentam minerais (macro e microelementos), como fósforo, potássio, selênio, além de outros, como ferro, zinco e manganês, que estão em maiores quantidades nas leveduras *Saccharomyces pastorianus* quando

comparado às *Saccharomyces cerevisiae*, conforme indicam estudos de Barros *et al.*, (2023).

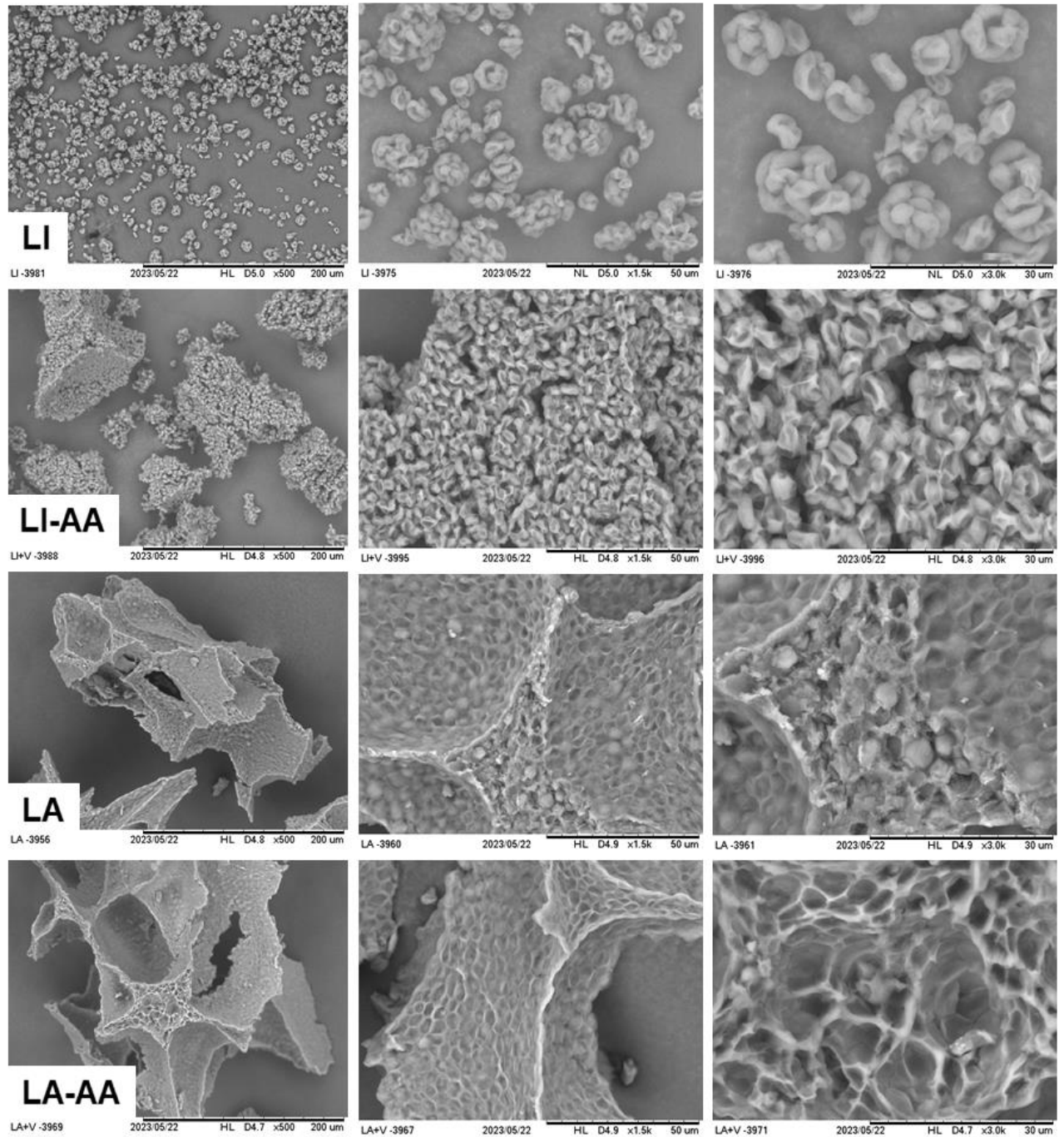
Assim, o uso de *Saccharomyces pastorianus* torna-se mais interessante para futuras aplicações em formulações alimentícias, pois apresenta maior apelo nutricional que a *Saccharomyces cerevisiae*.

### 5.7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliar a superfície dos materiais bioSORVENTES de levedura *in natura* (LI) e alcalina (LA) e compreender suas respectivas estruturas, recorreu-se à técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura. A Figura 18 mostra as imagens obtidas antes e após a bioSORÇÃO de ácido ascórbico, com magnificação de 500, 1500 e 3000x.

A partir da Figura 18, é possível observar que a morfologia de LI-AA, LA e LA-AA é mais irregular. Isso pode ter ocorrido devido à rigidez estrutural típica do processo de secagem por liofilização, em que a falta de água no estado líquido acarreta na formação de estruturas porosas e irregulares, conforme relatado por Kuck & Noreña, (2016). Sendo assim, nesses materiais não é possível observar estruturas tão esféricas e ovaladas, como observado em LI, que se trata da levedura *in natura* que foi seca apenas por *spray drying* após a lavagem. O formato murcho e com concavidades apresentado por LI deve-se a secagem por atomização e é comum em partículas obtidas por esse método. Tal formato das partículas e seu encolhimento pode ser atribuído a evaporação de água do seu interior para fora e quase instantaneamente durante o processo de atomização (FÁVARO-TRINDADE *et al.*, 2010).

**Figura 18.** Micrografias de levedura *in natura* (LI), levedura alcalina (LA), levedura *in natura* após bioissorção de ácido ascórbico (LI-AA) e levedura alcalina após bioissorção de ácido ascórbico (LA-AA), com magnificação de 500, 1500 e 3000×.



Fonte: Autoria própria.

Ao observar a Figura 18, também vale destacar que, após a modificação alcalina, tanto antes quanto após a bioissorção (LA e LA-AA), as estruturas observadas apresentaram ainda mais irregularidades e aglomerados, devido à modificação da superfície do material, o que também pode ter interferido na cinética inicial de bioissorção mais lenta, com uma possível indisponibilidade dos sítios para interação com o ácido ascórbico.

Apesar disso, a presença de poros na superfície dos materiais, principalmente de LA, seca por liofilização, pode auxiliar a difusão da vitamina C pelas células de levedura, o que pode explicar seu desempenho mais favorável, atingindo o equilíbrio em tempos menores de bioissorção quando comparado à LI.

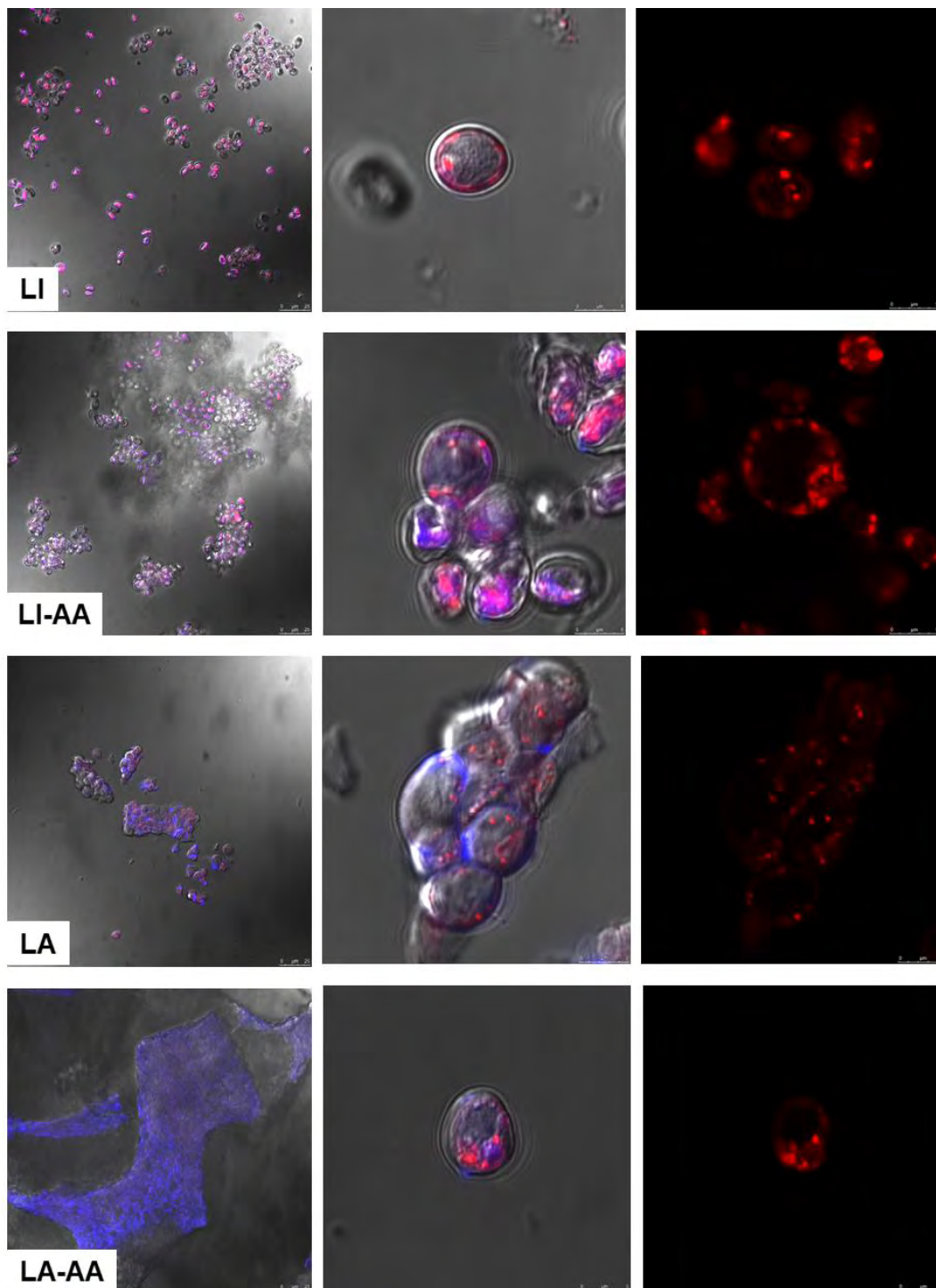
Também é importante notar que não foi possível observar diferença muito significativa antes e após a bioissorção a partir das micrografias apresentadas na Figura 18, visto que a vitamina C não pode ser identificada pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura por ser uma molécula muito pequena e solúvel em água, não permitindo sua visualização na superfície das células de levedura. Além disso, essa técnica permite baixa ampliação, não sendo possível distinguir as moléculas nas estruturas.

### **5.7.3. Microscopia Confocal de Varredura a Laser**

Para visualização do interior das células de levedura antes e após a bioissorção de vitamina C, foi utilizada a técnica de Microscopia Confocal a Laser, cujo sistema óptico confoca a luz em um único ponto focal, rejeitando a luz fora do plano, permitindo imagens de alta resolução (ELLIOTT, 2020). As imagens obtidas estão apresentadas na Figura 19.



**Figura 19.** Micrografias confocal de levedura *in natura* (LI), levedura alcalina (LA), levedura *in natura* após biossorção de ácido ascórbico (LI-AA) e levedura alcalina após biossorção de ácido ascórbico (LA-AA).



Fonte: Autoria própria.

A partir da Figura 19, nota-se algumas diferenças de intensidade e coloração que podem indicar a presença da vitamina C e seus padrões de distribuição. Em LI é possível observar menos pontos em contraste corados em vermelho quando comparado à LI-AA, em que há mais pontos corados, inclusive dentro das células e não apenas na superfície, como em LI. Assim, podemos atribuir essa diferença à presença de outros componentes nas células, ou da modificação dos componentes já existentes.

Os corantes são utilizados para marcar e visualizar melhor estruturas ou componentes específicos em amostras biológicas, sendo que o corante azul fluoresce na presença de polissacarídeos, que são componentes da parede celular das leveduras, enquanto o vermelho fluoresce ao interagir com moléculas lipídicas, que são componentes importantes do interior das membranas celulares, além de servir como forma de avaliar a integridade das membranas celulares (PHAM-HOANG *et al.*, 2018).

Desta forma, LI foi corada com ambos os corantes, devido aos componentes presentes em sua estrutura interna e externa. O ácido ascórbico não é corado por nenhum corante, assim, é possível discutir sua presença nas células de levedura apenas a partir das alterações ocorrentes nas demais estruturas coradas.

Assim, ao observar LI e LA, nota-se estruturas coradas em vermelho, que provavelmente correspondem às organelas, que, segundo Rubio *et al.*, (2021), são predominantemente hidrofóbicas. Após a incorporação de ácido ascórbico, LI-AA e LA-AA mostraram estruturas mais coradas e predominantemente mais próximas da superfície. Isso pode ter ocorrido após a incorporação da vitamina C, um composto bastante hidrofílico que, ao entrar nas células, possivelmente repeliu compostos hidrofóbicos presentes.

Além disso, destaca-se as paredes celulares dos materiais, que aparentam não ter sofrido rompimento ou danificação em sua estrutura, o que não prejudicaria a interação com a vitamina C.

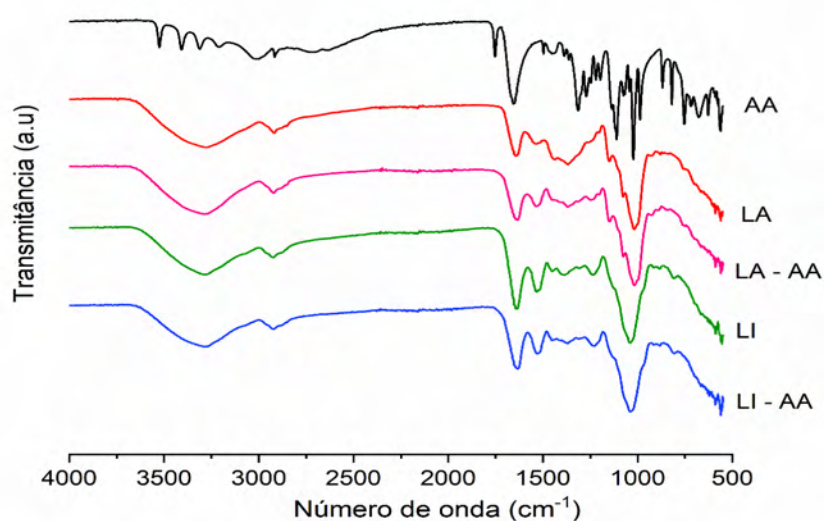
Ademais, observou-se a formação de aglomerados em LA, LI-AA e LA-AA, característicos do processo de secagem por liofilização, que também foram

observados pelas imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura, principalmente em LA-AA, apresentando aglomerados ainda maiores, visto que este material passou duas vezes pelo processo de liofilização. Esses aglomerados, apesar de dificultarem o escoamento dos pós, propiciam, em geral, maior proteção aos bioativos, uma vez que o empacotamento das partículas faz com que o ativo fique mais protegido fisicamente e ainda dificulta a difusão de oxigênio, por exemplo.

#### 5.7.4. Espectroscopia de Radiação na região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Para compreender melhor os possíveis sítios de sorção que participaram do processo de incorporação de vitamina C às células de *Saccharomyces pastorianus*, foi realizada a análise de Espectroscopia de Radiação na região do Infravermelho com Transformada de Fourier. Os gráficos obtidos das leveduras antes (LI e LA) e após (LI-AA e LA-AA) a bio-sorção, bem como da vitamina C pura estão apresentados na Figura 20.

**Figura 20.** Espectros de infravermelho de ácido ascórbico (AA), levedura *in natura* (LI), levedura alcalina (LA), levedura *in natura* após bio-sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e levedura alcalina após bio-sorção de ácido ascórbico (LA-AA).



Fonte: Autoria própria

Ao observar a Figura 20, em um primeiro momento, nota-se a similaridade entre os biossorventes antes e após a sorção, demonstrando que nem a modificação alcalina, nem a presença de ácido ascórbico causaram alterações muito significativas nos espectros, que apresentaram bandas bem semelhantes, como o esperado, indicando que as principais conformações moleculares e a composição da levedura não foram consideravelmente alteradas.

No entanto, é possível notar que a levedura *in natura* (LI) apresentou bandas um pouco mais intensas quando comparadas às da levedura após modificação alcalina (LA), como em cerca de  $1644\text{ cm}^{-1}$ , uma banda característica de amidas presentes nas proteínas e peptídeos, demonstrando que o tratamento pode ter causado quebra dessas ligações químicas, o que pode ser vantajoso, visto que sítios ativos podem estar mais disponíveis, favorecendo a interação entre sorvente e sorvato, da mesma forma que relata Ribeiro *et al.*, (2019) ao utilizar tratamento alcalino em *Saccharomyces cerevisiae*.

Além disso, próximo deste mesmo comprimento de onda há uma banda característica do ácido ascórbico (C=C), causando um leve alargamento da banda nos materiais LI e LA após a biossorção (LI-AA e LA-AA), sendo possível inferir a presença da vitamina C nos biossorventes.

Ademais, vale destacar outra banda de grande intensidade presente nas leveduras em cerca de  $1040\text{ cm}^{-1}$ , característica de  $\beta$ -glucanas e mananas, que representam a maior parte da composição das *Saccharomyces*. Adicionalmente, esta banda pode indicar ligações C-O-H em álcoois formados a partir de carboidratos residuais do processo de fermentação de cerveja (SILVERSTEIN *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2019).

Outra banda característica da *Saccharomyces pastorianus* é em cerca de  $3280\text{ cm}^{-1}$ , podendo indicar ligações O-H entre os carboidratos e/ou proteínas (RIBEIRO *et al.*, 2019), enquanto no espectro da vitamina C também há a presença de bandas correspondentes à ligação O-H entre  $3540$  e  $3170\text{ cm}^{-1}$  (PANICKER; VARGHESE; PHILIP, 2006). Assim, foi possível notar que as bandas de LI e LA após a biossorção (LI-AA e LA-AA) apresentaram leve alargamento da banda em

3280  $\text{cm}^{-1}$ , sendo assim, outro indício da presença do ácido ascórbico nas células de levedura tanto *in natura* quanto alcalina.

### 5.7.5. Potencial zeta e mobilidade eletroforética

O potencial zeta consiste na tendência de uma partícula se mover em resposta a um campo elétrico, podendo apresentar valores positivos, negativos ou iguais a zero. A Tabela 5 mostra os valores de potencial zeta dos materiais antes (LI e LA) e após (LI-AA e LA-AA) o processo de bioissorção, além dos valores de mobilidade eletroforética, que descreve o movimento de partículas carregadas em um campo elétrico.

**Tabela 5.** Valores de potencial zeta e mobilidade eletroforética de levedura *in natura* (LI), levedura alcalina (LA), levedura *in natura* após bioissorção de ácido ascórbico (LI-AA) e levedura alcalina após bioissorção de ácido ascórbico (LA-AA). n=3.

	Potencial zeta (mV)	Mobilidade eletroforética ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{Vs}$ )
LI	$-10,7^a \pm 0,47$	$-0,84^a \pm 0,04$
LI-AA	$-11,7^{ab} \pm 1,50$	$-0,91^{ab} \pm 0,12$
LA	$-15,1^b \pm 2,33$	$-1,18^b \pm 0,18$
LA-AA	$-9,2^a \pm 0,43$	$-0,72^a \pm 0,03$

Fonte: Autoria própria.

Quando o potencial zeta é mais negativo, a partícula tem mais cargas elétricas negativas na superfície, ou seja, apresenta grupos funcionais ou moléculas aniônicas sorvidas em sua superfície, causando uma repulsão eletrostática, de modo a evitar sua agregação e contribuir para a estabilidade da suspensão (CLOGSTON; PATRI, 2011).

Ao avaliar os dados da Tabela 5, nota-se que o potencial zeta de LI (-10,7 mV) é menos negativo que de LA (-15,1 mV), sendo assim, o material com

tratamento alcalino apresentou maior estabilidade, visto que apresenta mais cargas negativas em sua superfície modificada com NaOH.

Após a incorporação de ácido ascórbico, esperava-se que os materiais apresentassem valores mais negativos, no entanto, LA-AA apresentou os valores de potencial zeta mais altos, conseqüentemente, indicando uma menor estabilidade da suspensão, o que corrobora para resultados de estabilidade das partículas carregadas, cujos resultados indicaram estabilidade ligeiramente menor de LA-AA quando comparado à LI-AA.

É interessante destacar os valores de mobilidade eletroforética, também apresentados na Tabela 5, considerando a velocidade de deslocamento das partículas sob influência do campo elétrico, sendo assim, segundo Clogston; Patri, (2011), uma partícula com uma carga elétrica maior terá uma mobilidade eletroforética maior, visto que a força eletrostática que age sobre a partícula é proporcional à sua carga elétrica.

Assim, como a magnitude da mobilidade eletroforética é diretamente proporcional à velocidade de deslocamento da partícula, o bioissorvente LA, que possui a mobilidade eletroforética mais negativa, apresenta as partículas que se movem mais rapidamente. Um dos fatores que pode influenciar na mobilidade eletroforética é o tamanho, visto que partículas menores tendem a se mover mais rapidamente no campo elétrico. Desta forma, ao observar as imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura, a levedura alcalina (LA) realmente aparenta apresentar um tamanho menor quando comparado à levedura *in natura*.

#### **5.7.6. Umidade e atividade de água**

Para avaliar as alterações de umidade de atividade de água dos materiais enriquecidos (LI-AA e LA-AA), os mesmos foram acompanhados a cada 7 dias, junto ao estudo de estabilidade das partículas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Valores de umidade e de atividade de água das partículas de levedura *in natura* após sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e de levedura alcalina após sorção de ácido ascórbico (LA-AA) durante o estudo de estabilidade (de 0 a 35 dias). n=3.

Tempo (dias)	Umidade (%)		Atividade de água	
	LI-AA	LA-AA	LI-AA	LA-AA
0	9,26 <sup>a</sup> ± 0,60	7,42 <sup>a</sup> ± 0,70	0,440 <sup>a</sup> ± 0,012	0,307 <sup>a</sup> ± 0,003
7	10,71 <sup>b</sup> ± 0,05	10,78 <sup>b</sup> ± 1,38	0,473 <sup>a</sup> ± 0,16	0,479 <sup>b</sup> ± 0,023
14	9,95 <sup>a</sup> ± 0,07	10,95 <sup>b</sup> ± 0,08	0,412 <sup>a</sup> ± 0,014	0,420 <sup>c</sup> ± 0,008
21	10,26 <sup>ab</sup> ± 1,05	10,00 <sup>b</sup> ± 0,0	0,461 <sup>a</sup> ± 0,03	0,408 <sup>c</sup> ± 0,003
28	10,68 <sup>b</sup> ± 0,30	10,31 <sup>b</sup> ± 0,44	0,401 <sup>a</sup> ± 0,03	0,408 <sup>c</sup> ± 0,003
35	9,08 <sup>a</sup> ± 0,37	10,35 <sup>b</sup> ± 0,50	0,419 <sup>a</sup> ± 0,04	0,430 <sup>c</sup> ± 0,024

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Tabela 6, os valores de atividade de água ( $A_w$ ) dos materiais após a biossorção de ácido ascórbico foram similares e dentro da faixa esperada para produtos liofilizados. Além disso, também apresentaram valores abaixo dos recomendados para garantir estabilidade microbológica ( $< 0,6$ ) (RIGHI DA ROSA *et al.*, 2019), variando de 0,401 até 0,473 em LI-AA e de 0,307 até 0,479 em LA-AA durante os 35 dias.

Desta forma, nota-se que LI-AA apresentou valores de  $A_w$  que indicaram maior estabilidade da partícula, enquanto em LA-AA houve uma variação superior, principalmente ao comparar o ponto 0 com os demais tempos, que apresentaram valores próximos, mas com tendência de aumento. Isso indica que, provavelmente, LI-AA apresenta maior estabilidade da partícula carregada do que LA-AA.

Já a umidade, conforme indica a Tabela 6, também apresentou a mesma tendência de aumento após o início do estudo de estabilidade (ponto 0), principalmente em LA-AA, cujo aumento foi mais significativo.

No entanto, as porcentagens de umidade foram baixas, variando de 9,08 a 10,71% para LI-AA e de 7,42 a 10,95% para LA-AA. Valores menores de umidade são desejáveis para pós, visto que, comumente, o aumento da umidade está relacionado à instabilidade dos compostos encapsulados, pois pode promover sua liberação ou difusão para a superfície do material encapsulante, onde o composto fica mais propício à degradação (PARAMERA *et al.*, 2011).

Isso corrobora para a hipótese de que as partículas de levedura com modificação alcalina, quando carregadas com ácido ascórbico, apresentaram uma estabilidade ligeiramente menor que a levedura *in natura*. De acordo com RUBIO *et al.*, (2018), o tratamento alcalino pode alterar as ligações existentes e moléculas na superfície das leveduras, o que pode modificar a disponibilidade de sítios de sorção, mas não de forma irreversível. De fato, essa mudança pode ter ocorrido em LA, o que pode ter interferido na estabilidade da partícula após sua interação com o ácido ascórbico.

No entanto, a partir do tempo de 7 dias, foi possível notar que a  $A_w$  e as porcentagens de umidade se mantiveram praticamente estáveis tanto para LI-AA, quanto para LA-AA, até o 35º dia, não apresentando alterações significativas a serem destacadas.

## 5.8. Estudo de estabilidade

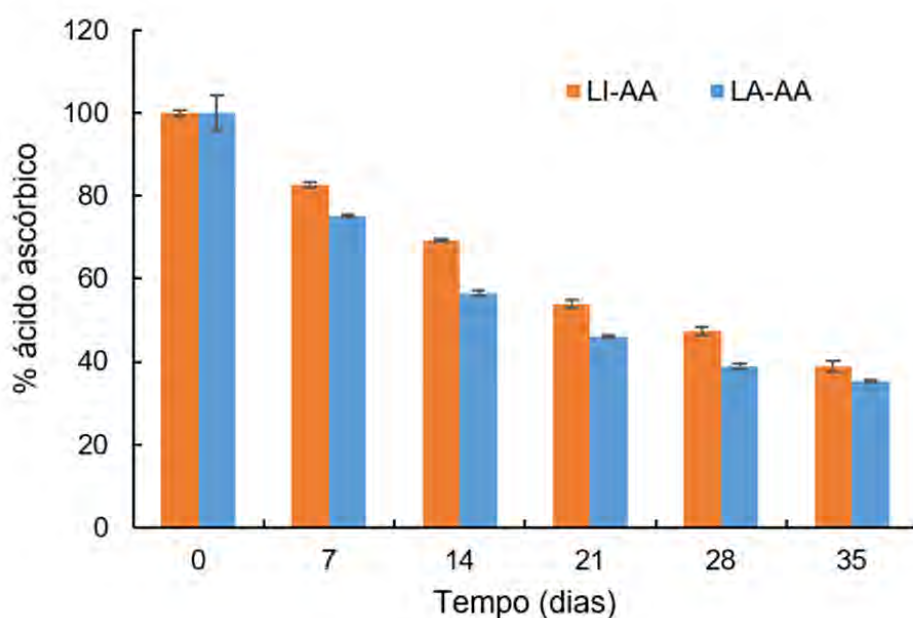
A Figura 21 mostra o gráfico de estabilidade dos bioSORVENTES após a incorporação de vitamina C (LI-AA e LA-AA) nas condições previamente otimizadas pelo estudo de bioSORÇÃO, sendo que o ponto 0 representa 100%.

De acordo com a Figura 21, nota-se que a estabilidade de ambos os bioSORVENTES decai com o tempo, chegando a  $38,83^a \pm 1,21$  % (LI-AA) e a  $35,29^b \pm 0,29$  (LA-AA) da quantidade inicial de vitamina C que foi desSORVIDA. Sendo assim, nota-se um comportamento esperado, em que a estabilidade das partículas carregadas diminui com o passar do tempo, pois, apesar da ideia de proteção, a levedura não é capaz de evitar completamente que haja degradação do ácido ascórbico.



No entanto, o uso deste material de parede é uma alternativa interessante tanto do ponto de vista nutricional, servindo, também, como fonte de proteína, carboidrato e minerais, além de apresentar proteção para a vitamina C, visto que esta é instável e pode interagir com outros componentes dos alimentos, causando sua degradação de maneira mais acelerada.

**Figura 21.** Estabilidade das partículas de levedura *in natura* após sorção de ácido ascórbico (LI-AA) e de levedura alcalina após sorção de ácido ascórbico (LA-AA), em um período entre 0 e 35 dias. n=3.



Fonte: Autoria própria.

Vale destacar que, conforme outras técnicas de caracterização também demonstraram, a levedura alcalina carregada com ácido ascórbico apresentou porcentagens ligeiramente menores em todos os tempos avaliados, conforme mostra a Figura 21, indicando que este material é menos estável que a levedura *in natura* contendo o ácido ascórbico. Isso pode ter ocorrido devido às alterações na parede celular e nos sítios ativos da levedura após a modificação alcalina e, principalmente, devido às interações entre o biossorbente modificado e vitamina C.

Apesar do estudo de biossorção ter descrito que o processo envolve fenômenos de natureza química, podem ter ocorrido interações reversíveis e na superfície do material, facilitando a oxidação e acarretando em uma estabilidade de LA-AA menor que LI-AA.

Comunian *et al.*, (2013) também estudaram a estabilidade da vitamina C, mas encapsulada por coacervação complexa, e obtiveram valores de degradação de quase 100 % da vitamina C em 15 dias. Sendo assim, os materiais LI e LA, propostos para proteção de vitamina C, apresentaram bons resultados para possíveis aplicações na formulação de produtos alimentícios.

## 6. CONCLUSÕES

A partir do estudo de biossorção, foram obtidos valores de capacidade experimental ( $q_e$ ) de  $19,11 \pm 0,97$  mg/g para LI e  $18,11 \pm 2,77$  mg/g para LA, demonstrando valores próximos e vantajosos para ambos os materiais, apesar das diferenças encontradas ao trabalhar em concentrações mais baixas, de 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $1,43 \pm 0,12$  mg/g e  $10,87 \pm 0,46$  mg/g, respectivamente para LI e LA), além do tempo de equilíbrio encontrado para biossorção de vitamina C por LA ter sido menor (180 min), em contraste com LI (300 min).

Para melhor compreensão do processo, foram aplicados modelos isotérmicos aos dados experimentais de capacidade de sorção, sendo o de Sips o que obteve melhores ajustes para LI e LA, indicando que interações de natureza física e química estão envolvidas no processo entre vitamina C e levedura, no entanto, os ajustes isotérmicos também indicaram que, em LA, as interações são mais predominantemente químicas do que as ocorrentes em LI, sugerindo que em LA podem haver ligações mais fortes e provavelmente difíceis de serem quebradas.

No entanto, a partir de estudos de dessorção e estabilidade das partículas carregadas, foi possível notar que a vitamina é extraída mais facilmente de LA do que de LI, o que pode ser justificado devido à possibilidade das interações físicas envolverem difusão para dentro da célula, tornando a retirada de LA mais difícil.

Apesar disso, os resultados obtidos por ambos materiais foram semelhantes nas condições otimizadas, inclusive no estudo de estabilidade, alcançando  $38,83 \pm 1,21$  % (LI-AA) e a  $35,29 \pm 0,29$  (LA-AA) de vitamina desorvida após 35 dias.

Desta forma, LI e LA apresentaram resultados favoráveis para atuarem como veículos na incorporação de vitamina C, o que também pôde ser demonstrado através das técnicas de caracterização.

Ademais, a biomassa de levedura *in natura* foi empregada para estudos de impregnação a vácuo, a fim de avaliar a influência desta técnica na capacidade do material, alcançando resultados muito favoráveis ( $25,15 \pm 1,01$  mg/g) e superiores à biossorção.

Para trabalhos futuros, espera-se realizar mais estudos que façam uso da impregnação a vácuo, com materiais modificados e investigando melhor o seu efeito no processo de biossorção.

Além disso, visando compreender o mecanismo de liberação da vitamina C, o tamanho de partícula, a porosidade e a permeabilidade das paredes celulares da levedura também são aspectos que devem ser avaliados.

Também seria interessante realizar estudos que avaliem e comparem a liofilização com outras técnicas de secagem, como *spray drying*, com o objetivo de compreender quais os métodos mais vantajosos para encapsular e preservar um maior conteúdo de vitamina C.

Ademais, investigações para determinar a biodisponibilidade e a bioacessibilidade da vitamina encapsulada seriam necessárias, a fim de prever sua capacidade de absorção pelo organismo.

Tais pesquisas contribuiriam para obter uma melhor compreensão dos processos envolvidos na encapsulação de vitamina C por *Saccharomyces pastorianus*, auxiliando no desenvolvimento de novos produtos fortificados e mais nutritivos.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS, S.; DA WEI, C.; HAYAT, K.; XIAOMING, Z. Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review. *Food Reviews International*, v. 28, n. 4, p. 343–374, 2012.

AGUILAR-USCANGA, B.; FRANCOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 37, n. 3, p. 268–274, 2003.

AMORIM, M.; PEREIRA, J. O.; GOMES, D.; PEREIRA, C. D.; PINHEIRO, H. PINTADO, M. Nutritional ingredients from spent brewer's yeast obtained by hydrolysis and selective membrane filtration integrated in a pilot process. *Journal of Food Engineering*, v. 185, p. 42-47, 2016.

ANWAR, J.; SHAFIQUE, U.; ZAMAN, W.; SALMAN, M.; DAR, A.; ANWAR, S. Removal of Pb(II) and Cd(II) from water by adsorption on peels of banana. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 6, p.1752–1755, 2010.

AOKI, N.; NISHIKAWA M.; HATTORI K. Synthesis of chitosan derivatives bearing cyclodextrin and adsorption of p-nonylphenol and bisphenol A. *Carbohydrate Polymers*, v. 52, n. 3, p. 219–23, 2003.

ARIEF, V. O.; TRILESTARI, K.; 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.

AZEVEDO, F. G.; FERREIRA, F. G. D.; DA MOTTA SOBRINHO, M. A. remoção de cobre e chumbo presentes em efluentes pelo gênero *saccharomyces*. *Revista Eletrônica da Estácio Recife*, v. 6, n. 4, 2020.

BARROS, M. C.; BIZERRA-SANTOS, J.; MAIA, L.; RIBEIRO-FILHO, N. Industrial yeast characterisation for single cell protein application. *Food Science and Engineering*, p. 116-129, 2023.

BLOOMER, R. J.; FISHER-WELLMAN, K. H. Impact of vitamin C on exercise-induced oxidative stress and tissue injury. In: KUCHARSKI H.; ZAJAC J. (Eds). *Handbook of Vitamin C Research: Daily Requirements, Dietary Sources and Adverse Effects* (p.1-43). Nova Science Publishers. New York, 2009.

BREXÓ, R. P. *Caracterização, interação com bactéria láctica, e o impacto do reciclo de células e lavagem ácida durante a fermentação etanólica sobre leveduras originárias de processo artesanal de cachaça e do resíduo de malte cervejeiro*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces sp.*) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. *Food Science and Technology*, v. 17, p. 102-106, 1997.

CHANG, D.; ABBAS, S.; HAYAT, K.; XIA, S.; ZHANG, X.; XIE, M.; KIM, J. M. Encapsulation of ascorbic acid in amorphous maltodextrin employing extrusion as affected by matrix/core ratio and water content. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 45, n. 9, p. 1895–1901. 2010.

CHEN, X. Modeling of experimental adsorption isotherm data. *Information*, v. 6, p.14–22, 2015.

CHEN, X.; HE, L. Microwave irradiation assisted preparation of chitosan composite microsphere for dye adsorption. *International Journal of Polymer Science*, v. 2017, p. 1–8, 2017.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids*, v. 61, p. 442–457. 2016.

COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; DE MATOS JUNIOR, F. E.; DE CARVALHO BALIEIRO, J. C.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Research International*, v. 52, p. 373–379. 2013.

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

DADKHODAZADE, E.; MOHAMMADI, A.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; MIRMOGHTADAIE, L.; HOSSEINI, S. M. Yeast cell microcapsules as a novel carrier for cholecalciferol encapsulation: development, characterization and release properties. *Food Biophysics*, v. 13, n. 4, p. 404–411, 2018.

DAVEY, M. W.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I. J. J.; STRAIN, J. J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 7, p. 825–860. 2000.

DEBS, K. B.; CARDONA, D. S.; SILVA, H. D. T.; NASSAR, N.; CARRILHO, E. N. V. M.; HADDAD, P. S.; LABUTO, G. Oil spill cleanup employing magnetite nanoparticles and yeast-based magnetic bionanocomposite *Journal of Environmental Management*, v. 230, p. 405–412, 2019.

DEMARCHI, C. A.; DEBRASSI, A.; MAGRO, J. D.; NEDELKO, N.; ŚLAWSKA-WANIEWSKA, A.; DŁUZEWSKI, P.; GRENECHE, J. M.; RODRIGUES, C. A. Adsorption of Cr(VI) on crosslinked chitosan-Fe(III) complex in fixed-bed systems. *Journal of Water Process Engineering*, v. 7, p. 141–152, 2015.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by *spray drying*. *Journal of Microencapsulation*, v. 22, n. 2, p. 179–192. 2005.

DUBININ, M. M.; RADUSHKEVICH, L. V. The equation of the characteristic curve of the activated charcoal. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR. Physical Chemistry Section*, v. 55, p. 331–337, 1947.

EITENMILLER, R. R.; YE, L.; LANDEN, J. R. W.O. *Ascorbic acid: vitamin C. Vitamin analysis for the health and food sciences*. 2 ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, p. 231-289, 2008.

- ELLIOTT, A. D. Confocal microscopy: principles and modern practices. *Current protocols in cytometry*, v. 92, n. 1, p. 68, 2020.
- ESTEVINHO, B. N.; CARLAN, I.; BLAGA, A.; ROCHA, F. Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a *spray drying* process. *Powder Technology*, v. 289, p. 71–78, 2016.
- FAO, WHO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 2004.
- FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n. 2, p. 103–112, 2008.
- FÁVARO-TRINDADE, C. S.; SANTANA, A. D. S.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. A.; NETTO, F. M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food hydrocolloids*, v. 24, n. 4, p. 336-340, 2010.
- FOMINA, M; GADD, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology*, v. 160, p. 3–14, 2014.
- FRANCO, D. S. P.; TANABE, E. H.; DOTTO, G. L. Continuous adsorption of a cationic dye on surface modified rice husk: Statistical optimization and dynamic models. *Chemical Engineering Communications*, v. 204, n. 6, p. 625–634, 2017.
- FREUNDLICH, H. M. Over the Adsorption in Solution. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 57, p. 385–470, 1906.
- GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance, and significance for pollution treatment. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, v. 84, p. 13–28, 2009.
- GUILLEMIN, A.; DEGRAEVE, P.; NOËL, C.; SAUREL, R. Influence of impregnation solution viscosity and osmolarity on solute uptake during vacuum impregnation of apple cubes (var. Granny Smith). *Journal of Food Engineering*, v. 86, n. 4, p. 475–483, 2008.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, v. 96, n. 4, p. 654-664, 2006.

HILL, T. L. Statistical mechanics of multimolecular adsorption II. Localized and mobile adsorption and absorption. *The Journal of Chemical Physics*, v. 14, n. 7, p. 441-453, 1946.

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

JACH, M. E.; SEREFKO, A. Nutritional yeast biomass: Characterization and application. *Diet, Microbiome and Health*, p. 237-270, 2018.

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

JILANI, H.; CILLA, A.; BARBERÁ, R.; HAMDÍ, M. Improved bioaccessibility and antioxidant capacity of olive leaf (*Olea europaea L.*) polyphenols through biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. *Industrial Crops and Products*, v. 84, p. 131-138, 2016.

JOHNSTON, C. S.; STEINBERG, F. M.; RUCKER, R. B. Ascorbic Acid. In: *Handbook of Vitamins*, 4th ed. CRC Press: Boca Raton FL, 2007.

JOSÉ, J. C.; DEBS, K. B.; LABUTO, G.; CARRILHO, E. N. V. M. Synthesis, characterization and application of yeast-based magnetic bionanocomposite for the removal of Cu(II) from water. *Chemical Engineering Communications*, v. 206, n.11, p.1581-1591. 2019.

KARAMAN, K. Fabrication of gallic acid loaded yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) microcapsules: Effect of plasmolysis treatment and solvent type on bioactivity and release kinetics. *LWT*, v. 148, p. 111640, 2021.

KONG, J.; LI, Z.; ZHANG, H.; GAO, X. D.; NAKANISHI, H. Production of encapsulated creatinase using yeast spores. *Bioengineered*, v. 8, n. 4, p. 411-419, 2017.



KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food chemistry*, v. 194, p. 569-576, 2016.

LABUTO, G.; CARDONA, D. S.; DEBS, K. B.; IMAMURA, A. R.; BEZERRA, K. C. H.; CARRILHO, E. N. V. M.; HADDAD, P. S. Low cost agroindustrial biomasses and ferromagnetic bionanocomposites to cleanup textile effluents. *Desalination and Water Treatment*, v. 12, p. 80–89, 2018.

LAGERGREN, S. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, v. 241, p. 1–39. 1898.

LANGMUIR, I. The dissociation of hydrogen into atoms. III. The mechanism of the reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 38, n. 6, p. 1145–1156, 1916.

LEE, D. W.; LIM, H.; CHONG, H. N.; SHIM, W. S. Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: A review. *The Open Biomaterials Journal*, v. 1, p. 10–20, 2009.

LIU, X.; LI, Z.; CHEN, Z.; WANG, N.; GAO, Y.; NAKANISHI, H.; GAO, X. D. Production of l-ribulose using an encapsulated l-arabinose isomerase in yeast spores. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 17, p. 4868–4875, 2019.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavor encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 41, n.1, p.1–21. 2006.

MARCELLINO, S.; ATTAR, H.; LIÈVREMONT, D.; LETT, M. C.; BARBIER, F.; LAGARDE, F. Heat-treated *Saccharomyces cerevisiae* for antimony speciation and antimony(III) preconcentration in water samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 629, p. 73–83, 2008.

MAROLDI, W. V.; MACIEL, G. M.; ROSSETTO, R.; BORTOLINI, D. G., FERNANDES, I. D. A. A.; HAMINIUK, C. W. I. (Biosorption of phenolic compounds

from *Plinia cauliflora* seeds in residual yeast: Kinetic, equilibrium, and bioaccessibility studies. *Journal of Food Processing and Preservation*, p. 17156, 2022.

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

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.

MOUBARIK, A.; GRIMI, N. Valorization of olive stone and sugar cane bagasse byproducts as biosorbents for the removal of cadmium from aqueous solution. *Food Research International*, v. 73, p.169–175, 2015.

MOVASAGHI, Z., REHMAN, S., REHMAN, D. I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008.

NAKHAE MOGHADAM, M.; KHAMENEH, B.; FAZLY BAZZAZ, B. S. *Saccharomyces cerevisiae* as an efficient carrier for delivery of bioactives: a review. *Food Biophysics*, v. 14, p. 346–353, 2019.

NEIMAN, A. M. Ascospore formation in the yeast. *Society*, v. 69, n. 4, p. 565–584, 2005.

OLIVEIRA, M. R. F.; ABREU, K. V.; ROMÃO, A. L. E.; DAVI, D. M. B.; MAGALHÃES, C. E. C.; CARRILHO, E. N. V. M.; ALVES, C. R. Carnauba (*Copernicia prunifera*) palm tree biomass as adsorbent for Pb(II) and Cd(II) from water medium. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, p. 18941–18952, 2021.

PANICKER, C.; VARGHESE, H. T.; PHILIP, D. FT-IR, FT-Raman and SERS spectra of vitamin C. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 65, n. 3-4, p. 802-804, 2006.

PARAMERA, E. I., KONTELES, S. J., & KARATHANOS, V. T. Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, v. 125, p. 892–902, 2011.

PARK, D.; YUN, Y. S.; PARK, J. M. The past, present, and future trends of biosorption. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 15, n. 1, p. 86–102, 2010.

PEREIRA, K. C.; FERREIRA, D. C. M.; ALVARENGA, G. F.; PEREIRA, M. S. S.; BARCELOS, M. C. S.; COSTA, J. M. G. Microencapsulação e liberação controlada por difusão de ingredientes alimentícios produzidos através da secagem por atomização: revisão. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 21, p. 1–9, 2018.

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

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, v. 13, p. 76-83, 2016.

RIBEIRO, V. R.; MACIEL, G. M.; FACHI, M. M.; PONTAROLO, R.; DE ANDRADE ARRUDA FERNANDES, I.; STAFUSSA, A. P.; HAMINIUK, C. W. I. Improvement of phenolic compound bioaccessibility from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts after biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, v. 126 n. 2019. 108623. p. 1-10, 2019.

RIBEIRO, V. R.; MACIEL, G. M.; FACHI, M. M.; PONTAROLO, R.; FERNANDES, I. D. A. A.; STAFUSSA, A. P.; HAMINIUK, C. W. I. Improvement of phenolic compound bioaccessibility from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts after biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, v. 126, p. 108623, 2019.

RIGHI DA ROSA, J. et al. Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium spp.*) by *spray drying*: Characterization,

stability and simulated gastrointestinal conditions. *Food hydrocolloids*, v. 89, p. 742-748, 2019.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. F.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*. v. 90, p. 37–42, 2012.

ROSSETTO, R., MACIEL, G. M., BORTOLINI, D. G., RIBEIRO, V. R., & ISIDORO HAMINIUK, C. W. Acai pulp and seeds as emerging sources of phenolic compounds for enrichment of residual yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) through the biosorption process. *LWT - Food Science and Technology* v. 128. 109447. p. 1-9. 2020.

RUBIO, F. T. V.; HAMINIUK, C. W. I.; SANTOS, M. M.; THOMAZINI, M.; MORAES, I. C. F.; MARTELLI-TOSI, M.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Development of natural pigments microencapsulated in waste yeast *Saccharomyces cerevisiae* using spray drying technology and their application in yogurt. *Food & Function*, v. 12, n. 19, p. 8946-8959, 2021.

RUBIO, F. T. V.; MACIEL, G. M.; DA SILVA, M. V.; CORRÊA, V. G.; PERALTA, R. M.; HAMINIUK, C. W. I. Enrichment of waste yeast with bioactive compounds from grape pomace as an innovative and emerging technology: Kinetics, isotherms and bioaccessibility. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 45, p. 18–28, 2018.

SAADI, R.; SAADI, Z.; FAZAELI, R.; FARD, N. E. Monolayer and multilayer adsorption isotherm models for sorption from aqueous media. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 32, n. 5, p. 787–799, 2015.

SALARI, R.; BAZZAZ, B. S.; RAJABI, O.; KHASHYARMANESH, Z. New aspects of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel carrier for berberine. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 21, n. 1, p. 73, 2013.

SILVA, M. P.; RAI, R.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; NITIN, N. Vacuum-assisted biosorption for developing combined delivery formulations of live probiotics and

plant-phenolic compounds and their in-vitro evaluation. *Food Bioscience*, p. 102732, 2023.

SILVERSTEIN R. M., WEBSTER F. X., KIEMLE D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*. 8<sup>th</sup> ed., Wiley, New Jersey. 2012.

SIPS R. Combined form of Langmuir and Freundlich equations. *The Journal of Chemical Physics*, v. 16, p. 490–495, 1948.

SOARES, B. C.; ABILIO, T. E.; JOSÉ, J. C.; LABUTO, G.; CARRILHO, E. N. V. M. Removal of Cr(VI) from water by *in natura* and magnetic nanomodified hydroponic lettuce roots. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, DOI: 10.1007/s11356-022-21755-0.

SONG, S. H.; YEOM, B. Y.; SHIM, W. S.; HUDSON, S. M., HWANG, T. S. Synthesis of biocompatible CS-g-CMS ion exchangers and their adsorption behavior for heavy metal ions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 13, n. 6, p. 1009–1016, 2007.

SPÍNOLA, V., MENDES, B., CÂMARA, J. S., & CASTILHO, P. C. Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 489–495. 2013.

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

SZULTKA, M.; BUSZEWSKA-FORAJTA, M.; KALISZAN, R.; BUSZEWSKI, B. Determination of ascorbic acid and its degradation products by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Electrophoresis*, v. 35, n. 4, p. 585–592. 2014.

- TARRARO-TRANI, M. T.; PHILLIPS, K. M.; COTTY, M. Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 12-25, 2012.
- TEMKIN M. I.; PYZHEV V. Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalyst. *Acta physicochimica URSS*, v. 12, p. 327–356, 1940.
- TRINDADE, M.A.; GROSSO, C.R.F. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. *Journal of Microencapsulation*. v. 17, p. 169–176, 2000.
- ULLRICH, A. H.; SMITH, M. W. The biosorption process of sewage and waste treatment. *Sewage and Industrial Wastes*, v. 23, n. 10, p. 1248-1253, 1951.
- VAITHANOMSAT, P. et al. Functionality of yeast  $\beta$ -glucan recovered from *Kluyveromyces marxianus* by alkaline and enzymatic processes. *Polymers*, v. 14, n. 8, p. 1582, 2022.
- VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces Meyen ex Reess (1870)*. *The Yeasts*, p.733–746, 2011.
- VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y. S. Bacterial biosorbents and biosorption.
- VOLESKY, B., MAY-PHILLIPS, H. A. Biosorption of Heavy Metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 42, p. 797-806, 1995.
- WICKERHAM, L. J. *Taxonomy of yeast* US Dept Agric Tech Bull No. 1029, p. 1–59. US Dept Agric Tech Bull, n. 1029, p. 1–59, 1951.
- YOUNG, S.; NITIN, N. Thermal and oxidative stability of curcumin encapsulated in yeast microcarriers. *Food Chemistry*, v. 275, p. 1–7, 2019.
- ZHANG, H.; TACHIKAWA, H.; GAO, X.D.; NAKANISHI, H. Applied usage of yeast spores as chitosan beads. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 16, p. 5098–5105, 2014.
- ZHANG, J.; CHEN, X.; ZHOU, J.; LUO, X. Uranium biosorption mechanism model

of protonated *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 385, p.121588, 2020.

ZHOU, C.; GONG, X.; HAN, J.; GUO, R. Removal of Pb(II) and Zn(II) from aqueous solutions by raw crab shell: a comparative study. *Water Environment Research*, v. 88, n. 4, p. 374–383, 2016.

ZUMREOGLU-KARAN, B. The coordination chemistry of vitamin C: An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 250, p. 2295–2307, 2006.