



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA SILVA FARINAZZO

**MAÇÃ ORGÂNICA E CONVENCIONAL: ESTUDO CINÉTICO  
DA FERMENTAÇÃO COM *Saccharomyces boulardii* E  
EFEITO PROTETOR AO ESTRESSE OXIDATIVO CELULAR**

FERNANDA SILVA FARINAZZO

**MAÇÃ ORGÂNICA E CONVENCIONAL: ESTUDO CINÉTICO  
DA FERMENTAÇÃO COM *Saccharomyces boulardii* E  
EFEITO PROTETOR AO ESTRESSE OXIDATIVO CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Farinazzo, Fernanda Silva.

Maçã orgânica e convencional: estudo cinético da fermentação com *Saccharomyces boulardii* e efeito protetor ao estresse oxidativo celular / Fernanda Silva Farinazzo. - Londrina, 2016.  
145 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. *Malus domestica* - Teses. 2. espécies reativas de oxigênio - Teses. 3. levedura - Teses. 4. probiótico - Teses. I. Garcia, Sandra . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

FERNANDA SILVA FARINAZZO

**MAÇÃ ORGÂNICA E CONVENCIONAL: ESTUDO CINÉTICO DA  
FERMENTAÇÃO COM *Saccharomyces boulardii* E EFEITO  
PROTETOR AO ESTRESSE OXIDATIVO CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Karla Bigetti Guergoletto  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de maio de 2016.

Aos meus pais Luiz Eduardo e Lucinda, pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Por me mostrarem a direção correta a importância da família e o caminho da honestidade e persistência. Aos meus irmãos Carolina e Eduardo, pelo amor, amizade e carinho. Amo todos vocês.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora, por sempre me concederem sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Garcia, pela confiança depositada, pela orientação, disposição, amizade e ensinamentos. Pelo exemplo, competência profissional, caráter e generosidade. Minha admiração e respeito. Minha eterna gratidão.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Wilma Spinosa, por me receber em seu laboratório de portas abertas e sempre estar à disposição, respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Obrigada pelos ensinamentos, convívio e amizade.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições acerca desta dissertação.

Aos docentes e profissionais do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina por compartilharem seus ensinamentos e estarem sempre à disposição para auxiliar nas dúvidas e tonarem possível a realização deste trabalho.

Ao laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica (DIA) e em especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Suzana Lucy Nixdorf, pela oportunidade de fornecer espaço no laboratório para que pudesse realizar as determinações cromatográficas. Pela amizade, disposição e ensinamentos.

Ao Tiago Madeira, doutorando em Química e membro do Laboratório DIA, pelas realizações das análises cromatográficas. Pela dedicação, profissionalismo, disposição e sobretudo amizade. Com certeza você foi muito importante para a realização deste trabalho. Serei eternamente grata.

À Universidade Estadual de Londrina, pela infraestrutura e facilidades proporcionadas.

Ao CNPq e Capes, pela bolsa de estudos concedida e incentivo. Foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amados pais, Luiz Eduardo e Lucinda, por me proporcionarem a oportunidade de estudar e de seguir o caminho desejado. Vocês

são os melhores pais do mundo. Pelo amor, dedicação, compreensão, amizade e carinho. Obrigado por estarem sempre presente.

Ao meu amado irmão Eduardo pelo convio diário e por me aguentar nos dias de estresse. Pela disponibilidade em me ajudar sempre que necessário, pela amizade e companheirismo. Obrigada pela formatação deste trabalho.

À minha amada irmã Carolina por sempre ter me dado força, pelos conselhos, amizade e por sempre estar presente nos meus dias apesar da distância.

Aos meus avós, Felício (saudades eternas), Alice e Aurora, que dignamente me apresentaram o apoio da família, pelo amor que me mostraram a direção correta e me ensinaram a ter fé na vida. Obrigada por tudo. Amo muito vocês.

Ao meu tios João Marcos e Margareti; ao meu cunhado João Paulo; aos meus primos Leonardo e Gabriel, vocês são minha família e meus amigos. Obrigada pelos conselhos, apoio e por sempre torcerem pelo meu sucesso. Amo vocês.

Às minhas queridas amigas Flávia e Marília pela amizade sincera, carinho, por me ajudarem sempre que precisei, pela colaboração, pela ajuda nos experimentos e pelas risadas que amenizavam o estresse diário.

Às grandes amigas Letícia e Mariana pelos dias que passamos no Laboratório DIA, pela amizade, risadas, muita conversa e carinho, vocês são muito especiais.

As companheiras de mestrado, Livia e Paola, vocês foram fundamentais nesses dois anos.

Aos demais colegas do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, em especial a Camila, Alessandra, Marli, Marsívio e Maria Thereza, pela amizade e pelos momentos engraçados e conversa durante os dias no laboratório.

Às grandes e eternas amigas, Bárbara, Thatiane, Letícia e Ana Maria que apesar da distância sempre foram presentes. Obrigada pelos conselhos, apoio nos momentos difíceis e amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desde trabalho, direta e indiretamente, para que essa etapa da minha vida pudesse ser concretizada.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original”  
(Albert Einstein)

FARINAZZO, Fernanda Silva. **Maçã orgânica e convencional: estudo cinético da fermentação com *Saccharomyces boulardii* e efeito protetor ao estresse oxidativo celular.** 2016. 145f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

A cultura de maçã é destaque como atividade econômica no Brasil, principalmente na região Sul. O cultivo de maçã ocorre preferencialmente sob os sistemas orgânico e convencional, sendo que estes acabam interferindo diretamente nas características nutritivas e sensoriais do fruto. A maçã apresenta compostos bioativos, como os fenólicos, que fornecem benefícios à saúde por atuarem como antioxidantes prevenindo ou retardando a formação de radicais livres. Os compostos fenólicos, devido suas características positivas à saúde, comumente são denominados funcionais, designação que também se enquadram os produtos que contenham probióticos. Estes agem positivamente no equilíbrio da microbiota intestinal e por consequência impactam na saúde do consumidor. O trabalho propôs investigar a utilização de maçã convencional e orgânica como substrato fermentativo de células de *Saccharomyces boulardii*, avaliando o efeito protetor dos antioxidantes presentes no substrato e sua correlação com o estresse oxidativo celular da levedura. As maçãs orgânicas e convencionais, passaram pelo processo de sacarificação e fermentação simultânea (SFS), na presença de *S. boulardii*, e avaliada suas características cinéticas e o efeito protetor dos antioxidantes presentes nos substrato sobre células eucarióticas. A determinação do estresse oxidativo sofrido pela levedura foi para verificar o impacto dos flavonoides, sobretudo da quercetina, no aumento da viabilidade celular. A liberação de açúcares pela sacarificação de celulose e pectina da polpa de maçã orgânica e convencional, provavelmente interferiu no processo, proporcionando um desequilíbrio no teor de monossacarídeos e no rendimento de biomassa. Pode-se obter maior produção de biomassa em substrato orgânico ( $4,885 \pm 0,004$  g.L<sup>-1</sup>) que em convencional ( $4,798 \pm 0,002$  g.L<sup>-1</sup>). A medida que a SFS progredia, a síntese de ácido acético, succínico e cítrico ocorria, reduzindo consequentemente o pH do mosto. Esta redução foi visivelmente maior para polpa de maçã convencional, o que pode ter contribuído para a menor produção de biomassa nesse substrato. Através da construção de curva cinética, foi possível verificar que o teor de quercetina e compostos fenólicos, foram maiores para o fermentado em polpa de maçã orgânica. A proteção celular foi correlacionada com a diminuição nos marcadores de estresse oxidativo e constatou-se que as concentrações de quercetina presentes na maçã orgânica e convencional, conseguiram reduzir os níveis de estresse celular, entretanto, menor oxidação foi verificada quando utilizou-se quercetina sintética, a uma concentração de 0,1 mg de quercetina ramnosídeo. mL<sup>-1</sup>. Estes resultados suportam que a quercetina reduz o estresse oxidativo mediado pelas espécies reativas de oxigênio, devido sua ação antioxidante nas células de *S. boulardii*.

**Palavras-chaves:** *Malus domestica*. Espécies reativas de oxigênio. Levedura. probiótico.

FARINAZZO, Fernanda Silva. **Organic and conventional apple: kinetic study of fermentation with *Saccharomyces boulardii* and protective effect on cellular oxidative stress.** 2016. 145p. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Londrina State University, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

The apple's culture is featured as economic activity in Brazil, mainly in the South. The apple cultivation is preferably in the organic and conventional systems, and they end up interfering directly in the nutritional and sensory characteristics of the fruit. The apple presents bioactive compounds, such as phenolic, that provide health benefits by acting as antioxidants preventing or retarding the formation of free radicals. Phenolic compounds, due to their positive characteristics to the health, are commonly called functional designation that also fall products containing probiotics. These act positively on the balance of intestinal microbiota and therefore impact on consumer health. The work proposed to investigate the use of conventional and organic apple as fermentation substrate *Saccharomyces boulardii* cells, evaluating the protective effect of the antioxidants present in the substrate and its correlation with the cellular oxidative stress yeast. The organic and conventional apples, passed by the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) in the presence of *S. boulardii*, and evaluated their kinetic characteristics, and protective effect of antioxidants on the substrate eukaryotic cells. The determination of oxidative stress suffered by yeast was to verify the impact of flavonoids, especially quercetin, increased cell viability. The release of sugars by saccharification of cellulose and pectin in conventional and organic apple pulp probably has interfered in the process, providing an imbalance in the monosaccharide content and biomass yield. It's can get higher biomass production in organic substrate ( $4.885 \pm 0.004$  g.L<sup>-1</sup>) than conventional ( $4.798 \pm 0.002$  g.L<sup>-1</sup>). As SSF progressed, the synthesis of acetic acid, succinic acid and citric occurred, thereby reducing the pH of the wort. This decrease was noticeably larger for conventional apple pulp, which may have contributed to the lower production of biomass on the substrate. Through kinetic curve of construction, it was verified that the quercetin content and phenolic compounds, was greater for fermented organic apple pulp. Cell protection was correlated with a decrease in markers of oxidative stress and it was found that the concentrations of quercetin present in organic and conventional apple, can reduce the cell stress levels, however, the lower oxidation was observed when we used synthetic quercetin, at a concentration of 0.1 mg quercetin rhaminoside mL<sup>-1</sup>. These results support the use of quercetin reduces oxidative stress mediated by reactive oxygen species, due to its antioxidant activity in the cells of *S. boulardii*.

**Keywords:** *Malus domestica*. Reactive oxygen species. Yeast. Probiotics.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Estrutura básica dos flavonoides e sistema de numeração .....30
- Figura 2** - Estrutura química da quercetina .....33
- Figura 3** - Avaliação da agricultura orgânica em relação à agricultura convencional nas quatro principais áreas de sustentabilidade.....35
- Figura 4** - Biossíntese de outros subprodutos (metabólitos) da fermentação .....40

### CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Superfície de resposta 3D e gráfico de contorno 2D. Resposta da produção de células ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) de *S. boulardii* durante a SFS em maçã orgânica (ORG) (a) e convencional (CONV) (b), de acordo com temperatura – ( $X_1$ ) e a concentração de pectinase ( $X_2$ ), quando fixada a concentração de celulase ( $X_3$ ), em seu ponto ótimo (8 e 7  $\mu\text{L.100 g}^{-1}$ , para ORG e CONV, respectivamente).....71
- Figura 2** - Superfície de resposta 3D e gráfico de contorno 2D. Resposta da produção de células ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) de *S. boulardii* durante a SFS em maçã orgânica (ORG) (a) e convencional (CONV) (b), de acordo com a temperatura ( $X_1$ ) e a concentração de celulase ( $X_3$ ), quando fixada a concentração de pectinase ( $X_2$ ) em seu ponto ótimo (20 e  $\mu\text{L.100 g}^{-1}$ , para ORG e CONV, respectivamente).....72
- Figura 3** - Superfície de resposta 3D e gráfico de contorno 2D. Resposta da produção de células ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) de *S. boulardii* durante a SFS em maçã orgânica (ORG) (a) e convencional (CONV) (b) de acordo com a concentração pectinase ( $X_2$ ) e celulase ( $X_3$ ), quando fixada a temperatura ( $X_1$ ) em seu ponto ótimo (27,5 °C) para ambos .....74

<b>Figura 4 -</b>	Valores ótimos previstos para as variáveis independentes na resposta da produção de células (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de <i>S. boulardii</i> durante a SFS em maçã orgânica (a) e convencional (b) .....	75
-------------------	--	----

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1 -</b>	Viabilidade, pH e produção de biomassa de <i>S. boulardii</i> (a); metabolização de açúcares, sacarose (b), glicose (c) e frutose (d), durante a SFS, em dois diferentes substratos, maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV) .....	90
<b>Figura 2 -</b>	Comportamento de ácidos orgânicos, (a) Ácido acético; (b) Ácido málico; (c) Ácido succínico; e (d) Ácido cítrico durante a SFS com <i>S. boulardii</i> em diferentes substratos, maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV) .....	95

### CAPÍTULO 4

<b>Figura 1 -</b>	Compostos fenólicos totais vs tempo de fermentação, para fermentado de polpa de maçã orgânica e convencional .....	111
<b>Figura 2 -</b>	Atividade antioxidante vs tempo de fermentação para fermentado de polpa de maçã orgânica e convencional .....	113
<b>Figura 3 -</b>	Concentração de quercetina 3-D galactosídeo vs tempo de fermentação, para fermentado de polpa de maçã orgânica e convencional .....	115
<b>Figura 4 -</b>	Concentração de quercetina 3-O ramnosídeo vs tempo de fermentação, para fermentado de polpa de maçã orgânica e convencional .....	116
<b>Figura 5 -</b>	Sobrevivência da <i>S. boulardii</i> em presença de 1,5 mM de peróxido de hidrogênio, durante período de incubação de 6 horas .....	117
<b>Figura 6 -</b>	Sobrevivência da <i>S. boulardii</i> em presença de radical hidroxila pela presença de 1 mM de peróxido de hidrogênio, durante período de incubação de 6 horas .....	118

**Figura 7 -** Semeadura de *S. boulardii* em placa com disco de inibição contendo 10 µL de solução de paraquat a 10 mM. *S. boulardii* previamente fermentada em: (a) polpa de maçã orgânica; (b) polpa de maçã convencional; (c) YPD + quercetina ramnosídeo (d) YPD .....120

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1 -</b>	Produção mundial de maçã em milhões de toneladas (2010 – 2015).....	24
<b>Tabela 2 -</b>	Produção total, importação, exportação, consumo aparente e quantidade de maçã no cenário brasileiro.....	25
<b>Tabela 3 –</b>	Composição química de maçã por 100 g de partes comestíveis (com casca).....	27
<b>Tabela 4 -</b>	Microrganismos probióticos de uso em humanos e animais .....	44

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1 -</b>	Caracterização físico-química em base seca, de partes comestíveis (com cascas) de maçãs cultivadas sob os sistemas orgânico (ORG) e convencional (CONV) .....	65
<b>Tabela 2 -</b>	Efeitos dos fatores de processo, $x_1$ ( $X_1$ ), $x_2$ ( $X_2$ ) e $x_3$ ( $X_3$ ) na viabilidade celular durante SFS de maçã orgânica ( $Y_{org}$ ) ou convencional ( $Y_{conv}$ ) obtida por planejamento fatorial $2^3$ com face centrada e 2 repetições no ponto central .....	67
<b>Tabela 3 -</b>	Anova para modelo quadrático relacionado à SFS em substrato de maçã orgânica.....	68
<b>Tabela 4 -</b>	Anova para modelo quadrático relacionado à SFS em substrato de maçã convencional.....	69
<b>Tabela 5 -</b>	Valores preditos e experimentais das respostas sob condições ótimas para fermentação de polpa de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV).....	76

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1 -</b>	Parâmetros cinéticos de crescimento celular de <i>S. boulardii</i> durante a SFS em polpa de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV).....	93
-------------------	---	----

## CAPÍTULO 4

- Tabela 1 –** Diferença no teor de compostos fenólicos, antioxidação (DPPH), quercetina ramnosídeo e galactosídeo, no fermentado de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV), para cada tempo.....112
- Tabela 2 -** Conteúdo de glutathione ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em células de *S. boulardii* cultivadas em polpa de maçã orgânica (ORG), convencional (CONV) e YPD com e sem a adição de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de quercetina ramnosídeo.....121

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SFS	Sacarificação e fermentação simultânea
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ABPM	Associação Brasileira de Produtores de Maçã
DPPH	Radical 2'2 – Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalente em Ácido Gálico
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina)
ATP	Trifosfato de adenosina (Adenosina trifosfato)
UFC	Unidades formadoras de colônias
PECTU	Pectin transeliminase unit (Unidade pectina transeliminase)
EGU	Unidad Endo-Glucanasa (Unidade endo-endoglucanase)
UV-VIS	Ultravioleta visível
YPD	Yeast extract, peptone e dextrose (extrato de levedura, peptona e dextrose)
ORG	Maçã orgânica/ polpa de maçã orgânica
CONV	Maçã convencional/ polpa de maçã convencional
ANOVA	Análise de variância
p	Nível de significância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
$Y_{x/s}$	Rendimento
$P_x$	Produtividade
$\mu_s$	Velocidade específica de consumo de substrato
$\mu_x$	Velocidade específica de geração de biomassa
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
GSSG	Glutathiona oxidada
GSH	Glutathiona reduzida
TGSH	Glutathiona total

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>– Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>24</b>
1.1	Maçã e Agroindústria da Maçã .....	24
1.2	Alimentos Funcionais .....	27
1.3	Compostos Fenólicos.....	29
1.3.1	Compostos Fenólicos em maçã.....	32
1.3.2	Quercetina .....	33
1.4	Cultivo Orgânico e Convencional.....	34
1.5	Processo Fermentativo .....	37
1.6	Hidrólise enzimática .....	40
1.7	Probióticos .....	42
1.8	<i>Saccharomyces boulardii</i> .....	45
1.9	REFERÊNCIAS .....	48
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>- Otimização do processo de sacarificação e fermentação simultânea na viabilidade celular de <i>saccharomyces boulardii</i> em maçã orgânica e convencional usando a metodologia de superfície de resposta</b> .....	<b>58</b>
Resumo	.....	58
1	Introdução .....	59
2	Material e Métodos .....	61
2.1	Matéria-prima.....	61
2.2	Enzimas .....	61
2.3	Caracterização dos substratos de maçã orgânica e convencional.....	62
2.4	Microrganismo e preparo do inóculo.....	62

2.5	Sacarificação e fermentação simultâneas.....	63
2.6	Determinação do número de células viáveis.....	63
2.7	Delineamento experimental .....	63
2.8	Validação das condições de otimização e dos modelos preditivos.....	64
3	Resultados e Discussão.....	65
3.1	Caracterização da matéria-prima.....	65
3.2	Delineamento central composto de face centrada para otimização de parâmetros eficazes na produção de s. <i>Boulardii</i> por SFS.....	66
3.3	Determinação e validação das condições ótimas .....	75
4	Conclusão .....	77
5	Referências.....	77

<b>CAPÍTULO 3 -</b>	<b>Estudo cinético da produção de biomassa de <i>saccharomyces boulardii</i> durante sacarificação e fermentação simultânea (SFS) em maçã orgânica e convencional.....</b>	<b>81</b>
	Resumo.....	81
1	Introdução .....	82
2	Material e Métodos .....	83
2.1	Matéria-prima, processamento e obtenção da polpa .....	83
2.2	Cultura de levedura e manutenção da cepa .....	84
2.3	Fermentação submersa com agitação.....	84
2.4	Análises dos processos fermentativos (polpa de maçã orgânica e convencional) em batelada.....	85
2.4.1	Viabilidade celular.....	85
2.4.2	Biomassa seca.....	85
2.4.3	pH .....	86
2.4.4	Determinações Analíticas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	86
2.4.4.1	Preparo das amostras.....	86
2.4.4.2	Determinação de açúcares .....	86
2.4.4.3	Determinação de ácidos orgânicos.....	87

2.5	Cálculo dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica.....	87
2.6	Estatística .....	88
3	Resultado e Discussão .....	88
3.1	Estudo cinético de produção de biomassa de <i>S. boulardii</i> .....	88
3.2	Síntese de ácidos orgânicos durante a multiplicação celular.....	94
4	Conclusão .....	97
5	Referências.....	98
<b>CAPÍTULO 4 - Efeito antioxidante da quercetina na resposta ao estresse oxidativo em células de <i>saccharomyces boulardii</i>, a partir da fermentação em substrato de maçã orgânica e convencional .....</b>		
	Resumo.....	102
1	Introdução .....	103
2	Material e Métodos .....	104
2.1	Matéria-prima e obtenção da polpa .....	104
2.2	Microrganismo .....	105
2.3	Condições da Fermentação submersa .....	105
2.4	Preparo de extrato etanólico.....	106
2.5	Capacidade antioxidante, fenólicos totais e determinação de quercetina .....	106
2.5.1	Capacidade Antioxidante .....	106
2.5.2	Compostos fenólicos totais .....	107
2.5.3	Determinação e quantificação de quercetina .....	107
2.6	Estresse oxidativo.....	107
2.6.1	Resistência aos ERO.....	108
2.6.1.1	Resistência ao peróxido de hidrogênio .....	108
2.6.1.2	Resistência ao ânion superóxido .....	108
2.6.1.3	Resistência ao radical hidroxila.....	109
2.6.2	Determinação de glutatona .....	109
2.7	Estatística .....	110
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>110</b>
3.1	Capacidade antioxidante, fenólicos totais e determinação de quercetina .....	110
3.2	Estresse Oxidativo .....	117

3.2.1	Resistência ao peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	117
3.2.2	Resistência ao radical hidroxila.....	118
3.2.3	Resistência ao ânion superóxido .....	119
3.2.4	Glutaciona total, oxidada e reduzida.....	121
4	Conclusão .....	122
5	Referências.....	123

<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>127</b>
-----------------------------	------------

<b>ANEXOS .....</b>	<b>129</b>
---------------------	------------

<b>ANEXO 1 -</b>	Curvas de crescimento da <i>S. boulardii</i> em meio YPD (pré inóculo) e em polpa de maçã orgânica e convencional (inóculo) .....	130
------------------	---	-----

<b>ANEXO 2 -</b>	Teste Tukey – Valores médios para compostos fenólicos, antioxidação (DPPH), quercetina ramnosídeo e galactosídeo, no fermentado de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV). .....	132
------------------	---	-----

<b>ANEXO 3 -</b>	Teste Tukey – Valores médios de ácidos orgânicos para fermentado de polpa de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV). .....	133
------------------	---	-----

<b>ANEXO 4 -</b>	Teste de Tukey - valores médios de sacarose, glicose e frutose, para fermentado de polpa de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV). .....	134
------------------	--	-----

<b>ANEXO 5 -</b>	Cromatograma de quercetina .....	135
------------------	----------------------------------	-----

<b>ANEXO 6 -</b>	Cromatogramas ácidos orgânicos .....	136
------------------	--------------------------------------	-----

<b>ANEXO 7 -</b>	Cromatogramas de carboidratos.....	137
------------------	------------------------------------	-----

<b>ANEXO 8 -</b>	Ficha Técnica das enzimas Novozyme® 33095 e Celluclast® 1.5 L.....	139
------------------	--	-----

<b>ANEXO 9 -</b>	Certificação do IBD (Inspeções e Certificações Agropecuárias e Alimentícias) da fazenda produtora de maçã orgânica, localizada na cidade de Urupema – SC.....	141
------------------	---	-----

<b>ANEXO 10 -</b>	Ficha Técnica <i>Saccharomyces boulardii</i> – Bula medicamento Floratil - Merk® .....	142
-------------------	--	-----

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura de maçã é destaque como atividade econômica no Brasil, principalmente na região Sul. Em 2015, enquadrou-se em nona posição dentre os maiores produtores mundiais da fruta, com 1,240 mil toneladas (USDA, 2015). A produção nacional de maçã tem como finalidade primordial, atender a demanda do consumo *in natura* da fruta, porém devido às exigências do mercado, parcela da produção é destinada principalmente a fins industriais (WOSIACKI et al, 2002; RAUPP et al, 2004).

O sistema de cultivo de maçã, orgânico e convencional, são os empregados no Brasil e em diversos outros países. A maneira como se realiza o plantio da maçã é determinante nas diferenças de sua composição, como ocorre para o teor de minerais, sólidos solúveis e acidez, o que interfere diretamente na qualidade sensorial e nutritiva do fruto (AMARANTE et al., 2015).

A maçã, apresenta propriedades benéficas à saúde, reconhecidas devido à presença de conteúdo considerável de compostos bioativos. Dentre os compostos bioativos presentes em maçã encontram-se os compostos fenólicos, importantes devido suas capacidades antioxidantes. A pectina e os ácidos orgânicos, também presentes em maçã, melhoram o trânsito intestinal podendo levar à redução dos níveis séricos de colesterol e triglicérides (ZARDO et al., 2008; MIORELLI; BATTISTON, 2011).

Os compostos fenólicos mais comuns encontrados em maçã são os flavonoides, que estão disponíveis na maioria das estruturas vegetais como folhas, flores, frutos e sementes. São produzidos como forma de proteção do próprio vegetal contra a luz ultravioleta e visível, peróxido de hidrogênio e microrganismos patogênicos (HEIM, TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Como o teor destes compostos pode estar relacionado à forma como o fruto foi cultivado, assim também pode haver diferença quando um plantio ocorre de forma orgânica ou convencional (WINTER; DAVIS, 2006).

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes, pois conseguem retardar, bloquear ou prevenir a oxidação por radicais livres, além de funcionarem como quelantes de metais e inibirem a peroxidação lipídica celular (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1995).

Células de leveduras, por serem eucarióticas, são largamente utilizadas como modelo em estudos *in vitro*, a fim de verificar mecanismos de resistência ao estresse oxidativo. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio é detectado pela célula, que leva à indução de mecanismos de defesa e à resposta ao estresse oxidativo (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

A quercetina, um flavonoide da classe dos flavonóis, está presente em concentrações consideráveis em maçã, principalmente em sua casca, assim como os compostos fenólicos totais. É a mais potente eliminadora das espécies reativas de oxigênio, estando associada à redução do risco de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, atividade antitumoral, antitrombótica e antiviral, além de outras doenças crônicas (NIJEVEDT et al., 2001; CHOI et al., 2012; BEHLING et al., 2004; HAGEN et al., 2007).

A levedura probiótica, *Saccharomyces boulardii*, apresenta grande potencial terapêutico. Além de ser resistente a antibióticos, possui ação contra diferentes espécies de microrganismos patogênicos causadores de diarreia, como o *Clostridium difficile*, *Salmonella spp.*, *E. coli* e *Bacillus spp.* O consumo de leveduras probióticas pode ser realizado continuamente, já que não apresentam propriedade de se fixar na parede intestinal, possuem ação trófica no lúmen e efeitos antiinflamatórios na mucosa (MAVROUDI, 2012).

Como qualquer cultura probiótica, a *S. boulardii* deve ser mantida viável e estável durante o armazenamento e quando ingerida, sobreviver à ação do suco gástrico e sais biliares. Devem ainda atingir o colón e estabilizar a microbiota, mantendo o ambiente desfavorável a patógenos, o que acaba promovendo efeitos clínicos favoráveis. Esta levedura impede a ação de toxinas de patógenos, auxiliando os microrganismos da microbiota natural do indivíduo, restaurando os níveis de ácido graxos de cadeia curta e atuando como regulador imunológico (MCFARLAND, 2010).

Deste modo, o presente trabalho propôs investigar a utilização de maçã convencional e orgânica como substrato fermentativo de células de *Saccharomyces boulardii* a partir de estudo cinético, e avaliando o efeito protetor dos antioxidantes presentes no substrato e sua correlação com o estresse oxidativo celular da levedura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Investigar a utilização de maçã convencional e orgânica como substrato fermentativo de células de *Saccharomyces boulardii* a partir de estudo cinético, e avaliar o efeito protetor dos antioxidantes presentes no substrato e sua relação com o estresse oxidativo celular da levedura.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar possíveis diferenças na composição físico-química de maçã cultivada sob o sistema orgânico e convencional;
- ✓ Otimizar e avaliar a fermentação e sacarificação simultânea de polpa de maçã orgânica e convencional, pela ação da *Saccharomyces boulardii*, analisando possíveis diferenças;
- ✓ Avaliar em estudo cinético a fermentação e sacarificação simultânea, otimizada, das polpas de maçãs orgânica e convencional, verificando se existe diferença entre elas;
- ✓ Determinar o conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e quercetina, durante o período de tempo da sacarificação e fermentação simultâneas;
- ✓ Avaliar o efeito da quercetina presente nas polpas fermentadas de maçã orgânica e convencional, e em caldo YPD acrescido de quercetina ramnosídeo (95% de pureza), contra o estresse oxidativo na célula da *S. boulardii*, induzido por espécies reativas de oxigênio;
- ✓ Avaliar o conteúdo de glutatona reduzida, oxidada e total nos fermentados, a fim de verificar condições de proteção contra o estresse celular durante processo fermentativo da levedura.

### 3 REFERÊNCIAS

- AMARANTE, C. V. T.; DA ROSA, E. F. F.; ALBUQUERQUE, J. A.; KLAUBERG FILHO, O.; STEFFENS, C. A. Atributos do solo e qualidade de frutos nos sistemas convencionais e orgânicos de produção de maçãs do Sul do Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n.1, p.99–109, jan./mar. 2015.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.
- CHOI, G. N.; KIM, J. H.; KWAK, J. H.; JEONG, C-H; JEONG, H. R.; LEE, U.; HEO, H. J. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. **Food Chemistry**, v. 132, p.1019–1024, 2012.
- COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 4–5, p. 217–246, August–October 2001.
- HAGEN, S. F.; BERGE, G. I. A.; BENGTSSON, G. B.; BILGERM W.; BERGE, A.; HAFFNER, K.; SOLHAUG, K. A. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p.1–10, 2007.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p. 572–584, 2002.
- MAVROUDI, A. **Probiotics in Pediatrics – Properties, Mechanisms of Action, and Indications**. In: RIGOBELLO, E. C. Probiotics. 1. ed. Rijeka, Croácia: InTech, 2012. p. 310–324.
- MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative biotherapeutic agent. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 6, p. 157-171, 1993.
- MIORELLI, T. D.; BATTISTON, F. G. Efeitos do consumo de maçã (*Malus Domestica* Cultivar Fuji) na redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos tratados com dieta hipercalórica. **Unoesc & Ciência – ACBS**, Joaçaba, v. 2, n. 1, p. 39-48, jan./jun., 2011.
- NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOON, D. E. C.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and Potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418–25, 2001.

RAUPP, D. S.; CREMASCO, A. C. V.; CALDI, C. M.; MARQUES, S. H. P.; BANZATTO, D. A. Polpa refinada de maçã promove arraste via fecal de nutrientes ingeridos na dieta. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, p. 77–83, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1995.

USDA. FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Fresh Deciduous Fruit: World Markets and Trade (Apples, Grapes, & Pears)**. December, 2015. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/fruit.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

WINTER, C. K.; DAVIS, S. F. Organic food. **Journal of food Science**, v. 71, p. 117–124, 2006.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C.; DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation in Santa Catarina – Brazil. **Fruit Processing**, Schonborn, v. 12, n.1, p. 19–28, 2002.

ZARDO, D. M.; ALBERTI, A.; DANTAS, A. P. C.; GUYOT, S.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante em fermentados de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 829–838, out./dez., 2008.

A dissertação apresenta-se na forma de 4 capítulos distintos, descritos abaixo, seguidos da conclusão geral e anexos:

1 – Revisão Bibliográfica: Maçã e Agroindústria de Maçã; Alimentos funcionais; Compostos fenólicos; Cultivo orgânico e convencional; Processo fermentativo; Hidrólise enzimática; Probióticos; *Saccharomyces boulardii*;

2 – Artigo: Otimização do processo de sacarificação e fermentação simultânea na viabilidade celular de *Saccharomyces boulardii* em maçã orgânica e convencional usando a metodologia de superfície de resposta;

3 – Artigo: Estudo cinético da produção de biomassa de *Saccharomyces boulardii* durante sacarificação e fermentação simultânea (SFS) em maçã orgânica e convencional;

4 – Artigo: Efeito antioxidante da quercetina na resposta ao estresse oxidativo em células de *Saccharomyces boulardii*, a partir da fermentação em substrato de maçã orgânica e convencional.

## CAPÍTULO 1

### Revisão Bibliográfica

#### 1.1 Maçã e Agroindústria de Maçã

A cadeia produtiva da maçã (*Malus domestica*) no Brasil possui lugar de destaque no setor da fruticultura brasileira, conferindo importância na indústria agroalimentar do país. A cultura da maçã no Brasil teve início nos anos 70 no estado de Santa Catarina, enquadrando-se como a fruta de clima temperado mais cultivada (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005; ABPM, 2014).

A produção brasileira de maçã alcançou 1,3 milhões de toneladas em 2011. O Brasil consolidou-se como o 9º (nono) maior produtor mundial de maçã, posição que ainda ocupa atualmente (Tabela 1) (USDA, 2015). O cultivo mais significativo encontra-se nos estados do sul, com 96% dos pomares em Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRDE, 2011). A safra nacional 2013/14, comparada com a safra 2012/13, indicou uma redução de 2,4% na área colhida e aumentos de 14,6% e 11,9% no rendimento médio e na produção, respectivamente. As áreas de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul encolheram 2,2% e 3% e as produções cresceram 18,6% e 7,4%, respectivamente (EPAGRI/CEPA, 2014).

**Tabela 1** - Produção mundial de maçã em milhões de toneladas (2010 – 2015).

Produção	2010/11	2011/12	2012/13	2012/13	2013/14	2015/16
China	33.263	35,985	38,500	39,680	40,920	43,000
União Europeia	10.981	12,338	12,207	11,865	13,619	12,220
Estados Unidos	4.175	4,231	4,049	4,690	5,075	4,561
Turquia	2.500	2,700	2,900	2,930	2,289	2,740
Índia	2.891	2,203	1,915	2,200	2,200	2,200
Irã	1.843	1,700	1,693	1,693	1,693	1,693
Rússia	910	1,124	1,264	1,417	1,409	1,390
Chile	1.431	1,360	1,420	1,310	1,350	1,350
Brasil	1.339	1,340	1,231	1,377	1,266	1,240
Ucrânia	954	1,127	1,211	1,211	1,211	1,211
Outros	5.252	5,540	5,234	5,442	5,421	5,414

Fonte: USDA, 2015

Em 2012, o volume exportado de maçãs frescas foi de 72,3 mil toneladas a um preço de R\$ 1,28/kg, sendo este valor 25% maior ao registrado em 2001 (BRASIL, 2013). Dados da produção total, importação, exportação e consumo nacional da fruta encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2** - Produção total, importação, exportação, consumo aparente e quantidade de maçã no cenário brasileiro.

Ano	Produção (t)	Importações de maçãs frescas (t)	Exportação de maçãs frescas e sucos (t)	Suprimento doméstico (t)	Suprimento por habitante (kg/hab/ano)
2006	863.019	77.741	215.638	782.344	4,22
2007	1.115.319	68.574	323.016	973.240	5,19
2008	1.124.155	55.042	326.883	965.104	5,09
2009	1.222.885	61.343	252.706	1.130.220	5,90
2010	1.279.026	76.879	359.679	1.087.811	5,63
2011	1.338.995	96.565	282.941	1.202.837	6,17
2012	1.335.478	57.920	331.734	1.135.813	5,78

Fonte: BRASIL, 2013 *apud* IBGE e SECEX/MDIC

De acordo com a Associação Brasileira de Produção de Maçã (ABPM, 2014), em 2007 as variedades mais cultivadas foram a Gala (58%) e Fuji (35%), outras, como Eva, Golden Delicious, Joaquina e Condessa, corresponderam apenas 7%. O total de Gala e Fuji comercializado em 2012 foi de 106,4 mil toneladas, perfazendo um aumento de 23% nos últimos 12 anos (BRASIL, 2013).

A maçã é considerada a terceira fruta mais consumida pelos brasileiros, perdendo apenas para banana e laranja. No Brasil, o consumo é o de frutas de volume pequeno e médio, diferente das que vão para a exportação, que são de maiores tamanhos (BRDE, 2011). Além do consumo *in natura*, a maçã é amplamente utilizada como matéria-prima para diversos produtos, como doces, geléias, sidra e vinagre (RAUPP et al., 2004; ZARDO et al., 2008).

As maçãs industriais brasileiras, que são de qualidade inferior e por isso são descartadas da comercialização *in natura*, passaram a suprir, como matéria-prima, as unidades processadoras de suco concentrado e bebidas (NOGUEIRA et al., 2005). Aproximadamente 30% da produção nacional é destinada à indústria, sendo que 10% ocorre devido à má qualidade dos frutos, destinando-se ao processamento

de sidra e vinagre, e os outros 20% para a fabricação de suco clarificado de maçã (WOSIACKI et al., 2002).

O mercado consumidor é exigente tanto para os preços quanto para a qualidade dos frutos, ampliando, assim, o critério na seleção das maçãs. Este critério, em geral, está relacionado com os defeitos físicos, como forma, tamanho, coloração desuniforme e cicatrizes provenientes de insetos, e a degradação devido à maturação avançada, sintomas de doenças e ação microbiana (RAUPP et al., 2004).

Os atributos de qualidade em frutos dizem respeito à sua aparência, textura, valor nutritivo, sabor e odor. A importância destes atributos é variada, e dependente dos interesses da comercialização. A qualidade dos frutos também está relacionada com a forma que foi produzido, devido ao tipo de solo, manejo, clima, adubação, irrigação e ponto de colheita e se houve ou não aplicação de inseticidas (CHITARRA; CHITARRA, 1990). Sendo assim, a composição da maçã (Tabela 3) depende muito do método de cultivo, solo, clima e variedade, porém independentemente, é considerada boa fonte de nutrientes e não-nutrientes, tendo importante papel na dieta humana devido aos açúcares, minerais, fibras, vitamina C e compostos fenólicos (BALÁZS et al., 2012).

**Tabela 3** – Composição química de maçã para cada 100 g de partes comestíveis (com casca).

<b>Componentes</b>	<b>Composição</b>
pH	3,76
	<b>(g)</b>
Sólidos solúveis totais	14
Umidade	84,3
Acidez titulável (ác. Málico)	0,33
Lipídios	Tr*
Açúcares redutores totais	10,35
Carboidratos	15,2
Glicose	2,19
Frutose	7,58
Sacarose	3,39
Proteínas	0,3
Fibra alimentar	1,3
Fibra totais	11,6 - 44,5
Pectina	3,5 - 18
Celulose	12 - 23,2
Lignina	6,4 - 19
Hemicelulose	5 - 6,2
<b>Minerais:</b>	<b>mg</b>
Fósforo	9
Cálcio	2
Manganês	0,03
Cobre	0,06
Ferro	0,1
Potássio	75
Magnésio	2
Sódio	Tr*
Vitamina C	2,4
Valor calórico (kcal)	56

Fonte: (KENNEDY et al., 1999; GOULART; ANTUNES; ANTUNES, 2000; PAGANINI et al., 2004; TACO; UNICAMP; NEPA, 2011).

\*Tr: traços

## 1.2 Alimentos Funcionais

Os consumidores, nos últimos anos, estão mostrando maior interesse em alimentos com propriedades promotoras à saúde. O mercado dos produtos saudáveis vem crescendo, novos ingredientes vêm sendo desenvolvidos com o apelo de reduzir problemas de saúde e promover uma vida mais saudável, a estes alimentos dá-se o nome de funcionais (LEROY; DE VUYST, 2004; RAUD, 2008).

Muitas definições para alimentos funcionais existem, porém nenhuma delas é comumente aceita. Segundo a European Commission (2010), um dos pontos

a ser considerado é que qualquer alimento é realmente funcional, pois fornece nutrientes e tem efeito fisiológico. Assim, o alimento funcional nada mais é que um termo de *marketing* para um alimento cuja atração reside nas suas alegações de saúde e a forma como o produto é percebido.

De acordo com o *International Life Sciences Institute* (ILSI, 2014) o alimento pode ser considerado funcional desde que beneficie uma ou mais funções no organismo. Estas funções devem ser comprovadas de maneira satisfatória e o alimento causar efeitos nutricionais adequados, fornecendo maior saúde e bem-estar, ou reduzindo os riscos de doenças.

Alguns alimentos considerados funcionais são realmente alimentos integrais naturais, os quais apresentam informações científicas que podem ser usadas para anunciar seus benefícios à saúde. Muitos dos produtos funcionais, se não a maioria, são frutas, legumes, grãos, peixes, produtos lácteos e carnes, que contêm diversos componentes naturais que oferecem benefícios além da nutrição básica (EUROPEAN COMMISSION, 2010).

Os alimentos funcionais, além de conter naturalmente compostos bioativos, também são representados pelos alimentos contendo probióticos, prebióticos e simbióticos (LEROY; DE VUYST, 2004).

Os compostos bioativos são constituintes extranutricionais e ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos. Estas substâncias estão associadas à redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas. O efeito protetor tem sido atribuído às propriedades biológicas, como a atividade antioxidante, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica, pelo consumo de flavonoides, carotenoides, ácidos graxos  $\omega$ -3, vitaminas A, C e E, selênio e fibras (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Alimentos contendo microrganismos probióticos são capazes de melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do consumidor. Quando presentes nos alimentos, probióticos são capazes de produzir compostos aromáticos e antimicrobianos, alterando a composição e as características da matriz alimentar (LEROY; DE VUYST, 2004; BRASIL, 2008).

Os prebióticos são carboidratos complexos não digeríveis pelas enzimas salivares e intestinais, atuando na estimulação e proliferação da microbiota intestinal e inibindo a multiplicação de microrganismos patogênicos. Dentre os

prebióticos mais comuns, destacam-se a oligofrutose, inulina e frutooligosacarídeos (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

A combinação de culturas probióticas com um ou mais ingredientes prebióticos, resulta em um alimento denominado de simbiótico, o qual deve possibilitar a sobrevivência da cultura no alimento, resistência ao suco gástrico e apresentar ação sinérgica positiva no intestino (CAPRILES; SILVA; FISBERG, 2005).

### 1.3 Compostos Fenólicos

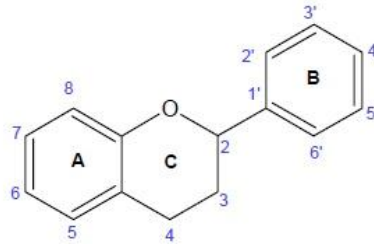
Os compostos fenólicos constituem desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até aquelas com certo grau de polimerização, como os taninos. Estas moléculas ocorrem principalmente na forma conjugada, com um ou mais resíduos de açúcares ligados à hidroxila. A glicose é o resíduo mais comum de açúcar presente, e alguns outros compostos, como ácidos orgânicos, aminas e lipídios também podem estar associados (BRAVO, 1998).

Os compostos fenólicos pertencem ao grupo dos fitoquímicos encontrados amplamente no reino vegetal, como frutas, legumes, ervas, especiarias e cereais, cuja importância bioquímica inclui propriedades antioxidantes que favorecem a redução e prevenção de algumas doenças crônicas (BRAVO, 1998; LEE; SMITH, 2000). O teor e o tipo de composto fenólico presente nas plantas varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do vegetal, grau de maturação, condições ambientais, além do processamento e armazenamento a que foram submetidos (BERTOLDI, 2006).

O grupo mais comum entre os compostos fenólicos das plantas são os flavonoides. Classe ampla e de baixo peso molecular, distribuída em folhas, sementes, polpa de frutos, cascas e flores. Estão presentes nos vegetais, como forma de proteção contra a luz ultravioleta e visível, peróxidos de hidrogênio e patogênicos (BRAVO, 1998; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

A estrutura química comum dos flavonoides (Figura 1) é descrita como  $C_6-C_3-C_6$  e consiste em dois anéis aromáticos ligados através de três átomos de carbono que formam normalmente uma estrutura cíclica oxigenada (BRAVO, 1998).

**Figura 1** - Estrutura básica dos flavonoides e sistema de numeração.



Composto derivado de benzo-pirona constituído de anéis fenólicos e pirano. Diferem nos arranjos de hidroxila, metoxi, grupos glicosídios laterais e na conjugação entre os anéis A e B. Fonte: HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002.

Variações estruturais dentro dos anéis subdividem os flavonoides em várias famílias, incluindo-se as antocianidinas (cianidina, pelargonidina, malvidina), flavonas (luteolina, crisina, apigenina, diosmina), flavonóis (quercetina, kaempferol, miricetina, rutina), flavanóis (catequina, epicatequina, galocatequina), isoflavonas (genisteína, daidzeína, gliciteína) e flavanonas (naringenina, naringina, taxifolina) (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; ESTEVES; MONTEIRO, 2001; TRUEBA; SÁNCHEZ, 2001).

As propriedades biológicas, farmacológicas e medicinais dos flavonoides têm sido amplamente estudadas. Os flavonoides e outros compostos fenólicos de plantas são relatados como antioxidantes, vasodilatadores, anticancerígenos, antiinflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, antialérgicos, antivirais e com efeitos estrogênicos (KUJUMGIEV et al., 1999; OWEN et al., 2000; DESPAIGNE, 2001; MILES; ZOUBOULI; CALDER, 2005; VAQUERO; ALBERTO; NADRA, 2007; CHEN et al., 2009; MUDNIC et al., 2010).

Os compostos fenólicos possuem propriedades químicas ideais como sequestrantes de radicais livres (oxidantes) e quelantes de metais, e têm demonstrado maior eficiência como antioxidante que as vitaminas E e C. Um composto fenólico é descrito como antioxidante por satisfazer certas condições mesmo quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato. Bloqueiam, retardam ou previnem a oxidação mediada por um radical livre, gerando um radical resultante mais estável às ligações de hidrogênio intramoleculares. Além disso, podem inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoxigenases e oxigenases, bem como inibir a peroxidação lipídica, impedindo a geração de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e proporcionando diversos efeitos

positivos à respostas inflamatórias e imunes (RICE-EVANS et al., 1995; LEE; SMITH, 2000; TRUEBA, 2003).

A atividade antioxidante em sistemas relacionados com a alimentação significa a inibição de quebra de cadeia de peroxidação lipídica, e em sistemas *in vivo*, os radicais livres podem danificar proteínas, DNA e outras moléculas pequenas. Embora as células sejam capazes de, através das enzimas antioxidantes, reduzir o estresse oxidativo, muitas vezes estas podem não ser suficientes para normalizar o estado redox durante o estresse gerado. Para tal, uma suplementação com antioxidantes exógenos é necessária, como por exemplo os compostos fenólicos (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; MOURE et al., 2001).

Um dos métodos para avaliar a atividade antioxidante dos compostos ou extratos específicos tem sido através da reação com um radical DPPH<sup>•</sup> (2,2,2-difenil-1-picril-hidrazila). A redução do DPPH<sup>•</sup> através da reação: DPPH<sup>•</sup> + AH (antioxidante) → DPPH-H + A<sup>•</sup> ou DPPH<sup>•</sup> + R<sup>•</sup> (espécies de radicais) → DPPH-R, é determinada através da redução da absorvância a um determinado comprimento de onda durante a reação (BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER; BERSET, 1995).

Os antioxidantes são eficazes na redução do estresse oxidativo, porque podem doar elétrons para as ERO neutralizando seus efeitos negativos. Estes podem ser antioxidantes exógenos, como os flavonoides, ou enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase), os quais catalisam e convertem as ERO em espécies menos reativas (KUNWAR; PRIYADARSINI, 2011).

As espécies reativas ao oxigênio é um termo usado para denominar certo grupo oxidante capaz de gerar radicais livres. As ERO compreendem principalmente os radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidroxila (OH<sup>•</sup>), alcóxila (RO<sup>•</sup>), peróxila (ROO<sup>•</sup>) e hidroperoxila (HOO<sup>•</sup>), além do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (TRUEBA; SÁNCHEZ, 2001; KUNWAR; PRIYADARSINI, 2011).

O estresse oxidativo pode ser avaliado através do dano oxidativo total à molécula de DNA, lipídeos e proteínas celulares. Na proteção ao organismo, o sistema de defesa antioxidante, como a enzima glutathione reductase, pode atuar como detoxificador das ERO, impedindo a sua formação, ou através do reparo de suas lesões (MOURE et al., 2001).

A glutathione reduzida (L-g-glutamyl-L-cisteinyl-glicina), por exemplo, apresenta capacidade redutora e está na maioria das células, sendo o mais abundante

tiol (-SH) do meio intracelular. Após exposição da glutathione ao agente oxidante, ocorre oxidação e sua recuperação é realizada através da enzima glutathione redutase, que é uma flavoproteína, que por consequência mantém íntegro o sistema celular. Assim, o teor de glutathione reduzida e oxidada é um indicador da ocorrência de estresse oxidativo celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As células eucarióticas de leveduras, são amplamente utilizadas como modelo *in vitro* para verificar mecanismos de resistência ao estresse oxidativo (BELINHA et al., 2007). As células de levedura exibem mecanismos moleculares comuns de defesa quando expostas a diferentes fatores de estresse, como choque térmico, etanol, íons metálicos e agentes oxidantes de seu próprio metabolismo. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio é detectado pela célula, que leva à indução de mecanismos de defesa e resposta ao estresse oxidativo (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001). Além disso, a levedura tem sido utilizada para elucidar o papel do estresse oxidativo no envelhecimento, na apoptose, e em doenças, como esclerose (MADEO; FROHLICH; FROHLICH, 1997; LAUN et al., 2001).

### 1.3.1 Compostos Fenólicos em maçã

A maçã apresenta importante quantidade de compostos fenólicos, representando, assim, boa fonte de antioxidantes (VINSON et al., 2001). O teor de compostos fenólicos do bagaço de maçã, segundo Peschel et al. (2005), chega ser de  $48,6 \pm 0,9$  mg de equivalentes em ácido gálico.  $\text{g}^{-1}$  de extrato seco, o que gera um grau de atividade antioxidante de 77,63%, em análise pelo método de captura do radical DPPH•.

De acordo com Wolfe, Wu e Liu (2003), o conteúdo de flavonoides, dentro de cada variedade de maçã é maior nas cascas que na polpa. As cascas de certas variedades chegam a conter  $588,9 \pm 83,2$  mg de equivalente em ácido gálico (EAG).  $100 \text{ g}^{-1}$  de cascas.

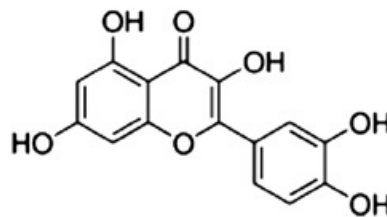
Os compostos fenólicos na maçã estão presentes nas seguintes classes principais: flavan-3-óis (catequina, procianidina B2 e epicatequina), ácidos hidroxicinâmicos (ácido clorogênico), floretina glicosídica (floretina e floretina xiloglucosídeo), quercetina glicosídica (quercetina, isoquercetina e rutina) e cianidina glicosídica (ALONSO-SALCES et al., 2004). Segundo Lee e Smith (2000) as concentrações médias para os principais compostos são, em mg.  $100\text{g}^{-1}$  de maçãs

frescas: 16,78 de floretina glicosídeo; 15,84 de quercetina glicosídeo; 9,34 de procianidina B2; 9,02 de ácido clorogênico e 8,65 de epicatequina.

### 1.3.2 Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7- pentahydroxyflavone) (Figura 2), é o mais abundante flavonoide presente na dieta humana. Da classe dos flavonóis, está presente principalmente em chá, maçã e cebola, e a presença na dieta diária estimada, entre a população ocidental, compreende entre 10 a 20 mg (NIJVELDT et al., 2001; CERMAK; LANDGRAF; WOLFFRAM, 2003; WACH; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2007).

**Figura 2** - Estrutura química da quercetina.



Fonte: CURIEL; MUÑOZ; FELIPE, 2010.

Na maçã, a quercetina encontra-se localizada principalmente nas cascas como forma de proteção ao estresse induzido pela luz ultravioleta (HAGEN et al., 2007). Hertog et al. (1993), descreveram o conteúdo de quercetina em alguns vegetais, como, alface (14 mg.kg<sup>-1</sup>), cebola (347 mg.kg<sup>-1</sup>), vagem (20 mg.kg<sup>-1</sup>), vinho tinto (11 mg.L<sup>-1</sup>), chá preto (20 mg.L<sup>-1</sup>), maçã (36 mg.kg<sup>-1</sup>) e suco de maçã (2,8 mg.L<sup>-1</sup>).

A quercetina é a forma aglicona de rutina e amplamente encontrada nos alimentos. A maçã contém uma variedade de glicosídeos de quercetina, incluindo galactosídeos, arabinósídeos, ramnosídeos e xilosídeos (HOLLMAN et al., 1997; YOU; AHN; JI, 2010).

Dentro da família dos flavonoides, a quercetina apresenta-se como o mais eficiente eliminador de espécies reativas de oxigênio, incluindo o radical superóxido e óxido nítrico. Ela inibe o processo de formação de radicais livres por interação com íon superóxido, por quelar íons de ferro e por reagir com radicais peróxido de lipídio (BEHLING et al., 2004; BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

Segundo Choi et al. (2012), a quercetina pode conter ampla atividade benéfica para distúrbios neurodegenerativos como o Alzheimer. No estudo, os efeitos anti-amnésicos da quercetina foram avaliados no modelo *in vivo*, em ratos. Os neurônios foram altamente vulneráveis às espécies reativas ao oxigênio devido ao seu alto teor de ferro, atividade metabólica aeróbica e principalmente por conter alto teor de lipídeos poliinsaturados. Entretanto, a quercetina teve efeito inibitório contra o estresse oxidativo, reduzindo este em até 44,71%.

O efeito da quercetina sobre o estresse oxidativo, também foi relatado por Belinha et al. (2007). Células de *Saccharomyces cerevisiae*, foram usadas como modelo para avaliar os efeitos do antioxidante *in vitro* quando a levedura foi submetida ao peróxido de hidrogênio. Quando, as células foram tratadas com quercetina e expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a viabilidade celular aumentou em 40% e longevidade em 60%, o que foi relatado devido a presença do flavonoide.

A quercetina também tem sido estudada como forma de melhorar a capacidade de fermentação por microrganismos. Curiel, Muñoz e Felipe (2010), pela primeira vez demonstraram que a quercetina e o pH exercem efeitos dose-dependente no desempenho fermentativo de *Lactobacillus plantarum*. Em pH 5,5 a quercetina provocou acelerado crescimento da bactéria, causando rápida produção de ácido láctico a partir do consumo de açúcares. Sendo assim, a quercetina foi crucial para uma fermentação mais instantânea, além de não ter sido catabolizada pelo microrganismo, de modo que suas propriedades antioxidantes foram mantidas.

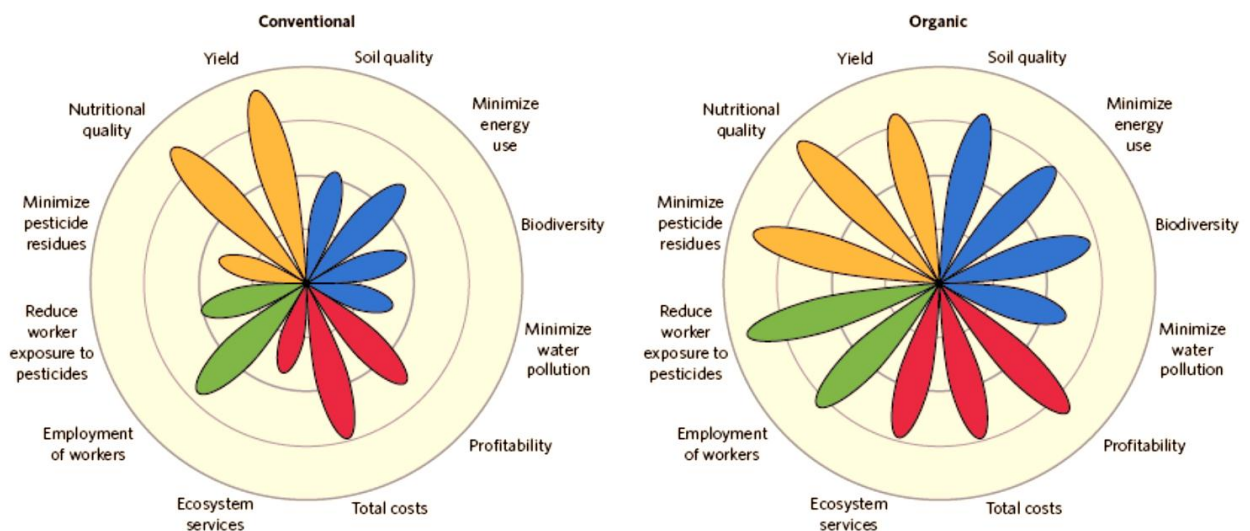
A suplementação com quercetina pode ser possível de várias maneiras, incluindo a forma pura (quercetina aglicona) ou através de uma dieta alimentar rica no componente. A quercetina presente nos vegetais normalmente vem acompanhada de seus derivados, já nos suplementos apenas a forma aglicona está biodisponível. Portanto, assim como os demais antioxidantes, os maiores efeitos benéficos da quercetina à saúde podem ser descritos quando a suplementação é através de alimentação balanceada e rica em compostos fenólicos (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

#### **1.4 Cultivo Orgânico e Convencional**

Agricultura orgânica contempla um conjunto de processos de produção agrícola que partem do pressuposto básico de que a fertilidade é função

direta da matéria orgânica contida no solo. A opção pelo uso do sistema orgânico apoia-se no questionamento por parte de alguns produtores e da sociedade quanto à sustentabilidade do sistema convencional. Esse sistema é caracterizado pelo alto custo de produção, devido, principalmente, à dependência de recursos não-renováveis, como os fertilizantes requeridos para manutenção de altos níveis de fertilidade do solo, e ao excessivo número de aplicações de agrotóxicos utilizados no controle fitossanitário. Isso contamina as águas, contribui para degradação do solo, redução da biodiversidade e dos processos microbianos do solo e representa riscos à saúde dos consumidores e dos trabalhadores que manuseiam os pesticidas, além de deixarem resíduos químicos em alimentos (Figura 3) (REGANOLD; WACHTER, 2016).

**Figura 3** - Avaliação da agricultura orgânica em relação à agricultura convencional nas quatro principais áreas de sustentabilidade.



O comprimento das pétalas são qualitativamente o nível do desempenho de sustentabilidade em relação aos quatro círculos que representam 25, 50, 75 e 100%. As pétalas laranjas representam áreas de produção; as azuis áreas de sustentabilidade ambiental; vermelhas áreas de sustentabilidade econômica; e verdes representam áreas de bem-estar. Os comprimentos das pétalas ilustram que os sistemas de agricultura orgânico equilibra melhor as quatro áreas da sustentabilidade.

Fonte: REGANOLD; WACHTER, 2016.

A qualidade dos frutos, bem como a qualidade do solo, a nutrição e a fisiologia da cultura podem sofrer diversas influências e tornarem-se distintas entre a produção convencional e orgânica dos frutos. O sistema de produção orgânica impacta menos negativamente o solo e o ambiente, quando se compara com o sistema convencional, como já relatado anteriormente (PECK et al., 2006).

Para frutas e vegetais, inúmeros estudos têm sido realizados a fim de comparar possíveis diferenças existentes entre o produto orgânico e convencional. Grande parcela destes estudos atentam para o poder nutricional que a forma de cultivo possa prover. Woese (1997), reuniu diversos estudos comparativos sobre a qualidade dos alimentos produzidos convencionalmente ou organicamente, bem como produtos fabricados a partir deles, dentre os quais estavam cereais, batatas, vegetais, fruta, vinho, cerveja, pães, bolos e tortas, leite, ovos e mel. A maioria dos estudos avaliados foram sobre investigações físico-químicas de concentrações de ingredientes desejáveis e indesejáveis, resíduos de pesticidas, contaminantes, análises sensoriais e estudos nutricionais. O autor concluiu, que apesar da heterogeneidade do material de pesquisa, algumas diferenças entre os produtos orgânicos e convencionais são identificadas, como o teor de proteínas, minerais, carboidratos e vitaminas.

Amarante et al. (2015), ao avaliarem as características físicas, químicas e biológicas do solo, a composição mineral e a qualidade de frutos, em pomares de maçãs 'Royal Gala' conduzidos sob os sistemas de produção convencional e orgânico, verificaram que existem diferenças significativas sobre as características avaliadas. O sistema orgânico apresentou maior qualidade nos atributos físicos do solo, bem como maior disponibilidade de certos nutrientes, especialmente cálcio, magnésio e nitrogênio, em relação ao convencional. A qualidade do fruto orgânico foi superior à do fruto convencional, devido aos maiores valores de acidez total, sólidos solúveis e intensidade de coloração vermelha da casca.

Como já foi mencionado neste capítulo, a quantidade e a qualidade dos compostos fenólicos presentes nos alimentos vegetais podem variar significativamente devido a fatores, como genética e cultivar, composição do solo e as condições de crescimento, estado de maturidade e condições pós-colheita, entre outros (JAFFERY et al., 2003). No entanto, uma vez que a presença de fenólicos constituem parte dos mecanismos de defesa inatos das plantas, a síntese passa ser estimulada sob condições de stress, como alterações de temperatura, exposição aos raios UV, e ataques patogênicos (BRAVO, 1998; HEIM, TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

A agricultura orgânica, em geral, é caracterizada pela restrição contra o uso de pesticidas sintéticos e fertilizantes. Esta característica básica leva pesquisadores a crerem ser as duas principais hipóteses pela qual frutas e legumes

cultivados organicamente podem resultar em alimentos de origem vegetal com maior teor de compostos fenólicos. A primeira reflete o impacto das diferentes práticas de fertilização sobre o metabolismo da planta. Fertilizantes sintéticos oferecem fontes mais biodisponíveis de nitrogênio, que acelera o desenvolvimento da planta, a alocação de recursos vegetais para fins de crescimento e não para a produção de metabólitos secundários, tais como fenólicos. A segunda hipótese baseia-se na exposição da planta a situações de estresse resultante da falta de pesticidas, tais como, os ataques de insetos, ervas daninhas e agentes patogênicos, que conduzem a um arsenal de substâncias naturais de defesa, como os compostos fenólicos (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997; WINTER; DAVIS, 2006).

Este fato pode ser consolidado em estudo de Dani et al. (2007), que observaram teores de resveratrol e antocianinas presentes no sucos de uva orgânico superiores ( $p \leq 0,01$ ) quando comparados com o suco de uvas cultivadas pelo sistema convencional. No suco comercial produzido com uvas tintas orgânicas e convencional, o conteúdo de cianidina foi de 11,79 e 0,76 ppm, respectivamente, diferença que também foi observada para os conteúdos de delphinidina (26,3 e 4,10 ppm), malvidina (232,46 e 95,26 ppm) e peonidina (19,21 e 8,59 ppm) revelando que de fato o teor dos fenólicos sofreram interferência direta pelo uso ou não de pesticidas durante o cultivo dos frutos.

Mitchell et al. (2007), determinaram o teor dos flavonoides agliconas de quercetina e kaempferol, em amostras de tomate secos. As comparações de análises de amostras, convencionais e orgânicas, demonstraram níveis estatisticamente maiores ( $p \leq 0,05$ ) de quercetina e kaempferol em tomates orgânicos. Possíveis diferenças entre o teor de micronutrientes e antioxidantes em tomate orgânico e convencional também foram verificadas, segundo Caris-Veyrat et al. (2004). Quando os resultados foram expressos como matéria fresca, tomates orgânicos tiveram maior teor de vitamina C, carotenóides e conteúdo de compostos fenólicos (exceto ácido clorogênico) do que os tomates convencionais.

## **1.5 Processo Fermentativo**

Existem várias maneiras de conduzir um processo fermentativo. O reator biológico pode ser de forma contínua, semicontínua ou descontínua (batelada). Nos processos industriais, a fermentação costuma ocorrer por processos contínuos

ou semicontínuos (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001), entretanto, para fins acadêmicos e de pesquisas, normalmente usa-se processos em batelada.

O processo fermentativo em batelada ou descontínuo, ocorre exclusivamente de forma a adicionar no reator o meio de cultivo com nutrientes adequados, adicionar o microrganismo responsável pelo processo biológico e aguardar que a fermentação ocorra. Após determinado tempo, retira-se o caldo fermentado do reator e executa-se as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Fermentação significa, bioquimicamente, um processo metabólico que ocorre sob condições anaeróbicas com liberação de energia. Os substratos orgânicos, principalmente açúcares, liberam energia, atuando como doadores e como receptores finais de elétrons (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Para Lehinger, Nelson e Cox (2006), fermentação é a degradação anaeróbica da glicose ou outros nutrientes orgânicos com o objetivo primordial de obter energia e conserva-los na forma de ATP.

Os açúcares consumidos pelas leveduras como fonte de energia, são exclusivamente glicose, frutose e sacarose. Grande parte destes açúcares, catabolizados pelas leveduras, são então convertidos em etanol e CO<sub>2</sub> através da glicólise, ao passo que o glicerol, ácidos orgânicos e alguns álcoois superiores são formados em pequenas quantidades (D'AMORE; RUSSELL; STEWART, 1989).

A fermentação conduzida por leveduras, leva especialmente à produção de álcool, componente este considerado o principal da fermentação alcoólica. Entretanto, há também a formação de compostos secundários através de outras vias metabólicas (Figura 4) realizadas para o crescimento celular e produção de massa celular. Mesmo que, em maior ou em menor quantidade, o gêneros de leveduras, as espécies e o número de células, podem interferir diretamente no desempenho do processo fermentativo. O gênero *Saccharomyces*, é considerado o mais utilizado para estes processos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

A glicose, é quebrada à ácido pirúvico na glicólise, e o ácido pirúvico pode ser completamente quebrado na respiração celular, ou então ser convertido em um produto orgânico na fermentação, quando NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> são regeneradas e podem entrar em uma nova sequência da glicólise. Sendo assim, a fermentação ocorre de forma a reoxidar as coenzimas de NADH e NADPH que são formadas durante a glicólise, para manter o balanço de redução-oxidação dentro da célula. Os

elétrons são transferidos das coenzimas para um composto orgânico, fornecendo  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  suficientes para a continuação da glicólise (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A produção de etanol ocorre dentro do processo fermentativo anaeróbico, como já mencionado, porém quando existe a presença de oxigênio no sistema, a viabilidade celular acaba sendo mantida até o término da fermentação. A adição de oxigênio promove assim, maior síntese de massa celular, de modo que aumenta a taxa de fermentação, já que é um fator importante na síntese de lipídios constituintes da membrana celular das leveduras. No entanto, um excesso de fluxo de oxigênio pode acabar produzindo espécies reativas de oxigênio, podendo gerar peróxido de hidrogênio, e afetar diretamente a qualidade do produto final (ROSENFELD et al., 2003).

Para Schmidell (2001), o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons, ao final da cadeia respiratória, sendo então reduzido a água, permitindo que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação e, ainda, permitindo o armazenamento de energia através da passagem das moléculas de ADP para ATP. Estas últimas, por sua vez, irão participar necessariamente nas reações de síntese de moléculas, para a sobrevivência das células e para o surgimento de novas células, no processo de proliferação da biomassa microbiana, para as quais é fundamental a introdução de energia.

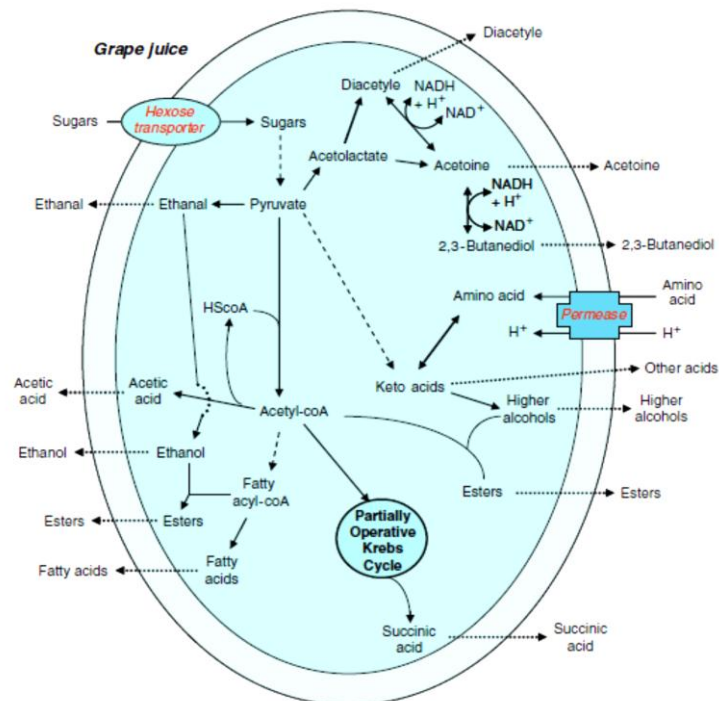
O metabolismo respiratório de *S. cerevisiae* produz cerca de 16 ATP por mol de glicose consumida, o que resulta em um rendimento de 0,50 g de biomassa por g de glicose (VERDUYN et al., 1991; PRONK et al., 1994). Sob condições anaeróbicas o rendimento é de apenas 2 ATP por mol de glicose e, conseqüentemente, a produção de biomassa das células decai para 0,10 g de biomassa para cada grama de glicose (VERDUYN et al., 1990).

Considera-se como crescimento celular, em sistemas microbiológicos, o aumento da massa resultante de um acréscimo ordenado de todos os componentes de protoplasma. Assim, aumentos de tamanho decorrentes de fenômenos como absorção de água ou acúmulo de material de reserva não pode ser considerado como crescimento. Em microbiologia, embora seja possível estudar o crescimento individual, geralmente o que se mede é o crescimento de uma população, exprimindo-se quer em termos de massa total pela leitura da densidade ótica, quer

em função do número de indivíduos pela contagem da unidade formadora de colônias por ml (SCHMIDELL, 2001).

Durante as primeiras etapas da fermentação com aeração, produção de etanol, glicerol e ácido acético, podem ocorrer. Em condições aeróbicas, vários sistemas de transporte de NADH para a cadeia mitocondrial existem. Além disso, o glicerol pode ser também utilizado como uma fonte de carbono sob condições aeróbicas por muitas leveduras. O ácido acético é normalmente produzido durante a fermentação alcoólica e sua acumulação seria uma consequência da atividade insuficiente de acetil-CoA sintase, necessária para oxidar completamente acetato produzido a partir de acetaldeído (ESTELA-ESCALANTE et al., 2012).

**Figura 4** - Biossíntese de outros subprodutos (metabólitos) da fermentação



Fonte: CALIARI, 2014.

## 1.6 Hidrólise enzimática

A célula vegetal, possui uma parede celular bastante rígida, composta por uma mistura complexa de polissacarídeos e outros componentes secretados pela célula, os quais estão dispostos e organizados por meio de ligações covalentes e não covalentes. A parede celular primária, constituída de celulose, hemicelulose e pectina,

é formada durante o crescimento da célula e deve ser suficientemente rígida, para evitar a ruptura celular, porém flexível, para permitir o crescimento da célula. A parede celular secundária é obtida com o cessar do crescimento da célula, sendo composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, além de diferentes proteínas (TAIZ; ZIEGER, 2002).

A celulose é um polímero não-ramificado constituído unicamente de subunidades de glicose associadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). A unidade de repetição da celulose é a celubiose, um dissacarídeo. Na molécula de celulose, pode haver mais de 15 mil unidades de glicose, sendo formadas cadeias que se encontram agregadas paralelamente para formar fibras elementares. Essas estruturas são formadas devido a ligações covalentes, pontes de hidrogênio e forças de Van de Waals. A estrutura da celulose apresenta regiões cristalinas altamente ordenadas, estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e regiões menos ordenadas ou amorfas onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (TAIZ; ZIEGER, 2002).

A pectina, localizada na parede celular primária e na lamela média das células vegetais, age no controle iônico e da porosidade da parede. A pectina é formada por uma cadeia linear de unidade de ácido D-galacturônico, unidos por ligação  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) na qual proporções variáveis dos grupos ácidos estão presentes (PRADE et al., 1999). Os grupos carboxílicos do ácido galacturônico podem ser parcialmente esterificados a agrupamentos metil e parcialmente ou completamente neutralizados por sódio, potássio e amônia. A pectina apresenta ainda cadeias laterais formadas por moléculas de arabinose, galactose e ramnose, ligadas covalentemente (GUMMANDI; PANDA, 2003).

Algumas enzimas são usadas para degradar os tecidos de plantas para melhorar o rendimento de extração dos mais diversos tipos de compostos como: corantes; compostos fenólicos; açúcares; líquidos. Geralmente, uma combinação das enzimas celulase e pectinase, acelera a hidrólise e obtêm-se completa liquefação. A celulase divide aleatoriamente cadeias de celulose em glicose enquanto preparações pectinase podem ter atividade de pectinesterase (PE), poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL) (ÇINAR, 2005).

A pectina liase são as pectinases, produzidas especialmente por *Aspergillus sp* conhecidas pela capacidade de degradar as pectinas altamente esterificadas em pequenas moléculas, pelo mecanismo de  $\beta$ -eliminação sem produzir

metanol, em contraste com a combinação de PG e PE, as quais são normalmente encontradas em produtos comerciais. O metanol, além de tóxico pode prejudicar o aroma do produto formado (YADAV et al., 2009).

Diversos estudos demonstram melhores condições de processos fermentativos de substratos vegetais, quando ocorrem de forma combinada a hidrólise enzimática com a fermentação, no mesmo reator e ao mesmo tempo, sendo comumente conhecida como sacarificação e fermentação simultânea (SFS). As enzimas hidrolisam polissacarídeos em açúcares que são imediatamente consumidos pela levedura. A SFS aumenta as taxas de hidrólise e reduz a inibição inicial das leveduras, que ocorreria pela presença de componentes de degradação enzimática. Este tipo de processo comumente é empregado para obtenção de etanol nos mais diversos substratos (WILKINS; WIDMER; GROHMANN, 2007).

O uso de enzimas em muitos processos, também é importante pois devido à quebra das unidades formadoras da parede celular vegetal, principalmente, pectina e celulose, uma infinidade de componentes intracelulares são desprendidos. Oszmiański, Wojdyło e Kolniak (2011), demonstraram que o tratamento enzimático em polpa de maçã teve um efeito positivo na extração de suco e no conteúdo fenólico. O estudo indicou que mesmo utilizando-se diferentes pectinases comerciais, o uso de enzima na extração de suco de maçã, também agiu diretamente na extração de compostos fenólicos, o que conseqüentemente levou a elevação da atividade antioxidante do suco.

## **1.7 Probióticos**

A palavra probiótico é derivada do grego e significa “em prol da vida”. Este termo foi utilizado pela primeira vez em 1953 por Kollath, que usou a palavra para descrever a restauração da saúde em pacientes subnutridos, através de suplementos alimentares. Em 1954, Vergin, sugeriu que uma dieta rica em probióticos poderia restaurar o desequilíbrio microbiano provocado pela ingestão de antibióticos. Anos mais tarde, em 1992, Fuller definiu probiótico como “suplemento de microrganismos vivos que alteram benéficamente o animal hospedeiro pelo melhoramento do balanço da microbiota intestinal” (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

De acordo com a FAO/WHO (2002) os probióticos são descritos como microrganismos viáveis que quando ingeridos em quantidades adequadas irão

conferir benefícios à saúde do hospedeiro. A legislação brasileira também define o termo em questão, como microrganismos vivos que apresentam capacidade de melhorar o equilíbrio da flora intestinal produzindo efeitos benéficos a quem os consome (BRASIL, 2002).

Os probióticos podem ser considerados como um suplemento oral ou um produto alimentar que contenha quantidades suficientes de microrganismos viáveis para alterar a microbiota intestinal do hospedeiro, oferecendo assim, benefícios (THOMAS; GREE; COMMITTEE ON NUTRITION, 2010). Para manter estes efeitos positivos, a dose diária mínima do microrganismo deve ser de  $10^9$  UFC (unidades formadoras de colônias).  $100 \text{ g}^{-1}$  de produto ingerido (HILL et al., 2014).

Para uma cultura microbiana ser considerada probiótica deve manter-se viável e estável após sua manipulação e armazenamento antes do consumo, deve sobreviver ao suco gástrico, sais biliares e pancreáticos, devendo ainda estabilizar a microbiota intestinal mantendo o ambiente desfavorável a patógenos e ter a capacidade de colonizar o trato gastrintestinal produzindo benefício funcional e clínico (MAVROUDI, 2012).

Com o fim de tratar ou prevenir a colonização do hospedeiro por patógenos, a ingestão de probióticos é indicada, uma vez que por competição alguns destes microrganismos concorrem com os patógenos pelo mesmo sítio de aderência (MARTÍN et al., 2004). Os probióticos podem ainda afetar os patógenos agindo sobre o metabolismo celular, reduzindo amônia no organismo, liberando enzimas, como a lactase ou também, através de bacteriocinas, ácidos orgânicos voláteis, peróxido de hidrogênio, que reduzem o número de células bacterianas viáveis ou afetar a produção de toxinas ou metabolismo bacteriano (ROLFE, 2000; COPPOLA; TURNES, 2004).

Os agentes probióticos mais frequentes são as bactérias produtoras de ácido láctico, algumas espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Outros gêneros como o *Streptococcus*, *Bacillus* e a levedura *Saccharomyces boulardii* também têm sido utilizados a fim de promover benefícios a quem os consome (Tabela 4) (SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012).

**Tabela 4 - Microrganismos probióticos de uso em humanos e animais**

<b>Lactobacillus</b>	<b>Bifidobacterium</b>	<b>Outras espécies</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Clostridium butiricum</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. Cremoris</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.dextranicum</i>
<i>L. delbrueckii subsp.bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Pediococcus acidilatici</i>
<i>L. fermentum</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gasseri</i>		<i>Streptococcus salivarius subsp.thermophilus</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. lactis</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. paracasei</i>		<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. salivarius</i>		
<i>L. gallinarum</i>		

Fonte: SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012.

Os mecanismos de ação dos probióticos, em geral, podem estar associados a todos os grupos taxonômicos que apresentam esta denominação probiótica, tais como a inibição de agentes patogênicos e a produção de metabólitos ou enzimas favoráveis. Outros efeitos, mais específicos, em nível intestinal ou extra intestinal, são particulares de algumas espécies isoladas, como efeitos neurológicos, endocrinológicos e imunológicos (HILL et al., 2014).

Os probióticos são, assim, amplamente utilizados em aplicações terapêuticas, incluindo a prevenção de doenças urogenitais, alívio da constipação intestinal, proteção e redução de diarreia provocada por antibióticos ou pela ação sobre patógenos. Outros benefícios como, a redução da intolerância à lactose e do nível de colesterol sérico no sangue, queda da atividade cancerígena, controle de sintomas da síndrome do intestino irritável, prevenção contra a osteoporose e alergias

alimentares, têm sido vastamente estudados, porém muitas comprovações ainda não foram efetivamente alcançadas (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2002; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Os produtos lácteos foram os primeiros a terem as culturas probióticas introduzidas na industrialização, sendo ainda os mais produzidos e consumidos, principalmente na forma de leite acidificado, iogurte ou queijo. Entretanto, os sucos de frutas também vêm sendo considerados bom veículo para o desenvolvimento de probióticos. Os sucos podem apresentar sabor agradável e aroma diferenciado quando fermentados com diferentes linhagens probióticas (SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012).

Além dos benefícios nutricionais e farmacológicos, estes microrganismos oferecem várias vantagens tecnológicas, principalmente sob o aspecto sensorial. Durante a fermentação, muitas das culturas probióticas produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas que modificam a textura do alimento. Outra ação é a formação de acetaldeído que fornecerá aroma ao produto (LEROY; DE VUYST, 2004).

### **1.8 *Saccharomyces boulardii***

A levedura *Saccharomyces boulardii*, foi descoberta por Henri Boulard, um microbiologista francês, em 1920. Ao buscar novas linhagens de leveduras que fossem capazes de suportar altas temperaturas a fim de produzir bom vinho, deparou-se na Indochina com uma epidemia de cólera. O francês foi informado então, que a população preparava um chá com as cascas de uma fruta local, a lichia, e que este aliviava os sintomas da diarreia provocada pela doença. Posteriormente, o pesquisador conseguiu isolar o agente responsável e verificou que na realidade a eficácia contra a diarreia era devida à presença de uma levedura, que foi denominada de *Saccharomyces boulardii* (MCFARLAND, 2010).

A *S. boulardii* de acordo com o atual Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN), é referida como uma variedade da levedura industrial mais comum, a *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, é mencionada como *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. No entanto, existem diferenças e semelhanças entre as leveduras, principalmente pela *S. boulardii* conseguir se desenvolver em temperatura de 37 °C, ser resistentes a pH ácido e sais biliares,

enquanto que as demais linhagens de *S. cerevisiae* crescerem preferencialmente em temperaturas próximas de 30 °C e não resistirem a pH inferior a 2 (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007; ŁUKASZEWICZ, 2012).

As leveduras probióticas, como é o caso da *S. boulardii*, são diferentes dos probióticos bacterianos, pois são células eucarióticas que apresentam, em geral, diferentes estruturas fisiológicas, são de maiores tamanhos, não adquirem genes resistentes aos antibióticos, não sendo afetadas por estes. Deste modo, esta levedura tem sido amplamente testada na eficácia clínica para diversos tipos de doenças agudas, principalmente da diarreia associada ao uso de antibióticos e infecção por *Clostridium difficile*, ou diarreia do viajante e a doença de Crohn (MCFARLAND, 2010).

Diversos estudos demonstraram que *S. boulardii* possui diferentes maneiras de agir contra patógenos no intestino, seja pela ação luminal e trófica na mucosa ou ainda pela ação anti-inflamatória. No lúmen intestinal a levedura pode agir preservando a fisiologia celular, impedindo a adesão de patógenos, interagindo com a microbiota natural, auxiliando no restabelecimento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta e atuando como regulador imunológico. O efeito trófico intestinal inclui o aumento nas atividades totais de sacarase, maltase-glicoamilase, lactase, trealase, aminopeptidase, fosfatase alcalina, em células epiteliais isoladas e fluído endoluminal, aumentando a secreção de SIgA (Imunoglobulina A secretora) e melhorando a síntese do receptor de imunoglobulina polimérica (MCFARLAND, 2010; POTHOUKAKIS, 2010).

Durante sua passagem pelo intestino, a *S. boulardii*, pode segregar no lúmen intestinal proteínas enzimáticas, que atuam diretamente no bloqueio do receptor ou na destruição direta de uma toxina patogênica. A síntese de serina (aminoácido) (54 KDa) pela *S. boulardii* leva a degradação das toxinas A e B secretadas pelo *Clostridium difficile* (CASTAGLIUOLO et al., 1999), o que reduz, conseqüentemente, os efeitos citotóxicos e enterotóxicos da infecção por esta bactéria. Não diferente, a fosfatase (63 KDa), também sintetizada pela levedura, é capaz de desfosforilar e inativar a endotoxina (lipopolissacarídeo) da *Escherichia coli* O55:B5 (BUTS et al., 2006).

Segundo Ali et al. (2012), a *S. boulardii* também apresenta potencial terapêutico na atividade antimicrobiana. Os resultados indicaram que extratos hidroalcoólicos de células exibiram atividade antimicrobiana contra as cepas testadas de: *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Candida*

*albicans*. Foi observado também que em extrato de etanol a *S. boulardii* apresentou atividade contra fungos filamentosos e não filamentosos, sendo que a maior atividade antifúngica foi registrada contra o *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride*.

Como relatado por Pontier-Bres et al. (2012), a *S. boulardii* consegue inibir a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium diminuindo a invasão da bactéria no cólon através da modificação de sua motilidade e trajetória. Quando ocorre a colisão entre a *Salmonella* e a levedura probiótica, uma mudança na organização dos flagelos bacterianos é observada. A partir deste fato a motilidade é afetada de modo que a velocidade das bactérias torna-se reduzida, alterando sua trajetória e por consequência permitindo a fácil adesão pela *S. boulardii* na parede intestinal.

A *S. boulardii* é comercializada em pó ou cápsulas, principalmente com células liofilizadas (MCFARLAND, 2010). Não existem relatos de produtos alimentícios industrializados produzidos ou adicionados da levedura probiótica, porém alguns estudos incorporando *S. boulardii* em matriz alimentar já foram realizados.

A *S. boulardii*, foi estudada em associação com *Lactobacillus* em iogurte, na tentativa de estimular o crescimento da cultura láctica e garantir sua sobrevivência durante o tempo de conservação (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001). Segundo os autores, a *S. boulardii* teve a capacidade de crescer dentro iogurte probiótico em números máximos superiores a 7 log UFC e permanecer estável por 29 dias. O nível populacional de levedura foi maior no iogurte com frutas, principalmente devido à presença sacarose e frutose do fruto. Apesar da incapacidade de *S. boulardii* de utilizar a lactose, a espécie de levedura utilizou ácidos orgânicos, galactose e glicose disponíveis devido ao metabolismo bacteriano. Entretanto, a produção de gás e álcool pelas leveduras provou ser o principal ponto negativo para a incorporação em produto lácteo, já que contribuem com aspectos sensoriais desagradáveis.

Karaolis et al. (2013) também formularam iogurte contendo *S. boulardii*, com o intuito de oferecer um produto probiótico como alternativa para o tratamento de diarreia associada à contaminação por patógenos ou pelo uso antibióticos. No estudo, foram formulados três diferentes iogurtes de cabra, o primeiro considerado controle, contendo apenas cultura láctica, o segundo iogurte com a levedura probiótica adicionada juntamente com a cultura e o terceiro a levedura adicionada após o iogurte ter coagulado com o fermento láctico. Os resultados mostraram que a *S. boulardii* estimulou a sobrevivência de lactobacilos, além de ter mantido a concentração celular constante durante o período de armazenamento. O

iogurte produzido com a adição simultânea de cultura *starter* e levedura probiótica, demonstrou propriedades sensoriais mais estáveis e de boa aceitabilidade que as demais formulações.

## 1.9 REFERENCIAS

ABPM. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em: julho de 2014.

ALI, M. A. E.; ABDEL-FATAH, O. M.; JANSON, J-C ; ELSHAFEI, A. M. Antimicrobial potential of *Saccharomyces boulardii* extracts and fractions. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n.8, p. 4537–4543, 2012.

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; ABAD, B.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2938–2952, 2004.

AMARANTE, C. V. T.; DA ROSA, E. F. F.; ALBUQUERQUE, J. A.; KLAUBERG FILHO, O.; STEFFENS, C. A. Atributos do solo e qualidade de frutos nos sistemas convencionais e orgânicos de produção de maçãs do Sul do Brasil. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n.1, p.99–109, jan./mar. 2015.

BALÁZS, A.; TÓTH, M.; BLAZICS, B.; HÉTHELYI, E.; SZARKA, S.; FICSOR, E.; FICZEK, G.; LEMBERKOVICS, E.; BLÁZOVICS, A. Investigation of dietary important components in selected red fleshed apples by GC–MS and LC–MS. **Fitoterapia**, v. 83, n.8, p.1356–1363, 2012.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.

BELINHA, I.; AMORIM, M. A.; RODRIGUES, P.; DE FREITAS, V.; MORADAS-FERREIRA, P.; MATEUS, N.; COSTA, V. Quercetin Increases Oxidative Stress Resistance and Longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2446–2451, 2007.

BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*)**. 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 325–337, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. **Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em julho de 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 18 de julho de 2008. **Lista de Alegações de Propriedade Funcional**. Publicado no Diário Oficial da União de julho de 2008. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em julho de 2014.

\_\_\_\_\_. Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *In*: Secretaria de Política Agrícola. **Cenário da Cadeia Produtiva da Maçã**. Ano 6, vol. 54, março de 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola>>. Acesso em: julho de 2014.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n. 11, p. 317–333, nov. 1998.

BRDE. BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. **Superintendência de Planejamento. Cadeia produtiva da maçã no Brasil: limitações e potencialidades**. Porto Alegre, 44 p., 2011. Disponível em:<<http://www.brde.com.br/>> Acesso em: jul. 2014.

BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4841-4844, 2001.

BUTS, J-P; DEKEYSER, N.; STILMANT, C.; DELEM, E.; SMETS, F.; SOKAL, E. *Saccharomyces boulardii* Produces in Rat Small Intestine a Novel Protein Phosphatase that Inhibits *Escherichia coli* Endotoxin by Dephosphorylation. **Pediatric Research**, v. 60, n.1, p. 24–29, 2006.

CALIARI, V. Processos Biotecnológicos e Bioquímicos (em mostos e vinho). Curitiba, 2014. Disponível em: <<http://roneiandre.dominiotemporario.com/doc/microbiologiaebioquimica.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

CAPRILES, V. D.; SILVA, K. E. A.; FISBERG, M. Prebióticos, probióticos e simbióticos: nova tendência no mercado de alimentos funcionais. **Nutrição Brasil**, Rio de Janeiro, v.4, n. 6, p. 327–335, nov./dez. 2005.

CARIS-VEYRAT, C.; AMIOT, M.-J.; TYSSANDIER, V.; GRASSELLY, D.; BURET, M.; MIKOLAJCZAK, M.; GUILLAND, J.-C.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; BOREL, P. Influence of Organic versus Conventional Agricultural Practice on the Antioxidant Microconstituent Content of Tomatoes and Derived Purees; Consequences on Antioxidant Plasma Status in Humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6503–6509, 2004.

CASTAGLIUOLO, I.; RIEGLER, M. F.; VALENICK, L.; LAMONT, J. T.; POTHOUKAKIS, C. *Saccharomyces boulardii* Protease Inhibits the Effects of Clostridium difficile Toxins A and B in Human Colonic Mucosa. **Infection and Immunity**, v. 67, n.1, p. 302–307, 1999.

CERMAK, R.; LANDGRAF, S.; WOLFFRAM, S. The Bioavailability of Quercetin in Pigs Depends on the Glycoside Moiety and on Dietary Factors. **Nutrient Metabolism**, v.133, p 2802–2807, 2003.

CHEN, B. H.; WU, P. Y.; CHEN, K. M.; FU, T. F.; WANG, H. M.; CHEN, C. Y. Antiallergic Potential on RBL-2H3 Cells of Some Phenolic Constituents of *Zingiber officinale* (Ginger). **Journal of Natural Products**, v. 72, n.5, p. 950–953, 2009.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL, FAEPE, 1990. 293 p.

CHOI, G. N.; KIM, J. H.; KWAK, J. H.; JEONG, Chang-Ho; JEONG, H. R.; LEE, U.; HEO, H. J. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. **Food Chemistry**, v. 132, p.1019–1024, 2012.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, jul./ago., 2004.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 4–5, p. 217–246, Aug./Oct. 2001.

CURIEL, J. A.; MUÑOZ, R.; FELIPE, F. L. pH and dose-dependent effects of quercetin on the fermentation capacity of *Lactobacillus plantarum*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 926–933, 2010.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 26, p. 767–778, 2007.

ÇINAR, I. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 945–949, 2005.

DANI, C.; OLINONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2574–2580, 2007.

D' AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 4, p.315–324, 1989.

DESPAIGNE, D. A. N. Fitoestrógenos y su utilidade para el tratamiento del síndrome climatérico. **Revista Cubana Endocrinol**, v. 12, n.2, p. 128-131, 2001.

EPAGRI/CEPA. EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**. v. 1, p. 207. Florianópolis, 2014. ISSN 1677-5953.

ESTELA-ESCALANTE, W.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.; HATTA-SAKODA, B. Effect of aeration on the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* cultured in apple juice. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 11, n. 2, p. 211–226, 2012.

ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n.1, p. 43–52, jan./abr., 2001.

EUROPEAN COMMISSION. **Functional Foods**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2010. 24 p. Disponível em: <[ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/fp7/kbbe/docs/functional-foods\\_en.pdf](ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/fp7/kbbe/docs/functional-foods_en.pdf)>. Acesso em: jul. 2014.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, 30 April and 01 May, 2002. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)>. Acesso em: abr. 2016.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, p.1401-1412, 1995.

GOULARTE, V. D. S.; ANTUNES, E. C.; ANTUNES, P. L. Qualidade de maçã Fuji osmoticamente concentrada e desidratada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.20, n.2, p.160-163, maio/ago. 2000.

GUMMANDI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987-996, 2003.

HAGEN, S. F.; BERGE, G. I. A.; BENGTSSON, G. B.; BILGERM W.; BERGE, A.; HAFFNER, K.; SOLHAUG, K. A. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p.1–10, 2007.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p. 572–584, 2002.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutrition and Cancer**, v. 20, n. 1, 1993.

HILL, C.; GUAMER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, publicação on-line em 10 julho de 2014. Disponível em: <[www.nature.com/nrgastro](http://www.nature.com/nrgastro)>. Acesso em: 18/08/2014.

HOLLMAN, P. C. H.; VAN TRIJP, J. M. P.; BUYSMAN, M. C. P.; GAAG, M. S.; MENGELERS, M. J. B.; DE VRIES, J. H. M.; KATAN, M. B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Letters**, v. 418, p. 152-156, 1997.

ILSI. INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE. **Functional Food**. Disponível em: <<http://www.ilsi.org/Europe/Pages/FUFOSE.aspx>>. Acesso em: jul. 2014.

JAFFERY, E. H.; BROWN, A. F.; KURILICH, A. C.; KEEK, A. S.; MATUSHESKI, N.; KLEIN, B. P. Variation in content of bioactive components in broccoli. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 323–330, 2003.

KARAOLIS, C.; BOTSARIS, G.; PANTELIDES, I.; TSALTAS, D. Potential application of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in goat's yoghurt: survival and organoleptic effects. **International Journal of Food Science and Technology**, v.48, p.1445–1452, 2013.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p.1–9, 2002.

KENNEDY, M.; LIST, D.; LU, Y.; FOO, L. Y. Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis. In: **Modern methods of plant analyses: analysis of plant waste materials**. Berlin: Springer Verlag, p. 75–119, 1999.

KUJUMGIEV, A. TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V. CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235–240, 1999.

KUNWAR, A.; PRIYADARSINI, K. I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. **Journal of Medical e Allied Sciences**, v. 1, n. 2, p. 53-60, 2011.

LAUN, P.; PICOVA, A.; MADEO, F.; FUCHS, J.; ELLINGER, A.; KOHLWEIN, S.; DAWES, I.; FROHLICH, K. U.; BREITENBACH, M. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 1166–1173, 2001.

LEE, C. Y.; SMITH, N. L. Apples: an important source of antioxidants in the American diet. **New York Fruit Quarterly**, v. 8, n. 2, p. 12–17, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. COX, M. M. Lehninger. **Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier, 4. ed. São Paulo, 2006. p 409–439.

LEROY, F.; De VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, v. 34, p.791–796, 2001.

ŁUKASZEWICZ, M. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* – Probiotic Yeast. In: RIGOBELLO, E. C. **Probiotics**. 1. ed. Rijeka, Croácia: InTech, 2012. p. 3–36.

MADEO, F.; FROHLICH, E.; FROHLICH, K. U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis in yeast. The **Journal of Cell Biology**, v. 139, p. 729–734, 1997.

MARTÍN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M. L.; OLIVARES, M.; BOZA, J.; JIMÉNEZ, J.; FERNÁNDEZ, L.; XAUS, J.; RODRÍGUES, J. M. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. **Trends in Food Science & Technology**. v.15, p. 121–127, 2004.

MAVROUDI, A. Probiotics in Pediatrics – Properties, Mechanisms of Action, and Indications. In: RIGOBELLO, E. C. **Probiotics**. 1. ed. Rijeka, Croácia: InTech, 2012. p. 310–324.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n.18, p. 2202–2222, May 2010.

MILES, E. A.; ZOUBOULI, P.; CALDER, P. C. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. **Nutrition**, v. 21, p. 389–394, 2005.

MITCHELL, A. E.; HONG, Y-J.; KOH, E.; BARRETT, D. M.; BRYANT, D. E.; DENISON, R. F.; KAFFKA, S. Ten-Year Comparison of the Influence of Organic and Conventional Crop Management Practices on the Content of Flavonoids in Tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6154–6159, 2007.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145–171, 2001.

MUDNIC, I.; MODUN, D.; RASTIJA, V.; VOKOVIC, J.; BRIZIC, I.; KATALINIC, V.; KOZINA, B.; MEDIC-SARIC, M.; BOBAN, M. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1205–1210, 2010.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOON, D. E. C.; BOELENS, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and Potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418–25, 2001.

NOGUEIRA, A. SANTOS, L. D.; PAGANINI, C.; WOSIACKI, G. Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 187-194, abr./jun., 2005.

OSZMIAŃSKI, J.; WOJDYŁO, A.; KOLNIAK, J. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. **Food Chemistry**, v. 127, p. 623–631, 2011.

OWEN, R. W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1235–1247, 2000.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçã, considerando suas avaliações físico-químicas (Dados da safra 2001/2002). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1336–1343, nov./dez. 2004.

PECK, G. M.; ANDREWS, P. K.; REGANOLD, J. P.; REGANOLD, J. K. Apple orchard productivity and fruit quality under organic, conventional, and integrated management. **Horticultural Science**, v. 41, n. 1, p. 99–107, 2006.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137–150, 2005.

PONTIER-BRES, R.; PRONDON, F.; MUNRO, P.; RAMPAL, P.; LEMICHEZ, E.; PEYRON, J. F.; CZERUCKA, D. Modification of *Salmonella* Typhimurium Motility by the Probiotic Yeast Strain *Saccharomyces boulardii*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, mar., 2012.

POTHOULAKIS, C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 34, n.1, p.62–70, 2010.

PRADE, R. A.; ZHANG, D. F.; AYOUBI, P.; MORT, A. J. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 16, p. 316–391, 1999.

PRONK, J. T.; WENZEL, T. J.; LUTTIK, M. A. H.; KLAASSEN, C. C. M.; SCHEFFERS, W. A.; STEENSMA, H. Y.; VAN DIJKEN, J. P. Energetic aspects of glucose metabolism in a pyruvate-dehydrogenase-negative mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v.140, p. 601–610, 1994.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1–7, 2010.

RAUD, C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da danone e da nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. **Revista Sociologia e Política**, Curitiba, v. 16, n. 31, p. 85–100, nov., 2008.

RAUPP, D. S.; CREMASCO, A. C. V.; CALDI, C. M.; MARQUES, S. H. P.; BANZATTO, D. A. Polpa refinada de maçã promove arraste via fecal de nutrientes ingeridos na dieta. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, p. 77-83, 2004.

REGANOLD, J. P.; WACHTER, J. M. Organic Agriculture in the twenty-first century. **Nature plants**, v. 2, February, 2016. Disponível em: <[www.nature.com/natureplants](http://www.nature.com/natureplants)>. Acesso em: 18 abril 2016.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1995.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v.2, n. 4, p152–159, abr., 1997.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas de suco de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, v. 4, p. 750–756, out. – dez., 2005.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 396-402, 2000.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B.; BLONDIN, B.; SALMON, J. Oxygen consumption by anaerobic *Sacharomyces cerevisiae* in enological conditions: effect on fermentation kinetics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.1, p. 113–121, 2003.

SCHMIDELL, W.; **Agitação e Aeração em Biorreatores**. In: SCHMIDELL, W.; BORZANI, W; LIMA, U. A; AQUARONE, E. Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 1. ed. 2001. v. 2. 2541p.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. 2001. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 1. ed. 2001. v. 2.; p.179–192.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 91–113, 1997.

SONG, D.; IBRAHIM, S.; HAYEK, S. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. In: RIGOBELLO, E. C. **Probiotics**. 1. ed. Rijeka, Croácia: InTech, 2012. p. 3-36.

TACO; UNICAMP; NEPA. **Tabela de Composição de Alimentos**, 4 ed. rev. e ampl. Campinas, 2011. Disponível em: <[http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf?arquivo=taco\\_4\\_versao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf)>. Acesso em: 02 maio 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

THOMAS, D. W.; GREE, F. R.; COMMITTEE ON NUTRITION, section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Probiotics and Prebiotics in Pediatrics. **Official Journal of the American Academy of Pediatrics**, v. 126, n. 6, dez., 2010.

TORTORA, G. T.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. **Microbiologia**. Editora Artmed. 10. ed. Porto Alegre, 2012. p. 124-136.

TRUEBA, G. P.; SÁNCHEZ, G. M. Los Flavonoides como Antioxidantes Naturales. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 20, n.4, p. 297–306, 2001.

TRUEBA, G. P. Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. **Revista Cubana Invest Biomed**, v. 22, n. 1, p. 48–57, 2003.

USDA. FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Fresh Deciduous Fruit: World Markets and Trade (Apples, Grapes, & Pears)**. December, 2015. Disponível em <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/fruit.pdf>>. Acesso em: 20 abril 2016.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, n. 7, p. 714–728, 2008.

VAQUERO, M. J. R.; ALBERTO, M. R.; NADRA, M. C. M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, p. 93–101, 2007.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucoselimited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**, v.136, p. 395–403, 1990.

VERDUYN, C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 60, p. 325–353, 1991.

VINSON, J. A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5315–5321, 2001.

WACH, A.; PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chemistry**, v. 100, p. 699–704, 2007.

WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. **Process Biochemistry**, v. 42, p.1614–1619, 2007.

WINTER, C. K.; DAVIS, S. F. Organic foods. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 117–124, 2006.

WOESE, K.; LANGE, D.; BOESS, C.; BÖGL, K. W. A Comparison of Organically and Conventionally Grown Foods. Results of a Review of the Relevant Literature. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, p. 281–293, 1997.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n.1, p. 609–6014, 2003.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C.; DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation in Santa Catarina – Brazil. **Fruit Processing**, Schonborn, v. 12, n.1, p. 19–28, 2002.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S.; Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44 p.1–10, 2009.

YOU, H. J.; AHN, H. J.; JI, G. E. Transformation of Rutin to Antiproliferative Quercetin-3-glucoside by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.10886–10892, 2010.

ZARDO, D. M.; ALBERTI, A.; DANTAS, A. P. C.; GUYOT, S.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante em fermentados de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.4, p. 829–838, out./dez., 2008.

## CAPÍTULO 2

---

### Otimização do processo de sacarificação e fermentação simultânea na viabilidade celular de *Saccharomyces boulardii* em maçã orgânica e convencional usando a metodologia de superfície de resposta

---

#### Resumo

Sacarificação e a fermentação simultânea (SFS) constitui em uma hidrólise enzimática que ocorre concomitante ao processo fermentativo, sendo considerado eficiente em multiplicação celular de microrganismos e etanol. Neste estudo o planejamento fatorial com pontos estrelas de face centrada ( $\alpha = \pm 1$ ) foi empregado para verificar a influência da temperatura e da concentração de enzimas celulase e pectinase sobre a produção de células de *Saccharomyces boulardii* durante a sacarificação e fermentação simultâneas em substrato de polpa de maçã orgânica e convencional. O efeito das variáveis do processo, temperatura de fermentação (25 – 35 °C), concentração de pectinase (5 – 25  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ ) e concentração de celulase (4 – 8  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ ) foram analisadas por regressão múltipla, através dos dados experimentais, desenvolvendo-se modelos polinomiais de segunda ordem, os quais proporcionaram a descoberta das condições ideais para multiplicação celular da levedura. Sob as condições estabelecidas foram determinadas a viabilidade celular nos substratos de maçã, pela viabilidade em placas, e expresso em  $\log\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A condição ideal para temperatura foi de 27,5 °C para ambos fermentados de maçã, de 20 e 5  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  para pectinase e 8 e 7  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  para celulase, respectivamente, para polpa maçã orgânica e convencional. Os valores experimentais para a viabilidade estiveram de acordo com os preditos, mantendo-se em  $8,349 \pm 0,015\log\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$  (maçã orgânica) e  $8,319 \pm 0,016\log\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$  (maçã convencional), sugerindo adequação dos modelos desenvolvidos. Os valores de viabilidade celular em ambos os substratos, com características físico-químicas significativamente diferentes, foram considerados estatisticamente iguais, indicando que mesmo que o sistema de cultivo gere maçãs com atributos diferentes, estas não interferiram na viabilidade celular. A contagem de células, em ambas as maçãs, foram compatíveis para que os fermentados contendo *S. boulardii* possam ser considerados probióticos.

**Palavras-chaves:** probióticos, *Malus Domestica*, pectinase, celulase, SFS

## 1 Introdução

A levedura probiótica, *Saccharomyces boulardii*, apresenta grande potencial terapêutico. Sua eficácia contra as doenças gastrointestinais está associada ao fato de bloquear moléculas de sinalização celular, que promovem a inflamação intestinal, preservar a fisiologia celular, interferir na fixação de patógenos, interagir com microbiota normal e também atuar como regulador imunológico (MCFARLAND, 2010; POTHOUKAKIS, 2010). Para Pontier-Bres et al. (2012), a *S. boulardii* consegue inibir a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium diminuindo a invasão da bactéria no cólon através da modificação de sua trajetória e motilidade, possibilitando uma adesão mais facilitada pela própria levedura na parede intestinal.

É desejável que em uma cultura probiótica, *S. boulardii*, permaneça viável, sobreviva ao armazenamento e quando ingerida, sobreviva à ação do suco gástrico e sais biliares (MCFARLAND, 2010). Por ser uma célula eucariótica, *S. boulardii* possui certas especificidades como probiótica que a distingue das células procarióticas bacterianas. São de tamanhos maiores, agindo conseqüentemente como obstáculo às bactérias, não adquirem genes de resistência a antibióticos, e ainda, não possuem a capacidade de transferir material genético (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007).

Por se tratar de uma levedura, o processo fermentativo leva especialmente à produção de álcool, sendo este considerado o principal metabólito deste processo. Entretanto, há também a formação de compostos secundários através de outras vias metabólicas realizadas para o crescimento celular e produção de massa celular (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). A adição de oxigênio promove, maior síntese de massa celular, de modo a aumentar a taxa de fermentação, fator importante na síntese de lipídeos constituintes da membrana celular das leveduras (ROSENFELD et al., 2003).

A ampla utilização de diversos substratos ricos em componentes orgânicos para processos fermentativos vêm ganhando espaço na pesquisa, como estudado por Jang et al. (2012) que utilizou *Saccharina japonica* como substrato na produção de etanol. Entretanto, a geração de massa celular também é necessária, principalmente quando se trata de uma levedura considerada probiótica, já que neste caso o primordial é a produção de células.

Maçã de qualidade inferior é descartada no campo e na comercialização *in natura* e passa a suprir, como matéria-prima, as unidades industriais processadoras de sucos, bebidas alcoólicas e geleias (NOGUEIRA et al., 2005). Todavia a qualidade perante a comercialização não altera atributos de composição, já que os açúcares, minerais, proteínas e compostos bioativos, se mantêm inerentes ao fruto. A qualidade do solo, o clima e a nutrição da cultura, é que são fatores que podem impactar diretamente nas características nutricionais dos frutos (PECK et al., 2006).

A maçã também apresenta componentes não nutritivos, como a pectina e a celulose, que fornecem à polpa da fruta certa viscosidade. O efeito sinérgico da combinação de pectinase e celulase é a parte decisiva no tratamento enzimático para a liquefação quase completa da polpa, quando requerida. A hidrólise enzimática da parede celular aumenta o teor de açúcar redutor, teor de sólidos solúveis, de ácido galacturônico e acidez titulável da polpa, gera um produto com baixa viscosidade e reduzida quantidade de resíduos (DRILLEAU, 1994; WILKINS et al., 2007; PARMAR; RUPASINGHE, 2013).

De acordo com Knight e Newman, (2013), a cultura orgânica vem ganhando amplo reconhecimento por ser uma forma de cultivo mais sustentável. Algumas pesquisas reportam que vegetais cultivados sob o sistema orgânico contêm maior teor de minerais, vitaminas e compostos bioativos do que as culturas convencionais (BOURN; PRESCOTT, 2002; MAGKOS; ARVANITI; ZAMPELAS, 2003; MÄDER et al., 2007; DANGOUR et al., 2009; LAIRON, 2010; MAZZONCINI et al., 2015).

A sacarificação e fermentação simultânea ocorre ao mesmo tempo e utilizando um mesmo recipiente. As enzimas hidrolisam os polissacarídeos à açúcares, que são imediatamente consumidos pela levedura (WILKINS; WIDMER; GROHMANN, 2007). Este processo requer uma condição intermediária de temperatura para as enzimas e para a levedura, além da concentração enzimática suficiente para a liberação dos açúcares (MARTIN et al., 2008; PARMAR; RUPASINGHE, 2013).

O objetivo do trabalho foi realizar planejamento fatorial com pontos estrelas de face centrada ( $\alpha = \pm 1$ ), a fim de verificar a influência da temperatura e da concentração de enzimas celulase e pectinase sobre a multiplicação celular de

*Saccharomyces boulardii* durante a sacarificação e fermentação simultâneas em substrato de polpa de maçã orgânica e convencional.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Matéria-prima

As matérias-primas testadas como fonte de carbono nos experimentos foram maçãs cultivadas no sistema orgânico (ORG) e convencional (CONV). Padrão indústria, da cultivar 'Fuji' (safra 2014/2015) adquiridas de produtores da região de Urupema, Santa Catarina. As maçãs foram lavadas, sanitizadas e trituradas em processador (Walita Master RI7633) com 0,5% (m.v<sup>-1</sup>) de ácido ascórbico para inativação de enzimas polifenoloxidasas e peroxidases, que levam ao escurecimento dos frutos (NOGUEIRA; SILVA, 1989). Após processada a polpa de maçã fora acondicionada em sacos de polietileno e armazenadas a – 20 °C.

### 2.2 Enzimas

As enzimas Celluclast<sup>®</sup> 1.5 L (celulase) e Novozym<sup>®</sup> 33095 (pectinase) produzidas a partir da fermentação de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus aculeatus* / *Aspergillus niger*, respectivamente, foram cedidas pela NOVOZYMES<sup>®</sup>, Dinamarca.

A Celluclast<sup>®</sup> 1.5 L, segundo o fabricante possui atividade enzimática de 700 EGU.g<sup>-1</sup>, sendo considerada uma endo-glucanase que hidrolisa as ligações (1,4)- $\beta$ -D-glucosídica em celobiose e glicose. As condições ótimas da enzima segundo a União Internacional de Química Pura e Analítica (IUPAC), ocorre em pH 4,8 e temperatura de 50 °C (GHOSE, 1987).

De acordo com o fabricante, a Novozym<sup>®</sup> 33095 com atividade enzimática de 10000 PECTU. mL<sup>-1</sup> tem como principal componente enzimático a pectina liase, que catalisa a clivagem das ligações (1,4)- $\alpha$ -D-galacturonato metil-éster, agindo entre 15 e 60 °C, e pH de 3,0 a 5,0.

### 2.3 Caracterização dos substratos de maçã orgânica e convencional

A caracterização da maçã orgânica ou convencional foi através da determinação de proteína, umidade, pH, acidez total titulável e sólidos solúveis totais, conforme a AOAC (1994). Os minerais foram determinados em espectrofotômetro de plasma induzido por argônio (ICP/OES, Optima 8300 – Perkin Elmer®, EUA) e os açúcares redutores e totais foram determinados em espectrofotômetro UV-VIS (Genesys 10S UV-Vis, Thermos Scientific™) pelas metodologias descritas por Somogyi (1956) e Dubois et al. (1956), respectivamente.

Os valores médios (triplicata), foram submetidos ao teste Tukey em nível de 5% de significância, em software *Statistica* versão 8.0, a fim de comparar possíveis diferenças na composição dos substratos de polpa de maçã orgânica e convencional.

### 2.4 Microrganismo e preparo do inóculo

A cultura de *Saccharomyces boulardii* foi obtida a partir de produto comercial na forma liofilizada (Floratil® Merck). Cada cápsula com 100 mg continha  $0,5 \cdot 10^9$  células de *S. boulardii* – 17.

A cepa da levedura liofilizada foi reativada em 50 mL de meio de cultivo YPD líquido (extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup>; peptona bacteriológica, 20 g.L<sup>-1</sup>; dextrose, 20 g.L<sup>-1</sup>) esterilizado em autoclave (121 °C por 30 min), distribuídos em frascos Erlenmeyer de 125 mL e incubadas a 30 °C, 120 rpm por 24 horas, em incubadora rotatória tipo *Shaker* (CT-712, Cientec, Brasil). Culturas de trabalho foram mantidas em tubos contendo meio YPD sólido (extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup>; peptona bacteriológica, 20 g.L<sup>-1</sup>; dextrose, 20 g.L<sup>-1</sup>; ágar, 15 g.L<sup>-1</sup>) inclinados. Posteriormente mantidos a 4 °C e repicados para um novo meio de cultivo YPD a cada duas semanas, visando a manutenção da cepa.

O inóculo foi preparado pela transferência de três alçadas de células contidas no tubo inclinado para cada 50 mL de meio YPD líquido. A incubação sob agitação em incubador *Shaker* ocorreu a 30 °C e 120 rpm por 24 horas. Resultados de testes preliminares indicavam que nesse tempo os microrganismos se encontravam na fase estacionária de multiplicação.

## 2.5 Sacarificação e fermentação simultâneas

A sacarificação e fermentação simultânea (SFS) foi conduzida através da inoculação de massa celular de *S. boulardii* adicionada com as enzimas Celluclast® 1.5 L e Novozym® 33095 no substrato de maçã orgânica ou convencional.

Massa celular (10 % m.v<sup>-1</sup>) da levedura, centrifugada a 3000 rpm por 15 min (Eppendorf, 5804 R, Alemanha) e lavada com água salina (0,9% m.v<sup>-1</sup>), foi inoculada em frascos com 100 g de maçã, previamente tratados termicamente a 80 °C por 20 minutos (PAGANINI et al., 2005). A contagem, em placas no tempo inicial, tanto para o substrato de maçã orgânica quanto para o de maçã convencional foi de 6 log UFC.mL<sup>-1</sup>.

O processo de otimização, para obter-se maiores concentrações de células de *S. boulardii*, foi avaliado através das variáveis, concentração de enzimas Novozyme® 33095 e Celluclast® 1.5L e de temperatura de incubação. A fermentação ocorreu em incubadora tipo *Shaker* a 120 rpm e em diferentes temperaturas, de acordo com o delineamento experimental (Tabela 2). As amostras foram retiradas após 24 horas de fermentação e a contagem da viabilidade celular feita em placas (item 2.6).

## 2.6 Determinação do número de células viáveis

A determinação da concentração de células foi realizada na proporção de 1:10 de substrato em água peptonada (0,1% m.v<sup>-1</sup>) com diluição seriada até 10<sup>-8</sup>. 100 µL das diluições 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-8</sup> foram plaqueados em triplicata no ágar YPD e incubadas a 30 °C por 24 horas. A média do número de colônias foi utilizada para o cálculo das unidades formadoras de colônias. Sendo os resultados expressos em log UFC. mL<sup>-1</sup>.

## 2.7 Delineamento experimental

A otimização foi um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, com pontos estrelas de face centrada ( $\alpha = \pm 1$ ) e 2 repetições no ponto central, totalizando 18 experimentos. Optou-se por este delineamento, pois neste projeto os pontos axiais são o centro de cada face do espaço fatorial, requerendo apenas três níveis para cada fator

(REZAZADEH et al., 2013). Os níveis dos fatores utilizados são mostrados na Tabela 2, onde (-1), (0) e (+1) significam o menor, médio e maior nível, respectivamente.

A temperatura, concentração de pectinase e celulase foram utilizados como variáveis independentes na produção celular de *S. boulardii*. Os valores de temperatura foram preestabelecidos para crescimento de *S. boulardii* de acordo com a literatura, de 25 a 35 °C (ALI et al., 2012; NAGASHIMA et al., 2013). A concentração de pectinase variou entre 5 e 25  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  de acordo com as especificações do fabricante (NOVOZYMES®, Dinamarca), assim como a concentração de celulase, que ocorreu entre 4 a 8  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ .

O dados experimentais foram projetados através software *Statistica* versão 8.0. Um modelo de regressão polinomial quadrática completo foi utilizado para correlacionar os dados experimentais (Equação 1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^i \beta_i x_i + \sum_{i=1}^i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^i \sum_{j=i+1}^i \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

onde Y é a variável de resposta de viabilidade celular ( $\log\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $x_i$  são fatores de processo, incluindo a temperatura de fermentação, concentração de pectinase e celulase,  $\beta_0$  é o coeficiente de compensação,  $\beta_i$  são coeficientes lineares,  $\beta_{ii}$  são coeficientes quadráticos e  $\beta_{ij}$  são coeficientes de interação (WANG et al., 2013).

As equações polinomiais estabelecidas foram usadas para traçar superfícies tridimensionais (3D) e bidimensionais (2D), a fim de visualizar os efeitos individuais e interativos do processo, quando um dos parâmetros eram fixados em seu ponto ótimo. O impacto e significado de cada termo (linear, quadrático e interações) na equação de regressão foi avaliado por análise de variância (ANOVA).

## 2.8 Validação das condições de otimização e dos modelos preditivos

Validação das condições otimizadas e dos modelos preditivos, foi testada utilizando as condições ideais previstas. Experiências em triplicata, realizadas nas condições ótimas de cada substrato, e os valores experimentais médios foram comparados com os valores previstos, de modo a determinar a validade dos modelos. O crescimento de *S. boulardii* e ambas as maçãs, orgânica e convencional, foi comparado pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância, a fim de verificar a interferência do substrato.

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Caracterização da matéria-prima

Os dados obtidos na caracterização das polpas de maçã (Tabela 1), após o procedimento de lavagem, sanitização e trituração (*Item 2.1*), apontaram que o sistema de cultivo, orgânico ou convencional, interferem significativamente nas características dos frutos. Houve diferença significativa entre os substratos, apresentando a maçã orgânica maiores concentrações de sólidos solúveis, acidez, açúcares totais, proteínas e minerais. Característica do substrato é de grande importância para processo de fermentação, pois muitos dos componentes existentes no meio, entre eles os minerais, podem influenciar positiva ou negativamente na multiplicação e no crescimento celular (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

**Tabela 1** - Caracterização físico-química em base seca, de partes comestíveis (com cascas) de maçãs cultivadas sob os sistemas orgânico (ORG) e convencional (CONV).

	Composição da maçã 'Fuji'*	
	ORG	CONV
pH	3,515 ± 0,002 <sup>a</sup>	3,640 ± 0,004 <sup>a</sup>
Sólidos solúveis totais (% m.m <sup>-1</sup> )	17,376 ± 0,002 <sup>a</sup>	14,772 ± 0,063 <sup>b</sup>
Umidade (% m.m <sup>-1</sup> )	86,240 ± 0,027 <sup>b</sup>	88,342 ± 0,079 <sup>a</sup>
Acidez titulável/ ác. málico (% m.m <sup>-1</sup> )	0,532 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,424 ± 0,015 <sup>b</sup>
Açúcares totais (% m.m <sup>-1</sup> )	12,738 ± 0,148 <sup>a</sup>	9,404 ± 0,361 <sup>b</sup>
Açúcares redutores (% m.m <sup>-1</sup> )	9,537 ± 0,050 <sup>a</sup>	8,512 ± 0,285 <sup>a</sup>
Proteínas (% m.m <sup>-1</sup> )	0,160 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,070 ± 0,010 <sup>b</sup>
Cinzas (mg.g <sup>-1</sup> )	3,445 ± 0,070 <sup>a</sup>	2,385 ± 0,100 <sup>b</sup>
Minerais (mg.g <sup>-1</sup> )		
Fósforo	0,233 ± 0,090 <sup>a</sup>	0,178 ± 0,100 <sup>b</sup>
Cálcio	0,110 ± 0,200 <sup>a</sup>	0,104 ± 0,150 <sup>b</sup>
Potássio	0,933 ± 0,033 <sup>a</sup>	0,713 ± 0,095 <sup>b</sup>
Magnésio	0,042 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,038 ± 0,001 <sup>b</sup>
Sódio	0,217 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,196 ± 0,050 <sup>b</sup>
Enxofre	0,026 ± 0,100 <sup>a</sup>	0,021 ± 0,010 <sup>b</sup>
Alumínio	0,010 ± 0,250 <sup>a</sup>	0,009 ± 0,008 <sup>b</sup>

\*médias na mesma linha seguidas por letras iguais não diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ).

De acordo com Amarante et al. (2015), o sistema de produção orgânico melhora as características físicas, químicas e biológicas do solo quando

comparado ao sistema de produção convencional, pois a necessidade de adubação constante, possibilita um solo mais homogêneo e íntegro, influenciando diretamente na qualidade dos frutos.

### 3.2 Delineamento central composto de face-centrada para otimização de parâmetros eficazes na produção de *S. boulardii* por SFS

Para otimizar a máxima produção de *S. boulardii* em polpa de maçã orgânica ( $Y_{org}$ ) e convencional ( $Y_{conv}$ ), mantendo suas características inatas, ou seja, sem qualquer adição de outros nutrientes, foram selecionadas, baseadas em testes preliminares, as variáveis independentes: temperatura ( $X_1$ ), concentração de pectinase ( $X_2$ ), e concentração de celulase, ( $X_3$ ), transformadas em codificadas ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ), respectivamente.

As várias combinações das condições experimentais, codificadas ( $x^n$ ) e reais ( $X^n$ ), com suas respectivas respostas (dados médios de resposta) estão representados na Tabela 2.

Os dados experimentais (Tabela 2) foram usados para desenvolver um modelo de regressão polinomial quadrática das três variáveis ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ) em ordem linear e quadrática. Os modelos estatísticos matemáticos, que representam a função resposta, equivalentes às Equações (2) e (3), orgânica e convencional, respectivamente. Na equação canônica ajustada aos dados experimentais,  $Y_{org}$  e  $Y_{conv}$ , variáveis dependentes, são o número de células viáveis ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ). Os termos significativos em nível de 5% são mostrados com um asterisco (\*).

$$Y_{ORG} = 8,301 \pm 0,016 - 0,056 \pm 0,056^* x_1 - 0,035 \pm 0,013^* x_2 + 0,048 \pm 0,013^* x_3 - 0,072 \pm 0,025^* x_1^2 - 0,027 \pm 0,025 x_2^2 + 0,004 \pm 0,025 x_3^2 - 0,034 \pm 0,014^* x_1 x_2 + 0,014 \pm 0,014 x_1 x_3 + 0,023 \pm 0,014 x_2 x_3 \quad (2)$$

$$Y_{CONV} = 8,284 \pm 0,010 - 0,070 \pm 0,008^* x_1 - 0,018 \pm 0,008 x_2 + 0,013 \pm 0,008 x_3 - 0,067 \pm 0,015^* x_1^2 - 0,016 \pm 0,015 x_2^2 - 0,052 \pm 0,015^* x_3^2 - 0,006 \pm 0,009 x_1 x_2 - 0,008 \pm 0,009 x_1 x_3 - 0,039 \pm 0,009^* x_2 x_3 \quad (3)$$

Verificou-se nas Equações (2) e (3) que a temperatura ( $x_1$ ) linear e quadrática foram as únicas a serem significativas em ambos os modelos ( $p \leq 0,05$ ).

Todos os termos significativos, exceto para a concentração de celulase ( $x_3$ ) (desconsiderando as interações) tiveram coeficientes negativos, indicando que quando aumenta-se a concentração de pectinase e a temperatura, ocorre uma queda na produção de células de *S. boulardii*. O sinal e o valor do efeito quantitativo representa a tendência e magnitude da influência da resposta, respectivamente (VERMA et al., 2009; ZHANG et al. 2013).

**Tabela 2** - Efeitos dos fatores de processo, temperatura ( $X_1$ ), concentração de pectinase ( $X_2$ ) e concentração de celulase ( $X_3$ ) na viabilidade celular durante a sacarificação e fermentação simultânea de maçã orgânica ( $Y_{org}$ ) ou convencional ( $Y_{conv}$ ) obtida por planejamento fatorial  $2^3$  com face centrada e 2 repetições no ponto central.

Ensaio	Parâmetros de processo			Parâmetros respostas	
	Níveis, variáveis codificadas e reais			$Y_{org}$	$Y_{conv}$
	$x_1 / X_1$	$x_2 / X_2$	$x_3 / X_3$		
1	-1 (25)	-1 (5)	-1 (4)	8,237 ± 0,006	8,176 ± 0,001
2	-1 (25)	-1 (5)	1 (8)	8,290 ± 0,001	8,279 ± 0,011
3	-1 (25)	1 (25)	-1 (4)	8,217 ± 0,013	8,204 ± 0,013
4	-1 (25)	1 (25)	1 (8)	8,284 ± 0,017	8,190 ± 0,001
5	1 (35)	-1 (5)	-1 (4)	8,224 ± 0,020	8,051 ± 0,010
6	1 (35)	-1 (5)	1 (8)	8,255 ± 0,001	8,161 ± 0,001
7	1 (35)	1 (25)	-1 (4)	7,989 ± 0,011	8,097 ± 0,001
8	1 (35)	1 (25)	1 (8)	8,190 ± 0,001	8,011 ± 0,053
9	-1 (25)	0 (15)	0 (6)	8,306 ± 0,005	8,312 ± 0,011
10	1(35)	0 (15)	0 (6)	8,114 ± 0,017	8,138 ± 0,024
11	0 (30)	-1 (5)	0 (6)	8,267 ± 0,001	8,284 ± 0,017
12	0 (30)	1 (25)	0 (6)	8,243 ± 0,001	8,267 ± 0,001
13	0 (30)	0 (15)	-1 (4)	8,224 ± 0,006	8,230 ± 0,001
14	0 (30)	0 (15)	1 (8)	8,347 ± 0,005	8,249 ± 0,006
15	0 (30)	0 (15)	0 (6)	8,322 ± 0,001	8,301 ± 0,021
16	0 (30)	0 (15)	0 (6)	8,322 ± 0,021	8,301 ± 0,001
17	0 (30)	0 (15)	0 (6)	8,301 ± 0,001	8,236 ± 0,006
18	0 (30)	0 (15)	0 (6)	8,337 ± 0,015	8,267 ± 0,001

$x_1/X_1$ : Temperatura, codificada/ real ( $^{\circ}$  C);  $x_2/X_2$ : concentração de pectinase, codificada/ real ( $\mu$ L. 100  $g^{-1}$ substrato);  $x_3/X_3$ : concentração de celulase, codificada/ real ( $\mu$ L. 100  $g^{-1}$ substrato);  $Y_{org}$  e  $Y_{conv}$ : viabilidade celular em log UFC.mL $^{-1}$  em fermentado de polpa de maçã orgânica e convencional, respectivamente. A aleatorização dos dados codificados foram gerados pelo software *Statistica*.

Para verificar a adequação e a aptidão das equações de regressão desenvolvidas, foi realizada a análise variância (ANOVA), em que valores de p inferiores a 0,05 indicam que os termos correspondentes foram significativos em um

nível de confiança de 95%. Os resultados estão nas Tabelas 3 e 4 (substrato maçã orgânica e convencional, respectivamente).

Na análise de variância tanto para SFS no substrato de maçã orgânica, quanto para o convencional (Tabela 3 e 4), constatou-se que nos modelos desenvolvidos houveram respostas significativas em nível de probabilidade de 5%. Isso ocorreu principalmente para a variável temperatura, a qual foi significativa tanto em modelo linear quanto quadrático, em ambos os substratos.

**Tabela 3** - Anova para modelo quadrático relacionado à SFS em substrato de maçã orgânica.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-valor	p-valor*
x <sub>1</sub> (L)	0,0316	1	0,0316	141,2184	0,0013
x <sub>1</sub> (Q)	0,0140	1	0,0140	62,5173	0,0042
x <sub>2</sub> (L)	0,0122	1	0,0122	54,3416	0,0052
x <sub>2</sub> (Q)	0,0019	1	0,0019	8,8068	0,0592
x <sub>3</sub> (L)	0,0227	1	0,0227	101,1299	0,0021
x <sub>3</sub> (Q)	0,0000	1	0,0000	0,1547	0,7203
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> (L)	0,0094	1	0,0094	42,1896	0,0074
x <sub>1</sub> x <sub>3</sub> (L)	0,0016	1	0,0016	7,0450	0,0767
x <sub>2</sub> x <sub>3</sub> (L)	0,0042	1	0,0042	18,8347	0,0226
Falta de ajuste	0,0128	5	0,0025	11,3933	0,0363
Erro Puro	0,0007	3	0,0002		
Total SS	0,1292	17			

x<sub>1</sub>: Temperatura codificada; x<sub>2</sub>: concentração de pectinase codificada; x<sub>3</sub>: concentração de celulase codificada. (Q) quadrático; (L) Linear. R<sup>2</sup> = 0,8960; R<sup>2</sup> Ajuste = 0,7789,

\*p ≤ 0,05 os termos são significativos.

**Tabela 4** - Anova para modelo quadrático relacionado à SFS em substrato de maçã convencional.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade(df)	Quadrado médio	F-valor	p-valor*
x <sub>1</sub> (L)	0,0493	1	0,0494	51,6463	0,0055
x <sub>1</sub> (Q)	0,0123	1	0,0124	12,8296	0,0372
x <sub>2</sub> (L)	0,0033	1	0,0033	3,4861	0,1587
x <sub>2</sub> (Q)	0,0007	1	0,0007	0,7717	0,4444
x <sub>3</sub> (L)	0,0017	1	0,0017	1,8134	0,2708
x <sub>3</sub> (Q)	0,0075	1	0,0075	7,8069	0,0682
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> (L)	0,0002	1	0,0002	0,2589	0,6459
x <sub>1</sub> x <sub>3</sub> (L)	0,0005	1	0,0005	0,5499	0,5121
x <sub>2</sub> x <sub>3</sub> (L)	0,0122	1	0,0122	12,8003	0,0373
Falta de ajuste	0,0024	5	0,0005	0,5020	0,7662
Erro Puro	0,0029	3	0,0009		
Total SS	0,1332	17			

x<sub>1</sub>: Temperatura codificada; x<sub>2</sub>: concentração de pectinase codificada; x<sub>3</sub>: concentração de celulase codificada. (Q) quadrático; (L) Linear (Q) quadrático; (L) Linear. R<sup>2</sup> = 0,9604; R<sup>2</sup> Ajuste = 0,9159.

\* p ≤ 0,05 os termos são significativos.

Mesmo havendo variáveis não significativas, o valor de R<sup>2</sup> da regressão para os modelos mostrado, foi de 0,8960 para maçã orgânica e 0,9604 para convencional, indicando que 89 e 96% de Y<sub>org</sub> e Y<sub>conv</sub>, respectivamente, puderam ser explicados pelos modelos estabelecidos. A falta de ajuste (Lack of Fit) foi significativa (p = 0,0363) apenas para maçã orgânica, revelando que o modelo não se encaixou com precisão aos dados, entretanto, Waszczyński, Rao e Silva (1981) sugerem que o teste da falta de ajuste pode ser considerado irrelevante quando o quadrado médio do erro experimental for baixo, o que ocorreu no presente trabalho, confirmando a validade do modelo de análise preditiva.

Considerando que os modelos foram válidos, as superfícies de respostas foram geradas com o objetivo de otimizar o processo. Para cada curva de superfície de resposta 3D foi construída uma curva de contorno correspondente 2D, a fim de expressar um número infinito de pontos entre duas variáveis independentes, em que o nível de cor representou as diferentes respostas para concentração de *S. boulardii*.

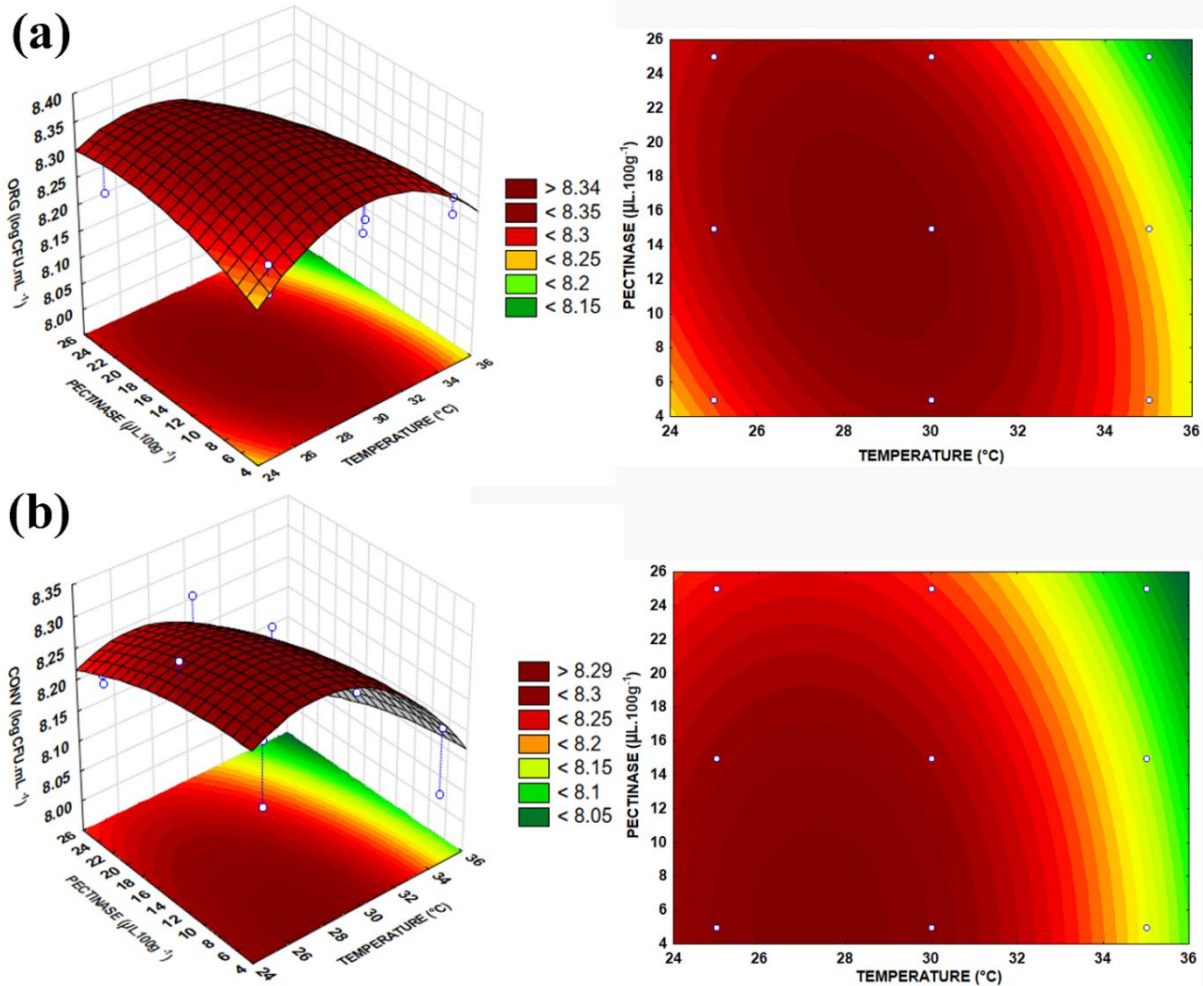
A relação entre as variáveis independentes e dependentes, ilustrada nas curvas em 3D e 2D geradas pelos modelos preditos nas equações de regressão (Equação 2 e 3), foram utilizados para explicar a interação entre dois parâmetros de processo, enquanto um deles era fixado no nível ótimo (WANG et al., 2013).

A Figura 1 mostrou o efeito interativo de temperatura e concentração de enzima pectina liase na concentração celular de *S. boulardii* durante a SFS em maçã orgânica (a) e convencional (b). As regiões com maior concentração de células, foram próximas de 28 °C, para (a) e (b), e de 15  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  para (a) e 5  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  para (b), revelando que o aumento da temperatura e da concentração de pectinase, quando a celulase fixada em seu ponto ótimo, não favorecem o crescimento das leveduras estudadas.

Como o pH de ambas as maçãs encontrou-se em torno de 3,0 (Tabela 1), ou seja, dentro da faixa de atividade da enzima pectina-liase Novozym® 33095, e a temperatura do processo esteve também em sua faixa ótima, constatou-se que provavelmente a melhor proporção enzima/substrato ocorreu nas condições observadas, aumentando a fluidez do mosto. A pectina-liase degradou a pectina presente na lamela média, catalisando a  $\beta$ -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico esterificados, clivando as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona da pectina, de modo endo ou exo, provocando, conseqüentemente uma liquefação da polpa de maçã (DEMIR et al., 2001; YADAV et al., 2009).

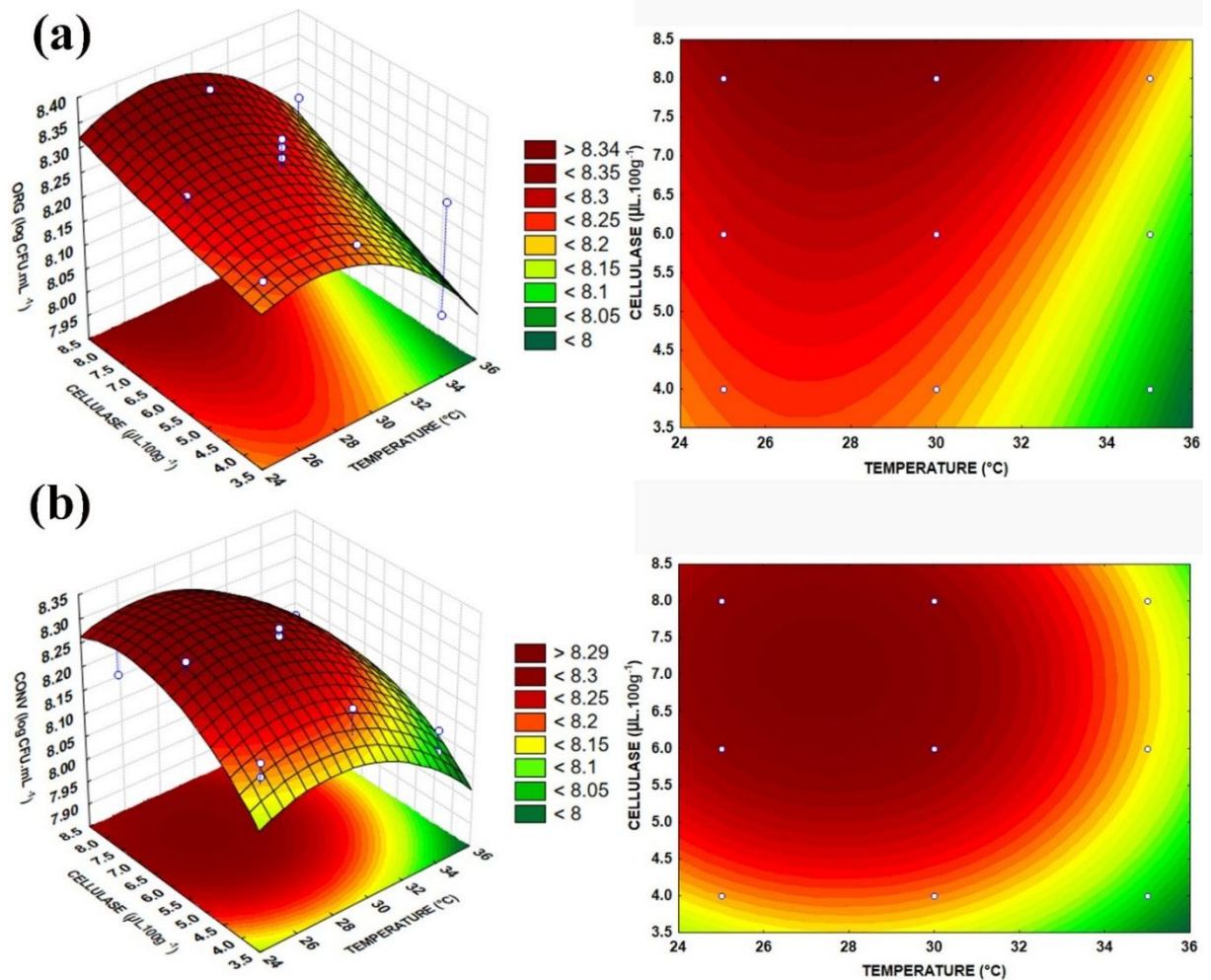
Todavia o efeito da temperatura foi mais expressivo, no modelo, que o efeito da concentração da pectinase, e a Figura 1, apenas nos reforça que esta variável significativa ( $p \leq 0,05$ ), tanto em seu termo linear, quanto quadrático, para os dois substratos, foi otimizada. Para Pardo, Galvagno e Cerrutti (2009) a melhor produção de biomassa de *S. boulardii*, em frascos agitados, ocorreu a 28 °C, com produção de 8,462 log cel.mL<sup>-1</sup>, valores estes muito próximos dos obtidos neste estudo. Já em temperaturas entre 25 e 30 °C a produção celular foi superior a 8,34 log UFC.mL<sup>-1</sup> ( $Y_{\text{org}}$ ) e 8,29 log UFC.mL<sup>-1</sup> ( $Y_{\text{conv}}$ ) (Figura 1).

**Figura 1** - Superfície de resposta 3D e gráfico de contorno 2D. Resposta da produção de células (log UFC.mL<sup>-1</sup>) de *S. boulardii* durante a SFS em maçã orgânica (ORG) (a) e convencional (CONV) (b), de acordo com temperatura (X<sub>1</sub>) e a concentração de pectinase (X<sub>2</sub>), quando fixada a concentração de celulase (X<sub>3</sub>), em seu ponto ótimo (8 e 7 μL.100 g<sup>-1</sup>, para ORG e CONV, respectivamente)



A Figura 2 mostra o efeito da interação entre a temperatura e concentração de enzima Celluclast<sup>®</sup> 1.5 L, na concentração celular de *S. boulardii* durante a SFS em maçã orgânica (a) e convencional (b), quando fixado a concentração de pectinase em seu valor ótimo (Figura 4). Nesta figura, tanto para (a) quanto para (b), as regiões onde houve maior crescimento da levedura, foram as encontradas entre 6 e 8 μL.100g<sup>-1</sup> para enzima celulase, e próximo de 28 °C para a temperatura.

**Figura 2** - Superfície de resposta 3D e gráfico de contorno 2D. Resposta da produção de células (log UFC.mL<sup>-1</sup>) de *S. boulardii* durante a SFS em maçã orgânica (ORG) (a) e convencional (CONV) (b), de acordo com a temperatura (X<sub>1</sub>) e a concentração de celulase (X<sub>3</sub>), quando fixada a concentração de pectinase (X<sub>2</sub>) em seu ponto ótimo (20 e µL.100 g<sup>-1</sup>, para ORG e CONV, respectivamente).

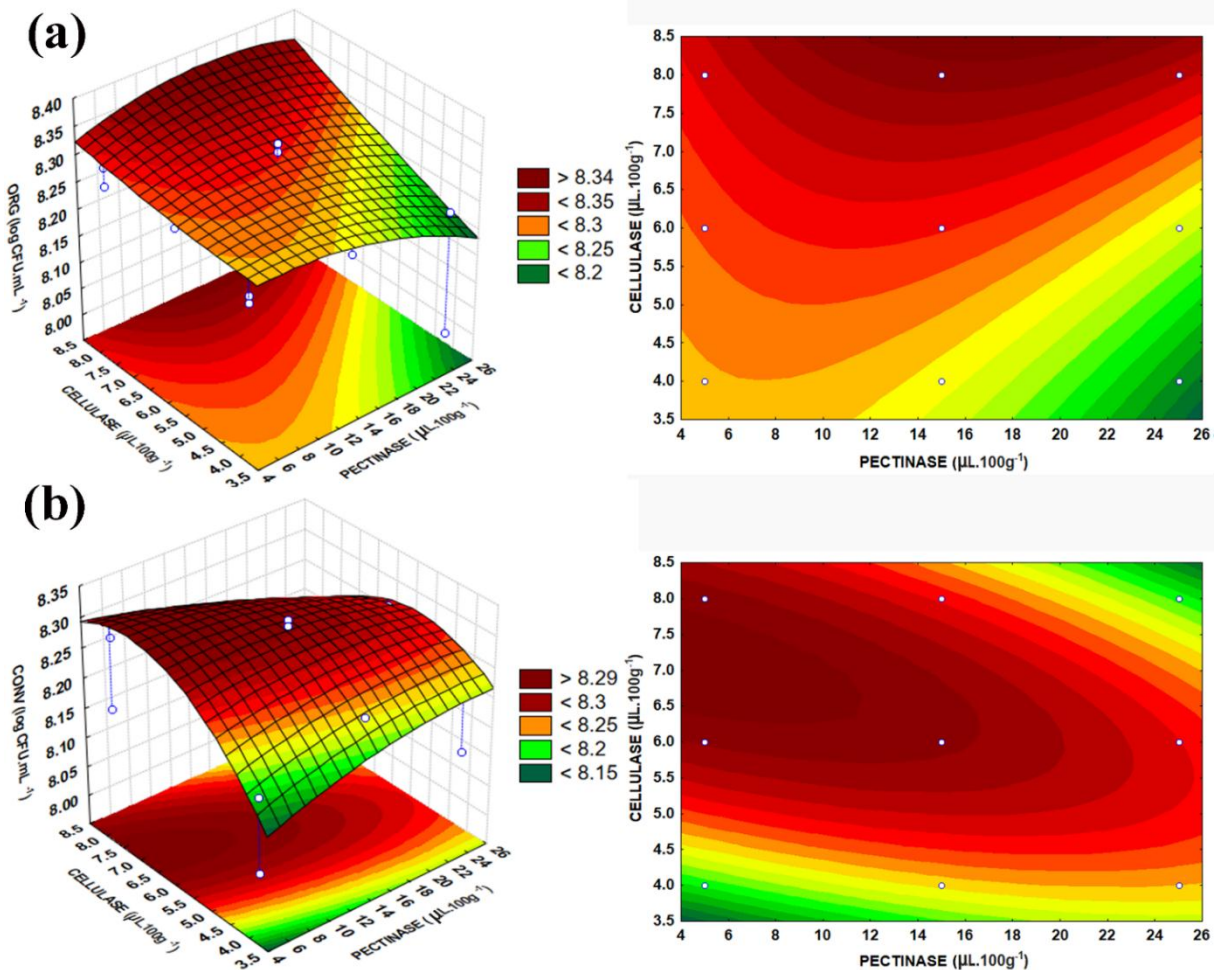


A enzima Celluclast<sup>®</sup> 1.5 L, mesmo em condições de pH (4,8) e temperatura (50 °C) desfavoráveis, mostrou-se eficiente no processo da quebra de unidades de endoglucanases, sendo significativa no processo de SFS (Tabelas 3 e 4). As endoglucanases promovem a hidrólise das cadeias internas de celulose, produzindo oligossacarídeos, celobiose e glicose (KARLSSON et al., 2002). O aumento da concentração de celulase, até ao nível máximo, provavelmente provocou liberação de mais unidades de glicose, as quais tornaram-se disponíveis para a levedura durante o processo fermentativo. Mesmo não se tratando de maçã, Yuliarti et al. (2011), verificaram, em Kiwi, uma variação significativa ( $p \leq 0,05$ ) no teor de açúcares, ao aplicarem três diferentes concentrações de Celluclast<sup>®</sup> 1.5L. Os valores

de glicose, passaram de 0,042 para 0,36% ( $\text{m.m}^{-1}$  base seca), mesmo quando adicionada a menor concentração estudada ( $0,1 \text{ mL.kg}^{-1}$ ).

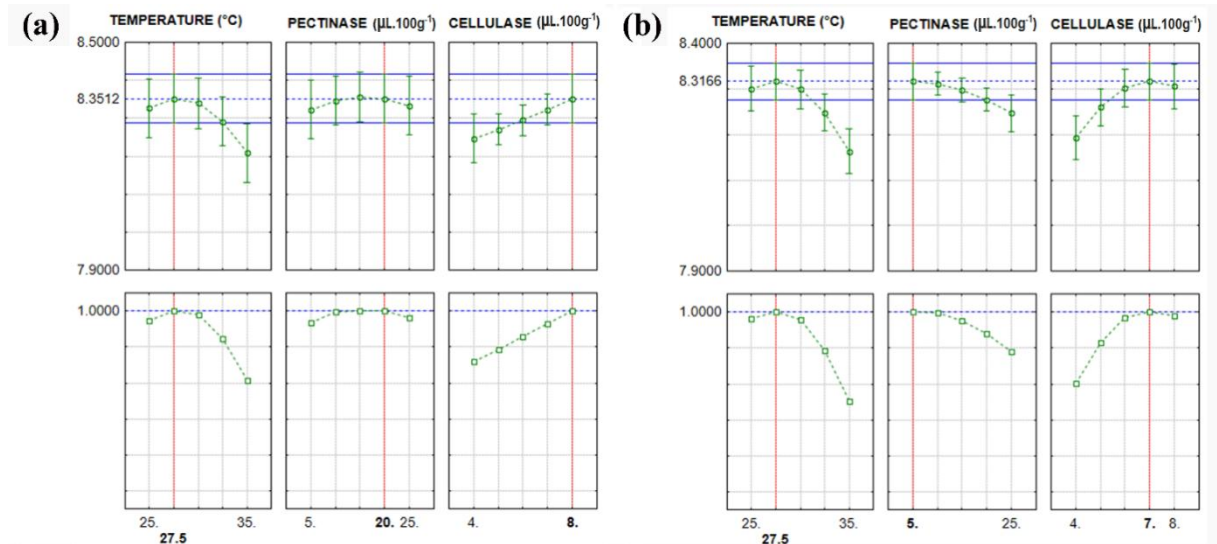
Na Figura 3 foram apontados os efeitos da interação entre celulase Celluclast® 1.5L e pectinase Novozym® 33095, quando fixou-se a temperatura no ponto ótimo. Ambas as curvas (a) e (b) estão próximas da região do ótimo, principalmente para polpa de maçã convencional. O gráfico de contorno em 2D, assim como o de superfície de resposta em 3D, reiterou a tendência de que a maior produção celular da levedura quando a concentração de celulase esteve próxima ou superior a  $8 \mu\text{L.100 g}^{-1}$  e de pectinase entre 5 e  $15 \mu\text{L.100 g}^{-1}$ , em polpa de maçã convencional. Já para maçã orgânica a concentração de celulase esteve entre 6 e  $8 \mu\text{L.100 g}^{-1}$  e pectinase inferior a  $10 \mu\text{L.100 g}^{-1}$ . Wilkins, Widmer e Grohmann (2007), também utilizaram pectinase e celulase combinadas a uma fermentação de cascas de limão por *Saccharomyces cerevisiae* para produzir etanol com maior rendimento. As enzimas hidrolisaram polissacarídeos em açúcares simples, que foram imediatamente consumidos pela levedura para produzir etanol. Assim, a SFS aumentou as taxas de hidrólise do substrato, reduzindo a inibição das enzimas pelo produto.

**Figura 3** - Superfície de resposta 3D e gráfico de contorno 2D. Resposta da produção de células (log UFC.mL<sup>-1</sup>) de *S. boulardii* durante a SFS em maçã orgânica (ORG) (a) e convencional (CONV) (b) de acordo com a concentração pectinase (X<sub>2</sub>) e celulase (X<sub>3</sub>), quando fixada a temperatura (X<sub>1</sub>) em seu ponto ótimo (27,5 °C para ambos substratos).



Cada temperatura e concentração de enzimas, podem limitar ou não o crescimento e manutenção metabólica de levedura. Foi importante verificar quais parâmetros propiciaram máxima concentração de *S. boulardii*. Nota-se na Figura 4 temperatura de 27,5 °C, concentração de pectinase de 20 e 5 μL.100 g<sup>-1</sup>, concentração de celulase de 8 e 7 μL.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente, para o substrato de polpa de maçã orgânica e convencional.

**Figura 4** - Valores ótimos previstos para as variáveis independentes na resposta da produção de células ( $\log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de *S. boulardii* durante a SFS em maçã orgânica (a) e convencional (b).



A concentração de enzima pectinase ( $X_2$ ) foi a variável que no ponto ótimo mais apresentou distinção para fermentado em polpa de maçã orgânica ( $20 \mu\text{L} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ) e convencional ( $5 \mu\text{L} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ). A concentração de enzima celulase ( $X_3$ ) no ponto ótimo, também teve concentrações diferentes nas polpas de maçãs. Isso provavelmente, ocorreu devido a polpa de maçã orgânica ter apresentado maior teor de sólidos solúveis e menor umidade (Tabela 1), e possivelmente maior teor de pectina, necessitando maiores concentrações da enzima pectínica para maior hidrólise da pectina, liquefazendo-a, proporcionando um substrato menos viscoso, o que permitiu maior aeração do meio e conseqüentemente produção de massa celular.

### 3.3 Determinação e validação das condições ótimas

Uma condição ideal para o crescimento da levedura foi verificada para obter máxima concentração da *S. boulardii*, segundo a ordem dos modelos polinomiais obtidos neste estudo. Adequações dos valores ótimos preditos pelas equações do modelo (2 e 3), foram realizadas, buscando manter valores do ótimo para ambos os substratos de maçã. Os experimentos foram realizados nas condições ideais, a fim de comparar os resultados experimentais com os valores previstos das

respostas usando as equações dos modelos empíricos desenvolvidos (Equação 2 e 3). As respostas previstas e as experimentais encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5** - Valores preditos e experimentais das respostas sob condições ótimas para fermentação de polpa de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV).

Variáveis	Valores ótimos dos parâmetros do processo		Valores otimizados (preditos)	
	ORG	CONV	Y <sub>ORG</sub> (log UFC.mL <sup>-1</sup> )	Y <sub>CONV</sub> (log UFC.mL <sup>-1</sup> )
X <sub>1</sub> (°C)	27,5	27,5	8,4155 (+ 95% conf)	8,35705 (+ 95% conf)
X <sub>2</sub> (µL.100 g <sup>-1</sup> )	20	5	8,3516 (predito)	8,3167 (predito)
X <sub>3</sub> (µL.100 g <sup>-1</sup> )	8	7	8,2869 (- 95% conf)	8,2764 (- 95%conf)

Variáveis	Valores ótimos dos parâmetros do processo		Valores experimentais*	
	ORG	CONV	Y <sub>ORG</sub> (log UFC.mL <sup>-1</sup> )	Y <sub>CONV</sub> (log UFC.mL <sup>-1</sup> )
X <sub>1</sub> (°C)	27,5	27,5	8,349 ± 0,015 <sup>a</sup>	8,319 ± 0,016 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub> (µL.100 g <sup>-1</sup> )	20	5		
X <sub>3</sub> (µL.100 g <sup>-1</sup> )	8	7		

X<sub>1</sub>: temperatura real; X<sub>2</sub>: concentração de pectinas real; X<sub>3</sub>: concentração de celulase real. \*médias na mesma linha seguidas por letras iguais não diferem significativamente (p ≤ 0,05).

Os resultados obtidos através de experimentos de validação, indicaram que o modelo quadrático e os valores ideais são válidos dentro do intervalo de confiança esperado (95%).

A fim de comparar estatisticamente se houve diferença significativa (p ≤ 0,05) entre a concentração de células da levedura obtidas no processo de SFS nos diferentes substratos de maçã estudados, teste de médias Tukey, foi realizado a partir dos dados experimentais (Tabela 5).

A Tabela 5 relevou que apesar das maçãs, orgânica e convencional, terem características físico-químicas diferentes, estas não interferem na multiplicação celular da levedura, uma vez que a viabilidade após 24 horas à 120 rpm, para ambos substratos, foi estatisticamente igual. Ambos os meios de cultivo foram considerados substratos fermentativos adequados, já que produtos com números superiores a 8 log UFC. mL<sup>-1</sup> podem apresentar ação probiótica (MITROPOULOU et al., 2013).

## 4 Conclusão

Os resultados mostraram que a temperatura teve efeito significativo sobre o crescimento da levedura para ambos os substratos de maçã estudados.

O planejamento central composto com face centrada foi eficaz para otimizar e estudar o efeito individual e interativo de variáveis de processo, temperatura, concentração de pectinase e celulase, sob a resposta de concentração de células de *S. boulardii*. O modelo desenvolvido teve a capacidade de prever a concentração celular, verificando ser comparáveis com o dos valores experimentais observados. Não houve diferença significativa entre os substratos de maçã para a produção de células de *S. boulardii*, indicando que mesmo havendo diferença significativa entre compostos presentes nos frutos, principalmente teor de açúcares, proteínas e minerais, estes não interferiram no desenvolvimento celular.

Estudos futuros poderão ser realizados a fim de se desenvolver um produto probiótico fermentado por levedura *S. boulardii*, já que o substrato de maçã mostrou-se eficiente para o crescimento da levedura.

## 5 Referências

ALI, M. A. E.; ABDEL-FATAH, O. M.; JANSON, J.; ELSHAFEI, A. M. Antimicrobial potential of *Saccharomyces boulardii* extracts and fractions. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n.8, p.4537–4543, 2012.

AMARANTE, C. V. T.; DA ROSA, E. F. F.; ALBUQUERQUE, J. A.; KLAUBERG FILHO, O.; STEFFENS, C. A. Atributos do solo e qualidade de frutos nos sistemas convencionais e orgânicos de produção de maçãs do Sul do Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n.1, p.99–109, 2015.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16<sup>th</sup> ed. v. 2. Washington: AOAC, 1994.

BOURN, D.; PRESCOTT, J. A. Comparison of the nutritional value, sensor qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 1–34, 2002.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.26, p.767–778, 2007.

DANGOUR, A. D.; DODHIA, S. K.; HAYTER, A.; ALLEN, E.; LOCK, K.; UAUY, R. Nutritional quality of organic foods: A systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, p. 680–685, 2009.

DEMIR, N.; ACAR, J.; SARIOĞLU, K.; MUTLU, M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering**, v.46, p. 275–280, 2001.

DRILLEAU, J. F. Biochemical characteristics of apple juices and fermented products from musts obtained enzymatically. **Fruit Processing**, v. 4, p.108–113, 1994.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**. v. 28, p. 350-356. 1956.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

JANG J.; CHO, Y.; JEONG, G.; KIM, S. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 11–18, 2012.

KARLSSON, J.; MOMCILOVIC, D.; WITGREN, B.; SCHULEIN, M.; TJERNELD, F.; BRINKMALM, G. Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei*. **Biopolymers**, v. 63, n.1, p. 32–40, 2002.

KNIGHT, K. W.; NEWMAN, S. Organic agriculture as environmental reform: a cross-national investigation. **Society & Natural Resources**, v. 26 n.4, p. 369–385, 2013.

LAIRON, D. Nutritional quality and safety of organic food. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, p. 33–41, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. COX, M. M. Lehninger – Princípios de Bioquímica. Ed. Sarvier, 4. ed. São Paulo, 2006. p. 409–439.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A.; AQUAROLE, E.; BONZANI, W.; SCHIMIDELL, W. 2001. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 3, p. 1–43.

MÄDER, P.; HAHN, D.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; ALFOLDI, T.; BERGMANN, H. Wheat quality in organic and conventional farming: Results of a 21 year field experiment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1826–1835, 2007.

MAGKOS, F., ARVANITI, F., ZAMPELAS, A. Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 54, p. 357–371, 2003.

MARTIN, C.; MARCET, M.; THOMSEN, A.B. Comparison between wet oxidation and steam explosion as pretreatment methods for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 3, p. 670-683, 2008.

MAZZONCINI, M.; ANTICHI, D.; SILVESTRI, N.; CIANTELLI, G.; SGHERRI, C. Organically vs conventionally grown winter wheat: Effects on grain yield, technological quality, and on phenolic composition and antioxidant properties of bran and refined flour. **Food Chemistry**, v. 175, p. 445–451, 2015.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n.18, p. 2202–2222, 2010.

MITROPOULOU, G.; NEDOVIC, V.; GOYAL, A.; KOURKOUTAS, Y. Review Article: Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. **Journal of Nutrition and Metabolism**, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/716861>.

NAGASHIMA, A. Y.; PANSIERA, P. E.; BARACAT, M. M.; GÓMEZ, R. J. H. C. Development of effervescent products, in powder and tablet form, supplemented with probiotics *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii*. **Food Science and Technology**, Campinas, v.33, n.4, p.605–611, oct/dec. 2013.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; PAGANINI, C.; WOSIACKI, G. Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 187–194, abr./jun., 2005.

NOGUEIRA, J. N.; SILVA, E. Efeito comparativo do calor, SO<sub>2</sub> e ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase e peroxidase de algumas frutas e hortaliças. **Analís da ESALQ**, Piracicaba, v.46, n.2, p. 453–471, 1989.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N, C.; WOSIACKI, G. Aproveitamento de bagaço de maçã para produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.9, p. 1231–1238, 2005.

PARDO, S.; GALVAGNO, M. A.; CERRUTTI, P. Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del preacondicionamiento fisiológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 2, p.155–160, 2009.

PARMAR, I.; RUPASINGHE, H. P. V. Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 613–620, 2013.

PECK, G. M.; ANDREWS, P. K.; REGANOLD, J. P.; REGANOLD, J. K. Apple orchard productivity and fruit quality under organic, conventional, and integrated management. **Horticultural Science**, v. 41, n. 1, p. 99–107, 2006.

- PONTIER-BRES, R.; PRONDON, F.; MUNRO, P.; RAMPAL, P.; LEMICHEZ, E.; PEYRON, J. F.; CZERUCKA, D. Modification of *Salmonella* Typhimurium Motility by the Probiotic Yeast Strain *Saccharomyces boulardii*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, mar., 2012.
- POTHOULAKIS, C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 34, n.1, p.62–70, 2010.
- REZAZADEH, M.; YAMINI, Y.; SEIDI, S.; ESRAFILI, A. One-way and two-way pulsed electromembrane extraction for trace analysis of amino acids in foods and biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 773, p.52–59, 2013.
- ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B.; BLONDIN, B.; SALMON, J. Oxygen consumption by anaerobic *Sacharomyces cerevisiae* in enological conditions: effect on fermentation kinetics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.1, p. 113–121, 2003.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 19–23, 1952.
- VERMA, S.; LAN, Y.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377 p.185–198, 2009.
- WANG, L.; LUO Z., SHAHBAZI, A. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) bagasse using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 42 p.280–291, 2013.
- WASZCZYNSKYJ, N.; RAO, C. S.; SILVA, R. S. F. Extraction of proteins from wheat bran: application of carbohydrases. **Cereal Chemistry**, v. 58 n. 4, p. 264–266, 1981.
- WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1614–1619, 2007.
- WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K.; CAMERON, R. G. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. **Bioresource Technology**, v. 98, p.1596–1601, 2007.
- YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1–10, 2009.
- YULIARTI, O; MATIA-MERINO, L.; GOH, K. K. T.; MAWSON, J. A.; BRENNAN, C. S. Effect of Celluclast 1.5L on the physicochemical characterization of Gold Kiwifruit Pectin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 407-641, 2011.
- ZHANG, W.; LIN Y.; ZHANG, Q.; WANG, X.; WU, D.; KONG, H. Optimisation of simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw for ethanol production. **Fuel**, v. 112, p. 331–337, 2013.

## CAPÍTULO 3

---

### **Estudo cinético da produção de biomassa de *Saccharomyces boulardii* durante sacarificação e fermentação simultânea (SFS) em maçã orgânica e convencional**

---

#### **Resumo**

A fermentação com incorporação de ar por agitação, favorece maior síntese de materiais de reserva constituintes da membrana celular das leveduras, de modo a aumentar a produção de biomassa, a medida que ácidos orgânicos são formados por distintas vias metabólicas. O trabalho teve por finalidade realizar hidrólise de polpa de maçã, orgânica e convencional, simultaneamente à fermentação pela *S. boulardii*, objetivando principalmente a produção de biomassa da levedura. Modelos cinéticos foram desenvolvidos para explicar a variação dos principais produtos gerados pela sacarificação e fermentação simultânea durante 48 horas. Utilizou-se biorreator de bancada, tipo tanque agitado, a 500 rpm. Alíquotas foram retiradas durante cada batelada, para análise dos componentes em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os resultados demonstraram que a levedura entrou em estado estacionário a partir de 16 horas de processo, com produção de biomassa, de  $4,885 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1}$  em polpa de maçã orgânica e  $4,798 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}$  em polpa de maçã convencional, resultados que apresentaram diferença significativa. A liberação de açúcares pela sacarificação de celulose e pectina provavelmente interferiu no processo, proporcionando um desequilíbrio no teor de monossacarídeos. Dentre os ácidos orgânicos determinados, o málico foi o de maior concentração no início da fermentação,  $1,890 \pm 0,014 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,370 \pm 0,014 \text{ g.L}^{-1}$ , em polpa de maçã orgânica e convencional, respectivamente. A medida que a SFS progredia, a síntese de ácido acético, succínico e cítrico ocorria, reduzindo conseqüentemente o pH do mosto. Esta redução foi visivelmente maior para polpa de maçã convencional, o que pode ter contribuído para a menor produção de biomassa nesse substrato. Contudo em ambos os substratos a concentração celular foi considerada com níveis compatíveis para que a *S. boulardii* pudesse ser considerada com ação probiótica.

**Palavras-chaves:** SFS, CLAE, ácidos orgânicos, levedura probiótica.

## 1 Introdução

O processo de sacarificação e fermentação simultânea (SFS) busca combinar, em mesmo reator, a hidrólise enzimática com a concomitante fermentação. Este processo difere dos sistemas em que a hidrólise enzimática e a fermentação ocorrem separadamente, pois os produtos gerados durante a sacarificação, no sistema simultâneo, não ocasionam uma inibição inicial das leveduras durante o processo fermentativo, ocorrendo rápida assimilação dos açúcares pela levedura durante processo (DESHPANDE et al., 1983; HARI KRISHNA et al., 1999).

A utilização de frutas como matéria-prima para produção de fermentados pode ser a solução para minimizar perdas pós-colheita de frutos perecíveis nas lavouras (SANDHU; JOSHI, 1995). A maçã, dependendo do cultivo, solo, clima e variedade, pode apresentar características físico-químicas imprescindíveis tornar-se matéria-prima eficiente no processo fermentativo, com significativos teores de açúcares, compostos nitrogenados, minerais e vitaminas (BALÁZS et al., 2012).

A fermentação é um processo metabólico anaeróbico induzido por microrganismos que convertem ou decompõem substratos orgânicos, em especial os açúcares, com o objetivo de obter energia para sua própria sobrevivência. Os açúcares catabolizados pelas leveduras, são convertidos em etanol e gás carbônico, ao passo que ácidos orgânicos e alguns álcoois superiores são formados em pequenas quantidades, por distintas vias metabólicas (D'AMORE; RUSSELL; STEWART, 1989).

Quando o oxigênio está disponível, o metabolismo da levedura é direcionado para a respiração, rendendo teoricamente 38 moles de ATP para cada mol de glicose, permitindo maior velocidade de crescimento, maior produção de biomassa, e síntese de materiais de reserva, como esteróis e ácidos graxos constituintes da membrana celular das leveduras de modo a aumentar a taxa de fermentação (HENICK-KLING, 1988, ROSENFELD et al., 2003).

A *Saccharomyces boulardii*, foi isolada pela primeira vez a partir de frutos de lichia na Indochina durante a década de 1950, desde então seu potencial terapêutico passou a ser investigado e conhecido por atuar na profilaxia e tratamento de infecções intestinais e doença inflamatória do intestino, principalmente em diarreias provocadas por bactérias (MCFARLAND, 2010).

Experimentos revelaram que a *S. boulardii* ajuda nos tratamentos de doenças crônicas, como a doença de Crohn (VILELA et al., 2008), síndrome do intestino irritável (BAFFUTO et al., 2013), diarreia relacionada com a infecção pelo vírus HIV (VILLAR-GARCÍA et al., 2015), giardíase (BESIRBELLIOGLU et al., 2006), e ainda, na redução dos efeitos colaterais no tratamento contra *Helicobacter pylori* (SZAJEWSKA; HORVATH; PIWOWARCZYK, 2010). Esta levedura é eficaz como probiótica, já que sobrevive à passagem pelo trato gastrintestinal de humanos, sobrevive à temperatura corporal (37 °C), resiste aos ácidos do estômago e sais biliares e age competitivamente com outros microrganismos no trato intestinal (FAO/WHO, 2001; FIETTO et al., 2004).

De acordo com a definição proposta pela FAO/WHO, probióticos são: "Microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2001). Os efeitos benéficos dos probióticos são obtidos quando um alimento contém um número adequado destes microrganismos, entre 6 e 8 log UFC.g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> (THOMAS et al., 2014).

Neste contexto, o trabalho teve por finalidade realizar hidrólise de polpa de maçã, orgânica e convencional, simultaneamente à fermentação pela *S. boulardii*, objetivando principalmente a produção de biomassa da levedura. Modelos cinéticos foram desenvolvidos para explicar a variação dos principais produtos gerados pela SFS, durante período tempo estabelecido.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Matéria-prima, processamento e obtenção da polpa**

Maçãs, variedade 'Fuji', cultivadas em sistema de plantio orgânico (ORG) e convencional (CONV), foram adquiridas de dois distintos produtores da região de Urupema, Santa Catarina (Safrá 2014/2015). Os frutos foram lavados, sanitizados e triturados em processador (Walita Master RI7633) com adição de 0,5% (m.v<sup>-1</sup>) de ácido ascórbico (NOGUEIRA e SILVA, 1989). A polpa foi acondicionada em sacos de polietileno e armazenada a – 20 °C, até fermentação submersa com agitação. Antes da fermentação, as polpas foram termicamente tratadas a 80 °C por 20 minutos.

## 2.2 Cultura de levedura e manutenção da cepa

A levedura empregada na fermentação de polpa de maçã orgânica e convencional, foi utilizada a partir do medicamento Floratil® (Merck), que continha aproximadamente  $0,5 \cdot 10^9$  células de *S. boulardii*-17 em 100 mg. A levedura liofilizada foi reativada em 50 mL de YPD líquido (extrato de levedura, 1% (m.v<sup>-1</sup>); peptona bacteriológica, 2% (m.v<sup>-1</sup>); dextrose, 2% (m.v<sup>-1</sup>)), incubada a 30 °C e 120 rpm por 24 horas, em incubadora de bancada refrigerada com agitação orbital (CT-712, Cientec, Brasil). Culturas trabalho, visando a manutenção da cepa, foram mantidas, a 4 °C, em tubos inclinados com ágar YPD (extrato de levedura, 1% (m.v<sup>-1</sup>); peptona bacteriológica, 2% (m.v<sup>-1</sup>); dextrose, 2% (m.v<sup>-1</sup>), Ágar, 1,5% (m.v<sup>-1</sup>)), e repicadas a cada duas semanas.

## 2.3 Fermentação submersa com agitação

Para efetividade e atividade da levedura, pré-inóculo foi preparado pela transferência de três alçadas de células trabalho para cada 50 mL de YPD líquido. A incubação sob agitação na incubadora orbital, *Shaker*, ocorreu a 30 °C e 120 rpm por 24 horas.

A polpa de maçã por se apresentar bastante espessa, necessitou do uso de enzimas para sacarificação, com conseqüente liquefação. A sacarificação e a fermentação da polpa ocorreram simultaneamente. A concentração de pectinase (Novozym® 33095) foi de  $10 \mu\text{L} \cdot 100 \text{g}^{-1}$  e celulase (Celluclast® 1.5 L) de  $8 \mu\text{L} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , baseando-se nas concentrações otimizadas no Capítulo 2. Entretanto, diferente das condições otimizadas no Capítulo 2, mesmas concentração de pectinase e celulase fossem usadas em ambos substratos, ORG e CONV, tomando o devido cuidado para que ocorresse a manutenção das condições de maior produção celular, dentro do intervalo de confiança de 95 %. Ambas enzimas foram cedidas pela NOVOZYMES®, Dinamarca.

Para melhor adaptação da *S. boulardii* ao meio de fermentação, inóculo foi preparado usando-se biomassa celular (10% m.v<sup>-1</sup>) do pré-inóculo, centrifugada a 3000 rpm por 15 min (Eppendorf, 5804 R, Alemanha). A biomassa obtida foi lavada com água salina (0,9% m.v<sup>-1</sup>), anterior à inoculação simultânea com as enzimas pectinase e celulase, em frascos contendo 100 g de polpa de maçã

orgânica ou convencional, separadamente, foi submetida à temperatura de 27,5 °C (Capítulo 2) e agitação de 120 rpm por 24 horas.

A fermentação e sacarificação da polpa de maçã orgânica, previamente pasteurizada, foi realizada em batelada em biorreator de bancada, tipo tanque agitado (Tec-Bio-Flex, Tecnal, Brasil), em condições assépticas. Foram utilizados 3 kg de polpa com 10  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  de pectinase e 8  $\mu\text{L}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  de celulase a uma taxa de inóculo de 10 % (m.v<sup>-1</sup>), durante 48 horas a 27,5 °C e 500 rpm. O mesmo ocorreu para a polpa de maçã convencional.

Para a determinação de concentração de células totais, viabilidade celular (contagem em placas), biomassa seca, pH, açúcares e ácidos orgânicos, alíquotas foram retiradas do biorreator nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24, 28, 32, 48 horas.

## **2.4 Análises dos processos fermentativos (polpa de maçã orgânica e convencional) em batelada**

### **2.4.1 Viabilidade celular**

A determinação da concentração de células viáveis foi realizada em placas semando-se diluições seriadas na proporção de 1:10 (v.v<sup>-1</sup>) em água peptona (0,1%), até 10<sup>-8</sup>. 100  $\mu\text{L}$  das diluições 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-8</sup> foram plaqueados em triplicata em ágar YPD e incubados a 30 °C por 24 horas, sendo os resultados expressos em log UFC.mL<sup>-1</sup>.

### **2.4.2 Biomassa seca**

A biomassa produzida durante a fermentação, foi determinada por secagem do material produzido e posterior determinação do peso seco. A biomassa da levedura foi obtida por centrifugação a 3000 rpm por 15 min (Eppendorf, 5804 R, Alemanha), em tubos previamente secos, depois, lavadas e centrifugadas. A operação foi repetida até o necessário para a retirada do substrato. A massa foi seca em estufa (TE394/1 TECNAL<sup>®</sup>, Brasil) a 80 °C até peso constante (aproximadamente após 24 horas). A biomassa seca foi calculada através da Equação 1. Controle sem a presença

de fermento, foi realizado para verificar se após sucessivas lavagens restava ainda substrato no precipitado.

$$\text{Peso seco (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{peso tubo biomassa (g)} - \text{peso tubo vazio (g)}) * 1000}{\text{volume de fermentado utilizado (mL)}} \quad (1)$$

### 2.4.3 pH

O pH do meio de cultivo foi medido por sensor digital acoplado ao biorreator de bancada Tec-Bio-Flex, sendo o eletrodo (InPro3250 Mettler-Toledo, Brasil), previamente calibrado, incorporado ao interior do vaso de fermentação.

### 2.4.4 Determinações analíticas por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### 2.4.4.1 Preparo das amostras

Nos tempos estabelecidos para estudo cinético das fermentações em polpa de maçã orgânica e convencional (*item 2.3*), 1 g de amostra foi homogeneizado com 1 mL de água ultra pura (Mili-Q<sup>(R)</sup>) (1:1 m.v<sup>-1</sup>), a mistura deixado a *overnight* à 4 °C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 6000 rpm durante 20 min a 4 °C, assim como descrito por Ma et al., 2014, com modificações. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana *Millipore* 0,22 µm constituindo-se em amostra para determinações de açúcares e ácidos orgânicos.

As soluções padrões de glicose, frutose e sacarose (pureza > 99%, para CLAE, Sigma-Aldrich) foram preparadas também em água ultrapura em concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup>, assim como as soluções padrões de ácido málico, cítrico, acético, oxálico e succínico (pureza > 98%, para CLAE, Sigma-Aldrich).

#### 2.4.4.2 Determinação de Açúcares

Para a determinação e quantificação dos açúcares glicose, frutose e sacarose, utilizou-se como fase móvel água ultra pura por apresentar melhor resolução cromatográfica e melhor simetria de picos. O sistema instrumental utilizado

consistiu em um cromatógrafo líquido Shimadzu (Shimadzu corp., Kyoto, Japão) composto de bomba de alta pressão (LC-20AT); injetor automático (SIL-20AC HT), com volume de injeção ajustado para 20  $\mu\text{L}$ ; detector por índice de refração (RID-10A); forno de coluna (CTO-20A), mantido em temperatura constante de 85  $^{\circ}\text{C}$ ; módulo de controle (CBM-20A) e coluna de troca iônica Aminex HPX-87P (7,8 x 300 mm na forma iônica  $\text{Pb}^{+2}$ , Biorad, CA, EUA). A aquisição de dados e a integração dos picos cromatográficos foram realizadas com o auxílio do software LC Solutions (Shimadzu corp., Kyoto, Japão) (PAULI; CRISTIANO; NIXDORF, 2011).

#### **2.4.4.3 Determinação de Ácidos orgânicos**

A determinação de ácidos orgânicos, málico, cítrico, succínico e acético, foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, sistema instrumental Shimadzu LC 20 A (Kyoto, japão), constituído por Bomba de alta pressão LC- 20AT, Injetor automático SIL-20AC HT, detector de índice de Refração RID-10A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de controle CBM-20A. Para as análises utilizou-se coluna cromatográfica Shiseido CapCell Pak 5 $\mu$  C18 MG 250 x 4,6mm. A fase móvel consistiu em solução tampão fosfato de sódio 25 mM, com pH ajustado para 2,4 na vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , a temperatura da coluna foi mantida a 30  $^{\circ}\text{C}$  e o volume de injeção em 20  $\mu\text{L}$ . A detecção foi realizada simultaneamente nos detectores de Índice de Refração (RID-10A) e Arranjo de Fotodiodos (SPD-M20A), programado em comprimento de onda fixo de 215 nm e no modo de varredura de 200 a 400 nm. A aquisição e processamento dos dados foram realizados com o auxílio do Software Shimadzu LCsolution (Kyoto, Japão) (REUTER, 2015).

### **2.5 Cálculo dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica**

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação, durante a fase logarítmica, foram calculados: produtividade em biomassa ( $P_x$ ), expressos em  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ; rendimento ( $Y_{x/s}$ ) expresso em % ( $\text{m.m}^{-1}$ ); velocidade específica de produção de biomassa ( $\mu_x$ ), velocidade de consumo de açúcar ( $\mu_s$ ), expressas em  $\text{h}^{-1}$  e rendimento da fermentação (%), conforme as equações a seguir (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

$$P_x \text{ (g. L}^{-1}\text{. h}^{-1}\text{)} = \frac{X_f - X_0}{t} \quad (2)$$

$$Y_{x/s} \text{ (\%)} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} * 100 \quad (3)$$

$$\mu_x \text{ (h}^{-1}\text{)} = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

$$\mu_s \text{ (h}^{-1}\text{)} = \frac{1}{X} * \left( -\frac{dS}{dt} \right) \quad (5)$$

Onde:

$X_0$ : biomassa celular inicial;

$X_f$ : biomassa celular final;

$S_0$ : açúcares totais substrato inicial;

$S_f$ : açúcares totais substrato final;

$x$ : biomassa após 16 horas.

## 2.6 Estatística

Para construção de curva cinética durante fermentação foi utilizada construção gráfica a partir do software Microsoft Excel 2013, sendo todos os ensaios realizados em duplicata.

Propôs-se ainda comparar os resultados obtidos a partir do estudo cinético do fermentado de polpa de maçã ORG e CONV. Para tal, teste de Tukey em nível de 5 % de significância, foi realizado em software *Statistica* versão 8.0.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Estudo cinético de produção de biomassa de *S. boulardii*

Após a determinação do tempo de cultivo do inóculo (24 horas), foi realizada a cinética da fermentação em batelada para os dois substratos, ORG e CONV, separadamente, em biorreator tipo tanque agitado. A condição do inóculo no momento da transferência da cultura, tem grande efeito sobre o desempenho da fermentação. O melhor momento para a transferência, deve ser determinado

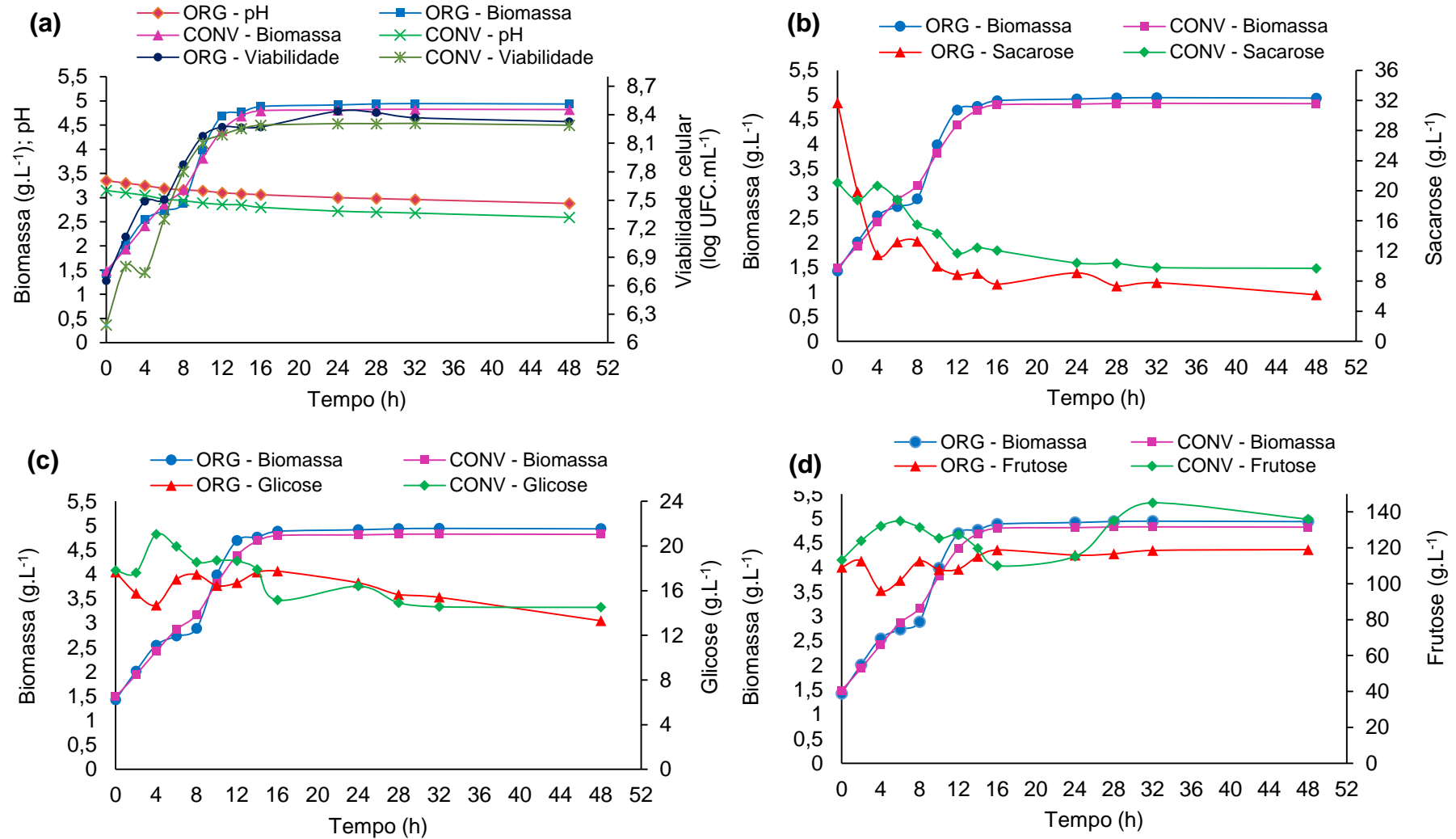
experimentalmente, para então, os procedimentos serem estabelecidos de modo que a inoculação ideal possa ser alcançada (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

Os parâmetros cinéticos constam na Figura 1. Durante o cultivo de *S. boulardii* a dinâmica das variáveis foi demonstrada por variações gráficas de viabilidade celular ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ), geração de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ); pH; e consumo de açúcares dos substratos, sacarose, glicose e frutose ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

Ao analisar as curvas de biomassa e viabilidade (Figura 1 (a)), para ambos substratos, constatou-se que a fase de adaptação (fase lag) foi imperceptível, ou seja, o crescimento da cepa foi em proporção logarítmica típica de fase exponencial (fase log). Tal fato pode ser explicado porque as células já se encontravam adaptadas ao meio e às condições de cultivo, adquiridas durante o preparo do inóculo em maçã liquefeita (item 2.3). A partir de 16 horas, a taxa de crescimento se manteve constante (fase estacionária), e a concentração de biomassa, neste tempo, foi de  $4,885 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1}$  em ORG e  $4,798 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}$  em CONV, apresentando diferença significativa em nível de 5 % (Tabela 1).

Na fase exponencial, a curva apresentou inclinação acentuada, atribuída a fatores e condições favoráveis ao metabolismo, em que a formação de unidades celulares foi máxima. O consumo de substrato também foi máximo, supriu as necessidades celulares no processo de fermentação, onde moléculas de glicose são convertidas em ATP, gerando energia para a célula. (SCHMIDELL et al., 2001; LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

**Figura 1** - Viabilidade celular, pH e produção de biomassa de *S. boulardii* (a); metabolização de açúcares, sacarose (b), glicose (c) e frutose (d), durante a SFS, em dois diferentes substratos, maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV).



\*Devido a escala dos gráficos, não foi possível a visualização das barras de erros nos tempos analisados.

Em relação ao pH (Figura 1 (a)), houve variação ao longo da fermentação, sendo que ao término das 48 horas, o pH obtido para substrato de polpa de maçã CONV fermentado foi inferior ao pH obtido para polpa ORG fermentada (Tabela 1). Isso ocorreu devido à maior produção de ácidos orgânicos, ácido acético e cítrico durante a metabolização de compostos secundários (Figura 2).

O padrão de fermentação de açúcares, foi diferente para sacarose, glicose e frutose (Figura 1 (b), (c) e (d), respectivamente).

O consumo de sacarose foi observado logo após o início da SFS, sendo que o maior foi para fermentação ORG (Figura 1 (b)). A concentração inicial desse carboidrato foi de  $31,700 \pm 0,400$  e  $21,050 \pm 0,150$  g.L<sup>-1</sup>, ORG e CONV, respectivamente. Nota-se que a concentração de sacarose decaiu à medida que as células se multiplicaram, o que promoveu conseqüente aumento da biomassa. A partir das 16 horas, com início da fase estacionária, a taxa do consumo de sacarose permaneceu praticamente constante.

Antes das leveduras consumirem a sacarose, hidrolisam-na em glicose e frutose. Nas leveduras do gênero *Saccharomyces* duas vias para a hidrólise da sacarose são conhecidas, podendo ocorrer em ambiente extracelular e intracelular. No meio extracelular, glicose e frutose são geradas por ação da invertase extracelular, e os monossacarídeos produzidos pela hidrólise da sacarose são captados por transportadores de hexoses para o interior da célula, onde serão metabolizados. A sacarose também pode ser capturada diretamente para o interior das células através do co-transporte com prótons H<sup>+</sup>, e hidrolisada pela maltase ( $\alpha$ -D-glicosidase) ou pela invertase ( $\beta$ -D-frutosidase) intracelulares (BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2006).

A hidrólise rápida de grande quantidade de sacarose produz altas concentrações de glicose e frutose, fato que causa alterações na expressão gênica, permitindo maior tolerância a alta pressão osmótica gerada pelos monossacarídeos. A pressão osmótica pode resultar em perda no rendimento da fermentação, causando desvio do carbono a ser utilizado na produção de etanol (em anaerobiose) ou produção celular (em aerobiose), para vias responsáveis pela formação de compostos de reserva energética celular, como glicerol e glicogênio, além da produção de ácidos como o ácido acético e succínico (MYERS; LAWLOR; ATTFIELD, 1997; VERSTREPEN et al., 2004).

O consumo de glicose ocorreu de maneira semelhante para ambos substratos, ORG e CONV (Figura 1 (c)). Nas primeiras 16 horas (fase exponencial), ocorreu instabilidade na curva de glicose, com aumentos e quedas na concentração. Isso foi provocado pela conversão de sacarose em glicose e também pela sacarificação de polissacarídeos em glicose, provocando um acúmulo do açúcar. Após este período e até o término das 48 horas, foi notada pequena queda na concentração de glicose (Figura 1 (c)).

O consumo da frutose (Figura 1 (d)) também foi instável ao longo do tempo, para os ambos substratos, semelhante ao perfil de glicose. Sucessivos aumentos e decréscimos na concentração ocorreram principalmente, durante as primeiras 16 horas, provocados pela conversão de sacarose em frutose. Entretanto, diferente da concentração de glicose, ao término das 48 horas, houve acúmulo no teor de frutose,  $135,950 \pm 0,050 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $119,050 \pm 0,250 \text{ g.L}^{-1}$ , para fermentado de maçã convencional e orgânica, respectivamente. É relatado que algumas linhagens de *Saccharomyces* não consomem frutose de forma eficiente (BERTHELIS et al., 2008).

O aumento inicial da glicose e frutose provavelmente foi gerado pela ação sinérgica das duas enzimas (Celluclast 1,5L e Novozyme 3355). Voragen et al. (1980), relatou aumento da liberação de monossacarídeos a partir da parede celular de maçã, usando uma combinação de enzimas pectinolíticas e celulase. Segundo Carpita e Gilbeaut (1993), a matriz de pectina protege as fibras de celulose revestidas com hemicelulose. Este fato sugere que a pectina possa dificultar a hidrólise da celulose na parede celular de maçã, tornando-se necessária a ação da pectinase e celulase para facilitar a liberação de unidades de monossacarídeos.

A fim de analisar e comparar os dois substratos fermentativos, polpa de maçã ORG e CONV, em processo batelada, foram calculados os parâmetros de crescimento celular, rendimento ( $Y_{x/s}$ ), produtividade ( $P_x$ ), velocidade específica de produção de biomassa ( $\mu_x$ ) e consumo de substrato ( $\mu_s$ ), durante a fase exponencial da SFS (0 – 16 horas) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Parâmetros cinéticos de crescimento celular de *S. boulardii* durante a SFS em polpa de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV)

	pH *	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> ) **	P <sub>x</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
ORG	2,885 ± 0,011 <sup>a</sup>	4,885 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,216 ± 0,002 <sup>a</sup>
CONV	2,595 ± 0,012 <sup>b</sup>	4,798 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,206 ± 0,001 <sup>b</sup>
	Y <sub>x/s</sub> (%)	μ <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )	μ <sub>s</sub> (h <sup>-1</sup> )
ORG	24,232 ± 1,464 <sup>a</sup>	0,044 ± 3,00.10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	0,189 ± 0,012 <sup>a</sup>
CONV	22,467 ± 1,693 <sup>a</sup>	0,043 ± 1,66.10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	0,193 ± 0,015 <sup>a</sup>

P<sub>x</sub>: produtividade; Y<sub>x/s</sub>: rendimento; μ<sub>x</sub>: velocidade específica de produção de biomassa; e μ<sub>s</sub>: velocidade específica de consumo de substrato.

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (p ≤ 0,05).

\*Valores obtidos no tempo 48 horas.

\*\*Valores obtidos no início da fase estacionária, T = 16 horas.

A partir dos resultados expressos na Tabela 1, constatou-se que não houve diferença significativa para o rendimento (Y<sub>x/s</sub>), velocidade específica de crescimento celular (μ<sub>x</sub>) e consumo de substrato (μ<sub>s</sub>) na SFS em maçã orgânica e convencional. A diferença na produtividade (P<sub>x</sub>), foi significativa, reportando maior produção celular de *S. boulardii* quando em polpa de maçã orgânica (0,216 ± 0,002 g.L.h<sup>-1</sup>). Este substrato também proporcionou maior produção de biomassa.

Muller et al. (2007) analisaram a cinética de crescimento de *S. boulardii* em frascos agitados em incubadora tipo *shaker* e biorreator *Air-lift*, com aeração de 1 e 1,5 volume de ar por volume de meio por minuto (vvm). Os autores obtiveram como resultados de biomassa, valores de 3,15, 3,97 e 3,91, respectivamente, para reator *Air-lift* 1,0 vvm, 1,5 vvm e *shaker*. Estes foram inferiores aos valores encontrados neste estudo, após 16 horas de cultivo, a concentração no fermentado CONV foi de 4,798 ± 0,002 g.L<sup>-1</sup> e em ORG de 4,885 ± 0,004 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 1).

O valor de produtividade encontrado por Muller et al. (2007), durante fermentação em *Air-lift* 1,0 vvm (0,263 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foi próximo ao obtido no presente estudo. Já os resultados de rendimento (% m.m<sup>-1</sup>) alcançados por estes autores foram de 33,4, 39,3 e 41,7, para cultivo nos reatores *Air-lift* 1,0 vvm, 1,5 vvm e *shaker*, respectivamente. Sendo maiores que o obtido nesse estudo, de 24,232 ± 1,464 e 22,467 ± 1,693% (m.m<sup>-1</sup>), ORG e CONV, respectivamente (Tabela 1). Valores estes

que estão relacionados principalmente ao acúmulo de monossacarídeos durante o processo. A concentração de açúcares obtidos pela sacarificação, desequilibrou o balanço de consumo de glicose e frutose pelo microrganismo. Para Moraes (2001), se a concentração de glicose ultrapassar determinado nível, cerca de 250 a 300 mg.L<sup>-1</sup>, as enzimas do metabolismo da levedura são inibidas, o que pode gerar uma repressão catabólica e como consequência redução no rendimento. Entretanto, isso mostrou que apesar do rendimento inferior obteve-se alta concentração celular atribuída às condições nutricionais da polpa de maçã, orgânica e convencional, como meio fermentativo para a levedura estudada.

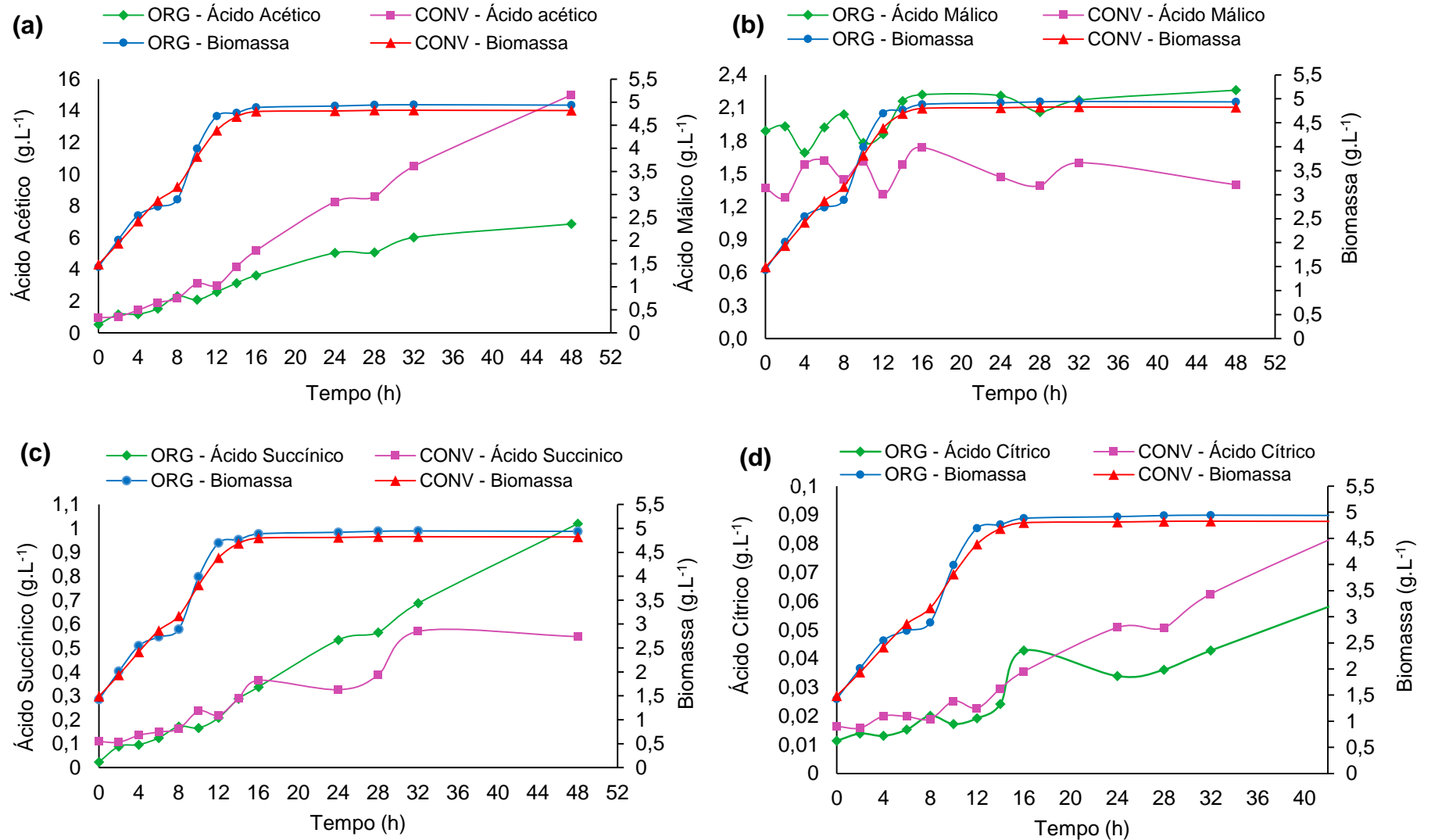
O sistema orgânico possui maior qualidade nos atributos físicos do solo e maior disponibilidade de certos nutrientes, especialmente cálcio, magnésio e nitrogênio, em relação ao convencional (AMARANTE et al., 2015). Como foi definido no estudo do Capítulo 2, os níveis de macronutrientes e micronutrientes (minerais), foram significativamente maiores em polpa de maçã orgânica, o que provavelmente contribuiu para melhor produção de biomassa e conseqüente maior produtividade nesse substrato.

As leveduras, são microrganismos que exigem fonte de carbono que forneça energia química e esqueleto carbônico para suas estruturas celulares. Algumas vitaminas também são exigidas, assim como minerais. O meio deve fornecer, igualmente nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Os micronutrientes têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente por serem cofatores para várias enzimas (STEHLINK-TOMAS et al., 2004).

### **3.2 Síntese de ácidos orgânicos durante a multiplicação celular**

A *S. boulardii*, sobrevive às mais adversas situações, inclusive às condições do trato gastrointestinal, resistindo aos ácidos do estômago e sais biliares (FIETTO et al., 2004). Ambos substratos de maçã, ORG e CONV, apresentaram baixo valor de pH (Figura 1), devido ao teor de ácidos orgânicos, principalmente de ácido málico (Figura 2). Pôde-se perceber que o baixo pH não interferiu na multiplicação da levedura, especialmente nas primeiras 16 horas.

**Figura 2** - Comportamento de ácidos orgânicos, (a) Ácido acético; (b) Ácido málico; (c) Ácido succínico; e (d) Ácido cítrico durante a SFS com *S. boulardii* em diferentes substratos, maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV).



\*Devido a escala dos gráficos, não foi possível a visualização das barras de erros nos tempos analisados.

O ácido acético foi produzido a partir das primeiras horas de fermentação, seguindo aumento até o término do processo (Figura 2 (a)). Ao final das 48 horas observou-se grande acúmulo do ácido, principalmente no fermentado CONV. Estela-Escalante et al. (2012), ao estudar a influência da aeração na atividade fermentativa de *S. cerevisiae* em suco de maçã, constataram que tanto no estado estático quanto no agitado, houve produção de ácido acético, porém, no primeiro a concentração foi bastante representativa (266 mg.mL<sup>-1</sup>).

O ácido acético é normalmente produzido durante a fermentação alcoólica. O piruvato, produzido na glicólise, sob condições aeróbicas, é oxidado a acetato, que entra no ciclo do ácido cítrico e é oxidado até CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). O acúmulo de ácido é consequência da atividade insuficiente da acetil-CoA sintase necessária para oxidar completamente acetato, produzido a partir de acetaldeído (VAN URK et al., 1990).

A polpa de maçã orgânica apresentou concentração do ácido málico superior à encontrada em polpa convencional, no tempo zero, 1,890 ± 0,014 e 1,370 ± 0,014 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 2 (b)). O ácido málico é o ácido orgânico mais importante presente em maçã, especialmente para suas características sensoriais. Contribui para a acidez total e qualidade sensorial dos frutos e consequente produtos obtidos a partir deles. Algumas *S. cerevisiae* comerciais, são capazes de degradar até 18% do ácido málico (REDZEPOVIC et al., 2003).

Na Figura 2 (b), pode-se inferir que o teor de ácido málico praticamente não se alterou no fermentado CONV, mantendo sua concentração do início até final da SFS. Sobretudo em fermentado ORG, houve aumento até o final do processo. No ciclo dos ácidos tricarboxílicos, o malato que é a forma ionizada do ácido málico e um composto intermediário formado pela hidratação do fumarato. Perde um hidrogênio com o auxílio da malato desidrogenase e do NAD, que se transforma em NADH. O resultado dessa reação é o oxaloacetato que entrará novamente no ciclo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Produção de ácido succínico durante o cultivo de *S. boulardii* em polpa ORG e CONV atingiu valores de cerca de 1,020 ± 0,003 e 0,548 ± 0,007 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 2 (c)). Na presença de oxigênio, succinato é sintetizado principalmente através do ciclo do ácido tricarboxílico, mesmo na presença de glicose em alta concentração (ARIKAWA et al., 1999). A variabilidade da sua síntese observada durante o curso da fermentação com agitação pode ocorrer, pelo fato do

ácido succínico ser continuamente excretado e exportado de dentro para fora das células de levedura. Sendo assim, na presença de oxigênio, ácido succínico é um composto intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, durante a oxidação completa de glicose (ARIKAWA et al., 1999).

Síntese de ácido cítrico também foi observada durante o cultivo da levedura sob condições de fermentação com agitação (Figura 2 (d)). Maior teor do ácido, foi em fermentado CONV, no final das 48 horas. Assim como os demais ácidos sintetizados, o ácido cítrico, em presença de oxigênio é gerado pelo ciclo do ácido tricarboxílico. O ciclo começa com a acetilcoenzima A (Acetil-CoA), produzida a partir do piruvato, que é produto da glicólise, ou da oxidação de ácidos graxos pela  $\beta$ -oxidação. A coenzima reage com o ácido oxalacético formando o citrato, ou ácido cítrico (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

#### 4 Conclusão

A produção de biomassa de levedura probiótica *S. boulardii* através da sacarificação e fermentação simultânea em condições submersas, foi significativamente diferente nos dois substratos testados, polpa de maçã orgânica e convencional.

A sacarificação de polissacarídeos e a conversão de sacarose em glicose e frutose, presentes na polpa de maçã, interferiram no teor do monossacarídeos, o que provocou na fase estacionária, acúmulo principalmente de frutose. Entretanto, até as 16 horas, fase exponencial, o consumo dos açúcares foi notado.

Houve maior consumo de açúcares totais em maçã orgânica, o que entretanto não contribuiu para maior rendimento. Diversos fatores podem ter limitado o rendimento e consequentemente a produção de biomassa da *S. boulardii* entre eles alta concentração de açúcares e baixo pH.

Tanto a polpa de maçã orgânica quanto a convencional foram consideradas bons substratos para o cultivo dessa levedura probiótica, já que uma diversidade de nutrientes presentes em maçã contribuíram para produção de células. Mesmo em condições extremas de acidez a levedura conseguiu se desenvolver em ambos substratos, e produzir quantidade suficiente de células para que os substratos fermentados possam ser considerados probióticos.

## 5 Referências

- AMARANTE, C. V. T.; DA ROSA, E. F. F.; ALBUQUERQUE, J. A.; KLAUBERG FILHO, O.; STEFFENS, C. A. Atributos do solo e qualidade de frutos nos sistemas convencionais e orgânicos de produção de maçãs do Sul do Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n.1, p.99–109, jan./mar. 2015.
- ARIKAWA, Y.; KUROYANAGI, T.; SHIMOFQAKA, M.; MURATSUBAKI, H.; ENOMOT, K.; KODAIRA, R. AND OKAZAK, M. Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 28–36, 1999.
- BADOTTI, F.; BATISTA, A. S.; STAMBUK, B. U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.115–123, 2006.
- BAFUTTO, M.; ALMEIDA, J. R. de; LEITE, N. V.; COSTA, M. B. G.; OLIVEIRA, E. C. de; RESENDE-FILHO, J. Treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome with mesalazine and/or *Saccharomyces boulardii*. **Arq. Gastroenterol**, v. 50 n.4, p. 304–309, 2013.
- BALÁZS, A.; TÓTH, M.; BLAZICS, B.; HÉTHELYI, E.; SZARKA, S.; FICSOR, E.; FICZEK, G.; LEMBERKOVICS, E.; BLÁZOVICS, A. Investigation of dietary important components in selected red fleshed apples by GC–MS and LC–MS. **Fitoterapia**, v. 83, n.8, p.1356–1363, 2012.
- BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.8, p.26–33, 2004.
- BERTHELS, N.; CORDERO OTERO, R.; BAUER, F.; PRETORIUS, I.; THEVELEIN, J. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.77, p.1083–1091, 2008.
- BESIRBELLIOGLU, B. A.; ULCAY, A.; CAN, M.; ERDEM, H.; TANYUKSEL, M.; AVCI, I. Y.; ARAZ, E.; PAHSA, A. *Saccharomyces boulardii* and infection due to *Giardia lamblia*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 38, n.6–7, p. 479–481, 2006.
- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Major review. **The Plant Journal**, v. 3, p.1–30, 1993.
- DESHPANDE, V.; RAMAN, H.S.; RAO, M. Simultaneous saccharification and Fermentation of cellulose to ethanol using *Penicillium funiculosum* cellulase and free or immobilized *Saccharomyces uvarum* cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 1679-1684, 1983.

D' AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 4, p.315–324, 1989.

ESTELA-ESCALANTE, W.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.; HATTA-SAKODA, B. Effect of aeration on the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* cultured in apple juice. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 11, n. 2, p. 211–226, 2012.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert. Cordoba, Argentina.

FIETTO, J. L. R.; ARAÚJO, R. S.; VALADÃO, F. N.; FIETTO, L. G.; BRANDÃO, R. L.; NEVES, M. J.; GOMES, F. C. O.; NICOLI, J. R.; M. CASTRO, I. M. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 615–621, 2004.

HARI KRISHNA, S.; CHOWDARY, G.V.; REDDY, D.S.; AYYANNA, C. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated *Antigonum leptopus* (Linn) leaves to ethanol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 1055–1060, 1999.

HENICK-KLING, T. **Yeast and Bacterial Control in Winemaking**. In: Modern methods of plant analysis, new series vol 6. Wine analysis. Edited by LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. Spring-Verlag Berlen Heidelberg, 1988.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. COX; M. M. 2006. Lehninger. **Princípios de Bioquímica**. Ed. Sarvier, 4. ed. São Paulo. p 409–439.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A.; AQUAROLE, E.; BONZANI, W.; SCHIMIDELL, W. 2001. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 3, p. 1–43.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n.18, p. 2202–2222, 2010.

MORAES, I. O. In: LIMA, U. A.; AQUAROLE, E.; BONZANI, W.; SCHIMIDELL, W. 2001. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 3, p. 199–217.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V.; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *air lift* e *shaker*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.27, n.4, p.688–693, 2007.

MYERS, D. K.; LAWLOR, D. T. M.; ATTFIELD, P. V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.145–150, 1997.

NOGUEIRA, J. N.; SILVA, E. Efeito comparativo do calor, SO<sub>2</sub> e ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase e peroxidase de algumas frutas e hortaliças. **Analís da ESALQ**, Piracicaba, v.46, n.2, p. 453–471, 1989.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de Carboidratos empregado na triagem de adulterações do café. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 689–694, 2011.

REDZEPOVIC, S.; ORLIC, S.; MAJDAK, A., KOZINA, B.; VOLSCHENK, H.; VILJOEN-BLOOM, M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p.49–61, 2003.

REUTER, W. M. **Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by HPLC and UV Detection**. Perkin Elmer, 2015.

<[https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-75518APP\\_Analysis-of-Organic-Acids-in-Fruit-Juices-by-HPLC-and-UV-Detection-012299\\_01.pdf](https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-75518APP_Analysis-of-Organic-Acids-in-Fruit-Juices-by-HPLC-and-UV-Detection-012299_01.pdf)> Acesso em: 05 abril 2015.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B.; BLONDIN, B.; SALMON, J. Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* in enological conditions: effect on fermentation kinetics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.1, p. 113–121, 2003.

SANDHU, D. K.; JOSHI, V. K. Technology quality and scope of fruit wines especially apple beverages. **Indian Food Industry**, New Delhi, v.14, n.1, p. 24–34, 1995.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biociologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2, cap. 8, p. 179–192.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. Great Britain: Pergamon, 1995. ISBN: 978-0-08-036131-4.

STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V. G. STANZER, D.; GRBA, S.; VAHCIC, N. Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n.2, p. 115–120, 2004.

SZAJEWSKA, H.; HORVATH, A.; PIWOWARCZYK, A. Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, p. 1069–1079, 2010.

THOMAS, M. B.; VAIDYANATHAN, M.; RADHAKRISHNAN, K.; RAICHUR, A. M. Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes. **Journal of Food Engineering**, v. 136, p. 1–8, 2014.

VAN URK, H.; VOLL, W. S. L.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 281–287, 1990.

VERSTREPEN, K. J.; ISERENTANT, D.; MALCORPS, P.; DERDELINCKX, G.; VAN DIJCK, P.; WINDERICKX, J.; PRETORIOUS, I. S.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? **Trends in Biotechnology**, v.22, p.531-537, 2004.

VILELA, E. G.; FERRARI, M. de L. de A.; TORRES, H. O. da G.; PINTO, A. G.; AGUIRRE, A. C. C.; MARTINS, F. P.; GOULART, E. M. A.; CUNHA, A. S. da. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 43, n. 7, p. 842–848, 2008.

VILLAR-GARCÍA, J.; HERNÁNDEZ, J. J.; GÜERRI-FERNÁNDEZ, R.; GONZÁLEZ, A.; LERMA, E.; GUEJAR, A.; SAENZ D.; SORLÍ, L.; MONTERO, M.; HORCAJADA, J. P.; FREUD, H. K. Effect of Probiotics (*Saccharomyces boulardii*) on Microbial Translocation and Inflammation in HIV-Treated Patients: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 68, N. 3, p. 256-263, 2015.

VORAGEN, F. G. J.; HEUTINK, K.; PILNIK, W. Solubilization of apple cell walls with polysaccharide-degrading enzymes. **Journal of applied biochemistry**, v. 2, p. 452–468, 1990.

## CAPÍTULO 4

---

### Efeito antioxidante da quercetina na resposta ao estresse oxidativo em células de *Saccharomyces boulardii*, a partir da fermentação em substrato de maçã orgânica e convencional

---

#### Resumo

As células de levedura podem ser usadas como sistema modelo para compreender o mecanismo molecular envolvido na resistência ao estresse oxidativo, por serem eucarióticas. A quercetina, flavonoide presente em maçã, é considerada o mais eficiente capturador de espécies reativas de oxigênio (ERO). Este trabalho propôs investigar o teor de quercetina presente em maçã orgânica e convencional durante a fermentação da polpa dos frutos por *S. boulardii*, e através da indução ao estresse oxidativo, verificar se o teor de quercetina, em ambos fermentados, é capaz de reduzir a oxidação provocada pelas ERO. Através da construção de curva cinética, foi possível verificar que o teor de quercetina, compostos fenólicos foram maiores para o fermentado em polpa de maçã orgânica fermentada. Após 16 horas, durante fase estacionária da fermentação, foi observada queda na concentração de atividade antioxidante, devido provavelmente a oxidação dos elementos fenólicos. A resistência ao peróxido de hidrogênio foi aumentada em células pré-tratadas com quercetina. Proteção celular foi correlacionada com a diminuição nos marcadores de estresse oxidativo, ou seja, os níveis de espécies reativas de oxigênio e a oxidação da glutathiona. Constatou-se que as concentrações de componentes fenólicos, sobretudo de quercetina, presentes nos fermentados (12 horas) de maçã orgânica ( $1,189 \cdot 10^{-2} \pm 0,383 \cdot 10^{-5}$  mg quercetina galactosídeo.mL<sup>-1</sup> e  $2,400 \cdot 10^{-3} \pm 0,143 \cdot 10^{-6}$  mg quercetina ramnosídeo.mL<sup>-1</sup>) e convencional ( $5,296 \cdot 10^{-3} \pm 0,311 \cdot 10^{-4}$  mg quercetina galactosídeo.mL<sup>-1</sup> e  $1,312 \cdot 10^{-3} \pm 1,005 \cdot 10^{-7}$  mg quercetina ramnosídeo.mL<sup>-1</sup>), conseguiram reduzir os níveis de estresse celular, entretanto, menor oxidação foi verificada quando empregada quercetina sintética a uma concentração de 0,1 mg de quercetina ramnosídeo m.L<sup>-1</sup>. Estes resultados suportam que a quercetina, incluindo aquela encontrada em maçã, reduz o estresse oxidativo mediados pelas espécies reativas de oxigênio, devido sua ação antioxidante nas células de *S. boulardii*.

**Palavras-Chaves:** levedura, compostos fenólicos totais, ERO, glutathiona.

## 1 Introdução

As células de levedura possuem semelhanças notáveis quando comparadas às células de mamíferos, pois ambas são células eucarióticas e assim, podem ser usadas como um sistema modelo para compreender o mecanismo molecular envolvido com a resistência ao estresse oxidativo (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

As células de leveduras quando multiplicam-se em condições aeróbias, ficam conseqüentemente expostas a espécies reativas de oxigênio (ERO), geradas a partir do metabolismo celular. A principal fonte ERO é a cadeia respiratória mitocondrial, que representa de 85 – 90 % do oxigênio consumido pelas células. ERO é um termo usado para denominar certo grupo oxidante capaz de gerar radicais livres, incluindo, principalmente, os radicais superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001; KUNWAR; PRIYADARSINI, 2011).

O estresse oxidativo ocorre quando níveis elevados de ERO são gerados, resultando, sobretudo, em danos celulares ao DNA, proteínas e lipídeos. O aumento dos níveis de ERO está diretamente ou indiretamente associado a processos biológicos e patológicos, como envelhecimento, processos inflamatórios, desenvolvimento de câncer, lesão isquêmica e esclerose (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000).

Em conseqüência, células e organismos desenvolvem mecanismos de defesa contra a toxicidade induzida pelo estresse oxidativo. Embora células sejam capazes de, através de enzimas antioxidantes, reduzir a oxidação, muitas vezes estas podem não ser suficientes para normalizar o estado redox durante o estresse gerado. Para tal, uma suplementação com antioxidantes exógenos é necessária, como por exemplo os flavonoides (MOURE et al., 2001).

As enzimas antioxidantes desempenham um papel crítico na defesa contra ERO. A glutathiona reduzida, apresenta capacidade redutora e está presente na maioria das células. Após exposição da glutathiona ao agente oxidante, ocorre a oxidação e sua recuperação posterior é realizada através da enzima glutathiona redutase, uma flavoproteína, que consegue manter íntegro o sistema celular (DEPONTE, 2013).

O flavonoide mais abundante no reino vegetal, a quercetina, (3,3',4',5,7- pentahidroxi flavona), é considerado o mais eficiente capturador de ERO.

Sua ação antioxidante ocorre, principalmente, pela inibição das ERO na interação com o radical superóxido, na formação de radicais hidroxil (por quelar os íons de ferro) e na peroxidação lipídica (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008). Os efeitos benéficos da quercetina, tem sido em parte, atribuídos à capacidade desse flavonoide em reduzir os níveis de estresse oxidativo, acarretando em ações anti-inflamatória (ROGERIO et al., 2010), anti-carcinogênica (MOLINA et al., 2003), anti-hipertensiva (PEREZ-VIZCAINO et al., 2006), anti-amnésica (CHOI et al., 2012) e anti-aterogênica (PEREZ-VIZCAINO et al., 2006).

Segundo Hertog et al. (1993) a quercetina está presente em altas concentrações em cebola, couve, vagem, brócolis, repolho e tomate, porém dentre as frutas estudadas, a concentração média de quercetina em maçã, foi a maior (21 e 72 mg.kg<sup>-1</sup>). O cultivo da maçã, em geral, é realizado através da agricultura convencional ou orgânica, sendo que esta ultima sem adição de pesticidas, fertilizantes sintéticos e produtos químicos tóxicos. Como não são utilizados pesticidas, as plantas tornam-se mais susceptíveis à ação de patógenos, o que acarreta na produção de maiores teores de componentes que irão defender a planta deste ataque, como os flavonoides (SOLEAS et al., 1997).

Portanto, o trabalho teve por objetivo investigar o teor de quercetina presente em maçã orgânica e convencional durante a fermentação da polpa dos frutos por *S. boulardii*. Estresse oxidativo foi induzido nas células da levedura, para verificar se o teor de quercetina, em ambos fermentados, foi capaz de reduzir a oxidação provocada por ERO.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Matéria-prima e obtenção da polpa**

Maçãs, da cultivar 'Fuji' (safra 2014/2015), cultivadas em sistema orgânico (ORG) ou convencional (CONV), foram adquiridas de produtores da região de Urupema, Santa Catarina. Foram previamente lavadas, sanitizadas e trituradas em processador (Walita Master RI7633) com adição de 0,5 % (m.v<sup>-1</sup>) de ácido ascórbico (NOGUEIRA; SILVA, 1989). A polpa de maçã obtida, foi destinada à fermentação submersa com agitação (120 rpm). Após processada foi acondicionada em sacos de

polietileno e armazenadas a – 20 °C, até sua utilização e antes da fermentação, tratadas termicamente à 80 °C por 20 minutos.

## 2.2 Microrganismo

Foi utilizada levedura do medicamento Floratil® (Merck). Cada cápsula de 100 mg continha  $0,5 \cdot 10^9$  células de *S. boulardii*-17 na forma liofilizada. A levedura foi reativada em 50 mL YPD líquido (extrato de levedura, 1% (m.v<sup>-1</sup>); peptona bacteriológica, 2% (m.v<sup>-1</sup>); dextrose, 2% (m.v<sup>-1</sup>)), incubada a 30 °C, 120 rpm por 24 horas, em incubadora tipo *Shaker* com agitação orbital (CT-712, Cientec, Brasil). Culturas trabalho foram mantidas em tubos inclinados contendo meio YPD sólido (extrato de levedura, 1% (m.v<sup>-1</sup>); peptona bacteriológica, 2% (m.v<sup>-1</sup>); dextrose, 2% (m.v<sup>-1</sup>), Ágar, 1,5% (m.v<sup>-1</sup>)).

## 2.3 Condições da Fermentação submersa

Pré-inóculo foi preparado pela transferência de três alçadas de células trabalho para cada 50 mL de YPD líquido. A incubação sob agitação em incubadora tipo *Shaker* ocorreu a 30 °C e 120 rpm por 24 horas.

Enzimas foram utilizadas na sacarificação da polpa de maçã durante a fermentação por *S. boulardii*. A concentração de pectinase (Novozym® 33095) foi de  $10 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  e celulase (Celluclast® 1.5 L) de  $8 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , de acordo com estudo de otimização (com adaptações), exposto no Capítulo 2. Ambas enzimas foram cedidas pela NOVOZYMES®, Dinamarca.

Inóculo foi preparado através da biomassa obtida (10% m.v<sup>-1</sup>) do pré-inóculo centrifugado a 3000 rpm por 15 min (Eppendorf, 5804 R, Alemanha) e lavada com água salina (0,9% m.v<sup>-1</sup>). A biomassa foi inoculada simultaneamente com as enzimas pectinase e celulase, em frascos contendo 100 g de polpa de maçã orgânica ou convencional, separadamente, em temperatura de 27,5 °C (Capítulo 2) e agitação de 120 rpm por 24 horas.

A fermentação e sacarificação das polpas ocorreram em biorreator de bancada, tipo tanque agitado (Tec-Bio-Flex, Tecnal, Brasil). Foram utilizados 3 kg de polpa de maçã orgânica ou convencional com  $10 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de pectinase e  $8 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de celulase, a uma taxa de inóculo de 10% (m.v<sup>-1</sup>), em batelada, a 27,5 °C e 500

rpm. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24, 28, 32 e 48 horas, para análise de número de células viáveis e teor de quercetina, compostos fenólicos e capacidade antioxidante.

A determinação da concentração de células foi realizada na proporção de 1:10 em água peptonada (0,1% m.v<sup>-1</sup>), com diluição seriada até 10<sup>-8</sup>. 100 µL das diluições 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-8</sup> foram plaqueados em triplicata no ágar YPD e as placas incubadas a 30 °C por 24 horas.

## **2.4 Preparo de extrato etanólico**

Para a determinação do teor de quercetina, fenólicos totais e capacidade antioxidante, extrato etanólico das alíquotas do fermentado probiótico de maçã, retirados nos tempos pre-estabelecidos no *item 2.3*, foi preparado conforme a metodologia descrita por McGhie, Hunt e Barnett (2005), com modificações. A amostra foi adicionada na proporção de 1:1 m.v<sup>-1</sup> à uma solução extratora de etanol: água: ácido fórmico (80:20:1), seguido por homogeneização em agitador *vortex* (Phoenix Luferco, AP 56, Brasil), até obtenção de uma pasta. As amostras foram extraídas a 4 °C durante 24 h e centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min. Os extratos foram armazenados a – 20 °C até análise.

Para determinação de quercetina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os extratos foram filtrados em membrana *Millipore* de 0,45 µm. Os padrões de quercetina 3-D galactosídeo (83388, Sigma-Aldrich) e quercetina 3-O ramnosídeo (Q4951, Sigma-Aldrich), em concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, foram diluídos na mesma proporção da solução etanólica empregada para as amostras.

## **2.5 Capacidade antioxidante, fenólicos totais e determinação de quercetina**

### **2.5.1 Capacidade Antioxidante**

A capacidade antioxidante foi medida pela capacidade de sequestrar radicais DPPH<sup>\*</sup> (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), seguindo a metodologia utilizada por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Foi adicionado 50 µL do extrato da amostra, em 1 mL de tampão acetato (pH 5,5), 1 mL de etanol absoluto e 0,5 mL de solução de DPPH 250 µmol.L<sup>-1</sup> (D9132, Sigma, Germany),

armazenados durante 30 min sem presença de luz. Leitura foi realizada em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermos Scientific™) a 517 nm. A quantificação ocorreu através da curva padrão de Trolox (238813, Sigma), sendo os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox por grama da amostra.

### 2.5.2 Compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico, a 760 nm, descrito por Swain e Hills (1959), utilizando ácido gálico (398225 Sigma-Aldrich) como padrão de referência. Alíquota de 0,5 mL dos extratos foi adicionada à 2,5 mL do reagente de Folin Ciocalteau 10% (2326, Dinâmica) e 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5%. Após repouso por 5 minutos a 50 °C, ao abrigo da luz. A quantificação foi através da curva analítica padrão de ácido gálico e os resultados expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG)  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra.

### 2.5.3 Determinação e quantificação de quercetina

A determinação e quantificação de quercetina foi por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo McGhie, Hunt e Barnett (2005), com modificações. O volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$  em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu corp., Kyoto, Japão), equipado com detector UV-VIS. A coluna utilizada foi CAPCELL Pak (C-18) CLAE (250 mm, 4,6 mm i.d, 5 $\mu\text{m}$ , Shiseido, Japan). Os analitos em cada amostra foram identificados por comparação de seus tempos de retenção na gama de 220 - 450 nm, com o composto autêntico de quercetina 3-D galactosídeo e quercetina 3-O ramnosídeo. A integração dos picos cromatográficos foi realizada com o auxílio do software LC Solutions (Shimadzu corp., Kyoto, Japão).

## 2.6 Estresse oxidativo

Neste trabalho, foram utilizadas células de *S. boulardii* como modelo eucariótico para investigar a ação de compostos fenólicos presentes em maçã, sobretudo a quercetina, na redução da oxidação celular.

Para análise do estresse oxidativo, utilizou-se amostra do fermentado probiótico de maçã orgânica ou convencional, no tempo 12 horas, período que a levedura encontrava-se no final da fase logarítmica e início da fase estacionária, onde a concentração celular foi de 8 log UFC.mL<sup>-1</sup>.

A fim de verificar se o efeito contra o estresse oxidativo ocorreu pela presença de quercetina, *S. boulardii* fermentada em YPD líquido, e em YPD líquido com adição de 0,1 mg de quercetina ramnosídeo mL<sup>-1</sup>, também foram empregadas, como controle. A resistência ao ERO (resistência ao peróxido de hidrogênio (*item 2.6.1.1*), ânions superóxido (*item 2.6.1.2*) e radical hidroxila (*item 2.6.1.3*) e determinação de glutatona (*item 2.6.2*), seguiu a metodologia descrita por Kullisaar et al., 2002, com modificações.

## **2.6.1 Resistência aos ERO**

### **2.6.1.1 Resistência ao peróxido de hidrogênio**

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

A resistência da células de *S. boulardii* ao peróxido de hidrogênio foi através da suspensão da cultura, com o mínimo de 7 log UFC.mL<sup>-1</sup>, em água peptonada (0,1% m.v<sup>-1</sup>) e incubação com 1,5 mM de peróxido de hidrogênio (50 wt.% em água, Biotec, Brasil), a 30 °C. Em intervalos de tempo de 2 horas, durante 6 horas, alíquotas foram retiradas e plaqueadas em ágar YPD, incubadas a 30 °C por 24 horas e o número de células viáveis determinado.

### **2.6.1.2 Resistência ao ânion superóxido**

Os ânions superóxido foram gerados utilizando-se paraquat 1,1V-dimethyl-4,4V-bipyridinium) (36541, Fluka). Os radicais de paraquat reagem com o O<sub>2</sub>, levando à formação de ânion superóxido (BUCHMEIER et al., 1997). A cultura foi suspensa em solução de água peptonada (0,1% m.v<sup>-1</sup>), 0,1 mL da suspensão plaqueada, em ágar YPD. Um disco inibição (papel filtro), foi colocado no centro do

ágar e embebido com 10  $\mu\text{L}$  de 10 mM de solução de paraquat em água estéril, incubação a 30 °C por 24 horas. A zona de inibição do crescimento (mm), foi medida.

### 2.6.1.3 Resistência ao radical hidroxila

Suspensão de *S. boulardii*, com no mínimo de 7 log UFC.mL<sup>-1</sup>, em água peptonada (0,1% m.v<sup>-1</sup>), foi exposta aos radicais hidroxila gerados através de uma reação contendo solução de ácido tereftálico 10 mM (ácido 1,4-benzenodicarboxílico) (185361, Sigma-Aldrich) em tampão fosfato e 0,01 mM de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (01S105401AF, Synth®). A reação iniciada pela adição de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em intervalos de tempo de 2 horas, durante 6 horas, o número de células viáveis foi estimado em log UFC.mL<sup>-1</sup> nas placas contendo ágar YPD a 30 °C após 24 horas.

### 2.6.2 Determinação de glutatona

Para eliminar as proteínas da amostra, 5 mL de solução a 10% (m.v<sup>-1</sup>) de ácido metafosfórico foi adicionado a 5 mL de amostra. Esta mistura ficou em repouso à temperatura ambiente durante 5 minutos e então centrifugada a 5000 rpm durante 5 min. O sobrenadante recolhido, foi armazenado a - 20 °C (para posterior determinação da glutatona). Para o ensaio da glutatona oxidada (GSSG), a glutatona reduzida (GSH), possivelmente presente nas amostras de fermentados, foi derivatizada por adição de 0,1 mL de 1 mM de 2-vinilpiridina (132292, Sigma-Aldrich) em etanol, agitou-se em vortex e manteve-se à temperatura ambiente durante 1 h. Para determinar o conteúdo de GSSG, para cada 0,3 mL da amostra derivatizada foi adicionado 0,015 mL de solução de trietanolamina (33729, Sigma-Aldrich) 4 M em água, misturados e imediatamente adicionados a 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,5) e 0,01 M de EDTA (15575020, Invitrogen Ultra pure™), 0,5 U de glutatona redutase (G3664, Sigma) e 0,3 mM de NADPH (N1630, Sigma). A reação enzimática foi iniciada pela adição de 0,3 mL de 1 mM de ácido 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzóico (D8130, Sigma-Aldrich) em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,5) e 0,01 M de EDTA. A alteração da densidade óptica foi medida após 10 min a 412 nm em espectrofotômetro. O teor de glutatona foi quantificado com base numa curva padrão gerada com quantidades conhecidas de glutatona reduzida (G4251, Sigma-Aldrich). A quantidade de GSH foi calculada como a diferença entre a glutatona total

e GSSG (glutathiona total - GSSG = GSH). O teor de glutathiona foi expresso como razão redox da glutathiona (GSSG / GSH).

## **2.7 Estatística**

Todos os ensaios foram feitos em triplicata e o estudo relacionando a concentração celular de *S. boulardii*, teor de quercetina, compostos fenólicos e atividade antioxidante, foi avaliado por construção gráfica em software Microsoft Excel 2013.

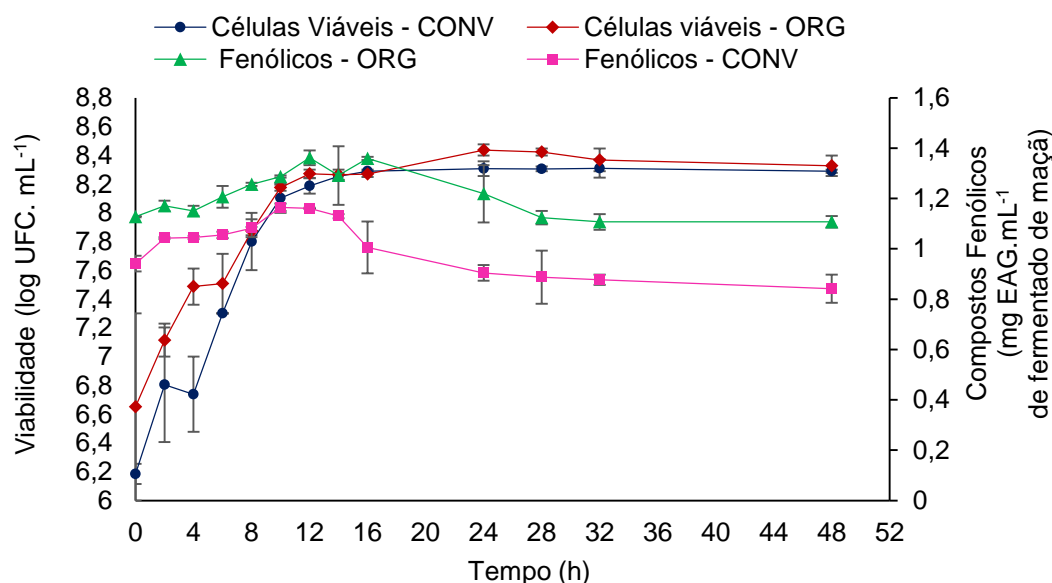
A fim de analisar a concentração de *S. boulardii* que resistiu às ERO, gráficos de dispersão também foram desenvolvidos em software Microsoft Excel 2013. A triplicata dos valores obtidos experimentalmente, foram dados como média e desvio padrão da média. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas com o teste Tukey. Em todas as análises, um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **3 Resultados e Discussão**

### **3.1 Capacidade antioxidante, fenólicos totais e determinação de quercetina**

As concentrações de compostos fenólicos totais obtidas em estudo cinético durante a batelada de 48 horas na fermentação e sacarificação simultânea, em polpa de maçã orgânica e convencional, constam na Figura 1.

**Figura 1** - Compostos fenólicos totais vs tempo de fermentação, para fermentado de polpa de maçã orgânica e convencional.



ORG: fermentado de polpa de maçã orgânica; CONV: fermentado de polpa de maçã convencional. Fermentação com a levedura *S. boulardii*.

Ao longo do processo da SFS, durante as primeiras 12 horas, as concentrações de compostos fenólicos tiveram um aumento, para ambos extratos etanólicos de polpas de maçã. Para o fermentado de maçã orgânica, no tempo 12 horas, obteve-se maior concentração e o conteúdo de fenólicos que foi de  $1,362 \pm 0,029$  mg EAG.mL<sup>-1</sup>, superior ao encontrado em maçã convencional, que correspondeu a  $1,162 \pm 0,002$  mg EAG.mL<sup>-1</sup> (Tabela 1). Após o tempo 16 horas, ocorreu decaimento na concentração, até o término da SFS. O decréscimo da concentração de fenólicos foi compatível com a fase estacionária de multiplicação da levedura, que teve início após as 16 horas (Figura 1).

A atividade antioxidante pela captura do radical DPPH<sup>\*</sup> nos fermentados apresentou aumento até a décima segunda hora após o início da SFS (Figura 2), coincidindo com a concentração de compostos fenólicos. A queda na atividade antioxidante para ambos os substratos, ocorreu efetivamente após 24 h. Segundo a Tabela 1 o fermentado de polpa de maçã orgânica não diferiu do convencional, para os valores de DPPH em nenhum dos tempos analisados.

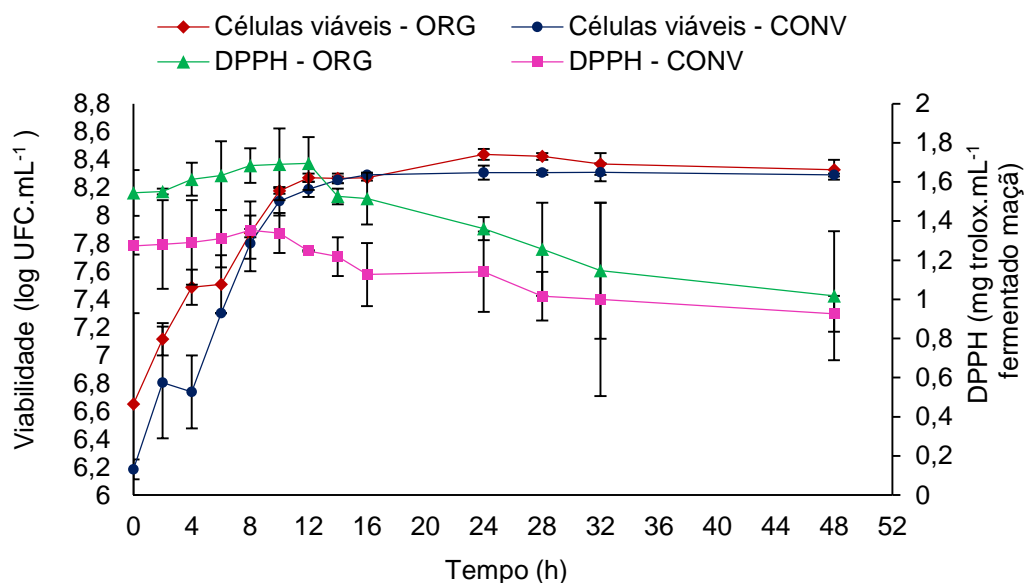
**Tabela 1** – Diferença no teor de compostos fenólicos, antioxidação (DPPH), quercetina ramnosídeo e galactosídeo, entre o fermentado de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV), para cada tempo.

Tempo (h)		Compostos fenólicos totais (mg.mL <sup>-1</sup> )	DPPH (mg.mL <sup>-1</sup> )
0	ORG	1,128 ± 0,002 <sup>a</sup>	1,545 ± 0,117 <sup>a</sup>
	CONV	0,942 ± 0,031 <sup>b</sup>	1,273 ± 0,044 <sup>a</sup>
4	ORG	1,150 ± 0,021 <sup>a</sup>	1,614 ± 0,084 <sup>a</sup>
	CONV	1,049 ± 0,006 <sup>b</sup>	1,292 ± 0,216 <sup>a</sup>
8	ORG	1,256 ± 0,006 <sup>a</sup>	1,684 ± 0,088 <sup>a</sup>
	CONV	1,083 ± 0,035 <sup>b</sup>	1,354 ± 0,146 <sup>a</sup>
12	ORG	1,362 ± 0,029 <sup>a</sup>	1,694 ± 0,135 <sup>a</sup>
	CONV	1,162 ± 0,002 <sup>b</sup>	1,248 ± 0,004 <sup>a</sup>
16	ORG	1,359 ± 0,006 <sup>a</sup>	1,515 ± 0,132 <sup>a</sup>
	CONV	1,005 ± 0,103 <sup>a</sup>	1,127 ± 0,162 <sup>a</sup>
24	ORG	1,219 ± 0,114 <sup>a</sup>	1,516 ± 0,058 <sup>a</sup>
	CONV	0,904 ± 0,031 <sup>a</sup>	1,128 ± 0,205 <sup>a</sup>
48	ORG	1,100 ± 0,023 <sup>a</sup>	1,018 ± 0,329 <sup>a</sup>
	CONV	0,843 ± 0,056 <sup>b</sup>	0,928 ± 0,091 <sup>a</sup>
Tempo (h)		Quercetina 3-O ramnosídeo (mg.mL <sup>-1</sup> )	Quercetina 3-D galactosídeo (mg.mL <sup>-1</sup> )
0	ORG	1,850.10 <sup>-4</sup> ± 0,136.10 <sup>-6</sup> a	1,287.10 <sup>-2</sup> ± 0,800.10 <sup>-4</sup> a
	CONV	3,420.10 <sup>-4</sup> ± 1,061.10 <sup>-4</sup> a	6,662.10 <sup>-3</sup> ± 1,072.10 <sup>-4</sup> b
4	ORG	1,861.10 <sup>-3</sup> ± 0,913.10 <sup>-5</sup> a	1,405.10 <sup>-2</sup> ± 0,226.10 <sup>-4</sup> a
	CONV	3,390.10 <sup>-4</sup> ± 0,756.10 <sup>-5</sup> b	6,308.10 <sup>-3</sup> ± 0,726.10 <sup>-4</sup> b
8	ORG	2,325.10 <sup>-3</sup> ± 0,279.10 <sup>-5</sup> a	1,452.10 <sup>-2</sup> ± 0,110.10 <sup>-4</sup> a
	CONV	9,810.10 <sup>-4</sup> ± 0,281.10 <sup>-5</sup> b	5,804.10 <sup>-3</sup> ± 0,450.10 <sup>-4</sup> b
12	ORG	2,400.10 <sup>-3</sup> ± 0,143.10 <sup>-6</sup> a	1,189.10 <sup>-2</sup> ± 0,383.10 <sup>-5</sup> a
	CONV	1,312.10 <sup>-3</sup> ± 1,605.10 <sup>-7</sup> b	5,296.10 <sup>-3</sup> ± 0,311.10 <sup>-4</sup> b
16	ORG	2,450.10 <sup>-3</sup> ± 0,259.10 <sup>-5</sup> a	1,147.10 <sup>-2</sup> ± 0,330.10 <sup>-5</sup> a
	CONV	1,222.10 <sup>-3</sup> ± 0,286.10 <sup>-5</sup> b	5,986.10 <sup>-3</sup> ± 0,135.10 <sup>-4</sup> b
24	ORG	3,186.10 <sup>-3</sup> ± 0,361.10 <sup>-5</sup> a	1,002.10 <sup>-2</sup> ± 0,810.10 <sup>-5</sup> a
	CONV	1,477.10 <sup>-3</sup> ± 0,172.10 <sup>-4</sup> b	4,471.10 <sup>-3</sup> ± 0,445.10 <sup>-4</sup> b
48	ORG	3,938.10 <sup>-3</sup> ± 0,336.10 <sup>-5</sup> a	7,144.10 <sup>-3</sup> ± 0,430.10 <sup>-5</sup> a
	CONV	1,574.10 <sup>-3</sup> ± 0,198.10 <sup>-5</sup> b	3,449.10 <sup>-3</sup> ± 0,727.10 <sup>-4</sup> b

Compostos fenólicos totais em mg de EAG por mL de fermentado; DPPH (Atividade antioxidante) em mg de trolox por mL de fermentado, quercetina ramnosídeo em mg de quercetina 3-O ramnosídeo por mL de fermentado e quercetina galactosídeo em mg de quercetina 3-O galactosídeo por mL de fermentado. Fermentação com a levedura *S. boulardii*.

\*Letras iguais na mesma coluna, para cada tempo, são iguais a 5% de significância.

**Figura 2** - Atividade antioxidante vs tempo de fermentação para fermentado de polpa de maçã orgânica e convencional.



ORG: fermentado de polpa de maçã orgânica; CONV: fermentado de polpa de maçã convencional. Fermentação com a levedura *S. boulardii*.  
Atividade antioxidante determinada pelo sequestro do radical DPPH\*

As diferenças encontradas entre os dois substratos, devem-se provavelmente, ao tratamento empregado durante o cultivo dos frutos. Em maçãs orgânicas não são aplicados fertilizantes e pesticidas, que defendem artificialmente a planta. Isto propicia maior produção de compostos fenólicos, funcionando como defesa natural das plantas orgânicas (SOLEAS et al., 1997).

A queda do teor de compostos fenólicos e, por consequência, da atividade antioxidante durante a SFS em ambas as polpas de maçã vai de acordo com o encontrado por Zardo et al. (2008). Segundo estes autores, a queda ocorreu após 9 horas de fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* em mostos de três diferentes cultivares de maçã, incluindo a 'Fuji'. Ainda de acordo com os mesmos autores, as principais perdas de compostos fenólicos e de atividade antioxidante ocorreram pela oxidação destes compostos na presença do ar.

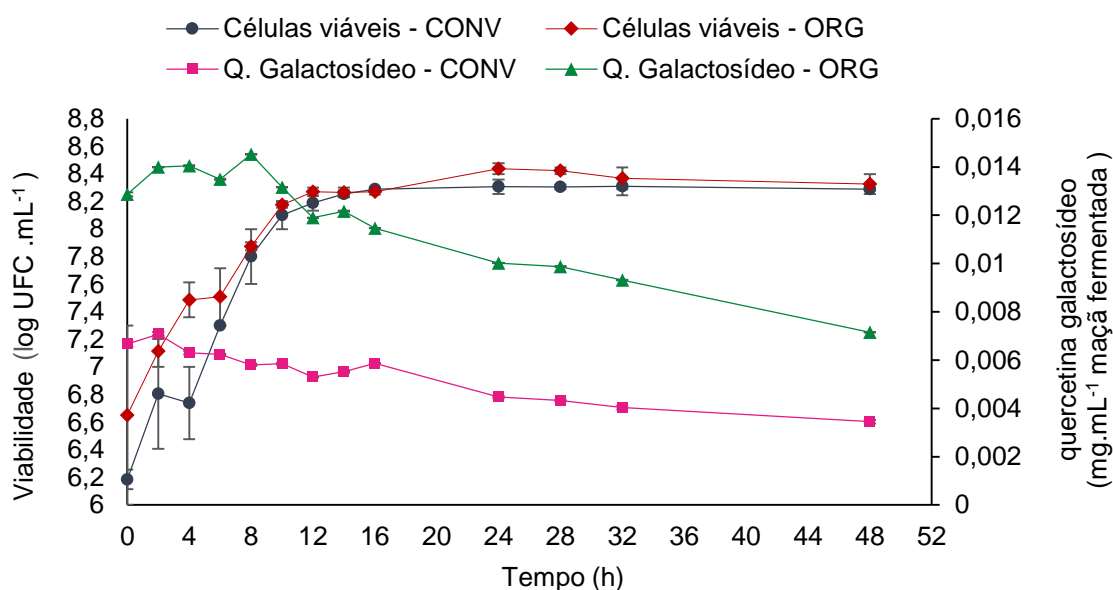
Enzimas pectinolíticas e celulolíticas utilizadas para liquefação da polpa resultam em sucos com maiores teores de fenóis (SCHIEBER et al., 2003). Com o rompimento da integridade celular, em decorrência do processamento para obtenção da polpa de maçã, os compostos fenólicos são transferidos dos vacúolos para o suco, promovendo, conseqüentemente, a liberação do conteúdo fenólico (LE

BOURVELLEC; GUYOT; RENARD, 2009). Porém, perdas destes componentes no processo fermentativo em presença de oxigênio podem ocorrer devido à sua fácil oxidação (SATORA et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2008). Este fato explica o comportamento do teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante durante este estudo. No início do processamento, quando, provavelmente, as enzimas agiram na quebra da pectina e celulose, a concentração de compostos fenólicos apresentou certo aumento, mantendo-se, porém, praticamente inalterada. Em contrapartida, após 12 horas de fermentação, provavelmente, a oxidação do conteúdo fenólico foi maior, o que acabou ocasionando a queda da concentração.

O ácido ascórbico, adicionado no momento da trituração dos frutos, atuou sequestrando o grupo prostético da polifenoloxidase, reduzindo, conseqüentemente, a oxidação dos compostos fenólicos durante a trituração da maçã para geração de polpa. Porém, segundo Son, Moon e Lee (2001), o poder de redução do ácido ascórbico pode ser perdido alguns minutos após sua adição e, permitir que se inicie a oxidação. Sendo assim, o conteúdo adicionado de ácido ascórbico, talvez não tenha sido efetivo em frear a oxidação mediada pela presença do oxigênio atmosférico durante a agitação provocada no biorreator, que foi conduzida para melhor incorporação de ar para aumentar a concentração de biomassa da levedura.

A Figura 3, cuja representação gráfica mostra maior queda na concentração de quercetina 3-D galactosídeo após 10 horas da SFS, está de acordo com o observado nas Figuras 1 e 2. Após 8 horas de fermentação, a queda na concentração foi bastante pronunciada (Figura 3).

**Figura 3** - Concentração de quercetina 3-D galactosídeo vs tempo de fermentação, para fermentado de polpa de maçã orgânica e convencional.



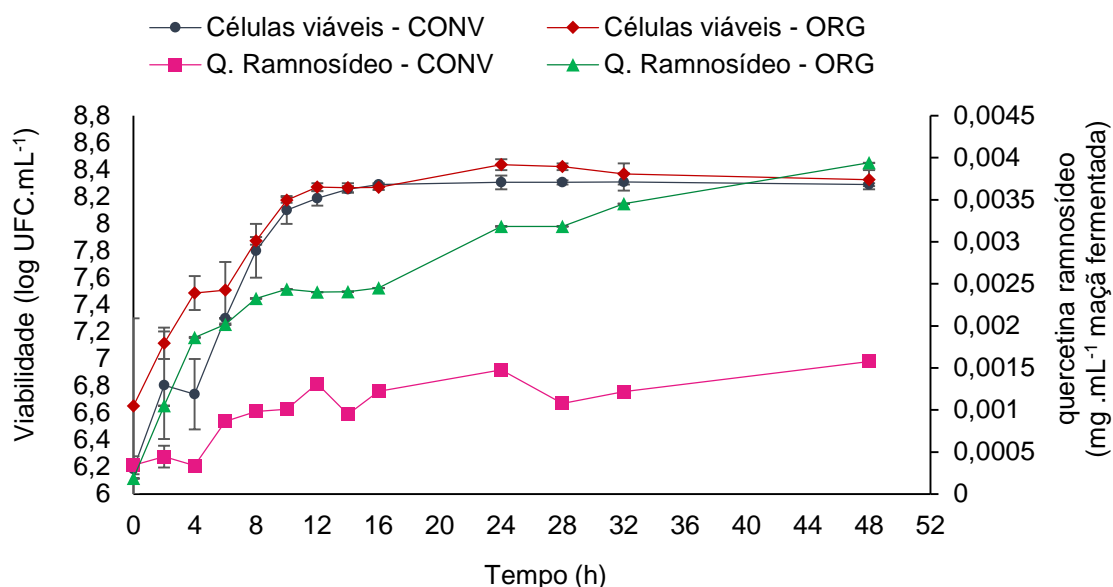
ORG: fermentado de polpa de maçã orgânica; CONV: fermentado de polpa de maçã convencional. Fermentação com a levedura *S. boulardii*.

A quercetina, flavonol mais comum em frutos, em geral é encontrada conjugada com carboidratos, na forma glicosilada. A absorção, metabolismo e efeito biológico dos diferentes flavonóis e flavonóis-conjugados variam muito, dependendo da presença, ausência e/ou da natureza da estrutura glicosídica (CUYCKENS; CLAYES, 2005).

Quercetina 3-D galactosídeo, é forma glicosilada de quercetina que apresenta maior concentração em maçã (SCHIEBER et al., 2002). Para Tsao et al. (2003), a concentração de quercetina 3 - galactosídeo foi superior à quercetina 3-ramnosídeo em 7 das 8 variedades de maçãs analisadas, exceto para a “Northern Spy”. Em média, o teor de quercetina 3 - ramnosídeo correspondeu a 3,5%, enquanto a quercetina 3 - galactosídeo, 5,2% do teor total de fenólicos.

A curva de concentração da quercetina 3 - O ramnosídeo ao longo as 48 horas de SFS (Figura 4) revelou aumento gradativo para ambos os substratos de maçã, diferentemente do ocorrido com a outra forma glicosilada. Isso mostra que possivelmente este glicosídeo foi sintetizado ao longo da fermentação. O fermentado de polpa de maçã orgânica apresentou concentração de  $3,938.10^{-1} \pm 0,336.10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>, enquanto a convencional,  $1,574.10^{-3} \pm 0,198.10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup> (tempo 48 h) (Tabela 1).

**Figura 4** - Concentração de quercetina 3-O ramnosídeo vs tempo de fermentação, para fermentado de polpa de maçã orgânica e convencional.



ORG: fermentado de polpa de maçã orgânica; CONV: fermentado de polpa de maçã convencional. Fermentado com a *S. boulardii*.

A quercetina 3-O ramnosídeo possui potencial antimicrobiano e também capacidade de bloquear a replicação de vírus da gripe, em relação aos demais glicosídeos (CHOI et al., 2009; TATSIMO et al., 2012).

O aumento do glicosídeo ramnosídeo e a queda do glicosídeo galactosídeo, também podem estar relacionados com a bioconversão de um glicosídeo à outro (OKA; JIGAMI, 2006; CHUNG et al., 2011). Entretanto o aumento do teor de quercetina 3-O ramnosídeo não pode ser de fato comprovado por esta conversão, já que pesquisas mais aprofundadas não foram aqui aplicadas.

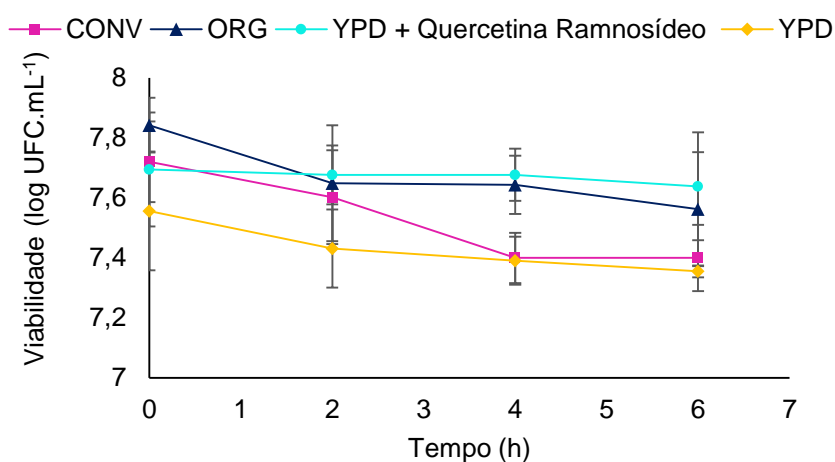
Com a conversão de um glicosídeo em outro, um aumento no teor de determinadas quercetinas ocorre. A biocatálise e biotransformação de flavonoides modificam sua estrutura e aumentam a diversidade dos flavonoides naturais, alterando as propriedades físico-químicas e biológicas (WANG et al., 2010).

## 3.2 Estresse Oxidativo

### 3.2.1 Resistência ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O número de células de *S. boulardii*, na presença de 1,5 mM de peróxido de hidrogênio, variou nos tratamentos analisados, com exceção do YPD + quercetina ramnosídeo (Figura 5). Os dados mostraram que a levedura foi resistente ao peróxido de hidrogênio, pois manteve-se, ao longo das 6 horas, com mesma população viável. Entretanto, o tratamento em caldo YPD teve menor resistência, quando comparado com os demais. Isso pode ter ocorrido pela capacidade da quercetina, ausente apenas no meio de cultivo YPD, em reduzir a oxidação mediada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Figura 5** - Sobrevivência da *S. boulardii* em presença de 1,5 mM de peróxido de hidrogênio, durante período de incubação de 6 horas.



\*CONV: polpa de maçã convencional; ORG: polpa de maçã orgânica; YPD + Quercetina ramnosídeo: extrato de levedura (1%), peptona bacteriológica (2%), dextrose (2%) e 0,1 mg de quercetina ramnosídeo.mL<sup>-1</sup>; YPD: extrato de levedura (1%), peptona bacteriológica (2%) e dextrose (2%).

No presente estudo quando adicionou-se quercetina ramnosídeo ao meio YPD, a viabilidade de *S. boulardii* foi resistente à presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas 6 horas do estudo, ocorrendo um aumento de até 25% na viabilidade da levedura, comparado ao meio de cultivo ausente de quercetina. Belinha et al. (2007) também verificaram que a presença de quercetina reduz o estresse mediado pela presença de 1,5 mM de

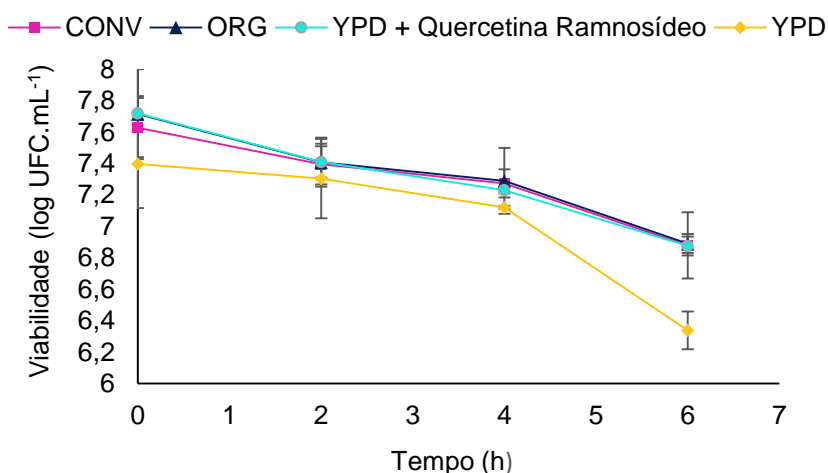
peróxido de hidrogênio em células de *S. cerevisiae*. A presença da quercetina, para estes autores, aumentou em até 40% a viabilidade celular da levedura.

Houve menor queda na viabilidade de *S. boulardii* fermentada em polpa de maçã orgânica do que em convencional, evidenciando, que a forma de cultivo orgânico gera maçãs com maiores teores de componentes fenólicos, sobretudo de quercetina.

### 3.2.2 Resistência ao radical hidroxila

O peróxido de hidrogênio tem toxicidade associada com a produção de radicais hidroxila extremamente reativos, catalisada por metais de transição, como ferro e cobre (PLÁTENÍK et al., 2001). A capacidade antioxidante dos flavonoides, incluindo a quercetina, tem sido atribuída à capacidade de ligação com esses metais, o que reduz a oxidação provocada por eles. Fica visível na Figura 6, uma queda na viabilidade celular da levedura principalmente após a quarta hora de incubação, sobretudo para o meio YPD, o qual não apresenta quercetina em sua composição.

**Figura 6** - Sobrevivência da *S. boulardii* em presença de radical hidroxila gerado pela presença de 1 mM de peróxido de hidrogênio, durante período de incubação de 6 horas.



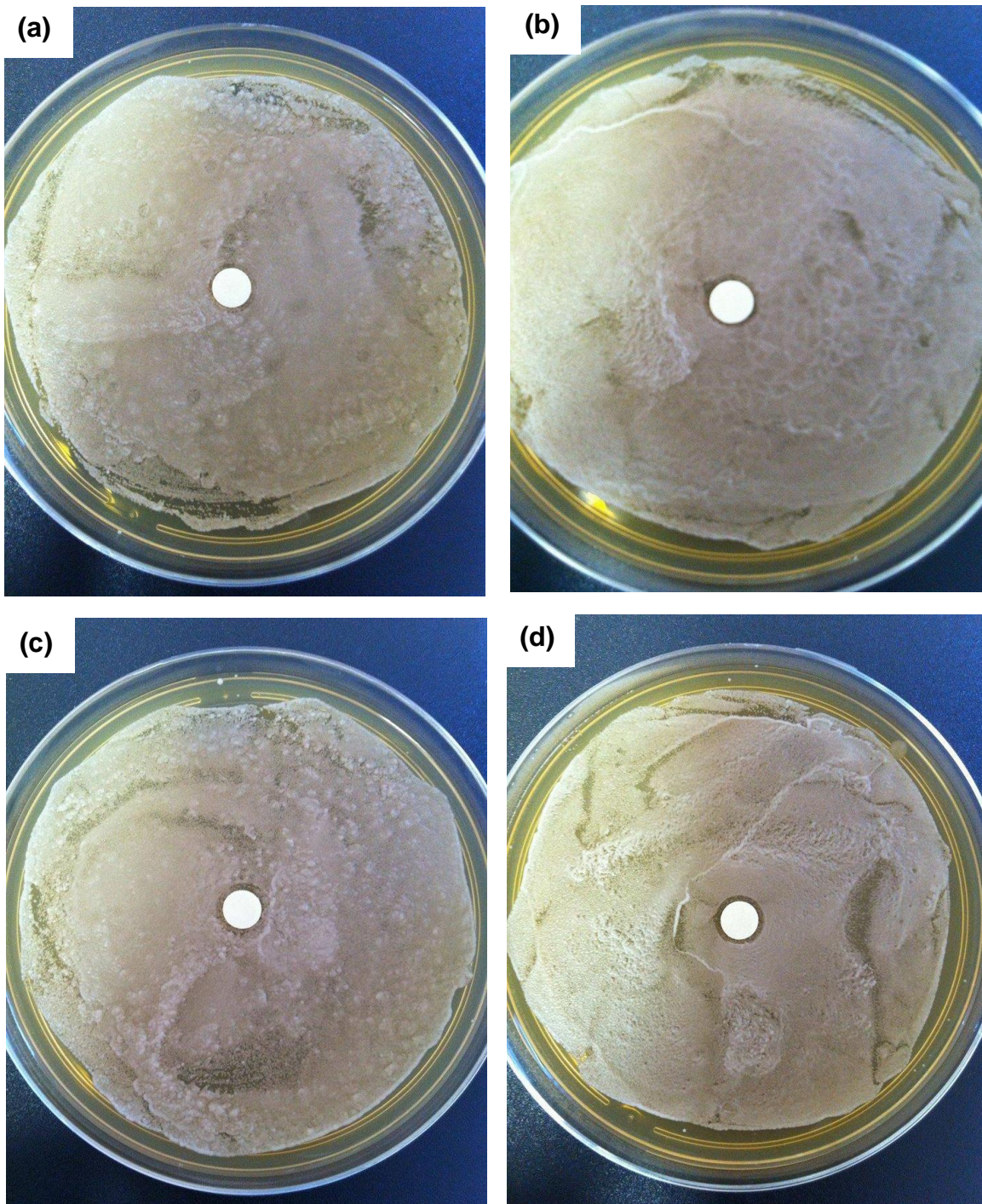
\*CONV: polpa de maçã convencional; ORG: polpa de maçã orgânica; YPD + Quercetina ramnosídeo: extrato de levedura (1%), peptona bacteriológica (2%), dextrose (2%) e 0,1 mg de quercetina rhmosíde.mL<sup>-1</sup>; YPD: extrato de levedura (1%), peptona bacteriológica (2%) e dextrose (2%).

### 3.2.3 Resistência ao ânion superóxido

. A presença de halo de inibição foi verificada nas Figuras 7 a, b e c, de 1 mm, as quais corresponderam, respectivamente, a placas semeadas com *S. boulardii*, cultivadas previamente em polpa de maçã orgânica, convencional e caldo YPD com 0,1 mg de quercetina ramnosídeo.mL<sup>-1</sup>. Houve crescimento de colônias no interior do halo. Na Figura 7d, também foi observada a formação de halo de inibição, porém de 1,5 mm, nas placas incubadas com *S. boulardii*, cultivadas previamente em caldo YPD

O crescimento de colônias no interior do halo mostrou que algumas células foram sensíveis e outras resistentes ao paraquat. Células de *S. boulardii* produzidas pela fermentação em polpa de maçã orgânica, podem ser consideradas resistentes, já que apresentou, visivelmente, maior número de colônias.

**Figura 7** - Semeadura de *S. boulardii* em placa com disco de inibição contendo 10  $\mu$ L de solução de paraquat a 10 mM. *S. boulardii* previamente fermentada em: (a) polpa de maçã orgânica; (b) polpa de maçã convencional; (c) YPD + Quercetina ramnosídeo; (d) YPD.



\*YPD + Quercetina ramnosídeo: extrato de levedura (1%), peptona (2%), dextrose (2%) e 0,1 mg de quercetina ramnosídeo mL<sup>-1</sup>; YPD: extrato de levedura (1%), peptona (2%) e dextrose (2%).

O estresse oxidativo em culturas na fase estacionária da levedura pode estar ligado ao maior acesso do oxigênio às células, pela redução do metabolismo. Em culturas na fase estacionária de crescimento, o metabolismo é consideravelmente atenuado, de modo que a concentração de oxigênio no interior das células pode ser mais elevada, o que as tornam mais passíveis de sofrerem oxidação mediada pela presença de radicais oxidantes (LONGO et al., 1999).

### 3.2.4 Glutaciona total, oxidada e reduzida

Na célula, a glutaciona encontra-se na forma reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e conjugada. Os níveis da GSH foram maiores em células de *S. boulardii* fermentada em YPD + quercetina ramnosídeo,  $0,353 \pm 0,038 \text{ mg.mL}^{-1}$ . O conteúdo de GSH, GSSG e GSH/GSSG, em *S. boulardii* cultivada em polpa de maçã orgânica e convencional, apresentam valores significativamente menores, mas há que ressaltar que foi maior em orgânica (Tabela 2).

**Tabela 2** - Conteúdo de glutaciona ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em células de *S. boulardii* cultivadas em polpa de maçã orgânica (ORG), convencional (CONV) e YPD com e sem a adição de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de quercetina ramnosídeo.

Tratamentos	TGSH	GSSG
ORG	$0,047 \pm 0,033^c$	$0,031 \pm 0,012^b$
CONV	$0,009 \pm 0,011^d$	$0,008 \pm 0,008^c$
YPD + quercetina ramnosídeo	$0,408 \pm 0,013^a$	$0,054 \pm 0,050^a$
YPD	$0,265 \pm 0,029^b$	$0,052 \pm 0,064^a$
Tratamentos	GSH	GSH/GSSG
ORG	$0,016 \pm 0,039^c$	$0,514 \pm 0,046^c$
CONV	$0,001 \pm 0,016^d$	$0,101 \pm 0,020^d$
YPD + quercetina ramnosídeo	$0,353 \pm 0,038^a$	$6,503 \pm 0,063^a$
YPD	$0,212 \pm 0,061^b$	$4,053 \pm 0,093^b$

TGSH – glutaciona total, GSSG – glutaciona oxidada, GSH – glutaciona reduzida; YPD + quercetina ramnosídeo: extrato de levedura (1%), peptona (2%), dextrose (2%) e  $0,1 \text{ mg}$  de quercetina ramnosídeo  $\text{m.L}^{-1}$ ; YPD: extrato de levedura (1%), peptona (2%) e dextrose (2%).

\*Letras iguais em mesma coluna, são iguais a um nível de 5% de significância.

A presença da quercetina reduziu, significativamente, a oxidação celular da *S. boulardii* (Tabela 2), pois, baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo (SCHAFER; BUETTNER, 2001). Todavia, as polpas de maçã, tanto orgânica quanto convencional, foram significativamente menos

efetivas, neste teste, ao serem comparadas com os demais tratamentos. A GSH exerce funções essenciais na célula, principalmente como cofator da família de enzimas glutathione peroxidases (GPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, causando sua oxidação (GSSG) (SIES, 1999).

A síntese de GSH associada à redução do GSSG, promove a manutenção do estado redox intracelular (GSH/GSSH) (BALLATORI et al., 2009). A relação GSH/GSSG, neste estudo, foi menor para as células cultivadas em polpa de maçã orgânica e convencional, o que vai contra os demais resultados referentes ao estresse oxidativo. Talvez alguns metabólitos gerados durante a fermentação em maçã, como ácidos orgânicos, tenham contribuído para o estresse celular, aumentando o número de glutathione oxidada. Porém, a relação foi maior em polpa de maçã orgânica que em convencional, revelando ter potencial redox maior, devido provavelmente à sua maior concentração de compostos fenólicos, incluindo a quercetina (Tabela1).

Este trabalho descreveu a geração do estresse oxidativo em células de *S. boulardii*. Diferentemente do ocorrido em outros estudos, que induziram a oxidação em *S. cerevisiae* (BELINHA et al., 2007; IZAWA, INOUE; KIMURA, 1995; COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001; JAKUBOWSKI; BILIŃSKI; BARTOSZ, 2000). A *S. boulardii* mostrou-se mais resistente quando exposta a condições estressantes, mesmo sem a presença de quercetina. Tal resistência está intimamente ligada a condições inatas, possibilitando-lhe, no trato gastrintestinal, proporcionar benefícios ao hospedeiro, por manter-se viável.

#### **4 Conclusão**

Durante a sacarificação e fermentação simultânea, a concentração de fenólicos totais, quercetina galactosídeo e antioxidantes aumentaram até entrada da *S. boulardii* em sua fase estacionária de multiplicação. Depois deste período, perdas no conteúdo fenólico, quercetina galactosídeo e atividade antioxidante, ocorreram, devido a reação de oxidação dos compostos fenólicos pela incorporação de oxigênio gerado pela agitação. Entretanto, o teor de quercetina ramnosídeo, aumentou durante às 48 horas de fermentação, provavelmente devido a possível biossíntese deste composto.

A *S. boulardii* foi resistente às espécies reativas de oxigênio, sobretudo na presença da quercetina ramnosídeo, durante a fermentação. A quercetina disponível em polpa de maçã orgânica e convencional, reduziram o estresse oxidativo mediado pelas ERO, devido sua ação antioxidante nas células da levedura, verificada através da viabilidade celular, o mesmo ocorreu em células cultivadas em meio YPD com quercetina ramnosídeo (sintética). A eficiência da quercetina mediante ao estresse também foi verificada pela alta concentração de GSH no tratamento onde se encontrava presente.

Estes resultados suportam que a quercetina, incluindo a encontrada em maçã, reduz o estresse oxidativo mediados pelas espécies reativas de oxigênio, devido sua ação antioxidante nas células de *S. boulardii*.

## 5 Referencias

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103–108, 1996.

BALLATORI, N.; KRANCE<sup>2</sup>, S. M.; NOTENBOOM, S.; SHI, S.; TIEU, K.; HAMMOND C. L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological Chemistry**, v. 390, n. 3, p. 191–214, 2009.

BELINHA, I.; AMORIM, M. A.; RODRIGUES, P.; DE FREITAS, V.; MORADAS-FERREIRA, P.; MATEUS, N.; COSTA, V. Quercetin Increases Oxidative Stress Resistance and Longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2446–2451, 2007.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 325–337, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BUCHMEIER, N.; BOSSIE, S.; CHEN, C-Y.; FANG, F. C.; GUINEY, D.; LIBBY, S. SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3725–3730, 1997.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29 p. 323–333, 2000.

CHOI, G. N.; KIM, J. H.; KWAK, J. H.; JEONG, Chang-Ho; JEONG, H. R.; LEE, U.; HEO, H. J. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. **Food Chemistry**, v. 132, p.1019–1024, 2012.

CHOI, H. J.; SONG, J. H.; PARK, K. S.; KWON, D. H. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 329–333, 2009.

CHUNG, D-M.; CHUNG, Y-C.; MAENG, P.J.; CHUN, H-K. Regioselective deglycosylation of onion quercetin glucosides by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 33, p.783–786, 2011.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 4–5, p. 217–246, 2001.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 3, p. 364–372, 2005.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, p. 3217–3266, 2013.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutrition and Cancer**, v. 20, n. 1, 1993.

IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 368, n. 1, p. 73-6, 10 July, 1995.

JAKUBOWSKI, W.; BILIŃSKI, T.; BARTOSZ, G. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 5, p. 659–664, 2000.

KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEMM, T.; ANNUK, H; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 215–224, 2002.

KUNWAR, A.; PRIYADARSINI, K. I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. **Journal of Medical e Allied Sciences**, v. 1, n. 2, p. 53–60, 2011.

LE BOURVELLEC, C.; GUYOT, S.; RENARD, C. M. G. C. Interactions between apple (*Malus domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 251–261. 2009.

LONGO, V. D.; LIOU, L. L.; VALENTINE, J. S.; GRALLA, E. B. Mitochondrial Superoxide Decreases Yeast Survival in Stationary Phase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 365, p.131–142, 1999.

McGHIE, T. K.; HUNT, M.; BARNETT, L. E. Cultivar and Growing Region Determine the Antioxidant Polyphenolic Concentration and Composition of Apples Grown in New Zealand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.3065–3070, 2005.

MOLINA, M. F.; SANCHEZ-REUS, I. IGLESIAS, I.; BENEDI, J. Quercetin a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 10, p. 1398–1402, 2003.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145–171, 2001.

NOGUEIRA, A.; GUYOT, S.; MARNET, N.; LEQUÉRE, J. M.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1025–1032. 2008.

NOGUEIRA, J. N.; SILVA, E. Efeito comparativo do calor, SO<sub>2</sub> e ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase e peroxidase de algumas frutas e hortaliças. **Analis da ESALQ**, Piracicaba, v.46, n.2, p. 453–471, 1989.

OKA, T.; JIGAMI, Y. Reconstruction of de novo pathway for synthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-xylose from intrinsic UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. **The FEBS Journal**, v. 273, p. 2645–2657, 2006.

PEREZ-VIZCAINO, F.; BISHOP-BAILLEY, D.; LODI, F.; DUARTE, J.; COGOLLUDO, A.; MORENO, L.; BOSCA, L.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, p. 919–925. 2006.

PLÁTENÍK, J.; STOPKA, P.; VEJRAŽKA, M.; ŠTIPEK, S. Quinolinic acid–iron(II) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the Fenton reaction. **Free Radical Research**, v. 34, p. 445–459, 2001.

ROGERIO, A. P.; DORA, C. L.; ANDRADE, E. L. CHAVES, J. S.; SILVA, K. F. C.; LEMOS-SENNA, E.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 288–297, 2010.

- SATORA, P.; TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A.; SROKA, P.; TUSZYŃSKI, T.; CZEPIELIK, M. Influence of Prefermentative Treatments and Fermentation on the Antioxidant and Volatile Profiles of Apple Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 11209–11217, 2009.
- SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191– 212, 2001.
- SCHIEBER, A.; HILT, P.; CARLE, R.; ENDREß, H.-U.; RENTSCHLER, C. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, n. 1, p. 99–107, 2003.
- SCHIEBER, A.; HILL, P.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; CARIE, R. Elution order of quercetin glycosides from apple pomace extracts on a new stationary phase with hydrophilic end capping. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 361–364, 2002.
- SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 916–921, 1999.
- SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 91–113, 1997.
- SON, S. M.; MOON, K. D.; LEE, C. Y. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. **Food Chemistry**, v. 73, p. 23–30, 2001.
- SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.63–69, 1959.
- TATSIMO, S. J. N.; TAMOKOU, J. D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; HOHMANN, J.; KUIATE, J.-R.; TANE, P. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from Bryophyllum pinnatum. **BMC Research Notes**, v. 5, p.158, 2012.
- TSAO, R.; YANG, R. J.; YOUNG, C.; ZHU, H. Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6347–6353, 2003.
- WANG, A.; ZHANG, F.; HUANG, L.; YIN, X.; LI, H.; WANG, Q.; ZENG, Z.; XIE, T. New progress in biocatalysis and biotransformation of Flavonoids. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n.10, p. 847–856, 2010.
- ZARDO, D. M.; ALBERTI, A.; DANTAS, A. P. C. GUYOT, S.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos e na Atividade antioxidante em fermentados de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 829–838, out./dez. 2008.

## CONCLUSÃO GERAL

Os dados obtidos na caracterização das polpas de maçã, apontaram que o sistema de cultivo, orgânico ou convencional, interferem significativamente nas características químicas e físicas dos frutos. A maçã orgânica apresentou maiores concentrações de sólidos solúveis, acidez, açúcares totais, proteínas, minerais, compostos fenólicos e quercetina.

O planejamento central composto com face centrada foi empregado com sucesso para otimizar e estudar o efeito individual e interativo de variáveis de processo, temperatura, concentração de pectinase e celulase, sob a resposta de concentração de células de *S. boulardii*. Não houve diferença significativa na produção de células da levedura quando o procedimento foi realizado em incubadora de bancada (*Shaker*) para polpa de maçã orgânica e convencional. Indicando que mesmo os frutos sendo significativamente diferentes em sua composição, estes não interferiram no desenvolvimento celular.

A produção de biomassa de levedura probiótica *S. boulardii* através da sacarificação e fermentação simultânea em condições submersas, em biorreator sob agitação de 500 rpm, foi significativamente diferente nos dois substratos testados, polpa de maçã orgânica e convencional.

Tanto a polpa de maçã orgânica quanto a convencional foram consideradas bons substratos para o cultivo dessa levedura, já que uma diversidade de nutrientes inatos à maçã contribuíram para produção de células. Mesmo em condições extremas de acidez a levedura conseguiu, se desenvolver em ambos substratos, e produzir quantidade suficiente de células para que o fermentado com *S. boulardii* pudesse ser considerado com ação probiótica.

Perdas na atividade antioxidante, ocorreram, devido a reação de oxidação dos compostos fenólicos pela incorporação de oxigênio gerado pela agitação, durante a fase estacionária da levedura. Entretanto, o teor de quercetina 3-O ramnosídeo, aumentou ao longo do tempo, provavelmente devido a uma biossíntese ou pela bioconversão de alguma das formas glicosiladas de quercetina.

A *S. boulardii* foi resistente às espécies reativas de oxigênio, sobretudo na presença da quercetina, durante a fermentação. A quercetina disponível em polpa de maçã orgânica e convencional, tanto quanto na forma de pó sintético adquirido comercialmente, reduziram o estresse oxidativo mediado pelas ERO, devido

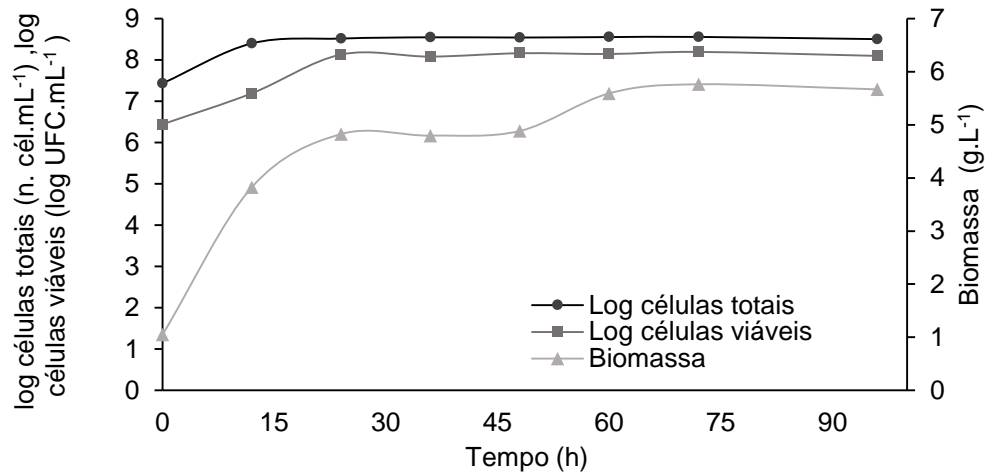
sua ação antioxidante nas células da levedura, verificada através da viabilidade. A eficiência da quercetina mediante ao estresse também foi verificada pela alta concentração de GSH no tratamento onde se encontrava presente.

Estes resultados reportam que as maçãs orgânicas e convencionais, apesar de terem composições diferentes e produzirem diferentes concentrações de biomassa, possuem quantidade de compostos fenólicos, sobretudo de quercetina, suficiente para que reduzam a oxidação mediada por radicais livres. Entretanto estudos futuros poderão ser realizados a fim utilizar a polpa de maçã na produção de biomassa probiótica com o objetivo de criar um novo produto. Podendo este ser seco ou liofilizado, o qual terá características funcionais bastante definidas, pela presença do probiótico e antioxidantes, além de outras características nutritivas inatas aos frutos.

**ANEXOS**

**ANEXO 1** - Curvas de crescimento da *S. boulardii* em meio YPD (pré inóculo) e em polpa de maçã orgânica e convencional (inóculo).

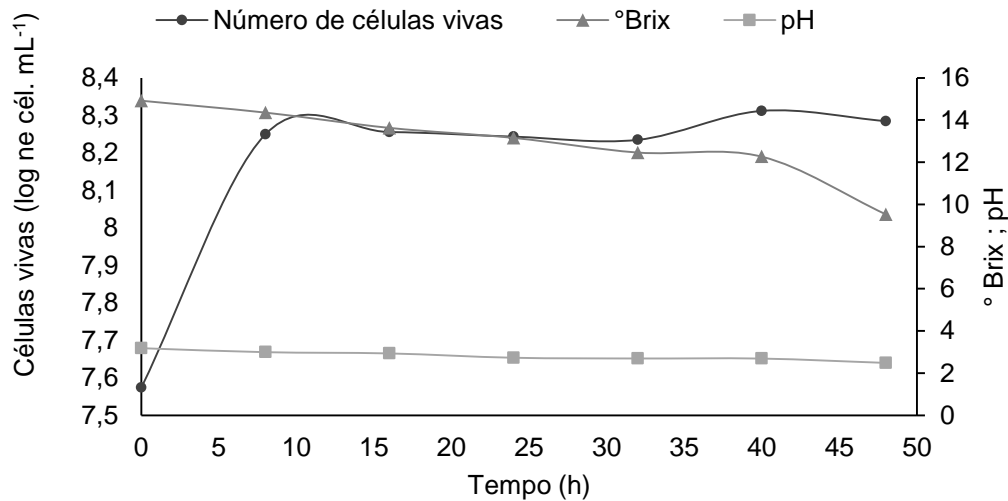
- Curva crescimento *S. boulardii* em YPD



\*Dados de médias a partir de triplicada dos valores;

Células totais em câmara de Neubauer, sem uso de corante azul de tripan;  
Células viáveis em placas (YPD ágar).

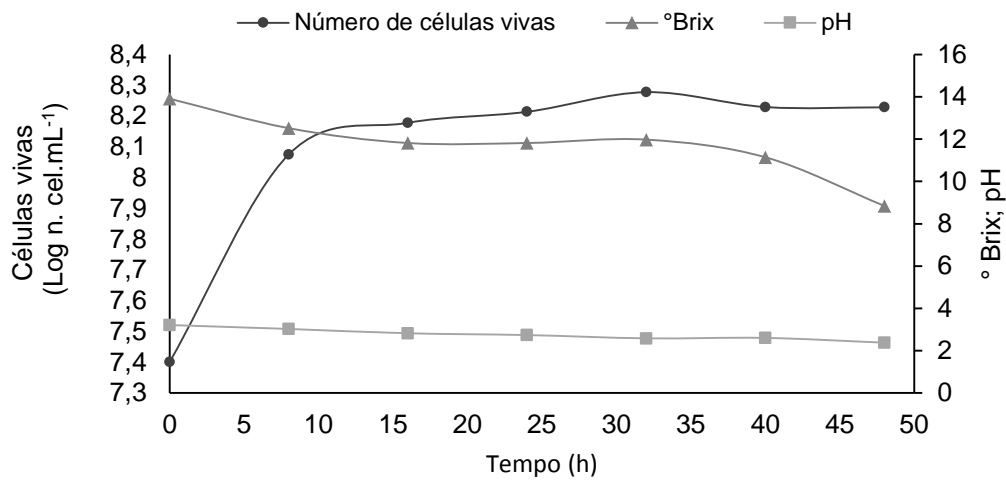
- Curva crescimento *S. boulardii* em polpa de maçã orgânica



\*Dados de médias a partir de triplicada dos valores;

Células vivas em câmara de Neubauer, com uso de corante azul de tripan;  
Células viáveis em placas (YPD ágar).

- Curva crescimento *S. boulardii* em polpa de maçã convencional



\*Dados de médias a partir de triplicada dos valores;  
 Células vivas em câmara de Neubauer, com uso de corante azul de tripan;  
 Células viáveis em placas (YPD ágar).

**ANEXO 2 - Teste Tukey – Valores médios para compostos fenólicos, antioxidação (DPPH), quercetina ramnosídeo e galactosídeo, no fermentado de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV).**

Tempo (h)		Compostos fenólicos totais (mg.mL <sup>-1</sup> )	DPPH (mg.mL <sup>-1</sup> )	Quercetina 3-O ramnosídeo (mg.mL <sup>-1</sup> )	Quercetina 3-D galactosídeo (mg.mL <sup>-1</sup> )
0	ORG	1,128 <sup>a</sup>	1,545 <sup>a</sup>	0,185 x10 <sup>-3 a</sup>	1,287 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	0,942 <sup>b</sup>	1,273 <sup>a</sup>	0,342 x10 <sup>-3 a</sup>	6,662 x10 <sup>-3 b</sup>
2	ORG	1,171 <sup>a</sup>	1,553 <sup>a</sup>	1,050 x10 <sup>-3 a</sup>	1,399 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	1,044 <sup>b</sup>	1,282 <sup>a</sup>	0,445 x10 <sup>-3 a</sup>	7,063 x10 <sup>-3 b</sup>
4	ORG	1,150 <sup>a</sup>	1,614 <sup>a</sup>	1,861 x10 <sup>-3 a</sup>	1,405 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	1,049 <sup>b</sup>	1,292 <sup>a</sup>	0,339 x10 <sup>-3 b</sup>	6,308 x10 <sup>-3 b</sup>
6	ORG	1,206 <sup>a</sup>	1,632 <sup>a</sup>	2,018 x10 <sup>-3 a</sup>	1,349 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	1,055 <sup>a</sup>	1,309 <sup>a</sup>	0,865 x10 <sup>-3 b</sup>	6,233 x10 <sup>-3 b</sup>
8	ORG	1,256 <sup>a</sup>	1,684 <sup>a</sup>	2,325 x10 <sup>-3 a</sup>	1,452 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	1,083 <sup>b</sup>	1,354 <sup>a</sup>	0,981 x10 <sup>-3 b</sup>	5,804 x10 <sup>-3 b</sup>
10	ORG	1,292 <sup>a</sup>	1,691 <sup>a</sup>	2,435 x10 <sup>-3 a</sup>	1,316 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	1,139 <sup>a</sup>	1,339 <sup>a</sup>	1,009 x10 <sup>-3 b</sup>	5,856 x10 <sup>-3 b</sup>
12	ORG	1,362 <sup>a</sup>	1,694 <sup>a</sup>	2,400 x10 <sup>-3 a</sup>	1,189 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	1,162 <sup>b</sup>	1,248 <sup>a</sup>	1,312 x10 <sup>-3 b</sup>	5,296 x10 <sup>-3 b</sup>
14	ORG	1,292 <sup>a</sup>	1,526 <sup>a</sup>	2,407 x10 <sup>-3 a</sup>	1,217 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	1,138 <sup>a</sup>	1,219 <sup>a</sup>	0,946 x10 <sup>-3 b</sup>	5,522 x10 <sup>-3 b</sup>
16	ORG	1,359 <sup>a</sup>	1,515 <sup>a</sup>	2,450 x10 <sup>-3 a</sup>	1,147 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	1,005 <sup>a</sup>	1,127 <sup>a</sup>	1,222 x10 <sup>-3 b</sup>	5,986 x10 <sup>-3 b</sup>
24	ORG	1,219 <sup>a</sup>	1,516 <sup>a</sup>	3,186 x10 <sup>-3 a</sup>	1,002 x10 <sup>-2 a</sup>
	CONV	0,904 <sup>a</sup>	1,128 <sup>a</sup>	1,477 x10 <sup>-3 b</sup>	4,471 x10 <sup>-3 b</sup>
28	ORG	1,124 <sup>a</sup>	1,257 <sup>a</sup>	3,182 x10 <sup>-3 a</sup>	9,872 x10 <sup>-3 a</sup>
	CONV	0,887 <sup>a</sup>	1,018 <sup>a</sup>	1,076 x10 <sup>-3 b</sup>	4,321 x10 <sup>-3 b</sup>
32	ORG	1,108 <sup>a</sup>	1,147 <sup>a</sup>	3,453 x10 <sup>-3 a</sup>	9,316 x10 <sup>-3 a</sup>
	CONV	0,877 <sup>b</sup>	1,000 <sup>a</sup>	1,216 x10 <sup>-3 b</sup>	4,034 x10 <sup>-3 b</sup>
48	ORG	1,100 <sup>a</sup>	1,018 <sup>a</sup>	3,938 x10 <sup>-3 a</sup>	7,144 x10 <sup>-3 a</sup>
	CONV	0,843 <sup>b</sup>	0,928 <sup>a</sup>	1,574 x10 <sup>-3 b</sup>	3,449 x10 <sup>-3 b</sup>

Compostos fenólicos totais em mg de EAG por mL de fermentado; DPPH (Atividade antioxidante) em mg de trolox por mL de fermentado, quercetina ramnosídeo em mg de quercetina 3-O ramnosídeo por mL de fermentado e quercetina galactosídeo em mg de quercetina 3-O galactosídeo por mL de fermentado.

ORG: fermentado de polpa de maçã orgânica; CONV: fermentado de polpa de maçã convencional. Fermentado por *S. boulardii*.

\*Letras iguais na mesma coluna, para cada tempo, são iguais a 5% de significância.

**ANEXO 3 - Teste Tukey – Valores médios de ácidos orgânicos para fermentado de polpa de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV).**

Tempo (hora)		Ác. Acético (g.L <sup>-1</sup> )	Ác. Málico (g.L <sup>-1</sup> )	Ác. Succínico (g.L <sup>-1</sup> )	Ác. Cítrico (g.L <sup>-1</sup> )
0	CONV	0,965 <sup>a</sup>	1,370 <sup>b</sup>	0,109 <sup>a</sup>	0,016 <sup>a</sup>
	ORG	0,517 <sup>b</sup>	1,890 <sup>a</sup>	0,023 <sup>b</sup>	0,011 <sup>a</sup>
2	CONV	1,020 <sup>a</sup>	1,280 <sup>b</sup>	0,106 <sup>a</sup>	0,016 <sup>a</sup>
	ORG	1,150 <sup>a</sup>	1,930 <sup>a</sup>	0,089 <sup>a</sup>	0,014 <sup>a</sup>
4	CONV	1,420 <sup>a</sup>	1,580 <sup>a</sup>	0,135 <sup>a</sup>	0,020 <sup>a</sup>
	ORG	1,170 <sup>a</sup>	1,690 <sup>a</sup>	0,096 <sup>a</sup>	0,013 <sup>b</sup>
6	CONV	1,900 <sup>a</sup>	1,620 <sup>b</sup>	0,149 <sup>a</sup>	0,019 <sup>a</sup>
	ORG	1,520 <sup>a</sup>	1,920 <sup>a</sup>	0,124 <sup>a</sup>	0,015 <sup>a</sup>
8	CONV	2,160 <sup>a</sup>	1,450 <sup>b</sup>	0,162 <sup>a</sup>	0,019 <sup>a</sup>
	ORG	2,310 <sup>a</sup>	2,040 <sup>a</sup>	0,172 <sup>a</sup>	0,020 <sup>a</sup>
10	CONV	3,100 <sup>a</sup>	1,610 <sup>a</sup>	0,237 <sup>a</sup>	0,025 <sup>a</sup>
	ORG	2,080 <sup>b</sup>	1,780 <sup>a</sup>	0,166 <sup>b</sup>	0,017 <sup>b</sup>
12	CONV	2,980 <sup>a</sup>	1,310 <sup>b</sup>	0,219 <sup>a</sup>	0,023 <sup>a</sup>
	ORG	2,580 <sup>a</sup>	1,860 <sup>a</sup>	0,208 <sup>b</sup>	0,019 <sup>a</sup>
14	CONV	4,160 <sup>a</sup>	1,580 <sup>b</sup>	0,290 <sup>a</sup>	0,029 <sup>a</sup>
	ORG	3,130 <sup>b</sup>	2,160 <sup>b</sup>	0,288 <sup>a</sup>	0,024 <sup>a</sup>
16	CONV	5,180 <sup>a</sup>	1,740 <sup>b</sup>	0,365 <sup>a</sup>	0,035 <sup>b</sup>
	ORG	3,620 <sup>b</sup>	2,200 <sup>a</sup>	0,337 <sup>b</sup>	0,043 <sup>b</sup>
24	CONV	8,260 <sup>a</sup>	1,470 <sup>b</sup>	0,326 <sup>b</sup>	0,051 <sup>a</sup>
	ORG	5,040 <sup>b</sup>	2,210 <sup>a</sup>	0,534 <sup>a</sup>	0,034 <sup>b</sup>
28	CONV	8,570 <sup>a</sup>	1,390 <sup>b</sup>	0,388 <sup>b</sup>	0,051 <sup>a</sup>
	ORG	5,060 <sup>b</sup>	2,060 <sup>a</sup>	0,565 <sup>a</sup>	0,036 <sup>b</sup>
32	CONV	10,500 <sup>a</sup>	1,600 <sup>b</sup>	0,570 <sup>b</sup>	0,062 <sup>a</sup>
	ORG	6,010 <sup>b</sup>	2,170 <sup>a</sup>	0,687 <sup>a</sup>	0,043 <sup>b</sup>
48	CONV	15,000 <sup>a</sup>	1,400 <sup>b</sup>	0,548 <sup>b</sup>	0,092 <sup>a</sup>
	ORG	6,860 <sup>b</sup>	2,260 <sup>a</sup>	1,020 <sup>a</sup>	0,067 <sup>b</sup>

ORG: fermentado de polpa de maçã orgânica; CONV: fermentado de polpa de maçã convencional. Fermentado por *S. boulardii*.

\*Letras iguais na mesma coluna, para cada tempo, são iguais a 5% de significância.

**ANEXO 4** - Teste de Tukey - valores médios de sacarose, glicose e frutose, para fermentado de polpa de maçã orgânica (ORG) e convencional (CONV).

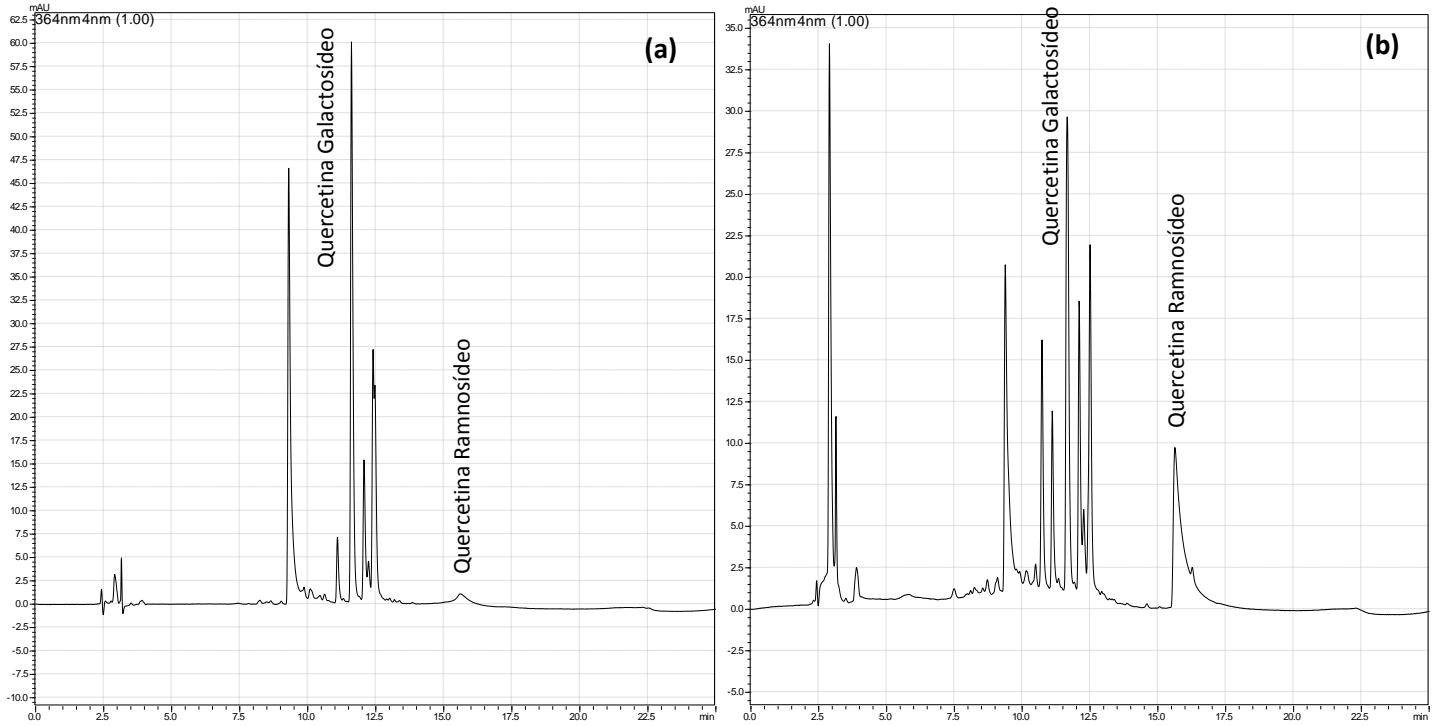
Tempo (hora)		Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	Glicose (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	Frutose (g.L <sup>-1</sup> )
0	CONV	21,050 <sup>b</sup>	17,800 <sup>a</sup>	113,250 <sup>a</sup>
	ORG	31,700 <sup>a</sup>	17,650 <sup>a</sup>	109,250 <sup>a</sup>
2	CONV	18,750 <sup>a</sup>	17,600 <sup>a</sup>	123,850 <sup>a</sup>
	ORG	19,850 <sup>a</sup>	15,750 <sup>b</sup>	112,700 <sup>b</sup>
4	CONV	20,650 <sup>a</sup>	21,050 <sup>a</sup>	132,050 <sup>a</sup>
	ORG	11,500 <sup>b</sup>	14,700 <sup>b</sup>	96,200 <sup>b</sup>
6	CONV	18,800 <sup>a</sup>	19,950 <sup>a</sup>	134,950 <sup>a</sup>
	ORG	13,200 <sup>b</sup>	17,000 <sup>b</sup>	101,850 <sup>b</sup>
8	CONV	15,500 <sup>a</sup>	18,550 <sup>a</sup>	131,400 <sup>a</sup>
	ORG	13,300 <sup>b</sup>	17,450 <sup>b</sup>	112,700 <sup>a</sup>
10	CONV	14,300 <sup>a</sup>	18,700 <sup>a</sup>	125,350 <sup>a</sup>
	ORG	10,000 <sup>b</sup>	16,450 <sup>b</sup>	107,950 <sup>b</sup>
12	CONV	11,700 <sup>a</sup>	18,650 <sup>a</sup>	127,400 <sup>a</sup>
	ORG	8,850 <sup>b</sup>	16,700 <sup>b</sup>	108,100 <sup>b</sup>
14	CONV	12,450 <sup>a</sup>	17,900 <sup>a</sup>	119,750 <sup>a</sup>
	ORG	9,050 <sup>b</sup>	17,650 <sup>a</sup>	115,250 <sup>a</sup>
16	CONV	12,050 <sup>a</sup>	15,150 <sup>b</sup>	110,000 <sup>b</sup>
	ORG	7,600 <sup>b</sup>	17,750 <sup>a</sup>	118,850 <sup>a</sup>
24	CONV	10,400 <sup>a</sup>	16,400 <sup>a</sup>	115,200 <sup>a</sup>
	ORG	9,100 <sup>b</sup>	16,700 <sup>a</sup>	116,000 <sup>a</sup>
28	CONV	10,350 <sup>a</sup>	14,900 <sup>b</sup>	135,100 <sup>a</sup>
	ORG	7,350 <sup>b</sup>	15,650 <sup>a</sup>	116,700 <sup>b</sup>
32	CONV	9,800 <sup>a</sup>	14,550 <sup>b</sup>	145,100 <sup>a</sup>
	ORG	7,800 <sup>b</sup>	15,400 <sup>a</sup>	118,600 <sup>a</sup>
48	CONV	9,700 <sup>a</sup>	14,500 <sup>a</sup>	135,950 <sup>a</sup>
	ORG	6,200 <sup>b</sup>	13,300 <sup>b</sup>	119,050 <sup>b</sup>

ORG: fermentado de polpa de maçã orgânica; CONV: fermentado de polpa de maçã convencional. Fermentado por *S. boulardii*.

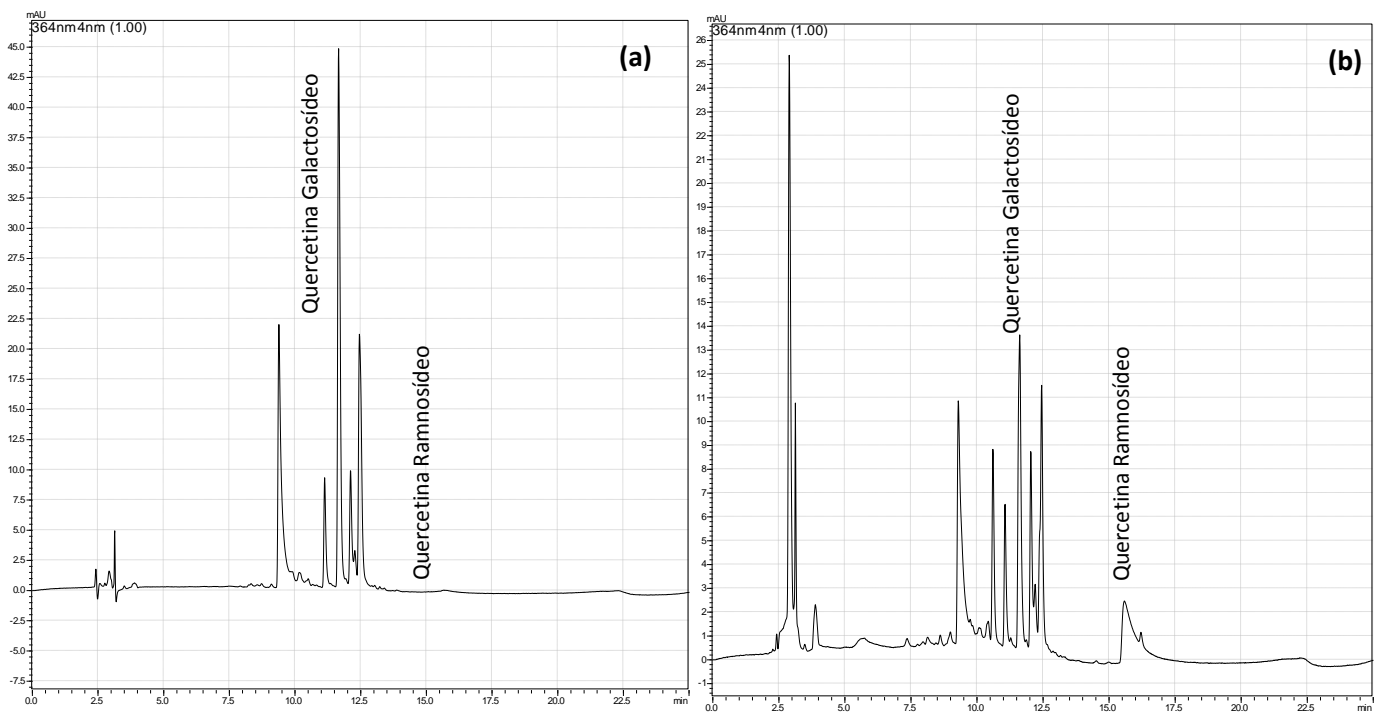
\*Letras iguais na mesma coluna, para cada tempo, são iguais a 5% de significância.

## ANEXO 5 - Cromatogramas de quercetina

- Amostra de maçã orgânica e (b) Amostra de maçã orgânica após 48h de fermentação.

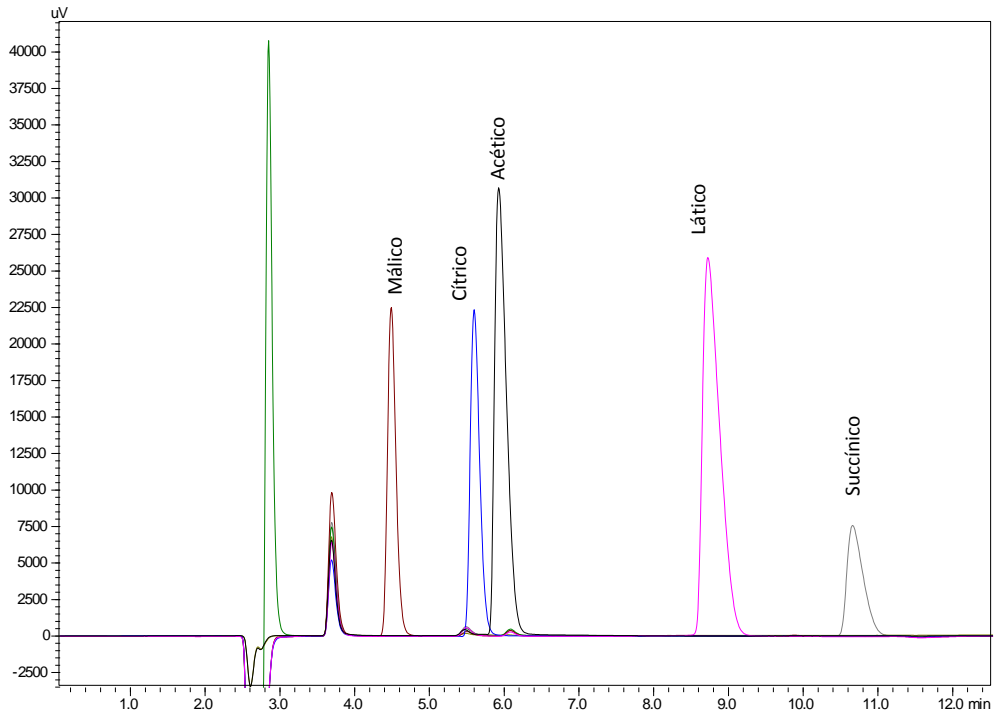


- Amostra de maçã convencional e (b) Amostra de maçã convencional após 48h de fermentação.

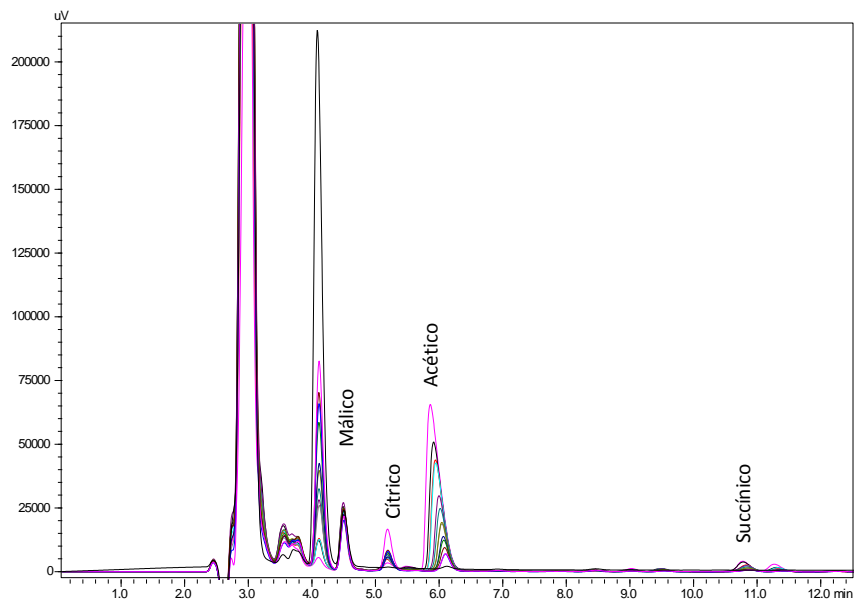


## ANEXO 6 - Cromatogramas ácidos orgânicos

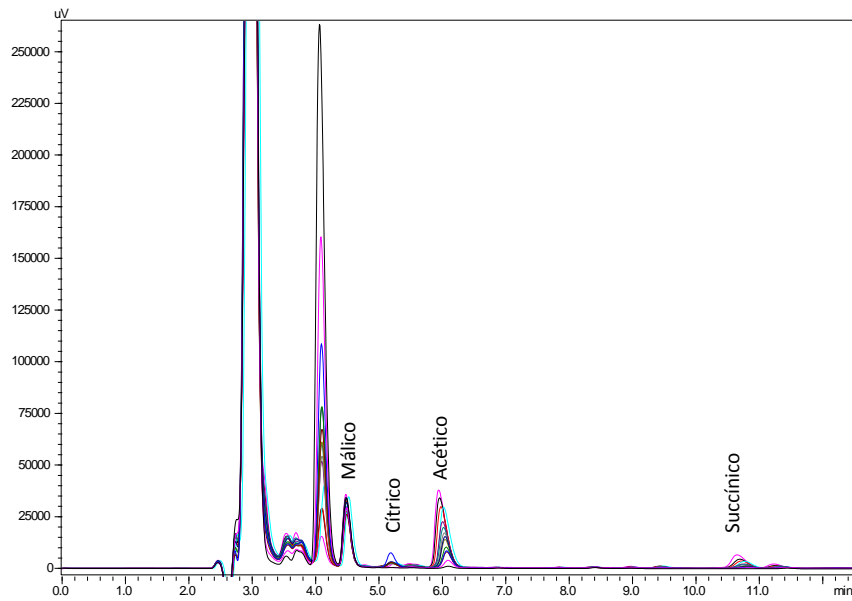
- Cromatograma dos padrões de ácidos orgânicos



- Região ampliada do cromatograma referente à análise de ácidos orgânicos das amostras de maçã convencional nos diferentes tempos de fermentação.

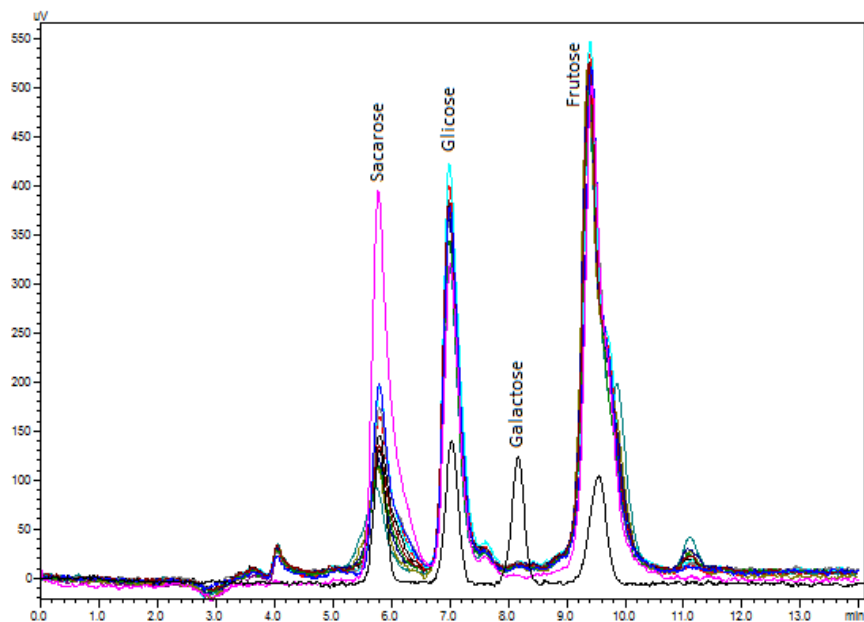


- Região ampliada do cromatograma referente à análise de ácidos orgânicos das amostras de maçã orgânica nos diferentes tempos de fermentação.

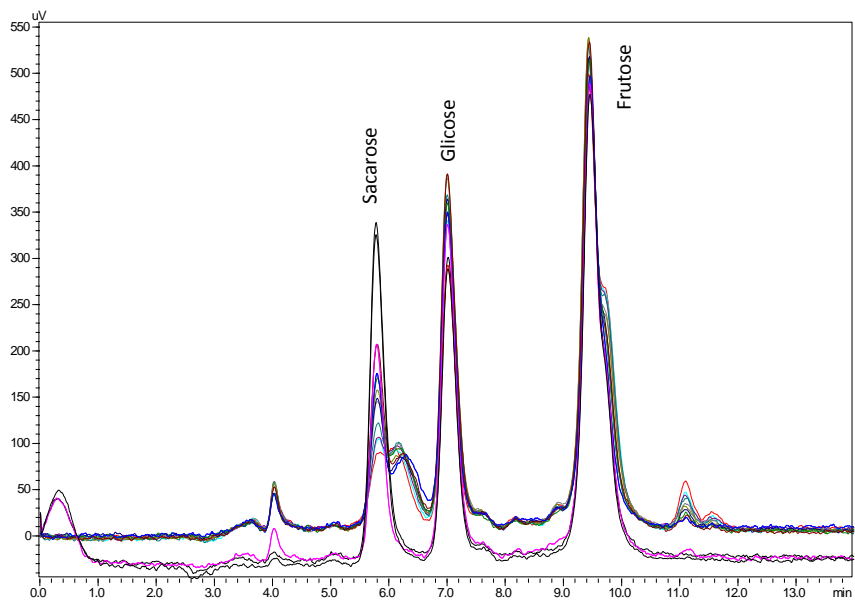


#### ANEXO 7 - Cromatogramas de carboidratos

- Sobreposição dos cromatogramas das amostras de maçã convencional referente à análise de carboidratos



- Sobreposição dos cromatogramas das amostras de maçã orgânica referente à análise de carboidratos



## ANEXO 8 - Ficha Técnica das enzimas Novozyme® 33095 e Celluclast® 1.5 L

### • Novozyme® 33095

Product Data Sheet



**novozymes®**

Rethink Tomorrow

1 of 2

Valid from 2012-02-14

## Novozym® 33095

In this product the key enzyme activity is provided by

pectin lyase catalyzing eliminative cleavage of (1,4)-alpha-D-galacturonan methyl ester giving oligosaccharides with 4-deoxy-6-O-methyl-alpha-D-galact-4-enuronosyl groups at their non-reducing ends

### PRODUCT CHARACTERISTICS/PROPERTIES

Declared enzyme	Pectin lyase
Declared activity	10000 PECTU/ml
Other activities	Polygalacturonase
Color	Brown
Physical form	Liquid
Approximate density (g/ml)	1.16
Odor	Slight fermentation odor
Solubility	Active component is readily soluble in water at all concentrations that occur in normal usage. Standardisation components can cause turbidity in solution.

*Color can vary from batch to batch. Color intensity is not an indication of enzyme activity.*

### PRODUCT SPECIFICATION

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Pectinase unit PECTU	10000		/ml
Total viable count		50000	/g
Coliform bacteria		30	/g
E. coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g
Heavy metals		Max 30	mg/kg
Lead		Max 5	mg/kg
Arsenic		Max 3	mg/kg
Cadmium		Max 0.5	mg/kg
Mercury		Max 0.5	mg/kg

### COMPOSITION

Ingredients	Appr. % (w/w)
Glycerol, CAS no. 56-81-5	49
Water, CAS no. 7732-18-5	42
Pectin lyase, CAS no. 9033-35-6*	5
Potassium chloride, CAS no. 7447-40-7	2
Polygalacturonase, CAS no. 9032-75-1*	2

\*Defined as enzyme conc. (dry matter basis)

No preservatives added

### ALLERGEN

Allergen	Substance contained <sup>1</sup>	Allergen	Substance contained <sup>1</sup>
Beef	no	Lactose	no
Carrot	no	Legumes	no
Celery	no	Lupin	no
Cereals containing gluten <sup>2</sup>	no	Milk	no
Chicken meat	no	Molluscs	no
Cocoa	no	Mustard	no
Coriander	no	Nuts <sup>3</sup>	no
Corn/maize	no	Peanuts	no
Crustaceans	no	Pork	no
Egg	no	Sesame	no
Fish	no	Soy	no
Glutamate	no	Sulphur dioxide/sulphites, more than 10 mg per kg or l	no

<sup>1</sup>Definition of substances according to LeDa/ALBA and EU Directives 2000/13/EC and 2007/68/EC, as amended

<sup>2</sup>i.e. wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut

<sup>3</sup>i.e. almond, hazelnut, walnut, cashew, pecan nut, Brazil nut, pistachio nut, macadamia nut and Queensland nut

### PRODUCTION ORGANISM

Production organism: *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*

Produced by fermentation of micro organisms. The enzyme protein is separated and purified from the production organisms.

### STORAGE CONDITION

**Recommended storage:** 0-10 °C (32-50 °F)

Packaging must be kept intact, dry, and away from sunlight. Please follow the recommendations and use the product before the best before date to avoid the need for a higher dosage.

**Best before:** You will find the best before date in the certificate of analysis or on the product label.

The product gives optimal performance when stored as recommended and used prior to the best-before date.

- Celluclast® 1.5 L

## Product Data Sheet



1 of 2

Valid from 2012-09-07

## Celluclast® 1.5 L

In this product the key enzyme activity is provided by cellulase that hydrolyzes (1,4)-beta-D-glucosidic linkages in cellulose and other beta-D-glucans

### PRODUCT CHARACTERISTICS/PROPERTIES

Declared enzyme	Cellulase
Declared activity	700 EGU/g
Color	Brown
Physical form	Liquid
Approximate density (g/ml)	1.22
Odor	Slight fermentation odor

*Color can vary from batch to batch. Color intensity is not an indication of enzyme activity.*

### PRODUCT SPECIFICATION

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Endoglucanase unit EGU	700		/g
Total viable count	-	10000	/g
Coliform bacteria	-	30	/g
E.coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g
Heavy metals		Max 30	mg/kg
Lead		Max 5	mg/kg
Arsenic		Max 3	mg/kg
Cadmium		Max 0.5	mg/kg
Mercury		Max 0.5	mg/kg

The enzyme analytical method is available from the Customer Center or sales representative.

### COMPOSITION

Preservatives	Potassium sorbate
Stabilizers	Sodium chloride Sorbitol

### ALLERGEN

Allergen	Substance contained <sup>1</sup>	Allergen	Substance contained <sup>1</sup>
Beef	no	Lactose	no
Carrot	no	Legumes	no
Celery	no	Lupin	no
Cereals containing gluten <sup>2</sup>	no	Milk	no
Chicken meat	no	Molluscs	no
Cocoa	no	Mustard	no
Coriander	no	Nuts <sup>3</sup>	no
Corn/maize	no	Peanuts	no
Crustaceans	no	Pork	no
Egg	no	Sesame	no
Fish	no	Soy	no
Glutamate	no	Sulphur dioxide/sulphites, more than 10 mg per kg or l	no

<sup>1</sup>Definition of substances according to LeDa/ALBA and EU Directives 2000/13/EC and 2007/68/EC, as amended

<sup>2</sup>i.e. wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut

<sup>3</sup>i.e. almond, hazelnut, walnut, cashew, pecan nut, Brazil nut, pistachio nut, macadamia nut and Queensland nut

### NUTRITIONAL VALUES

The product has a typical nutritional value of approximately 540 kJ/100 g enzyme product.

• Protein	14 g/100 g
• Polyols	30 g/100 g
• Organic acid	0 g/100 g
• Ash	5 g/100 g
- Sodium	(1.95 g/100 g)
• Moisture	51 g/100 g

### PRODUCTION ORGANISM

Production organism *Trichoderma reesei*

Produced by submerged fermentation of a micro organism. The enzyme protein is separated and purified from the production organism.

**ANEXO 9** - Certificação do IBD (Inspeções e Certificações Agropecuárias e Alimentícias) da fazenda produtora de maçã orgânica, localizada na cidade de Urupema – SC

19/05/2016

:: IBD - Relação de Clientes Certificados e Aprovados ::



**RELAÇÃO DE CLIENTES  
CERTIFICADOS E APROVADOS**

Matrícula: **SC 029**

Empresa: **Sítio Sabor da Serra**

Endereço: Geral Cedro, Sentido Urupema - Santa Izabel, Urupema / SC - 88625000 - Brasil

Telefone: +55 4932361316

**Contatos:**

Roque Roberto Gaio

Telefone: 049 32361316 E-mail: roquegaio@ibest.com.br

**Produto(s) e Diretriz(es):**

Batata Inglesa

Certificado(s): Lei 10.831

Maçã Catarina

Certificado(s): Lei 10.831

Maçã Fuji

Certificado(s): Lei 10.831

Maçã gala

Certificado(s): Lei 10.831

---

## ANEXO 10 - Ficha Técnica *Saccharomyces boulardii* – Bula medicamento Floratil - Merk®



### APRESENTAÇÕES

Cápsulas de gelatina.

Floratil® 100 mg - Embalagem contendo 12 cápsulas.

Floratil® 200 mg - Embalagem contendo 6 cápsulas.

### USO ORAL

#### USO ADULTO E PEDIÁTRICO

### COMPOSIÇÃO

#### Floratil® 100 mg

Cada cápsula contém 100 mg de *Saccharomyces boulardii* - 17 liofilizado (100 mg de liofilizado contém no mínimo  $0,5 \times 10^9$  células de *Saccharomyces boulardii* - 17) e excipientes (estearato de magnésio, lactose e sacarose).

#### Floratil® 200 mg

Cada cápsula contém 200 mg de *Saccharomyces boulardii* - 17 liofilizado (200 mg de liofilizado contém no mínimo  $1 \times 10^9$  células de *Saccharomyces boulardii* - 17) e excipientes (estearato de magnésio e lactose).

### INFORMAÇÕES AO PACIENTE

#### 1. PARA QUÊ ESTE MEDICAMENTO É INDICADO?

Floratil® está indicado como auxiliar na restauração da flora intestinal e também como auxiliar no tratamento de diarreias de diferentes causas.

#### 2. COMO ESTE MEDICAMENTO FUNCIONA?

A substância ativa do Floratil® é o *Saccharomyces boulardii*, um probiótico, ou seja, um microrganismo vivo que, quando administrado em quantidade adequada traz benefício para a sua saúde. Como função benéfica ao organismo, o *Saccharomyces boulardii* tem efeito sobre o equilíbrio bacteriano intestinal e sobre o controle de diarreias.

#### 3. QUANDO NÃO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?

Não são conhecidas, até o momento, condições que contraindiquem o uso de Floratil®, exceto se você tem alergia à substância ativa ou a qualquer um dos excipientes.

#### 4. O QUE DEVO SABER ANTES DE USAR ESTE MEDICAMENTO?

##### Advertências e precauções

O manuseio das cápsulas de Floratil® requer cuidados caso você esteja fazendo uso de cateter venoso central.

**Atenção diabéticos: contém açúcar (Floratil® 100 mg).**

**Gravidez e amamentação**

Este medicamento pode ser utilizado durante a gravidez desde que sob prescrição médica ou do cirurgião-dentista.

**Interações com alimentos, bebidas e outros medicamentos**

Não são conhecidas interações medicamentosas para o Floratil<sup>®</sup>, a não ser diminuição da sua ação quando é tomado juntamente com medicamentos para tratar micoses. Se você encontra-se sob tratamento com antibióticos ou quimioterápicos, ingerir Floratil<sup>®</sup> um pouco antes desses medicamentos. Não utilizar o produto junto com bebidas alcoólicas.

**Informe ao seu médico ou cirurgião-dentista se você está fazendo uso de algum outro medicamento.**

**Direção de veículos e operação de máquinas**

Você pode dirigir e lidar com máquinas normalmente durante tratamento com Floratil<sup>®</sup>.

**5. ONDE, COMO E POR QUANTO TEMPO POSSO GUARDAR ESTE MEDICAMENTO?**

Você deve conservar Floratil<sup>®</sup> em temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C), protegido da umidade, conservando as embalagens bem fechadas.

**Número de lote e datas de fabricação e validade: vide embalagem. Não use medicamento com o prazo de validade vencido. Guarde-o em sua embalagem original.**

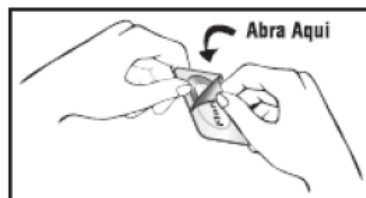
As cápsulas de Floratil<sup>®</sup> são opacas, de cor branca, com a inscrição “Merck 100 mg” (para as cápsulas com 100 mg) ou “Merck 200 mg” (para as cápsulas com 200 mg). O pó em seu interior tem aspecto granulado, de cor bege e odor característico.

**Antes de usar, observe o aspecto do medicamento. Caso ele esteja no prazo de validade e você observe alguma mudança no aspecto, consulte o farmacêutico para saber se poderá utilizá-lo.**

**Todo medicamento deve ser mantido fora do alcance das crianças.**

**6. COMO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?**

As cápsulas de Floratil<sup>®</sup> devem ser engolidas inteiras, sem mastigar, com um pouco de líquido. Para crianças pequenas ou pessoas com dificuldades de engolir, as cápsulas podem ser abertas, adicionando-se o conteúdo a mamadeiras e a pequenas quantidades de líquidos ou alimentos semissólidos. Não adicionar o produto a líquidos ou alimentos quentes (temperatura acima de 60°C) ou gelados, assim como a bebidas alcoólicas. Uma vez abertas as cápsulas, seu conteúdo deve ser imediatamente ingerido, pois o contato com o ar e a umidade altera o prazo de validade do produto. Floratil<sup>®</sup> deve ser tomado de preferência em jejum ou meia hora antes das refeições. Siga atentamente a instrução abaixo para a retirada da cápsula do blister. A forma correta de destacar o alumínio é puxar de acordo com o local da seta indicativa.



**Posologia****Floratil<sup>®</sup> 100 mg**

- Nas alterações agudas da flora intestinal e na diarreia por *Clostridium difficile*: duas cápsulas, duas vezes ao dia.
- Nas alterações crônicas da flora intestinal: uma cápsula duas vezes ao dia.

**Floratil<sup>®</sup> 200 mg**

- Nas alterações agudas da flora intestinal e na diarreia por *Clostridium difficile*: uma cápsula, duas vezes ao dia.
- Nas alterações crônicas da flora intestinal: uma cápsula uma vez ao dia.

A posologia de Floratil<sup>®</sup> pode ser alterada a critério médico. Na maioria dos casos, são suficientes dois a três dias de tratamento. Se os sintomas persistirem após cinco dias, procure o médico.

**Uso em idosos, crianças e outros grupos de risco**

Floratil<sup>®</sup> não é absorvido e pode ser utilizado por qualquer tipo de paciente.

**Siga corretamente o modo de usar. Em caso de dúvidas sobre este medicamento, procure orientação do farmacêutico. Não desaparecendo os sintomas, procure orientação de seu médico ou cirurgião-dentista.**

**7. O QUE DEVO FAZER QUANDO EU ME ESQUECER DE USAR ESTE MEDICAMENTO?**

Tome a dose seguinte na hora habitual. Não tome uma dose dobrada para compensar uma dose que se esqueceu de tomar.

**Em caso de dúvidas, procure orientação do farmacêutico ou de seu médico, ou cirurgião-dentista.**

**8. QUAIS OS MALES QUE ESTE MEDICAMENTO PODE ME CAUSAR?**

Até o momento não são conhecidas reações desagradáveis decorrentes do uso de Floratil<sup>®</sup>. Em algumas crianças ou recém-nascidos pode-se observar odor de fermento nas fezes, sem qualquer significado nocivo.

**Informe ao seu médico, cirurgião-dentista ou farmacêutico o aparecimento de reações indesejáveis pelo uso do medicamento. Informe também à empresa através do seu serviço de atendimento.**

**9. O QUE FAZER SE ALGUÉM USAR UMA QUANTIDADE MAIOR DO QUE A INDICADA DESTE MEDICAMENTO?**

Não são conhecidos sintomas provocados por uma dose excessiva de Floratil<sup>®</sup>.

**Em caso de uso de grande quantidade deste medicamento, procure rapidamente socorro médico e leve a embalagem ou bula do medicamento, se possível. Ligue para 0800 722 6001, se você precisar de mais orientações.**

**DIZERES LEGAIS**

M.S. 1.0089.0090

Farmacêutico Responsável: Alexandre Brasil Amaral dos Santos - CRF-RJ nº 6700

Importado por: **MERCK S.A.**

CNPJ 33.069.212/0001-84

Estrada dos Bandeirantes, 1099

Rio de Janeiro - RJ - CEP 22710-571

Indústria Brasileira

Fabricado e embalado por: Biocodex, Beauvais - França

**Siga corretamente o modo de usar, não desaparecendo os sintomas procure orientação médica.**