

MARCUS VINICIUS BASTOS DA SILVA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE O
CRESCIMENTO DE LEVEDURA ETANOLOGÊNICA (*Saccharomyces sp.*)
EM MEIO SINTÉTICO E EM CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae.***

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL**

2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586e
2013

Silva, Marcus Vinicius Bastos da, 1968-

Efeito da adição de compostos fenólicos sobre o crescimento de levedura etanolgênica (*Saccharomyces* sp.) em meio sintético e em caldo de cana-de-açúcar / Marcus Vinicius Bastos da Silva. – Viçosa, MG, 2013.
xv, 60 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-54.

1. Fermentação. 2. Fenóis. 3. Leveduras - Crescimento.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 663.13

MARCUS VINICIUS BASTOS DA SILVA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE O
CRESCIMENTO DE LEVEDURA ETANOLÓGICA (*Saccharomyces sp.*)
EM MEIO SINTÉTICO E EM CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.**

APROVADA: 06 de fevereiro de 2013.

Eduardo Basílio de Oliveira
(Co-orientador)

Luciano Gomes Fietto
(Co-orientador)

Vanessa Cristina de Castro

Paulo Henrique Alves da Silva
(Orientador)

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua
própria produção ou a sua construção”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido saúde, força, por me iluminar nos momentos difíceis e por ter guiado o meu caminho em busca deste objetivo.

À Universidade Federal de Viçosa e o Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade e apoio concedidos.

A minha esposa Cintia, meus filhos Marcus Vinicius e Matheus, meus pais Enéas e Joseny, minha tia Maria Olívia, meus sogros José Américo e Maria Severina, minhas avós, pela compreensão, amor, incentivo e pelo apoio incondicional para que eu conseguisse continuar nesta caminhada.

Ao professor Dr. Paulo Henrique por ter acreditado em mim, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, apoio e amizade.

Ao professor Dr. Luciano Gomes Fietto por ter disponibilizado o Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) com as instalações e equipamentos, pela orientação, apoio, ensinamentos, amizade, participação na banca examinadora e conselhos para o aprimoramento deste trabalho.

Ao professor Dr. Eduardo Basílio de Oliveira, pela orientação, apoio, ensinamentos, amizade, participação na banca examinadora, conselhos e grande conhecimento demonstrado sobre o assunto.

Aos professores Dr. Ézio e Dr. Márcio do departamento de Física por terem colaborado e disponibilizado os equipamentos para a realização de parte deste trabalho.

A professora Dra. Vanessa Cristina de Castro pela participação na banca examinadora.

Ao amigo Carlos, por ter colaborado e acompanhado grande parte deste trabalho, contribuindo com importantes e valiosas sugestões e críticas.

À Patrícia, Alexandre e Ariel, por grande auxílio nos experimentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioprocessos e Biomoléculas, pelos momentos de descontração, companheirismo e bom convívio: Alexandre, Ariel, Jussara, Brenda e Douglas. E também, aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular, pelo bom convívio e boa receptividade: Patrícia, Carlos, Murilo, Edgard, Mônica, Ananda, Glauco, Raphael e Silvana.

A secretária da pós-graduação, Maria Geralda, por sua agilidade, competência, paciência e atendendo a todos os alunos com muita atenção.

Às minhas avós Zeny, Teresa e Iracy, pelo carinho e orações.

A todos os meus amigos, que torceram por mim, pelo grande apoio e aqueles que contribuíram mesmo não sendo citados para o meu crescimento profissional e pessoal.

BIOGRAFIA

Marcus Vinicius Bastos da Silva, filho de Enéas Geraldo da Silva e Joseny Bastos da Silva, nasceu na cidade de Itaperuna, estado do Rio de Janeiro, em 26 agosto de 1968.

Em dezembro de 1986 concluiu o curso Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Alegre, atual Instituto Federal do Espírito Santo (IFES / Campus - Alegre).

Em março de 1994, ingressou no bacharelado em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, graduando-se em dezembro de 1998. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em março de 2010, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 06 de fevereiro de 2013.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Fermentação alcoólica	4
3.2. Principais produtos agroindustriais derivados da fermentação alcoólica ..	6
3.2.1. Cana-de-açúcar.....	8
3.3. Compostos fenólicos	11
3.3.1. Flavonóides	13
3.3.2. Não Flavonóides	15
3.4. Solubilidade dos compostos fenólicos.....	16
3.5. Caracterização bioquímica de <i>Saccharomyces sp</i>	20
3.6. Propriedades funcionais dos compostos fenólicos e sua influência na fermentação	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Obtenção e preparo das amostras de cana-de-açúcar e do meio YPS ..	24
4.2. Microrganismo e meios de cultura.....	25
4.3. Solubilização dos compostos fenólicos	25
4.3.1. Escolha do solvente	25
4.3.2. Preparo das soluções com o solvente selecionado.....	26
4.4. Avaliação do crescimento da levedura.....	27

4.4.1. Análise do crescimento com adição de solventes dos compostos fenólicos	27
4.4.2. Análise do crescimento com adição dos compostos fenólicos	28
4.4.3. Análise de crescimento e atividade fermentativa em mostos de caldo de cana-de-açúcar com adição de rutina	28
4.4.3.1. Método de análise do teor alcoólico	29
4.4.3.2. Determinação dos sólidos solúveis (expressos como °Brix)	30
4.4.3.3. Determinação da densidade ótica	30
4.4.4. Análise de crescimento em meio YPS.....	30
4.4.5. Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1. Avaliação do crescimento da levedura em diferentes solventes	32
5.2. Análise por microscopia ótica da solubilização dos compostos fenólicos em etanol	34
5.3. Avaliação de crescimento da levedura em meio YPD com adição dos compostos fenólicos.....	35
5.3.1. Influência dos compostos fenólicos em dispersão sobre o crescimento da levedura em meio YPD	35
5.3.1.1. Análise de densidade ótica do meio.....	35
5.3.1.2. Análise da velocidade específica de crescimento (μ).....	37
5.3.2. Influência dos compostos fenólicos em solubilização sobre o crescimento da levedura em meio YPD	38
5.3.3. Influência dos compostos fenólicos em solubilização sobre o crescimento da levedura em meio YPS	41
5.4. Avaliação do crescimento da levedura em caldo de cana-de-açúcar com e sem adição de rutina, expressos em densidade ótica e sólidos solúveis (°Brix)	42

6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência das reações enzimáticas pela fermentação alcoólica	5
Figura 2 - Esquema representativo da via metabólica dos compostos fenólicos.	11
Figura 3 - Estrutura química de base dos flavonoides.....	13
Figura 4 - Estrutura química da quercetina	14
Figura 5 - Estrutura química da rutina	14
Figura 6 - Estruturas químicas dos isômeros do resveratrol.....	15
Figura 7 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).....	16
Figura 8 - As estruturas das ligações de hidrogênio e pi-stacking dos isômeros de fenol com O ₂ (ligante - L).....	18
Figura 9 - Estrutura química dos ácidos carboxílicos largamente utilizados como conservantes	21
Figura 10 - Mecanismo de ação do ácido acético sobre a levedura (<i>S. cerevisiae</i>).....	22
Figura 11 - Curvas de crescimento da levedura em meio de crescimento com diferentes concentrações de solvente (etanol).....	31
Figura 12 - Curvas de crescimento da levedura em meio de crescimento com diferentes solventes (acetato de etila e metanol)	33
Figura 13 - As imagens de microscopia ótica (ampliação de 100 vezes) da solução de rutina em dispersão (a) e após solubilização (b)	34
Figura 14 - Curvas de crescimento da levedura com adição de compostos fenólicos (ácido ferúlico e quercetina) em dispersão em meio YPD.....	35

Figura 15 - Curvas de crescimento da levedura com adição de compostos fenólicos (resveratrol e rutina) em dispersão em meio YPD	36
Figura 16 - Curvas de crescimento da levedura com adição de compostos fenólicos (ácido ferúlico e quercetina) em solubilização em meio YPD.....	38
Figura 17 - Curvas de crescimento da levedura com adição de compostos fenólicos (resveratrol e rutina) em solubilização em meio YPD.....	39
Figura 18 - Curva de crescimento da levedura em meio YPS adicionado com e sem rutina.....	41
Figura 19 - Avaliação do crescimento da levedura em caldo de cana-de-açúcar com e sem adição de rutina, expresso em densidade ótica e sólidos solúveis (expressos como °Brix)	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do caldo de cana-de-açúcar	10
Tabela 2 - Solubilização dos compostos fenólicos com diferentes solventes .	19
Tabela 3 - Características chave das espécies do gênero <i>Saccharomyces</i>	20
Tabela 4 - Características fermentativas das espécies (<i>Saccharomyces</i>).....	21
Tabela 5 - Concentração final das células, estimadas por densidade ótica (D.O.), nas fermentações em meio YPD com compostos fenólicos	36
Tabela 6 - Velocidade de crescimento da linhagem de <i>Saccharomyces sp.</i> em meio YPD, acrescidos de diferentes concentrações de compostos fenólicos a 28°C	38
Tabela 7 - Concentração final das células, estimadas por densidade ótica (D.O.), nas fermentações em meio YPD com compostos fenólicos	40
Tabela 8 - Velocidade de crescimento da linhagem de <i>Saccharomyces sp.</i> em meio YPD, acrescidos de diferentes concentrações de compostos fenólicos a 28°C	41
Tabela 9 - Final das fermentações em caldos de cana-de-açúcar nas duas variedades com e sem adição de rutina (densidade ótica, brix e concentração de etanol)	42

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Análise de variância das médias das concentrações de ácido ferúlico com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).....	55
Anexo 2 - Análise de variância das médias das concentrações de quercetina com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).....	55
Anexo 3 - Análise de variância das médias das concentrações de resveratrol com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).....	55
Anexo 4 - Análise de variância das médias das concentrações de rutina com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	56
Anexo 5 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de ácido ferúlico em seis tratamentos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	56
Anexo 6 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de quercetina em seis tratamentos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).....	56
Anexo 7 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de resveratrol em seis tratamentos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	57
Anexo 8 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de rutina em seis tratamentos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	57
Anexo 9 - Análise de variância das médias das concentrações de ácido ferúlico com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$).....	57
Anexo 10 - Análise de variância das médias das concentrações de quercetina com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$).....	58
Anexo 11 - Análise de variância das médias das concentrações de resveratrol com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$).....	58
Anexo 12 - Análise de variância das médias das concentrações de rutina com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$).....	58

Anexo 13 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de ácido ferúlico em seis tratamentos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) ...	59
Anexo 14 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de quercetina em seis tratamentos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$).....	59
Anexo 15 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de resveratrol em seis tratamentos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$).....	59
Anexo 16 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de rutina em seis tratamentos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$).....	60

RESUMO

SILVA, Marcus Vinicius Bastos da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2013. **Efeito da adição de compostos fenólicos sobre o crescimento de levedura etanologênica (*Saccharomyces sp.*) em meio sintético e em caldo de cana-de-açúcar.** Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva. Co-orientadores: Eduardo Basílio de Oliveira e Luciano Gomes Fietto.

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito da adição de compostos fenólicos no crescimento e a atividade fermentativa de levedura etanologênica (*Saccharomyces sp.*) em meio sintético (YPD) e em caldos de duas variedades de cana-de-açúcar. A maior parte destes compostos é solúvel em solventes orgânicos, tais como metanol, etanol, acetato de etila e entre outros. Para solubilização dos compostos fenólicos adicionados, foram avaliados estes três solventes, quanto a sua influência no crescimento da levedura etanologênica em meio de crescimento YPD (2 % glicose) a 28°C. Dentre as concentrações 0, 2, 4, 8 e 16 % e os solventes analisados, o etanol com a concentração de 2 %, interferiu menos no crescimento da levedura etanologênica, sendo assim, selecionado para os demais ensaios. Utilizando-se este solvente selecionado foram realizados ensaios com os compostos fenólicos ácido ferúlico, quercetina, resveratrol e rutina adicionadas nas concentrações 0, 5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e nas concentrações $1,0 \times 10^{-4}$, $1,5 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Estes ensaios mostraram que os compostos fenólicos apresentam um efeito protetor contra a inibição pelo etanol, com relação ao crescimento da levedura e dentre estes compostos, destaca-se a rutina. Posteriormente, foram realizados experimentos em caldos de cana-de-açúcar das variedades (RB 92579 e RB 867515), com maior e menor teor de compostos fenólicos, respectivamente. Os ensaios de fermentação com caldos de cana-de-açúcar das duas variedades foram analisados com e sem adição de rutina com três repetições. Confirmou-se o efeito protetor da rutina sobre o etanol como agente “inibidor” da atividade oxidante.

ABSTRACT

SILVA, Marcus Vinicius Bastos da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Effect of phenolic compounds addition on the etanologenic yeast growth (*Saccharomyces sp.*) in synthetic medium and broth cane sugar.** Adviser: Paulo Henrique Alves da Silva. Co-Advisers: Eduardo Basílio de Oliveira and Luciano Gomes Fietto.

This study aimed to evaluate the effect of phenolic compounds addition on the etanologenic yeast growth and fermentation activity (*Saccharomyces sp.*) in synthetic medium (YPD) and within broths of two cane sugar varieties. Most of these compounds are soluble in organic solvents such as methanol, ethanol, ethyl acetate and others. For solubilization of the phenolic compounds added were evaluated these three solvents, and their influence on etanologenic yeast growth in the growth medium YPD (2 % glucose) at 28 °C. Among the concentrations 0, 2, 4, 8 and 16 % and the solvents tested, ethanol concentration of 2%, affected less the growth of etanologenic yeast, thus, it was selected for the other tests. Using this selected solvent, tests were performed with ferulic acid, quercetin, resveratrol and rutin added at these concentrations: 0, 5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $1,0 \times 10^{-4}$, $1,5 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-4}$ and $2,5 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$. These tests showed that phenolic compounds have a protective effect against inhibition by ethanol, related to the yeast growth and among these compounds, the best is rutin. Posteriorly, experiments were made with broths of cane sugar of these varieties, RB 867515 and RB 92579, with higher and lower levels of phenolic compounds, respectively. The fermentation tests with cane sugar broths from two varieties were analyzed with and without addition of rutin within three repetitions. It was confirmed the protective effect of rutin on ethanol as an “inhibitor” agent of oxidant activity.

1 - INTRODUÇÃO

O setor sucroalcooleiro e o setor de bebidas alcoólicas destiladas, notadamente cachaça e rum, utilizam como matéria-prima o caldo de cana-de-açúcar que é fermentado por ação de leveduras. O rendimento desta fermentação alcoólica depende, dentre outros fatores, da qualidade do caldo da cana-de-açúcar, que por sua vez é influenciada pela variedade agrícola, época de colheita, condições edafoclimáticas, controle de pragas e tratamentos culturais, especialmente as adubações.

Inúmeras variedades de cana-de-açúcar são plantadas no Brasil. Diversos trabalhos de melhoramento genético têm atualmente, ampliado a disponibilidade varietal. As variedades RB 867515 e RB 92579 têm sido as mais plantadas no país, (com destaque para a RB 92579 na região nordeste do Brasil) devido ao potencial produtivo em tonelada de cana por hectare, tonelada de açúcares, expressos pelos sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) por hectare, e ampla adaptação a diferentes ambientes edafoclimáticos. Na grande maioria dos locais a RB 92579 apresenta caldo escuro devido ao alto teor de fenóis (superior a 1.000 mg.L^{-1}), enquanto a variedade RB 867515, com caldo mais claro, apresenta menor teor de fenóis (em torno de 790 mg.L^{-1}) (ARISTIDES *et al.*, 2009). Grande parte dos fenóis se encontra na casca dos colmos. O caldo com menos fenóis e mais fósforo inorgânico é mais límpido. Dados têm indicado, portanto, que diferentes variedades de cana-de-açúcar possuem teores de compostos fenólicos diferenciados.

Os compostos fenólicos (monofenóis e polifenóis) podem causar ação inibidora sobre as leveduras no que se refere ao desdobramento de parte do açúcar residual durante a fermentação alcoólica. Estes compostos provocam uma perda na integridade da membrana celular, afetando a habilidade desta como barreira seletiva e assim, ocorre uma redução no crescimento celular e na assimilação de açúcares (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000). Compostos fenólicos, como por exemplo, flavonóides, ácido caféico e seu derivado fenetil éster, apresentam ação antimicrobiana, possuem a capacidade de inibir o crescimento e a divisão celular, aumentar a permeabilidade da

membrana e interferir na motilidade celular dos microrganismos. De acordo com Bisson (1999), a concentração e os tipos de compostos fenólicos presentes em uvas, podem inibir ou estimular a fermentação.

Neste trabalho foi avaliado o efeito da adição dos compostos fenólicos ácido ferúlico, quercetina, resveratrol e rutina, em diferentes concentrações, sobre o crescimento e a atividade fermentativa de levedura etanológica *Saccharomyces sp.* em meio sintético e em caldos de cana-de-açúcar de duas variedades, RB 92579 e RB 867515.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Avaliar diferentes solventes na solubilização dos compostos fenólicos e seus efeitos no crescimento da levedura, a fim de selecionar o solvente que tem o menor efeito inibitório sobre os microrganismos.

2.2 - Avaliar o efeito de diferentes concentrações de compostos fenólicos sobre o crescimento da levedura etanologênica, selecionando os compostos fenólicos e as concentrações respectivas que influenciam positivamente o crescimento da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

2.3 - Comparar o crescimento da levedura etanologênica em meio sintético e em caldos de cana-de-açúcar com e sem adição do composto fenólico selecionado.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Fermentação alcoólica

A fermentação é um processo de oxidação anaeróbica parcial da glicose. Dentre os microrganismos que realizam este processo fermentativo, tem-se leveduras e bactérias. Dentre estes, as leveduras apresentam uma maior aplicação tecnológica, pois possibilitam melhor rendimento. A levedura mais utilizada industrialmente é *Saccharomyces sp.*, principalmente devido à capacidade de produzir e tolerar altas concentrações de etanol (LIMA *et al.*, 2001). Apresentam-se normalmente na forma unicelular, com diâmetro entre 2 a 8 micrômetros. No citoplasma celular há um eficiente aparato enzimático, sendo nessa região da célula que se processa a fermentação. Trata-se de um organismo vivo, com habilidades metabólicas múltiplas, podendo alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações no meio, com grande impacto no rendimento dos processos (LIMA, BASSO & AMORIM, 2001).

Na fermentação são considerados como substratos os carboidratos, que podem ser tanto endógenos (glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros); estes últimos fornecidos à levedura (LIMA, BASSO & AMORIM, 2001).

O processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação das leveduras existe em dois ciclos distintos. O primeiro, denominado glicólise, tem a função de “quebrar” a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula. Na ausência de oxigênio, há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, produzindo etanol e CO₂ a partir do ácido pirúvico. A equação de Gay-Lussac faz um balanço desta etapa. Porém, na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água (LEHNINGER *et al.*, 1995; KOLB, 2002).

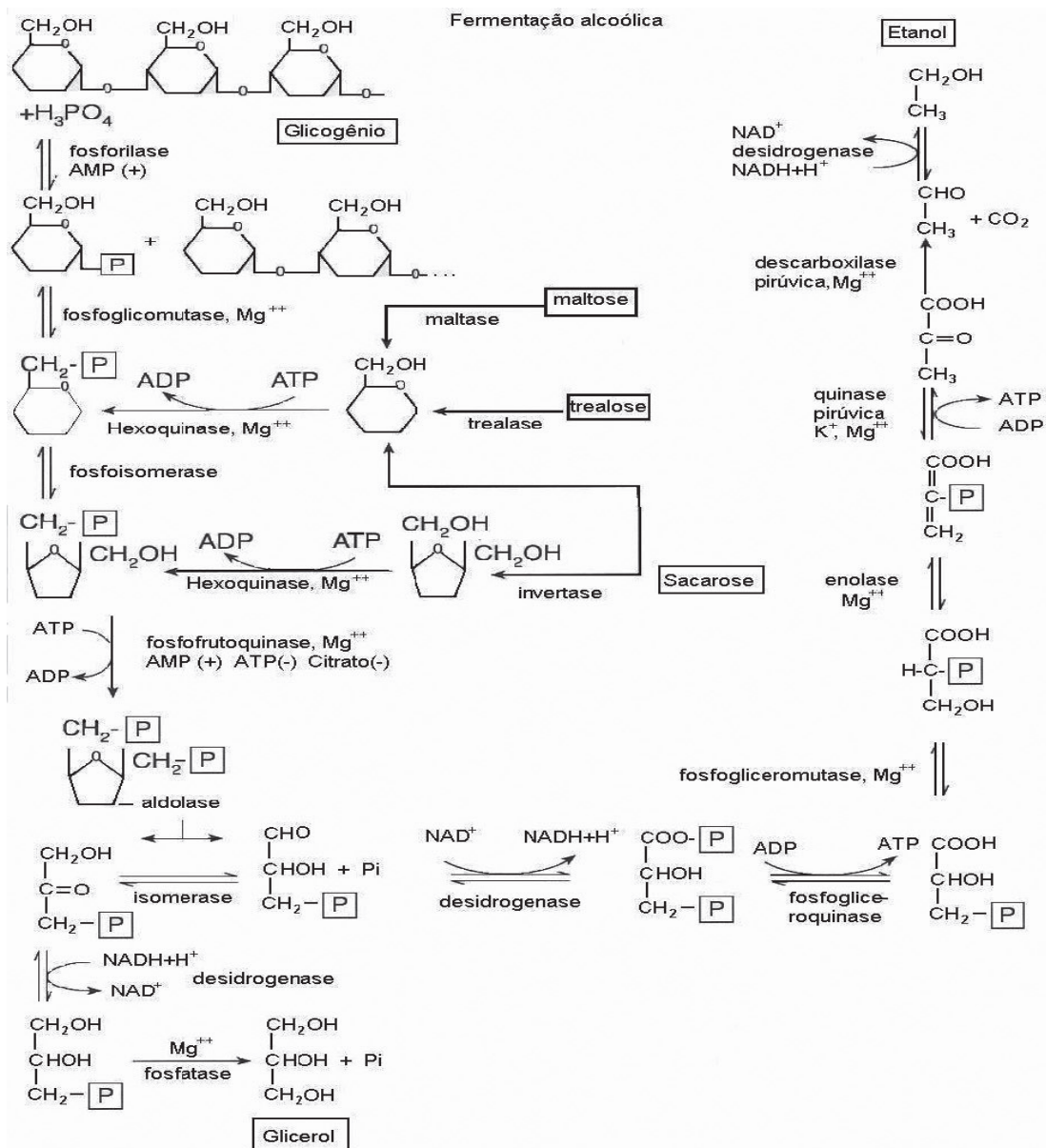


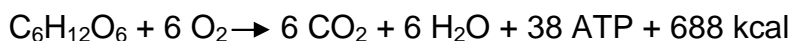
Figura 1 - Sequência das reações enzimáticas da fermentação alcoólica.

Fonte: LIMA *et al.*, 2001

O balanço global dos dois ciclos pode ser resumido pelas equações:



Equação de Gay-lussac



A reação global da glicólise demonstra que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono (88 g) e 57 kcal de energia.

A disponibilidade de açúcar pode afetar o metabolismo das leveduras e não somente, a ausência ou presença de oxigênio. Em concentrações de glicose inferior a $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e condições de aerobiose, provoca-se um elevado rendimento celular e a redução da glicólise anaeróbica ou da taxa de fermentação alcoólica; este efeito é denominado Pasteur. Por outro lado, o efeito Crabtree, que é o incremento na produção de etanol em concentrações de glicose superiores a $0,5-1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (independentemente da concentração de oxigênio) é tido como prejudicial ao processo de produção de leveduras, com impacto negativo no setor de panificação, pois parte do açúcar disponível é convertida a etanol e dióxido de carbono em detrimento à biomassa, reduzindo o rendimento (OKADA,1981). Portanto, fatores como concentração de substratos, concentração de nutrientes, pH, temperatura, pressão, oxigenação, etc., afetam os parâmetros cinéticos que definem as taxas de produção de etanol, reprodução celular e consumo de substrato.

3.2 - Principais produtos agroindustriais derivados da fermentação alcoólica

O setor sucroalcooleiro no Brasil, nesta última década, apresentou um grande crescimento devido à valorização global de seus dois principais produtos: o álcool e o açúcar. Por conseguinte, o país alcançou posições importantes no mercado global, tendo sido o maior produtor de açúcar, com aproximadamente 35,7 milhões de toneladas; e o segundo maior produtor de etanol, com aproximadamente 22,7 milhões de m^3 (BRASIL, 2012a).

O etanol tem sido continuamente valorizado devido à preocupação mundial relacionada ao aquecimento global, para redução da emissão de gases de efeito estufa (CO_2), à necessidade de uso de combustíveis renováveis e também, com o surgimento da tecnologia de motores flex fuel. Segundo a Lei nº 12.490 de 2011, que determina a adição de etanol anidro a gasolina, ao referido percentual até o limite de 25 % (vinte e cinco por cento) ou reduzi-lo a 18 % (dezoito por cento), estabelecendo dentre outras prerrogativas, a garantia do fornecimento de biocombustíveis em todo território nacional, promover a competitividade do país no mercado internacional de biocombustíveis e fomentar a pesquisa e o desenvolvimento relacionados à

energia renovável (BRASIL, 2011). A produção de etanol hidratado com 14 milhões de m³ da safra 2011/12, está se tornando um sucedâneo cada vez mais importante da gasolina e assim, modificando o perfil da produção e o destino final do produto. Este produto se destacou rapidamente, passando a substituir volumes de etanol anidro com 8.606.047 m³ da safra 2011/12, usado na mistura com a gasolina e deve continuar este movimento ascendente pelos próximos anos (BRASIL, 2012a).

Da mesma forma, a tendência de generalização do uso de etanol em mesclas com a gasolina, em muitos países, e o crescimento do comércio internacional associado a esta mudança no mercado de combustíveis, especialmente nos Estados Unidos da América, fez crescer bastante a participação das exportações no total desse comércio, mas ainda está longe de ser um componente importante da receita do setor (BRASIL, 2012a). Aproximadamente 70 % de todo o etanol produzido no mundo é utilizado como combustível.

Cachaça é a bebida alcoólica com denominação típica e exclusiva da Aguardente de Cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % vol a 48 % vol a 20 °C (vinte graus Celsius), obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g.L⁻¹, expressos em sacarose, como estabelecido na Instrução Normativa Nº 13 (MAPA, 2005).

Da produção de cachaça no Brasil (1,2 bilhão de litros por ano), menos de 1 % é exportado; mesmo assim, o produto é exportado para mais de 60 países. Dentre os principais países importadores estão Alemanha, Estados Unidos, Portugal e França. Em 2011 cerca de 90 empresas exportaram um total 9,80 milhões de litros, gerando uma receita de US\$ 17,3 milhões. Desse total, pouco mais de 10 % foi vendido para os Estados Unidos. No primeiro semestre de 2012, os Estados Unidos elevou em 12,62 % o volume de importação de cachaça, se comparado ao mesmo período do ano anterior, isto ocorreu devido ao reconhecimento da bebida pelo país norte-americano como “genuinamente brasileira”, este fato ocorreu após mais de 10 anos de negociações (BRASIL, 2012b).

A cachaça ocupa a terceira colocação no mundo entre as bebidas destiladas mais consumidas. No Brasil, ocupa a segunda colocação entre as bebidas alcoólicas mais consumidas, ficando atrás apenas da cerveja.

O Brasil é um dos maiores consumidores de açúcar do mundo, totalizando aproximadamente 12 milhões de toneladas na safra 2010/11. Este consumo continua a crescer, principalmente em virtude do aumento no consumo dos produtos industrializados com alto teor de açúcar. O Brasil é o maior exportador de açúcar do mundo, com 20,5 milhões de toneladas de açúcar bruto e 6,9 milhões de toneladas de açúcar refinado exportadas na safra 2010/11, segundo a Secex (Secretaria do Comércio Exterior) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio (BRASIL, 2012c).

Algumas etapas envolvendo o preparo da matéria-prima para a produção de bioetanol e cachaça são comuns, tais como moagem, decantação, filtração, eventualmente diluição e outras. Elas têm como objetivo preparar o caldo de cana-de-açúcar para que a fermentação ocorra da melhor maneira possível, otimizando a produtividade, o rendimento e outros parâmetros cinéticos. Inocula-se a levedura no caldo pré-tratado para que o processo fermentativo inicie adequadamente. Em alguns casos, em produção de cachaça, a fermentação espontânea pode ser conduzida. Concluído o processo fermentativo, realiza-se a destilação, para a coleta dos produtos com suas graduações alcoólicas específicas (BRASIL, 2003).

No caso, do destilado alcoólico para o biocombustível, a diferenciação do teor alcoólico entre as duas formas produzidas nas destilarias é de 96 % para AEHC e 99,6 % para AEAC. Já para a cachaça, além do teor alcoólico entre 38 e 48 °GL, a concentração de acidez, ésteres, álcoois superiores, metanol, cobre, chumbo, carbamato de etila e acroleína, devem obedecer aos limites estabelecidos pela legislação Instrução Normativa Nº 13 (MAPA, 2005), além de apresentar características sensoriais peculiares.

3.2.1 - Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é cultivada comercialmente em mais de 70 países e territórios sendo os maiores produtores o Brasil, Índia, Cuba, México, China,

Filipinas, Austrália, África do sul, Estados Unidos da América, República Dominicana e Formosa (ROS, 2004).

Mesmo antes de sua colonização pelos portugueses, o Brasil cultivava a cana-de-açúcar, mas os primeiros canaviais implantados com mudas trazidas de outros continentes pelos colonizadores. Embora existam opiniões divergentes com relação à sua origem geográfica, os historiadores relatam que a cana-de-açúcar é oriunda do Sudoeste Asiático, Java, Nova Guiné e também da Índia (FAHL *et al.*, 1998).

É uma planta da família *Gramineae*, apresenta uma larga escala de adaptação sendo cultivada principalmente em regiões situadas entre os paralelos 35 °N e 35 °S. As variações climáticas brasileiras possibilitam duas épocas de colheitas anuais, uma no norte-nordeste, de setembro a abril e a outra no centro-sul, de junho a dezembro (FERNANDES, 2005; ALFONSI *et al.*, 1987).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. A produtividade média brasileira tem apresentado significativa elevação, da ordem de 50 % nos últimos 20 anos (MACEDO, 2008). Conforme, dados do Departamento da Cana-de-Açúcar e Agroenergia (BRASIL, 2012a) a produtividade entre as safras de 2005/06 e 2010/11, aumentou de 65,5 para 77,5 toneladas de cana por hectare e a produção nacional de cana-de-açúcar, referente à safra de 2010/11 corresponde a 623 mil toneladas. Observa-se que muito ainda pode ser melhorado, em relação ao setor sucroalcooleiro. O estado de São Paulo, o maior produtor brasileiro apresenta produtividade média (safra 2010/11) de 83,02 toneladas de cana por hectare, e possui diversas unidades produtoras que ultrapassaram esta marca.

O caldo de cana-de-açúcar apresenta uma composição que pode variar dentro de certos limites, em função do clima, solo, idade e sanidade, da espécie da cana-de-açúcar, a variedade, os tratamentos culturais, condições de estocagem após a colheita e nas moendas, durante as condições de extração. Pode ser descrito como um líquido opaco, viscoso, espumoso, de cor parda a verde escuro e de reação ácida (SOUZA, 1988; CASTRO; ANDRADE, 2007).

Segundo Souza (1988), em geral, o caldo de cana é uma solução que contém uma grande variedade de constituintes solúveis (orgânicos e inorgânicos), tais como sacarose, amido, ácidos orgânicos, sais orgânicos e inorgânicos, matérias nitrogenadas (proteínas e aminoácidos) em suspensão, compostos insolúveis leves e pesados, bagacilhos, fibras, ceras, corantes, lignina e celulose. Na tabela 1 são listados os principais constituintes do caldo de cana-de-açúcar e suas porcentagens respectivas em relação aos sólidos solúveis.

Tabela 1 – Composição química do caldo de cana-de-açúcar

Componente	(%) em Sólidos
Solúveis	
Açúcares	75 - 92
Sacarose	70 – 88
Glicose	2 – 4
Frutose	2 – 4
Sais	3,0 - 4,5
De Ácidos Inorgânicos	1,5 - 4,5
De Ácidos Orgânicos	1,0 - 3,0
Ácidos orgânicos	1,5 - 5,5
Ácidos carboxílicos	1,1 - 3,0
Aminoácidos	0,5 - 2,5
Outros Não-Açúcares Orgânicos	-
Proteínas	0,5 - 0,6
Amido	0,001 - 0,100
Gomas	0,30 - 0,60
Ceras, Lipídeos, Fosfolipídios	0,05 - 0,15
Não-Identificados	3,0 - 5,0

Fonte: SOUZA, 1998; CHEN; CHOU, 1993.

3.3 - Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos fazem parte de uma classe de compostos que abrangem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que apresentam pelo menos um grupo fenol, sendo um grupo hidroxila em um anel aromático. Aproximadamente 10.000 compostos formam este grupo quimicamente heterogêneo de metabólitos vegetais secundários. Os metabólitos secundários, embora não sejam imprescindíveis, contribuem para o desenvolvimento das plantas, por favorecerem a adaptação das mesmas nas relações planta-planta, planta-animal e planta-microrganismo. Os metabólitos secundários, por serem bioativos, protegem contra a radiação ultravioleta e inibem a herbivoria, atraindo animais dispersores de sementes, entre outras funções (TAIZ & ZEIGER, 2004).

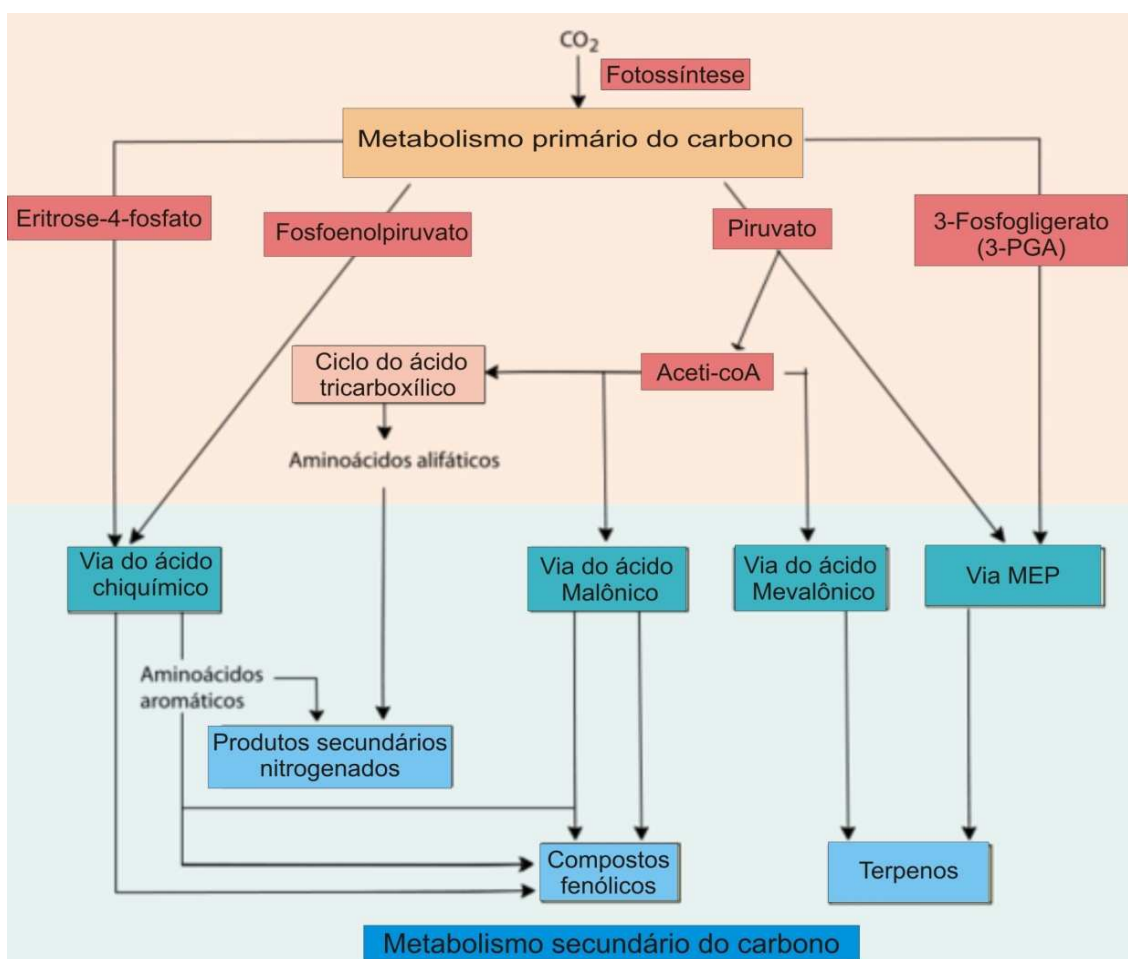


Figura 2 – Esquema representativo da via metabólica dos compostos fenólicos.

Fonte: (TAIZ & ZEIGER, 2004)

Os compostos fenólicos são biossintetizados através de diferentes rotas. As que merecem mais destaque são a rota do ácido chiquímico e a do ácido malônico, sendo a primeira rota a de maior importância para o reino vegetal. A primeira rota (ácido chiquímico) realiza a conversão dos precursores de carboidratos, resultantes da glicólise e da rota da pentose fosfato, em aminoácidos aromáticos (HERRMANN & WEAVER, 1999). Eles podem ser encontrados facilmente em plantas e correspondem a um grupo com uma ampla variedade de fitoquímicos oriundos da tirosina e fenilalanina.

Os compostos fenólicos apresentam ação antipatogênica e contribuem na pigmentação e são importantes para o crescimento e reprodução dos vegetais (SHAHIDI & NACZK, 1995). Nos alimentos, proporcionam aroma, cor, estabilidade oxidativa e adstringência (NACZK & SHAHIDI, 2004). Estão presentes principalmente, em frutas cítricas (laranja, limão e tangerina), estando também presentes em outras frutas, tais como pêra, cereja, mamão e uva, havendo maior quantidade na polpa da fruta do que no suco. Excelentes fontes destes compostos são os vegetais, como exemplo, repolho roxo, alho, tomate, cebola e brócolis (PIMENTEL, FRANCKI & GOLLÜCKE, 2005).

Há duas categorias básicas de antioxidantes: sintéticos ou naturais. Geralmente, os antioxidantes sintéticos apresentam estruturas fenólicas com vários graus de substituição alquila, podendo-se citar: butil hidroxianisol (BHA) e butil hidroxitolueno (BHT), utilizados como antioxidantes em alimentos (HUDSON, 1990). Dentre os antioxidantes naturais, destacam-se, os compostos fenólicos, que apresentam características antioxidantes por retardar ou inibir a oxidação de outras moléculas, seja na iniciação ou na propagação das reações de oxidação em cadeia.

Os taninos, tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos são os antioxidantes fenólicos de origem naturais mais comuns (KING & YOUNG, 1999). Os fenólicos apresentam solubilidade variável, influenciada pelo grau de polimerização dos polifenóis, pela polaridade do solvente a ser utilizado e pelas interações com outros constituintes que possam estar presentes. São mais utilizados como solventes para extração destes compostos, o metanol, etanol,

acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos, antocianinas e carotenóides presentes em frutas estão muito propícios à degradação, causando redução de sua bioatividade. Diversos fatores podem contribuir para este efeito, tais como alta temperatura, luz, oxigênio e baixo pH (GIORI, 2010).

O grau de hidroxilação dos compostos fenólicos (antocianinas) influencia a sua estabilidade: quanto mais grupos hidroxilas estiverem presentes na estrutura, menos estável será o composto. Inversamente, quando há um alto grau de metoxilação na estrutura, ocorre uma maior estabilidade do composto (FRANCIS, 1989).

3.3.1 - Flavonóides

São compostos que apresentam baixo peso molecular e são largamente distribuídos no reino vegetal, estando presentes em folhas, frutas, sementes e em outras partes da planta na forma de gliconas ou glicosídios. Estes compostos são formados por 15 átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$), sendo constituído por dois anéis aromáticos, denominados anel A e B. Na substituição do anel C padrão pode ocorrer variações dando origem a importantes classes de flavonóides (Figura 3), como flavononas, flavonóis, flavonas, isoflavonas e antocianinas. Diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides podem ser originados pela substituição dos anéis A e B, têm-se como inclusões destas substituições: oxigenação, glicosilação, sulfatação, alquilação e acilação (HOLLMAN & KATAN, 1999). Estão presentes em alimentos, tais como vinho tinto, chá preto, cerveja, frutas (maçã, uva, morango), vegetais (cebola, couve, vagem, brócolis), grãos, nozes, sementes e especiarias (NIJVELDT, R.J. *et al.*, 2001).

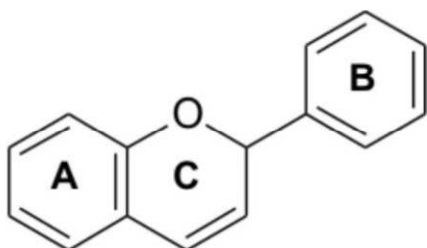


Figura 3 - Estrutura química de base dos flavonóides.

A quercetina é encontrada abundantemente nos alimentos na forma glicosilada e apresenta efetiva ação antioxidante devido à suas propriedades estabilizantes de radicais livres e por complexar íons metálicos, protegendo assim os tecidos contra radicais livres e da peroxidação lipídica (KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994). Particularmente, a quercetina sequestra radicais de oxigênio como ($\cdot\text{OH}$ e O_2^-), inibe a xantina oxidase e a peroxidação lipídica. A quercetina é conhecida também por suas propriedades complexantes de cátions de ferro (SORATA, TAKAHAMA & KIMURA, 1984).

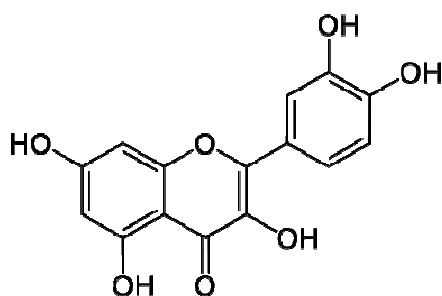


Figura 4 - Estrutura química da quercetina

A rutina é um flavonol que apresenta um dissacarídeo (raminose + glicose) ligado à posição 3 do anel pirano como se observa na Figura 5 (PEDRIALI, 2005). Este composto pode inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios, por reagirem com o íon superóxido e radicais peroxilas lipídicos e por formarem um complexo com o ferro, que é um catalisador da formação de radicais de oxigênio ativo (PATHAK *et al.*, 1991; YOKOZAWA *et al.*, 1997).

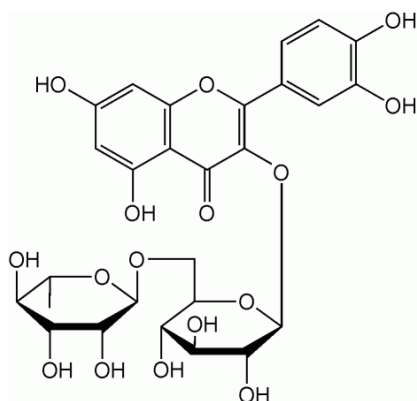


Figura 5 - Estrutura química da rutina

3.3.2 - Não Flavonóides

Estes compostos correspondem aos compostos fenólicos mais simples, tais como os ácidos benzoicos ($C_6 - C_1$) p-hidroxibenzoico e os ácidos cinâmicos que são, p-cumárico, caféico e ferúlico, portadores de cadeia lateral insaturada ($C_6 - C_3$) e outros derivados fenólicos de elevada importância como os estilbenos, destacando-se o resveratrol (FLANZY, 2000).

O resveratrol é uma fitoalexina produzida por diversas plantas, estando mais presente nas cascas de uvas. É sintetizado naturalmente nas plantas sob duas formas isômeras: trans-resveratrol e cis-resveratrol. O tempo de vida da levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser aumentado administrando ao fermento apenas resveratrol (SINCLAIR, 2006). Este composto tem sido usado na ativação de enzimas para prolongar o seu período de vida. O resveratrol estimula as enzimas (sirtuínas) em células humanas e acredita-se que estas enzimas desempenham a função a tempo de consertar os danos e impedir a morte da célula (CHAO *et al.*, 2005; CHONGWOO *et al.*, 2002; MICHAN & SINCLAIR, 2007).

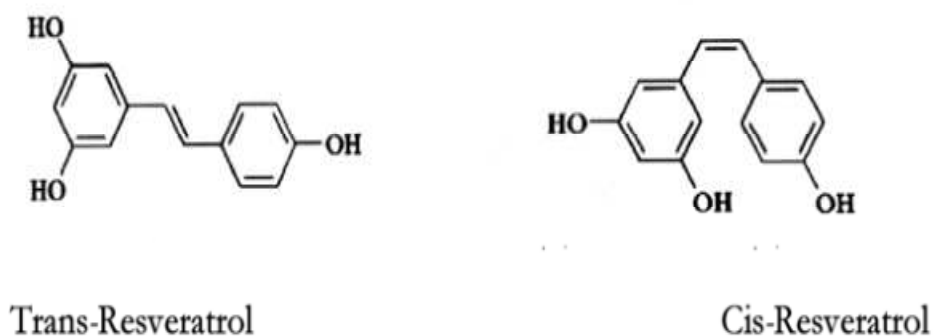


Figura 6 - Estruturas químicas dos isômeros do resveratrol

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula e um grupamento carboxílico, atribuindo propriedades antioxidantes para os vegetais. Estes consistem em dois grupos derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 7), sendo incluídos os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura

comum (C₆-C₁), pertencentes aos ácidos hidroxibenzóicos (BALASUNDRAM, SUNDRAM & SAMMAN, 2006). Os compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), como os ácidos ferúlico, sináptico, caféico e p-cumárico, são os mais comuns pertencentes aos ácidos hidroxicinâmicos. Estão presentes em alimentos, tais como: chá, café e vinhos.

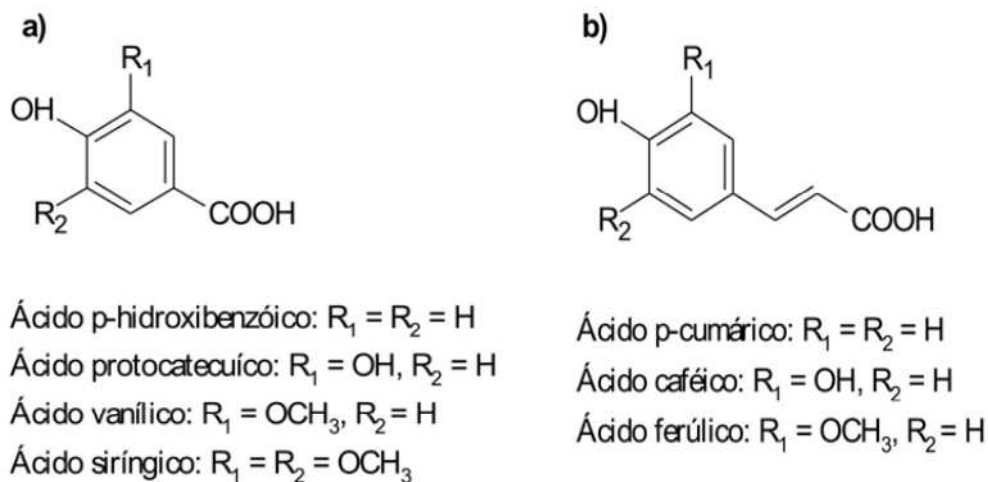


Figura 7 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

O ácido ferúlico ocorre frequentemente em alimentos na forma de ésteres simples, também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres (MATTILA & HELLSTROM, 2007). A hidroxila do ácido ferúlico existente na posição orto com o grupo metoxila, doador de elétrons, é um fator que aumenta a estabilidade do radical fenoxil e aumenta a eficiência antioxidante do composto (CUVELIER, RICHARD & BERSET, 1992). A presença de uma segunda hidroxila na posição orto ou para, também aumenta a atividade antioxidante (CHEN & HO, 1997).

3.4 - Solubilidade dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos podem ser solúveis ou insolúveis sendo encontrados compartimentalizados dentro dos vacúolos celulares (BECKMAN, 2000), estando na forma livre ou conjugada e ligada a estruturas da parede celular, esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes pécticos ou hemicelulósicos (FAULDS & WILLIAMSON, 1999).

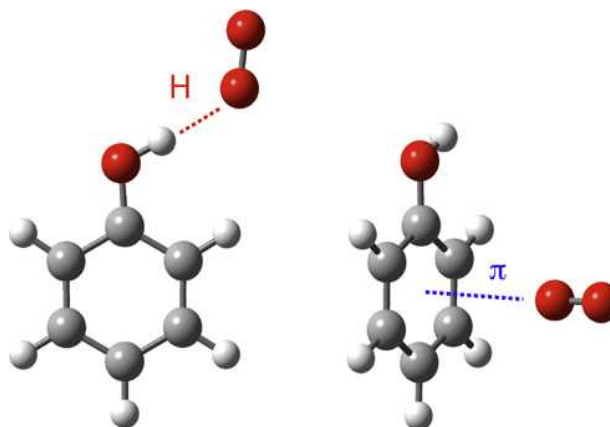
A solubilidade destes compostos é conduzida pela polaridade do solvente utilizado, sua interação com outros constituintes presentes, seu grau de polimerização e formação de complexos insolúveis. Grande parte dos compostos fenólicos não se encontra no estado livre, estando mais presente na forma de ésteres ou heterosídeos, portanto são solúveis em solventes orgânicos polares e em água (SIMÕES *et al.*, 2007).

A solubilidade é reconhecida como um fator chave para a bioacessibilidade e, portanto, biodisponibilidade (BIASUTTO *et al.*, 2009). A biodisponibilidade de um composto pode ser influenciada por diversos fatores, tais como bioacessibilidade, absorção, distribuição para os tecidos e bioatividade, sendo o primeiro fator a bioacessibilidade ou disponibilidade para absorção (STAHL *et al.*, 2002). Os compostos fenólicos podem apresentar dispersões em água e em solventes orgânicos, isto ocorre devido ao efeito ou interação pi-stacking e, portanto, podem apresentar formações de cristais, devido a isto podem não estar biodisponíveis, por não serem absorvidos pelas células. Especialmente, as indústrias farmacêuticas e de cosméticos tem explorado a utilização de nanopartículas para produção de drogas (compostos fenólicos). Estes nanocristais de drogas apresentam uma característica fundamental, que é a sua maior capacidade de transporte através da membrana celular e, portanto, apresentam diversas aplicações, tais como por via oral, via pulmonar, etc. Os nanocristais também apresentam outras vantagens, tais como excelente adesão às superfícies biológicas, aumento da solubilidade de saturação e velocidade de dissolução atribuída à sua maior área de superfície (KAKRAN *et al.*, 2012).

A interação pi-stacking trata-se de um caso especial de interação não-covalente, que proporciona maior estabilidade do dímero, por favorecer a transferência de carga entre um sistema pi (π) rico e um outro sistema pi (π) pobre em elétrons, ocorrendo assim, a formação de um complexo (PETITJEAN *et al.*, 2004).

As forças intermoleculares envolvendo moléculas aromáticas são vitais para o reconhecimento dos fenômenos químicos e biológicos. Os complexos de fenol com ligantes, L-fenol, oferecem a possibilidade interessante de

investigar dois tipos fundamentais e concorrentes de interações intermoleculares (Fig. 8), sendo estas, ligação de hidrogênio e pi-stacking (PATZER *et al.*, 2008).



Fonte: PATZER *et al.*, 2008

Figura 8 - As estruturas das ligações de hidrogênio e pi-stacking dos isômeros de fenol com O₂ (ligante - L).

Ocorre entre compostos aromáticos as interações intermoleculares pi-stacking que influenciam na formação supramolecular de moléculas em sólidos, em solução e nas interfaces (NANDY *et al.*, 2007). Estas interações influenciam na associação de vários complexos, nas drogas incluindo agentes anticancerígenos que se intercalam no DNA e nos cristais orgânicos. As moléculas orgânicas apresentam propriedades eletrônicas com elevação de condutividade elétrica, emissão em longos comprimentos de onda e eficiente transferência de elétrons (NANDY *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos apresentam uma solubilidade não muito eficiente, pois mesmo utilizando solventes apropriados, segundo a literatura (Tabela 2), estes compostos não se encontram totalmente solubilizados devido as interações intermoleculares (ligação de hidrogênio ou pi-stacking), e portanto, ocorre a formação de cristais na solução. Para haver uma completa solubilização destes compostos são necessários procedimentos como compilados na Tabela 2.

Tabela 2 – Solubilização dos compostos fenólicos com diferentes solventes

Compostos Fenólicos	Solventes	Condições Operacionais de Solubilização	Solubilidade ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ou $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Referências
ácido ferúlico	etanol (absoluto)	Agitação por 12 horas e a temperatura de 25°C	$66.10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Buranov, U.; Anvar, U.; Mazza, (2009); De Oliveira, Eduardo B. (2006).
	metanol	pesar 485 mg e colocar em um frasco volumétrico de 50 ml e completar o volume com o solvente. Agitar por 12 horas em temperatura ambiente.	$9,7.10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	De Oliveira, Eduardo B. (2006)
quercetina	etanol	Pesar o soluto utilizando a fração molar com a temperatura e agitação acelerada por 2 horas.	$215 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Razmara <i>et al.</i> , (2010). Srinivas <i>et al.</i> , (2010).
	metanol	Pesar o soluto utilizando a fração molar com temperatura e agitação acelerada por 2 horas.	$1,4.10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Razmara <i>et al.</i> , (2010).
resveratrol	etanol	Pesar o soluto utilizando a fração molar com a temperatura e colocar em um banho de temperatura constante por 36 horas.	$50.10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Amri <i>et al.</i> , (2012).
	metanol		$60 \mu\text{g.mL}^{-1}$	
	água (pH=6.0)	soluto 4 mg.mL^{-1} em Temperatura ambiente e agitação acelerada por 28 horas	$9.0 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Biasutto <i>et al.</i> , (2009).
	acetona		$3.0 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Sun <i>et al.</i> , 2008
rutina	acetato de etila	Pesar soluto utilizando uma fração molar de acordo com temperatura constante por cerca de 24 a 36 h	$12,6 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Zi, Junqing <i>et al.</i> , (2007).
	acetona		$6,5 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	
	água (pH=6.4)		$125 \mu\text{g.mL}^{-1}$	
	1-butanol		$7,8 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	
	etanol		$5,8 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	
	metanol		$8,5 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	
	1-propanol		$4,3 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	
	2-propanol		$4,5 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	

3.5 - Caracterização bioquímica de *Saccharomyces sp.*

A origem da palavra levedura, em muitos idiomas, provém de palavras que significam espuma e ascender, possuindo relação direta com os processos fermentativos que produzem a cerveja e o pão. Não é incomum em algumas áreas da biologia molecular, tratar as palavras “levedura” e “*Saccharomyces*” como sinônimos (KURTZMAN *et al.*, 2011).

Uma distinção imprecisa foi feita entre as leveduras e os filamentos dimórficos dos fungos que muitas vezes produzem abundante crescimento. As leveduras podem ser definidas como esses fungos cujo crescimento vegetativo predominantemente resulta de várias bolhas ou fissões, e que não formam seus estados sexuais no corpo de frutificação (KURTZMAN *et al.*, 2011). Diferentes espécies de leveduras foram classificadas em função de suas capacidades de fermentar diferentes açúcares em condições de aerobiose e anaerobiose (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Características chave das espécies do gênero *Saccharomyces*

Espécies	Reações de crescimento e outras características											
	Glicose	Galactose	sacarose	maltose	Lactose	rafinose	trealose	Metanol	Etanol	inulina	crescim. à 25°C	crescim. à 30°C
<i>S. arboricolus</i>	+	+	+	v	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>S. bayanus var. bayanus</i>	+	v	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>S. bayanus var. Uvarum</i>	+	v	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>S. cariocanus</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	+	v	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>S. kudriavzevii</i>	+	+	v	+	-	+	-	-	+	+	+	v
<i>S. mikatae</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>S. paradoxus</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>S. pastorianus</i>	+	+	v	+	-	+	v	-	+	-	+	+

Símbolos: +, positivo ou fraco; -, negativo; v, variável (+ / - , fraco / -); n, sem dados

Tabela 4 – Características fermentativas das espécies (*Saccharomyces*)

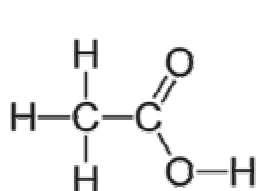
Espécies	Fermentação											
	Glicose	galactose	sacarose	maltose	Lactose	rafinose	trealose	Celobiose	Melibiose	inulina	α -D-metil glicosídeo	amido solúvel
<i>S. arboricolus</i>	+	+	+	-	-	+	n	n	n	n	n	n
<i>S. bayanus var. bayanos</i>	+	V	+	+	-	+	-	n	n	n	n	n
<i>S. bayanus var. Uvarum</i>	+	V	+	+	-	+	-	n	v	n	n	n
<i>S. cariocanus</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	+	V	+	+	-	+	-	n	-	n	n	n
<i>S. kudriavzevii</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	n	-
<i>S. mikatae</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	n	-
<i>S. paradoxus</i>	+	+	+	v	-	v	-	n	-	n	n	n
<i>S. pastorianus</i>	+	V	v	+	-	+	-	n	v	n	n	n

Símbolos: +, positivo ou fraco; -, negativo; v, variável (+ / -, fraco / -); n, sem dados

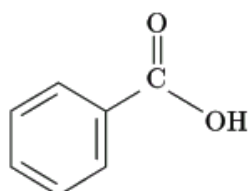
Fonte: KURTZMAN *et al.*, 2011

Certos compostos químicos podem interferir na parede celular e no metabolismo das leveduras. Dentre estes, podem ser citados os ácidos e sais orgânicos. A ação dos compostos fenólicos presentes em vários alimentos é uma ação protetora, embora não existam trabalhos que descrevam ou expliquem este processo, sobre as leveduras.

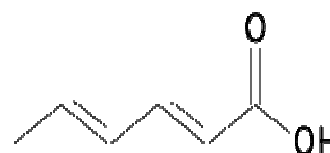
Para alguns compostos (Figura 9), tais como ácido acético, ácido benzoico e ácido sórbico, os seus efeitos já foram demonstrados. Ácidos orgânicos fracos agem como conservantes químicos, devido ao fato de inibir o crescimento de bactérias e fungos e em solução, estão em equilíbrio dependente do pH. Estes ácidos em presença de baixo pH do meio ou solução, passam à forma não dissociada e assim, conseguem penetrar na membrana celular.



Ácido acético



Ácido benzoico

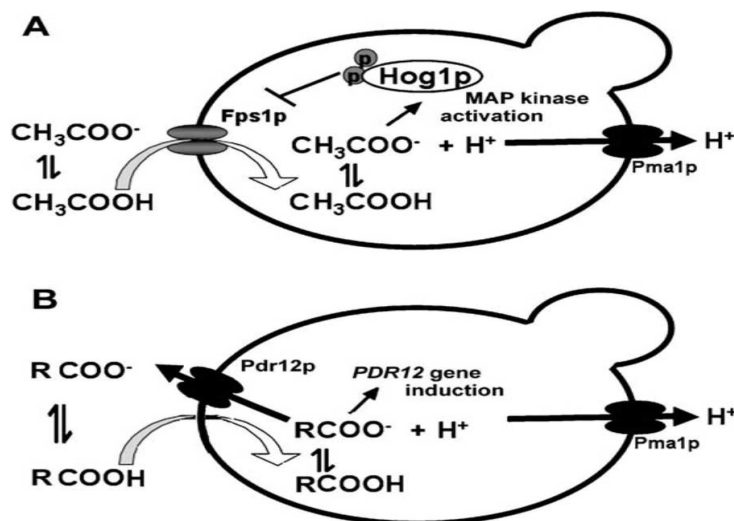


Ácido sórbico

Figura 9 - Estrutura química dos ácidos carboxílicos largamente utilizados como conservantes.

As leveduras *S. cerevisiae*, não conseguem metabolizar sorbato ou benzoato (MOLLAPOUR & PIPER, 2008). No interior da célula estes ácidos encontrando pH mais elevado irão se dissociar, causando redução no pH intracelular e perturbando as funções da membrana. Pode ser também responsável pela inativação microbiana. A elevada concentração de ânions (devido à dissociação) no interior das células poderia resultar em uma osmolaridade aumentada e, conseqüentemente, provocando uma perturbação no metabolismo celular (HIRSHFIELD *et al.*, 2003).

O mecanismo esquematizado na Figura 10 (A) Através do canal Fps1p ocorre permease do ácido acético, reprimindo a levedura (*S. cerevisiae*), desse modo provocando a sua própria destruição devido à acumulação intracelular de acetato ativando o Hog1p (gene) que desestabiliza o canal Fps1p e fecha a principal via de entrada do ácido acético para a célula, permitindo a sobrevivência em níveis elevados. (B) Indução de exclusão contínua do cátion (H^+) pelo gene (Pma1p) e do ânion $RCOO^-$ pelo gene (Pdr12p) são essenciais para a resistência a ácidos orgânicos fracos, mais lipofílicos do que o ácido acético. Este mecanismo demonstra como o ácido acético, de baixo peso molecular e mais lipofílico que os demais ácidos carboxílicos, entra na célula da levedura (*S. cerevisiae*), por difusão passiva através do sítio de glicerol da membrana plasmática, Fps1p. Este mecanismo favorece a desintoxicação da levedura por estes agentes químicos.



Fonte: MOLLAPOUR & PIPER, 2008

Figura 10 - Mecanismo de ação do ácido acético sobre a levedura (*S. cerevisiae*).

3.6 - Propriedades funcionais dos compostos fenólicos e sua influência na fermentação

Alguns estudos encontrados na literatura que demonstram, num meio de crescimento, a atividade antimicrobiana obtida de diferentes extratos de compostos fenólicos, a partir de produtos enológicos, tais como sementes de uva e vinhos tinto e branco, contra bactérias patogênicas. Os compostos fenólicos contendo principalmente ácidos fenólicos, têm sido descritos por serem mais ativos contra bactérias do que contra leveduras, sugerindo que as leveduras têm uma maior resistência à ação destes compostos (GARCÍA-RUIZ *et al.*, 2008).

Esses compostos bioativos com função antimicrobiana além de insetar resíduo de antibióticos ou produtos químicos, não geram resistência às bactérias, não afetam a levedura. Geralmente, é utilizado um único produto, podendo reduzir o consumo de ácido sulfúrico. A toxicidade apresentada pelos antimicrobianos naturais sobre alguns microrganismos pode ser atribuída à alta complexidade de sua fórmula química. Os grupamentos alcoóis, fenóis, ésteres, ácidos, aldeídos e terpenos podem explicar sua ação bacteriostática e/ou bactericida (NOVACOSK & TORRES, 2006).

Como mencionado anteriormente, a eficácia dos compostos fenólicos como agentes antimicrobianos contra bactérias do ácido lático em vinhos, depende da estrutura do composto e é dependente da dose. Em geral, o efeito antimicrobiano parece ocorrer em doses mais elevadas do que aquelas geralmente encontradas em vinhos (GARCÍA-RUIZ *et al.*, 2008).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Produção e Controle de Qualidade de Bebidas (LPQB) do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa / MG.

4.1 - Obtenção e preparo das amostras de cana-de-açúcar e do meio

YPS

As variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) utilizadas, RB 867515 e RB 92579, procedem respectivamente, do campo experimental da UFV, localizado na cidade de Viçosa / MG e da Destilaria Serra dos Aimorés (DASA), localizada no município de Serra dos Aimorés / MG.

Após a colheita sem queima dos colmos da cana-de-açúcar, em um intervalo de tempo não superior a 24 horas, os mesmos foram triturados utilizando uma máquina Ensiladeira (modelo EN 6500 / fabricante Nogueira Máquinas Agrícolas), e em seguida, foram prensadas em prensa hidráulica (modelo PH 45-II / fabricante Dedini Máquinas e Equipamentos) sob uma pressão de 250 Kgf/cm² no campo experimental da UFV em Ponte Nova / MG, distrito de Oratórios. Os caldos assim obtidos foram envasados em garrafas plásticas (PET) devidamente higienizadas.

Posteriormente, as amostras foram transportadas sob temperatura de refrigeração (5 °C) até o laboratório de Produção e Controle de Qualidade de Bebidas (LPQB) do DTA/UFV, onde permaneceram congeladas, procurando preservar as suas características. Após, trinta dias os caldos de cana-de-açúcar foram descongelados, permanecendo à temperatura de refrigeração por cerca de 12 horas. Os caldos foram diluídos com água destilada até a concentração final de 14 °Brix. Estas concentrações de sólidos solúveis foram avaliadas utilizando um aparelho refratômetro analógico portátil (modelo RT-30 ATC / fabricante Instrutherm).

4.2 - Microrganismo e meios de cultura

Utilizou-se a linhagem de levedura Saflager W-34/70 (baixa fermentação), levedura etanologênica (*Saccharomyces*), fornecida pela empresa Agromalte Ltda. Esta levedura liofilizada foi preparada antes da inoculação, realizando-se uma reidratação de 3 g do fermento em 20 mL de água esterilizada à 28 °C. Posteriormente, foi retirado 1 mL da cultura reidratada, que foi assepticamente inoculada no meio sólido YPD (2 % Agar), em placa de petri. Em seguida, a placa foi colocada em estufa a 28 °C durante 72 horas, para crescimento das células, sendo observada a placa em microscópio óptico, visando à obtenção de leveduras puras (isentas de contaminação) e, após mantida a 4 °C. Posteriormente, num Erlenmeyer com volume de 50 mL, foi colocado o meio YPD (1 % extrato de levedura, 2 % peptona e 2 % glicose) e realizou-se a inoculação, para proceder à propagação. Foi utilizado um agitador orbital (modelo TE-422 / fabricante Tecnal) a 28 °C por 12 horas.

4.3 - Solubilização dos compostos fenólicos

4.3.1 - Escolha do solvente

A solubilização do ácido ferúlico, quercetina, resveratrol e rutina foi realizada de duas formas: na primeira, chamada dispersão, foi utilizado um agitador vortex (modelo VM 3000 / fabricante Vixar), à temperatura ambiente, velocidade de rotação de 300 rpm e tempo de 30 segundos, para os quatro compostos fenólicos. Foram pesados 0,2 mg de cada composto, e separadamente colocados em tubos Eppendorf, sendo adicionado um volume de 1 mL de etanol. Na segunda, chamada solubilização, os quatro compostos foram solubilizados utilizando um agitador orbital (modelo TE-422 / fabricante Tecnal) 180 rpm a 28 °C, por 12 horas, para dois primeiros; e 36 horas, para os dois últimos compostos fenólicos (Tabela 2).

Imagens de microscopia ótica foram obtidas, para verificação da solubilidade dos compostos fenólicos nas soluções. O equipamento utilizado foi

o microscópio invertido Nikon Ti-S com objetiva de 100X, N.A. 1.4, com imersão a óleo e uma câmera CCD JAI (modelo BM500-GE) e a resolução do sistema 29 pixels/micrômetro.

Os compostos fenólicos, antes de serem adicionados aos meios de crescimento, foram solubilizados conforme se segue:

4.3.2 - Preparo das soluções com o solvente selecionado

- Preparação das soluções (concentrações de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$):

I – Solução de ácido ferúlico:

- 194,18 mg de $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$;
- 10 mL de etanol.

A mistura resultante foi agitada moderadamente por 12 horas à temperatura de $(28 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$, para que a completa dissolução ocorresse.

II - Solução de quercetina:

- 302,24 mg de $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$;
- 10 mL de etanol.

A mistura resultante foi agitada moderadamente por 12 horas à temperatura de $(28 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$, até ser completamente dissolvido.

III - Solução de resveratrol:

- 45,65 mg de $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$;
- 2 mL de etanol.

A mistura foi agitada moderadamente por 36 horas à temperatura de $(28 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$, para que possa ser homogeneizada.

IV - Solução de rutina:

- 610,52 mg de $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$;

- 10 mL de etanol.

A mistura foi agitada moderadamente por 36 horas à temperatura de $(28 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, para que possa ser homogeneizada.

A partir destas soluções ($100 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) para cada um dos compostos acima, foram realizadas diluições para obtenção de soluções para cada composto com a concentração de $5 (\mu\text{mol.mL}^{-1})$.

▪ Preparação das soluções:

- Concentrações de $5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$: As soluções de ácido ferúlico, quercetina e rutina foram diluídas separadamente, sendo colocados num Erlenmeyer (50 mL) um volume de 2 mL da solução ($100 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) e um volume de 38 mL de etanol. A solução de resveratrol foi diluída em Erlenmeyer (50 mL), sendo adicionados um volume de 1 mL da solução ($100 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) e um volume de 19 mL de etanol.

4.4 - Avaliação do crescimento da levedura

4.4.1 - Análise do crescimento com adição de solventes dos compostos fenólicos

Três solventes (metanol, etanol e acetato de etila) foram avaliados, quanto à sua influência no crescimento da levedura etanologênica no meio de crescimento YPD (2 % glicose) sendo estes ensaios realizados em microplaca com 96 poços, nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16 %, para cada um, separadamente. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* (Saflager W-34/70) foi previamente crescida em meio YPD (2 % glicose), sob agitação de 180 rpm a $28 ^\circ\text{C}$. Diluições foram realizadas em solução salina para ajustar a $\text{D.O.}_{(600 \text{ nm})}$ inicial para 0,1 e após, inoculada em meio YPD líquido (2 % glicose). Cada ensaio foi realizado em triplica e com volume final de 200 μL . A microplaca foi incubada na leitora Versamax (microplate reader, Molecular Devices) à temperatura de $28 ^\circ\text{C}$ por 16 horas e vedada usando plástico (Platemax-axysel sealing film, Axygen). A intervalos de 15 minutos foram medidas as densidades óticas.

4.4.2 - Análise do crescimento com adição dos compostos fenólicos

Os quatro compostos fenólicos avaliados neste estudo (ácido ferúlico, quercetina, resveratrol e rutina) foram adicionados separadamente ao meio de crescimento YPD (2 % glicose) com concentrações 5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, bem como soluções controle 0 % etanol e com 2 % etanol e outro experimento foi realizado com o mesmo procedimento, utilizando as concentrações $1,0 \times 10^{-4}$, $1,5 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Em seguida, foram inoculados com a levedura *Saccharomyces* (Saflager W-34/70), previamente crescida em meio YPD (2 % glicose), sob agitação de 180 rpm a 28 °C e realizadas diluições em solução salina para ajustar a D.O._(600 nm) inicial para 0,1. Cada ensaio realizado em triplica, com volume final de 200 μL . A microplaca com 96 poços foi vedada usando plástico (Platemax-axysel sealing film, Axygen) e incubada na leitora Versamax (microplate reader, Molecular Devices) à temperatura de 28 °C por 16 horas, medindo-se a densidade ótica nos intervalos de 15 minutos.

4.4.3 - Análise de crescimento e atividade fermentativa em mostos de caldo de cana-de-açúcar com adição de rutina

Para os ensaios de crescimento e atividade fermentativa, foram preparados volumes de 100 mL de mosto de caldo de cana-de-açúcar das variedades RB 867515 (menor teor de compostos fenólicos) e RB 92579 (maior teor de compostos fenólicos), que foram inoculados com o fermento previamente preparado.

Estes mostos foram obtidos dos caldos de cana-de-açúcar, recém-cortadas, sendo congelados, e posteriormente, diluídos para teor de sólidos solúveis de 14 °Brix. Procedeu-se a inoculação com a levedura nos meios adicionados com a devida concentração do composto fenólico selecionado, para cada variedade, e realizou-se o mesmo procedimento sem adição do composto selecionado.

O processo fermentativo foi conduzido à temperatura de 28 °C. Um volume de 1 mL dos mostos fermentados foi coletado no início da fermentação

e após 6, 12, 24, 36 e 48 horas de fermentação, para a realização das análises: teor alcoólico, densidade ótica e sólidos solúveis.

4.4.3.1- Método de análise do teor alcoólico

As concentrações de etanol foram determinadas por cromatografia em fase gasosa, utilizando um padrão com grau cromatográfico da marca Merck. As amostras foram previamente destiladas em destilador analítico (marca Gibertini) e as identificações foram feitas por comparação do tempo de retenção do pico das amostras com o padrão e injetadas na mesma condição no cromatógrafo a gás. Todos os volumes injetados foram de 1 μ L.

As amostras dos fermentados foram analisadas, utilizando-se um cromatógrafo de fase gasosa (Modelo – GC-17^a / Fabricante - Shimadzu) com detector de ionização de chama (GC-FID), coluna capilar de sílica fundida PAG, dimensões (30 m de comprimento x 0.25 mm de espessura de filme x 0.25 μ m de diâmetro interno), tendo sido utilizados os seguintes gases: hélio (gás de arraste), ar sintético e hidrogênio, todos com alto grau de pureza (99,999 %). As condições das análises cromatográficas para as amostras dos fermentados foram: temperatura inicial 35 °C por 5 minutos, elevando-se até 100°C, à taxa de 10 °C por minuto. Esta temperatura foi então mantida por 10 minutos. Outros parâmetros operacionais relevantes foram:

- Temperatura do injetor: 180 °C
- Temperatura do detector: 200 °C
- Vazão do gás de arraste (He): 1 mL/min.
- Vazão da chama (H₂): 20 mL/min.
- Vazão do ar sintético: 175 mL/min.
- Razão de divisão: 10

Estas determinações de teor alcoólico de etanol foram obtidas a partir de curva analítica de etanol e expressas em gramas por litro. A faixa de concentração de etanol estabelecida para a curva analítica foi de 0 a 140 g.L⁻¹

em seis interações, sendo a equação da reta $y = 177,72x + 150575$ e $R^2 = 0,9947$.

4.4.3.2 - Determinação dos sólidos solúveis (expressos como °Brix)

Os teores de sólidos solúveis das amostras dos fermentados foram obtidos, utilizando-se um refratômetro analógico portátil (modelo RT- 30 ATC / fabricante Instrutherm), com escala (0 a 32) °Brix. Foram retiradas algumas gotas de cada amostra para obtenção da leitura. Os resultados foram expressos como a média de três medidas para cada amostra retirada.

4.4.3.3 - Determinação da densidade ótica

Os valores de densidade ótica das amostras dos fermentados, foram determinados com a utilização de um espectrofotômetro (modelo Ultrospec 2100 PRO / fabricante Amersham Biosciences), com a finalidade de determinar a biomassa celular. Foram retirados volumes de 1 mL de cada amostra, sendo os mesmos colocados em tubos Eppendorf (1 mL) e centrifugados (microcentrífuga / modelo CT 14000 / fabricante Cientec). Em seguida, estes volumes foram ressuspensos no mesmo volume de água destilada. Foram realizadas diluições para possibilitar a verificação do crescimento celular e obteve-se as leituras das densidades óticas ($D.O_{600\text{ nm}}$) de cada amostra.

4.4.4 - Análise de crescimento em meio YPS

Os experimentos de análise de crescimento da levedura foram preparados com volume 50 mL de meio YP (2 % peptona e 1 % extrato de levedura), adicionados 2 % sacarose e esterilizados. Os ensaios foram realizados em duplicata, com e sem adição de rutina, na concentração de $0,410\ \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, totalizando-se 4 ensaios. Foram coletadas amostras de 1 mL em intervalos de 2 horas até a estabilização da densidade ótica, o que ocorreu após 60 horas de fermentação (Figura 18).

4.4.5 - Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados para avaliar o efeito da adição de compostos fenólicos no crescimento de levedura etanologênica nas diferentes

concentrações (0, 5, 25, 50 e 100) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e com o mesmo procedimento, nas concentrações $1,0 \times 10^{-4}$, $1,5 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de compostos fenólicos (ác. ferúlico, quercetina, resveratrol e rutina), sendo realizados com três repetições. Curvas de crescimento foram traçadas na presença e ausência dos compostos fenólicos. As comparações entre as concentrações foram efetuadas a partir dos dados correspondentes à fase exponencial de crescimento determinado pelos coeficientes angulares da equação da reta (b), através da equação $Y = a + bX$. Conforme Monod (1949) a taxa de crescimento (μ) corresponde ao mesmo valor do coeficiente angular da equação da reta. As comparações de médias das densidades óticas estimando o crescimento da levedura em diferentes concentrações de compostos fenólicos e também, as comparações dos coeficientes angulares de médias das repetições para diferentes concentrações em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, foram realizadas por análise de variância (ANOVA) com aplicação do teste F ao nível de 5 % de significância e teste de Tukey a 5 % de significância, utilizando o programa SAS (versão 9.0).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Avaliação do crescimento da levedura em diferentes solventes

As concentrações de etanol, metanol e acetato de etila a 16 % promoveram um baixo crescimento, com a densidade ótica (D.O._{600nm}) da ordem de 0,2 ao final dos crescimentos celulares (Figura 11 e 12). Dentre os solventes avaliados nos experimentos, o etanol proporcionou uma boa solubilidade dos compostos fenólicos, semelhante aos demais em baixa concentração, podendo ser considerado de menor influência no crescimento; devido ao fato de ser um produto principal da fermentação. De acordo com Chanjirakul *et al.*, 2007, o etanol aumenta a atividade antioxidante de compostos fenólicos, reforçando assim, a escolha deste solvente para as etapas posteriores. Com estas considerações, selecionou-se o etanol na concentração de 2 % para solubilização dos compostos fenólicos para as etapas posteriores.

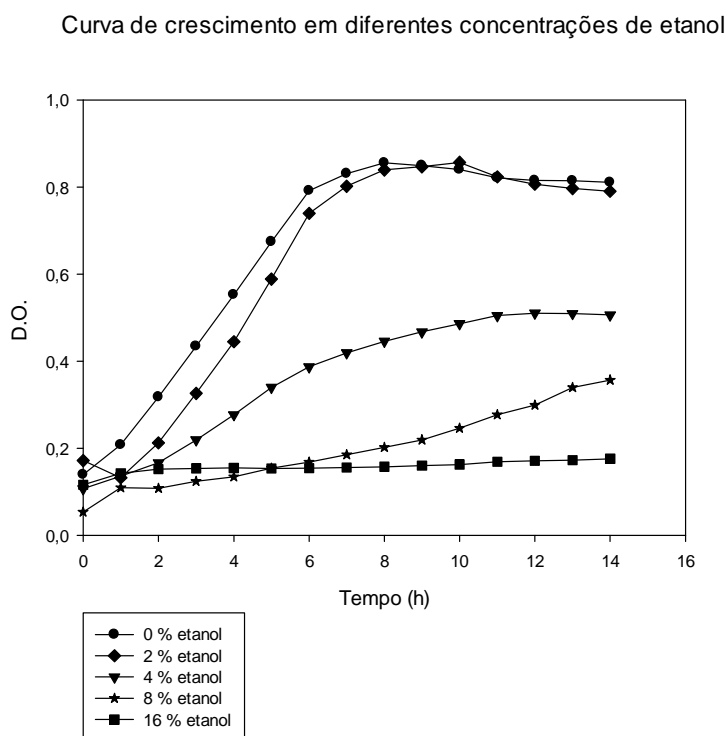
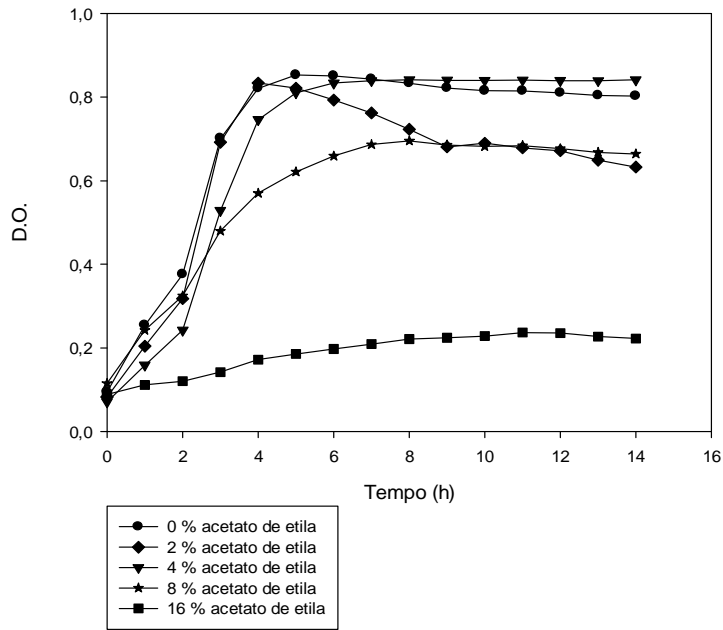


Figura 11 - Curvas de crescimento da levedura em meio de crescimento com diferentes concentrações (etanol)

Curva de crescimento em diferentes concentrações de acetato de etila



Curva de crescimento em diferentes concentrações de metanol

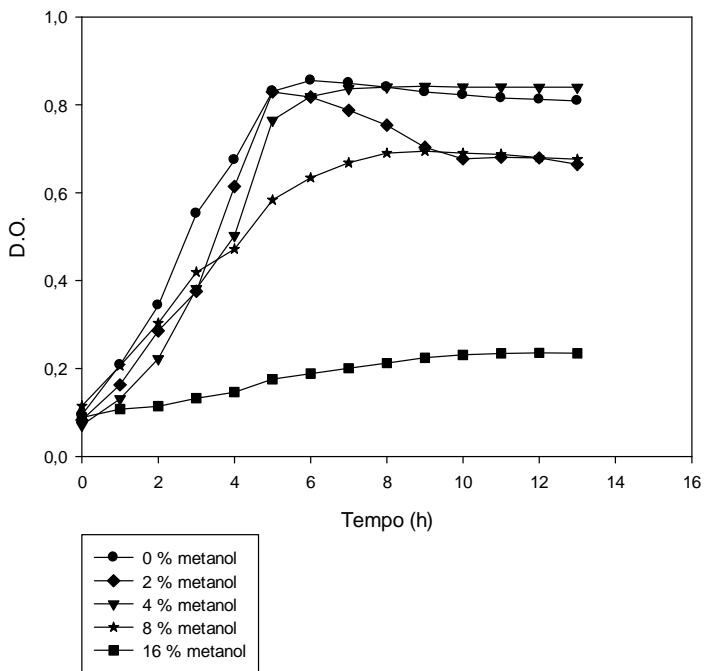


Figura 12 - Curvas de crescimento da levedura em meio de crescimento com diferentes concentrações (acetato de etila e metanol)

5.2 - Análise por microscopia ótica da solubilização dos compostos fenólicos em etanol

A figura 13 mostra as imagens da rutina dispersa em duas condições diferentes (dispersão e solubilização). A rutina é um polifenol que possui muitas hidroxilas em sua molécula, que favorecem as interações intermoleculares. Estas interações formam estruturas complexas, que mesmo estando em contato com solventes apropriados, podem apresentar cristais em meio solvente e, portanto, não estarem completamente solubilizadas e, por conseguinte, não estão biodisponíveis. É o que se observa na figura 13, onde na imagem a esquerda vê-se os cristais de rutina insolubilizados (dispersão) e na imagem da direita a forma totalmente solubilizada, sem cristais, onde a biodisponibilidade é efetiva.

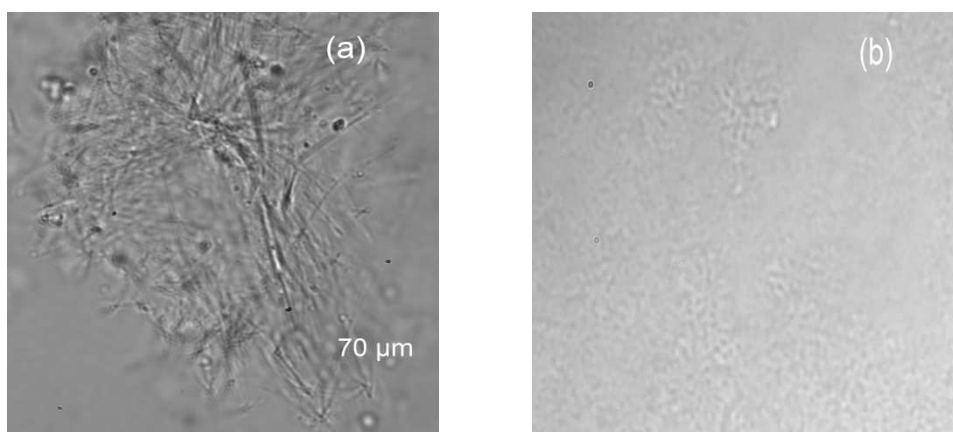


Figura 13 - As imagens de microscopia ótica (ampliação de 100 vezes) da solução de rutina em dispersão (a) e após solubilização (b).

O ácido ferúlico é um monofenol que apresenta poucas hidroxilas em sua molécula, não favorecendo as interações intermoleculares e sendo assim, não formam estruturas complexas. Este composto apresenta uma boa solubilidade em solventes apropriados (Tabela 2). Observou-se nas imagens de microscopia ótica para este composto fenólico que não havia formação de cristais. Em função desta não formação de cristais as imagens não estão apresentadas.

Nas soluções de quercetina preparadas com dispersão e solubilização, não foram observadas a presença de cristais, situação semelhante ao ácido ferúlico. Soluções de resveratrol não foram preparadas para análise em microscopia ótica, devido à indisponibilidade deste composto puro no laboratório.

5.3 - Avaliação de crescimento da levedura em meio YPD com adição dos compostos fenólicos

5.3.1 - Influência dos compostos fenólicos em dispersão sobre o crescimento da levedura em meio YPD

5.3.1.1 - Análise de densidade ótica do meio

As curvas de crescimento da levedura em meio YPD com adição dos compostos fenólicos ao final da fermentação (tempo - 14 horas), são apresentadas a seguir:

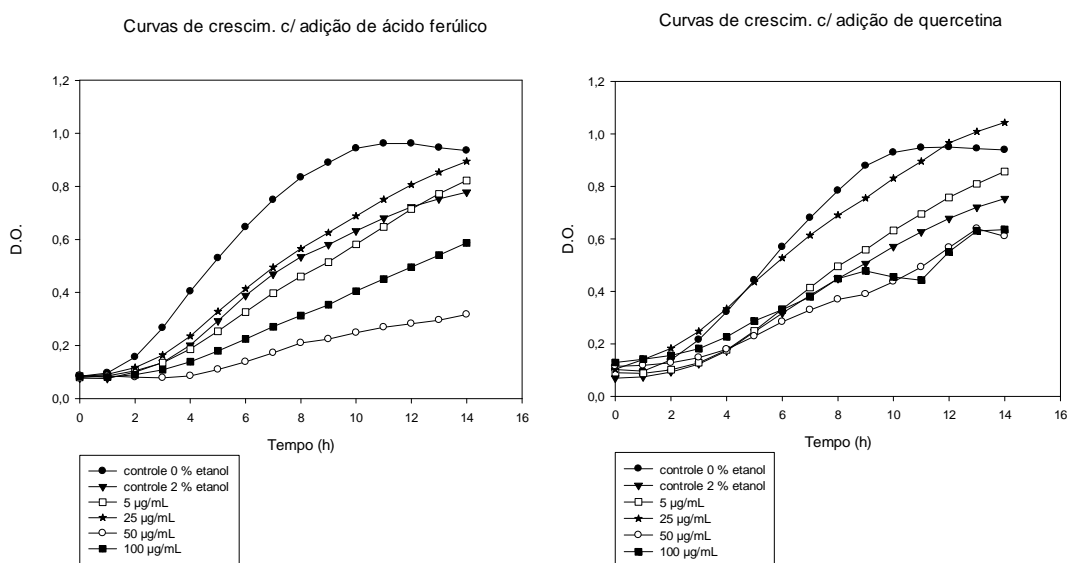


Figura 14 - Curvas de crescimento da levedura com adição de compostos fenólicos em dispersão em meio YPD.

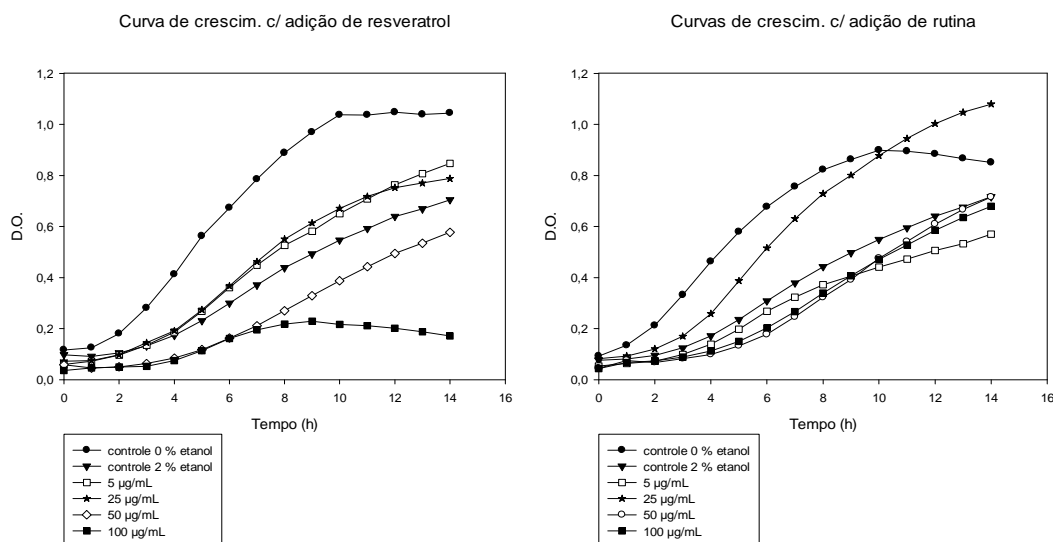


Figura 15 - Curvas de crescimento da levedura com adição de compostos fenólicos em dispersão em meio YPD.

Rutina e quercetina promoveram um maior crescimento da levedura, com densidade ótica (D.O. 600 nm) superior a 1,0 no final dos crescimentos celulares (Fig.14 e 15). Realizou-se as comparações de médias, por análise estatística Anova ($\alpha=0,05$) e teste de Tukey das densidades óticas dos compostos fenólicos ácido ferúlico, quercetina, resveratrol e rutina. Estes resultados estão expressos na tabela 5.

Compostos fenólicos em fermentados - primeiro experimento				
Concent.($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	ác. ferúlico	quercetina	resveratrol	rutina
controle 0 % etanol	0,9352 ^a	0,9395 ^a	1,0448 ^a	0,85114 ^{a,b}
controle 2 % etanol	0,7784 ^{a,b}	0,7536 ^a	0,7045 ^{a,b}	0,71678 ^{b,c}
5	0,8224 ^{a,b}	0,8570 ^a	0,8469 ^{a,b}	0,57034 ^c
25	0,8946 ^a	1,0438 ^a	0,7881 ^{a,b}	1,07954 ^a
50	0,3168 ^b	0,8325 ^a	0,5775 ^{a,b}	0,71541 ^{b,c}
100	0,5875 ^{a,b}	0,6360 ^a	0,5349 ^b	0,67928 ^{b,c}

Tabela 5 - Concentração final das células, estimadas por densidade ótica (D.O.), nas fermentações em meio YPD com compostos fenólicos. Médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5 %.

* As análises de variações são apresentadas nos anexos 1, 2, 3 e 4.

Rutina na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, promoveu um maior e menor crescimento, respectivamente. Nas curvas de crescimento em meio com ácido ferúlico, resveratrol e quercetina, as concentrações não apresentaram diferenças significativas (Tabela 5). A partir dos compostos analisados nestes experimentos, foi selecionada rutina na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as etapas posteriores, por ser o composto fenólico e a concentração que apresentou o maior crescimento dentre todos os tratamentos.

5.3.1.2 - Análise da velocidade específica de crescimento (μ)

A partir das velocidades específicas de crescimento (Tabela 6) dos compostos fenólicos adicionados ao meio sintético, pôde-se analisar a influência destes compostos sobre o crescimento da levedura. Estes resultados foram avaliados por comparação de médias. Dentre os compostos, a levedura em crescimento com ácido ferúlico apresentou velocidade específica de crescimento (μ) maior e menor nas concentrações, respectivamente, controle 0 % etanol e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 6). Já o crescimento da levedura em meio com quercetina, resveratrol e rutina, as velocidades específicas de crescimento não apresentaram diferença significativa nas diferentes concentrações (Tabela 6). Estas velocidades específicas de crescimento (μ) foram obtidas da fase logarítmica das curvas de crescimento.

Portanto, dentre os compostos fenólicos, o ácido ferúlico não contribuiu significativamente para o crescimento da levedura, pois a velocidade específica de crescimento (μ) é maior na ausência do composto e o contrário, ocorre na presença nas diferentes concentrações. Quercetina não contribuiu para o crescimento nas diferentes concentrações, pois não há diferença significativa entre as velocidades específicas de crescimento (μ). Resveratrol e rutina não contribuíram para o crescimento, pois não há diferença significativa entre as velocidades específicas de crescimento (μ) nas diferentes concentrações. Neste experimento de crescimento da levedura, rutina apresentou a maior velocidade específica de crescimento (μ) na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 6).

Dessa forma rotina foi selecionada para ser utilizada nos experimentos posteriores, uma vez que apresentou um melhor resultado sobre o crescimento.

Velocidade específica de crescimento (μ)				
concent. ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	ác. ferúlico	quercetina	resveratrol	rutina
Controle 0 % etanol	$0,437 \pm 0,03^a$	$0,394 \pm 0,03^a$	$0,381 \pm 0,03^a$	$0,416 \pm 0,03^a$
Controle 2 % etanol	$0,335 \pm 0,03^b$	$0,314 \pm 0,03^{a,b}$	$0,264 \pm 0,03^b$	$0,286 \pm 0,03^{a,b}$
5	$0,279 \pm 0,03^{b,c}$	$0,303 \pm 0,03^{a,b}$	$0,317 \pm 0,03^{a,b}$	$0,325 \pm 0,03^{a,b}$
25	$0,323 \pm 0,03^b$	$0,293 \pm 0,03^{a,b}$	$0,307 \pm 0,03^{a,b}$	$0,381 \pm 0,03^{a,b}$
50	$0,253 \pm 0,03^{b,c}$	$0,215 \pm 0,03^b$	$0,301 \pm 0,03^{a,b}$	$0,299 \pm 0,03^{a,b}$
100	$0,232 \pm 0,03^c$	$0,239 \pm 0,03^b$	$0,37 \pm 0,03^{a,b}$	$0,274 \pm 0,03^b$

Tabela 6 - Velocidade de crescimento da linhagem de *Saccharomyces sp.* em meio YPD, acrescidos de diferentes concentrações de compostos fenólicos a 28 °C. Médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5 %.

* As análises de variações são apresentadas nos anexos 5, 6, 7 e 8.

5.3.2 - Influência dos compostos fenólicos em solubilização sobre o crescimento da levedura em meio YPD

As curvas de crescimento da levedura em meio YPD com adição dos compostos fenólicos ao final da fermentação (tempo - 16 horas), são apresentadas a seguir:

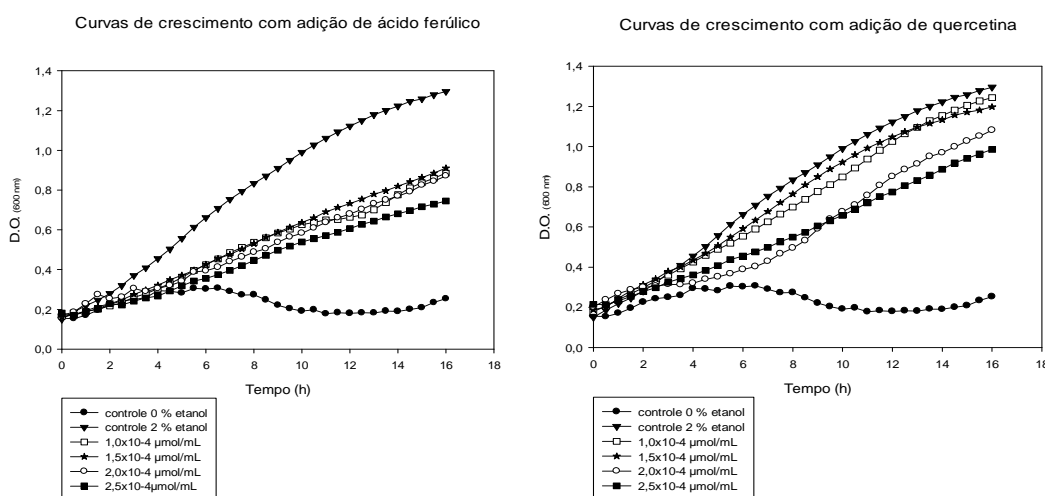


Figura 16 - Curvas de crescimento da levedura com adição de compostos fenólicos em solubilização em meio YPD

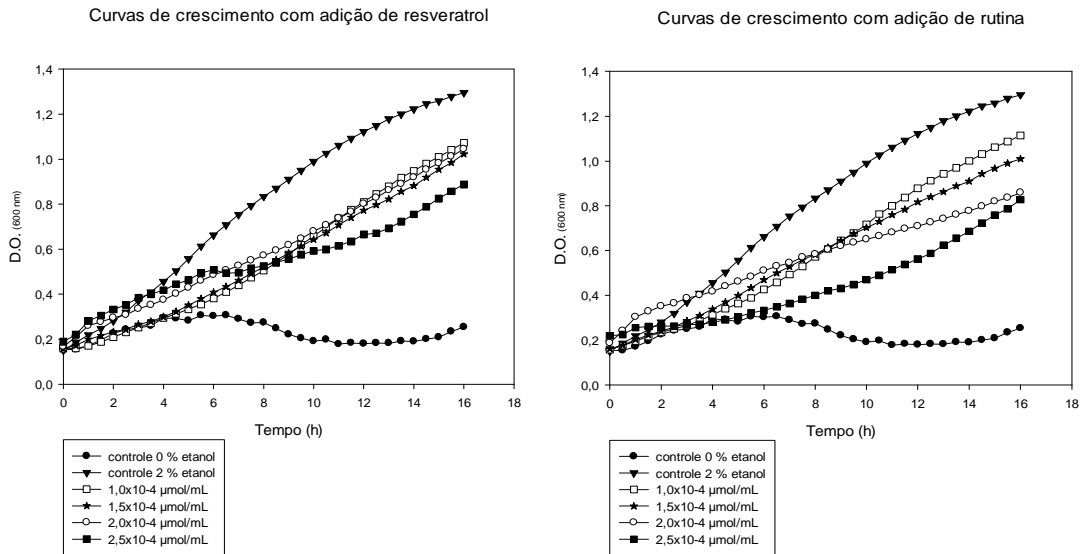


Figura 17 - Curvas de crescimento da levedura com adição de compostos fenólicos em solubilização em meio YPD

Outros ensaios foram realizados com adição de compostos fenólicos em meio sintético (YPD), efetuando-se a solubilização (item 4.3) destes compostos, possibilitando uma maior biodisponibilidade.

Nestes ensaios, grande parte dos compostos fenólicos e suas concentrações apresentaram uma influência positiva no crescimento da levedura. Ocorreram maiores crescimentos com quercetina, resveratrol e rutina, com densidade ótica (D.O._{600 nm}) superior ou igual a 1,0 no final dos crescimentos celulares. Todas as concentrações controle (0 % etanol; com glicose e sem composto fenólico) não apresentaram diferença significativa de crescimento para as diferentes concentrações nos ensaios e o contrário, verificou-se com o controle 2 % etanol (com glicose, etanol e sem composto fenólico).

Os compostos fenólicos nas quatro concentrações apresentam efeitos intermediários e a cinética de crescimento, parece não ser afetada nas primeiras seis horas.

Compostos fenólicos em fermentados - segundo experimento				
Concent.($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	ác. ferúlico	quercetina	resveratrol	rutina
controle 0 % etanol	1,2955 ^a	1,2955 ^a	1,2955 ^a	1,2955 ^a
controle 2 % etanol	0,2536 ^c	0,2536 ^b	0,2536 ^c	0,2536 ^c
$1,0 \times 10^{-4}$	0,8856 ^{a,b}	1,2446 ^a	1,07293 ^{a,b}	1,1144 ^{a,b}
$1,5 \times 10^{-4}$	0,9108 ^{a,b}	1,1977 ^a	1,02360 ^b	1,0096 ^{a,b}
$2,0 \times 10^{-4}$	0,8710 ^{a,b}	1,0819 ^a	1,04513 ^{a,b}	0,8583 ^b
$2,5 \times 10^{-4}$	0,745 ^b	0,9865 ^a	0,88817 ^b	0,8279 ^b

Tabela 7 - Concentração final das células, estimadas por densidade ótica (D.O.), nas fermentações em meio YPD com compostos fenólicos. Médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5%.

* As análises de variações são apresentadas nos anexos 9, 10, 11 e 12.

Ácido ferúlico não promoveu o crescimento nas diferentes concentrações (Tabela 7). Nas curvas de crescimento com quercetina, as concentrações não apresentaram diferenças significativas. Nas curvas de crescimento com resveratrol e rutina, verificou-se que não há diferença significativa entre as diferentes concentrações. Foram realizadas as comparações de médias das densidades óticas dos compostos fenólicos para os seis tratamentos do ácido ferúlico, quercetina, resveratrol e rutina.

Analisando as velocidades específicas de crescimento (μ) (Tabela 8) dos compostos fenólicos adicionados ao meio sintético, pode-se avaliar a influência destes compostos. Todos os compostos, ácido ferúlico, quercetina, resveratrol e rutina, não apresentaram diferenças significativas para as diferentes concentrações. Entre os compostos, ácido ferúlico e quercetina, apresentaram maiores velocidades específicas de crescimento, nas respectivas concentrações, $1,0 \times 10^{-4} \mu\text{mol.mL}^{-1}$, $2,5 \times 10^{-4} \mu\text{mol.mL}^{-1}$ e $1,5 \times 10^{-4} \mu\text{mol.mL}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-4} \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

Analisando os resultados, todos os quatro compostos fenólicos contribuem para o crescimento, pois as velocidades específicas (μ) são maiores na presença e o contrário, ocorre na ausência. A partir das

concentrações $2,0 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ para os compostos resveratrol e rutina, verifica-se uma redução das velocidades específicas (μ).

Velocidade específica de crescimento (μ)				
concent. ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	ác. ferúlico	quercetina	resveratrol	rutina
controle 0 % etanol	$0,199 \pm 0,04^a$	$0,199 \pm 0,04^a$	$0,199 \pm 0,04^a$	$0,199 \pm 0,04^a$
controle 2 % etanol	$0,135 \pm 0,06^a$	$0,135 \pm 0,06^a$	$0,135 \pm 0,06^{a,b}$	$0,135 \pm 0,06^{a,b}$
$1,0 \times 10^{-4}$	$0,182 \pm 0,01^a$	$0,138 \pm 0,05^a$	$0,138 \pm 0,01^{a,b}$	$0,151 \pm 0,03^{a,b}$
$1,5 \times 10^{-4}$	$0,138 \pm 0,02^a$	$0,161 \pm 0,01^a$	$0,129 \pm 0,03^{a,b}$	$0,122 \pm 0,02^{a,b}$
$2,0 \times 10^{-4}$	$0,116 \pm 0,04^a$	$0,148 \pm 0,02^a$	$0,096 \pm 0,03^b$	$0,067 \pm 0,02^b$
$2,5 \times 10^{-4}$	$0,125 \pm 0,04^a$	$0,108 \pm 0,04^a$	$0,072 \pm 0,03^b$	$0,091 \pm 0,04^b$

Tabela 8 - Velocidade de crescimento da linhagem de *Saccharomyces sp.* em meio YPD, acrescidos de diferentes concentrações de compostos fenólicos a 28°C.

* As análises de variações são apresentadas nos anexos 13, 14, 15 e 16.

5.3.3 - Influência dos compostos fenólicos em solubilização sobre o crescimento da levedura em meio YPS

Curva de crescimento (sacarose - 2%)

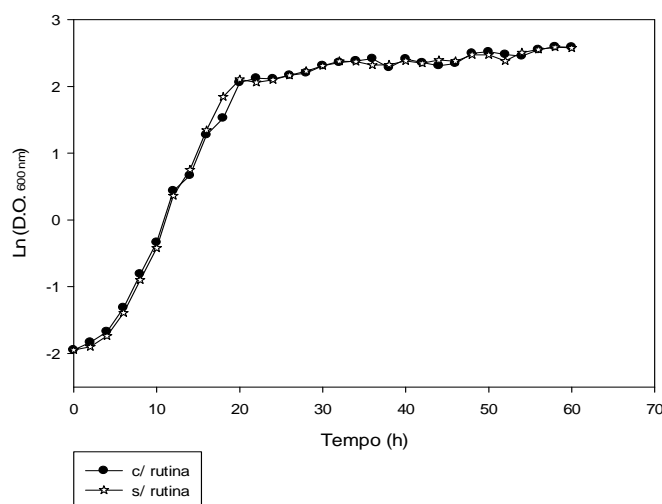


Figura 18 - Curva de crescimento da levedura em meio YPS adicionado com e sem rutina.

Esta parte experimental foi realizada em meio YP com sacarose como substrato, rutina em solubilização. A adição de rutina foi efetuada na

concentração de $0,410 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, sendo equivalente a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. De acordo com a figura 18, pode-se observar que a levedura não apresentou diferença de crescimento com e sem adição de rutina.

Estudos mais completos em meio com sacarose devem ser realizados para comprovar se os mesmos efeitos identificados em meio com glicose se repetem. Sabe-se que a levedura fermenta preferencialmente a glicose e posteriormente, os açúcares que necessitam de um meio mais complexo de transporte, embora, alguns sejam também altamente fermentescíveis.

5.4 - Avaliação do crescimento da levedura em caldo de cana-de-açúcar com e sem adição de rutina, expressos em densidade ótica e sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$)

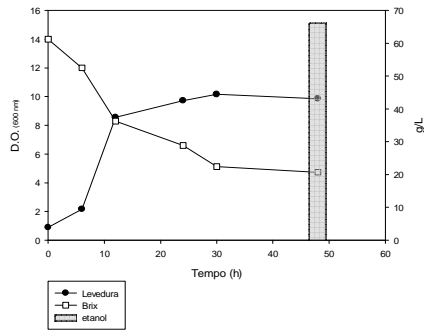
Nestes experimentos em caldos de cana-de-açúcar das variedades RB 867515 e RB 92579 com e sem adição de rutina, observou-se que, ao final dos crescimentos celulares os valores de densidades óticas ficaram muito próximos sempre no intervalo entre 8,5 a 10, aparentemente não ocorrendo um efeito diferenciado no crescimento celular quanto à adição ou não do composto fenólicos (Figura 18). Na Tabela 9, encontram-se os valores de densidade ótica, brix e das concentrações de etanol obtidas, referentes as variedades de cana-de-açúcar destes experimentos.

Variedades	com adição de rutina			sem adição		
	$^{\circ}\text{Brix}$	etanol	D.O.	$^{\circ}\text{Brix}$	etanol	D.O.
RB 867515	6,1	$52,8 \text{ g.L}^{-1}$	9,6	4,3	$58,3 \text{ g.L}^{-1}$	9,1
RB 92579	4,7	$66,2 \text{ g.L}^{-1}$	9,8	3,9	$64,1 \text{ g.L}^{-1}$	8,8

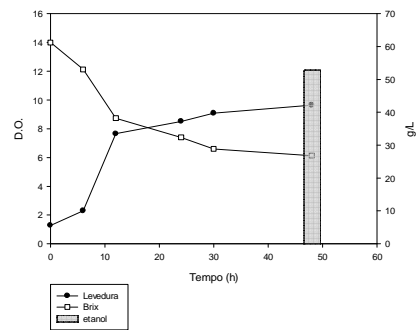
Tabela 9 - Final das fermentações em caldos de cana-de-açúcar nas duas variedades com e sem adição de rutina.

Com relação à produção de etanol, observou-se que ocorreu uma maior produção ao final da fermentação, nas fermentações da variedade RB 92579 com e sem adição de rutina. Naturalmente, a variedade RB 92579 apresenta uma maior concentração de compostos fenólicos, sendo uma característica intrínseca desta variedade e, portanto, podendo favorecer a maior produção de etanol.

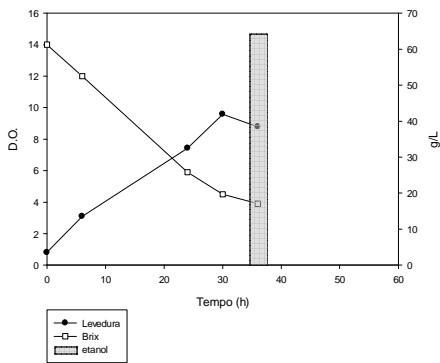
Curva de fermentação do caldo de cana-de-açúcar (RB 92579- c/ adição de rutina)



Curva de crescimento com caldo de cana-de-açúcar (RB 867515 - c/ adição de rutina)



Curva de crescimento do caldo de cana-de-açúcar (RB92579 - s/ adição de rutina)



Curvas de fermentação de caldo de cana-de-açúcar (RB 867515 - s/ adição de rutina)

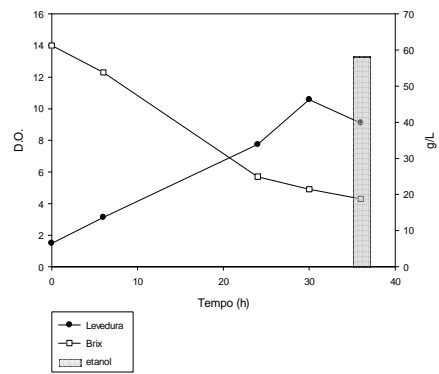


Figura 19- Avaliação do crescimento da levedura em caldo de cana-de-açúcar com e sem adição de rutina, expresso em densidade ótica e sólidos solúveis (expressos como °Brix)

6 - CONCLUSÕES:

Dentre os solventes avaliados numa primeira etapa deste trabalho para se definir qual seria o melhor para solubilização dos compostos fenólicos que seriam avaliados sobre o crescimento da levedura *Saccharomyces sp*, o etanol foi selecionado em comparação com acetato de etila e metanol, por apresentar boa solubilidade, não muito diferenciado em relação aos demais. Por ser um produto da própria fermentação alcoólica e, possivelmente potencializador da ação antioxidante dos compostos fenólicos foi selecionado para as etapas posteriores deste trabalho.

Para os compostos fenólicos ácido ferúlico, quercetina e resveratrol, a adição em meio YPD não proporcionou um maior crescimento da levedura, expresso em velocidade específica de crescimento, na primeira etapa dos experimentos com dispersão. A rutina propiciou, nesta primeira etapa, em relação aos demais compostos, uma maior velocidade específica de crescimento. Nos experimentos realizados com estes quatro compostos fenólicos em segunda etapa com solubilização, observou-se que todos os compostos apresentaram maiores velocidades específicas de crescimento. Sendo assim, todos pareceram contribuir para o crescimento da levedura e o composto quercetina propiciou maiores velocidades específicas de crescimento. Dentre os compostos avaliados, foi selecionada rutina à concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as etapas posteriores, por apresentar nestes primeiros ensaios, um melhor crescimento celular da levedura *Saccharomyces sp*.

Desta forma, a rutina foi adicionada em caldos de cana-de-açúcar de duas variedades (RB 867515 e RB 92579). O crescimento celular da levedura *Saccharomyces sp* não foi diferenciado nos caldos de cana-de-açúcar das duas variedades, quanto à adição de rutina. O caldo de cana-de-açúcar da variedade (RB 92579) apresentou uma elevação na produção de etanol com adição de rutina em comparação com a outra variedade (RB 867515).

Os compostos fenólicos analisados neste trabalho, quando presentes no processo fermentativo, parecem conferir uma proteção ou “inibição” do efeito

oxidativo do etanol sobre a levedura *Saccharomyces sp.*, proporcionando um maior crescimento celular no final deste processo. Estes compostos, para poderem desempenhar esta função de proteção, precisam estar solubilizados, sendo este fator importante para torná-los biodisponíveis e assim serem absorvidos e metabolizados pela levedura para exercerem a função antioxidante. Os valores de velocidades específicas de crescimento mais elevados nas fermentações com solubilização dos compostos fenólicos comprovam este efeito.

Nos experimentos realizados com adição de rutina nos caldo de cana-de-açúcar de duas variedades (RB 867515 e RB 92579) pode-se observar que, as fermentações apresentaram um maior intervalo de tempo para atingir o final do processo em comparação com experimentos sem adição deste composto. A partir da análise estatística dos experimentos realizadas nos primeiros ensaios, rutina, que foi selecionada dentre os quatro compostos fenólicos, pode ser adicionada à concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para se obter um melhor crescimento celular da levedura *Saccharomyces sp.*

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALFONSI, R. R.; PEDRO JUNIOR, M. J.; BRUNINI, O.; BARBIERI, V. **Condições climáticas para cana-de-açúcar.** In: PARANHOS, S. B. (Coord.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas, Fundação Cargil, v. 1, p. 42-45, 1987.

AMRI, A.; CHAUMEIL, J.C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. **Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations.** Journal of Controlled Release 158, p. 182–193, 2012.

ARISTIDES, E. V. S.; FERRO, J. H. A.; OLIVEIRA, M. W.; OLIVEIRA, T. B. A.; PAULINO, A. S. **Qualidade do caldo de duas variedades de cana adubadas com doses de cobre e manganês.** IN: IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica- Belém - PA, 2009.

BALASUNDRAM N.; SUNDRAM K.; SAMMAN, S. **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** Food Chem. 99 (1): 191-203, 2006.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.

BIASUTTO, L.; MAROTTA, E.; BRAASCHIA, A.; FALLICA, M.; MATTAREI, A.; GARBISA, S.; ZORATTI, M.; PARADISI, C. **Soluble polyphenols: Synthesis and bioavailability of 3,4,5-tri(a-D-glucose-3-O-succinyl) resveratrol.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19, 6721–6724, 2009.

BISSON, L. F. **Stuck and sluggish fermentations.** American Journal of Viticulture and Enology, Davis, v. 50, n. 1, p. 107-119, 1999.

BRASIL. Decreto nº 4.851, de 02 de outubro de 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, Seção 1, 03 out. 2003.

BRASIL. Lei nº 12.490, de 16 setembro de 2011. Altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 9.847, de 26 de outubro de 1999, que dispõem sobre a política e a fiscalização das atividades relativas ao abastecimento nacional de combustíveis; o § 1º do art. 9º da Lei nº 8.723, de 28 de outubro de 1993, que dispõe sobre a redução de emissão de poluentes por veículos automotores. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da Cana-de-Açúcar e Agroenergia**. Disponível em: www.mapa.gov.br. Acesso em: 16/09/12a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Venda de cachaça para os EUA cresce 12,62% em 2012**. Disponível em: www.mapa.gov.br. Acesso em: 16/09/12b.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Secretaria de comércio Exterior. **Conhecendo o Brasil em Números**. Disponível em: www.desenvolvimento.gov.br. Acesso em: 16/09/12c.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. **Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents**. Food Chemistry 115, p. 1542–1548, 2009.

CASTRO, S. B. de; ANDRADE, S. A. **Tecnologia do açúcar**. Ed. Universitária da UFPE. Recife. 2007.

CHANJIRAKUL, K.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y. & SIRIPHANICH, J. **Natural volatile treatments increase free-radical scavenging capacity of strawberries and blackberries.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 87, 1463-1472, 2007.

CHAO, H. H.; JUAN, S. H.; LIU, J. C.; YANG, H. Y.; YANG, E.; CHENG, T. H.; SHY, K. G. **Resveratrol inhibits angiotensin II – Induced endothelin 1 gene expression and subsequent proliferation in rat aorte smooth muscle cells.** European Journal of Pharmacology v. 515, p. 1-9, 2005.

CHEN, J. C. P.; CHOU, C. **Cane Sugar Handbook** - A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 12 ed. New York: John Wiley & Sons, 1993.

CHEN, J. H.; HO, C. T. **Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds.** J. Agric. Food Chemistry. Chicago: v, 45, n. 7, p. 2374-2378, 1997.

CHONGWOO, Y.; YOUNG, G. S.; ANITA, C.; LI, Y.; KOSMEDER, J. W.; LEE, Y. S.; HIRSCHELMAN, W. H.; PEZZUTO, J. M.; METHA, R. G.; VAN BREEMEN, R. B. **Human, Rat, and Mouse Metabolism of Resveratrol.** Pharmaceutical Research v. 19, p. 1907-1914, 2002.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. **Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols; structureactivity relationship.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Tokyo: v. 56, n. 2, p. 324-235, 1992.

DE OLIVEIRA, E. B. **Oxydation de composés monophénoliques par la laccase de *Myceliophthora thermophyla* en présence de chitosane: application à la production de colorants.** Dissertação (Mestrado). Institut National Polytechnique de Lorraine, Lorraine, França, 2006.

FAHL, J. I.; CAMARGO, N. B. P.; PIZZINATTO, M. A.; BETTI, J. A.; MELO, A. M. T.; DEMARIA, I. C. & FURLANI, A. M. C. (eds.). Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas , **Boletim 200**, ed. 6, IAC, p. 396, 1998.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 393-395, 1999.

FERNANDES, O. W. B. **Avaliação de variedades de cana-de-açúcar para produção de cachaça artesanal e a interferência dos resultados no comportamento do produtor na região de Salinas-MG: Uma contribuição extensionista**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ, 2005.

FLANZY, C. **ENOLOGIA: Fundamentos Científicos y tecnológicos**. Madrid: Mundi-Prensa, p. 784, 2000.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.

GARCÍA-RUIZ, A.; BARTOLOMÉ, B.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J.; PUEYO, E.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; MORENO-ARRIBAS, M. V. **Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine**. *Food Control* 19, 835–841, 2008.

GIORI, F. P. **Adaptação de metodologia de digestão *in vitro* e determinação da Bioacessibilidade *in vitro* de β - caroteno em três variedades de batata-doce de polpa alaranjada**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

HERMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.50, p.473-503, 1999.

HIRSHFIELD, I. N.; TERZULLI, S.; O'BYRNE, C. **Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria**. Science Progress 86, 245–269, 2003.

HOLLMAN, P. C. H; KATAN, M. B. **Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability**. Food Chem Toxicol: 37 (9/10): 937-42, 1999.

HUDSON, B.J.F. Ed. **Food Antioxidants, Elsevier Applied Science**. London, 1990;

KAKRAN, M.; SHEGOKAR, R.; SAHOO, N. G.; SHAAL, L. A.; Li, L.; MÜLLER, R. H. **Fabrication of quercetin nanocrystals: Comparison of different methods**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 80, p. 113 - 121, 2012.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E. J. R. **Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids**. Adv. Exp. Med. Biol., New York, v. 366, p. 351-376, 1994.

KING, A.; YOUNG, G. **Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals**. J Am Diet Assoc. 50 (2): 213-8, 1999.

KOLB, E. **Vinos de frutas – Elaboración artesanal e industrial**. Zaragoza - Espanha, Ed. Acribia, p. 232, 2002.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**. Fifth Edition, Ed. Elsevier, p. 3, 262, 263, 734 - 744, 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Traduzido por SIMÕES, A. A.; LODE, W. R. N. São Paulo: Ed. SARVIER, 2ªed., 1995.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, p. 593, 2001.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.) **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, p. 1-43 (Biotecnologia Industrial; v.3), 2001.

MACEDO, N. **Variedades da cana-de-açúcar, 2008.ComCiência**. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/comciencia/?section=23hjd=258>>. Acesso em: 02/06/2011.

MAPA, **Instrução Normativa Nº 13**, de 29 de junho de 2005. Disponível em: legislacao/mapa/IN13.pdf. Acesso em: 30/06/2011.

MATTILA, P.; HELLSTROM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. **Journal of Food, Composition and Analysis**, v. 20, 2007.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. **Sirtuins in mammals: insights into their biological function**. *Biochem J*, v.404, n.1, May, p.1-13. 2007.

MOLLAPOUR, MEHDI; PIPER PETER W. **Weak Organic Acid Resistance of Spoilage**. *Yeasts British Mycological Society Symposia Series, Volume 27*, p. 143-145, 2008.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of microbiology**, Palo Alto, v. 3, p. 371, 1949.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in food**. *J Chromatogr A*; 1054 (1/2): 95-111, 2004.

NANDY, R.; SUBRAMONI, M.; VARGHESE, B.; SANKARARAMAN, S.; **Intramolecular π -Stacking Interaction in a Rigid Molecular Hinge Substituted with 1-(Pyrenylethynyl) Units**, Journal Org. Chem., 72: p. 938-944, 2007.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E. V.; HOORN, D. E. C. V.; BOELEN, P. G.; NORREN, K. V.; LEEUWEN, P. A. M. V. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications**. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 74, p. 418-425, 2001.

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. **Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*)**. Revista Analytica, São Paulo, n. 21, 2006.

OKADA, W.; FUKUDA, H.; MORIKAWA, H. **Kinetic expressions of ethanol production rate and ethanol consumption rate in baker's yeast cultivation**. J. Ferment. Technol., 59:103-109, 1981.

PAMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition**. Bioresource Technology, v. 74, p. 25-33, 2000.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. **Flavonoids as medicinal agents: recent advances**. *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 57, p. 371-389, 1991.

PATZER, A.; KNORKE, H.; LANGER, J.; DOPFER, O. **IR spectra of phenol+-(O₂)_n cation clusters (n = 1-4): Hydrogen bonding versus stacking interactions**. Chemical Physics Letters 457, 298-302, 2008.

PEDRIALI, C. A., **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PETITJEAN, A.; KHOURY, R. G.; KYRITSAKAS, N. & LEHN, J. M. **Dynamic Devices Shape Switching and Substrate Binding in Ion-Controlled Nanomechanical Molecular Tweezers**, J. Am. Chem. Soc.126 (21): 6637-6647, 2004.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

RAZMARA, R.S.; DANESHFAR, A.; SAHRAEI, R. **Solubility of quercetin in water + methanol and water + ethanol from (292.8 to 333.8) K**. J. Chem. Eng. Data, p. 3934–3936, 2010.

ROS, P.B. **Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo da soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. Dissertação (mestrado), Piracicaba/SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic, 1995.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SINCLAIR, D. A. **A natural substance found in red wine is shown to extend lifespan in mice, 2006**. Disponível em: http://websites.afar.org/site/PageServer?pagename=IA_feat46. Acesso em: 05 /11/ 2011.

SORATA, Y.; TAKAHAMA, U.; KIMURA, M. **Protective effect of quercetin and rutin on the photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin**. Biochim. Biophys. Acta., v. 799, n. 3, p. 313-317, 1984.

SOUZA, J. **Estudo da eficiência de alguns polielitrólitos utilizados na clarificação do caldo de cana**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

SRINIVAS, K.; KING, J. W.; HOWARD, L. R.; MONRAD, J. K. **Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water**. Journal of Food Engineering 100, p. 208–218, 2010.

STAHL, W.; VAN DEN BERG, H.; ARTHUR, J.; BAST, A.; DAINTY, J.; FAULKS, R. M.; GÄRTNER, C.; HAENEN, G.; HOLLMAN, P.; HOLST, B.; KELLY, F. J.; POLIDORI, M. C.; RICE-EVANS, C.; SOUTHON, S.; VAN VLIET, T.; VIÑA-RIBES, J.; WILLIAMSON, G.; ASTLEY, S.B. **Bioavailability and metabolism**. Molecular Aspects of Medicine 23, 39–100, 2002.

SUN, XILAN; PENG, BIN; YAN, WEIDONG. **Measurement and correlation of solubility of trans-resveratrol in 11 solvents at T = (278.2, 288.2, 298.2, 08.2, and 318.2) K**. J. Chem. Thermodynamics 40, p. 735–738, 2008.

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

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z. W.; SHIMIZU, M. **Antioxidative activity of flavones and flavonols in vitro**. Phytother. Res., Bognor Regis, v. 11, p. 446-449, 1997.

ZI, JUNQING; PENG, BIN; YAN, WEIDONG. **Solubilities of rutin in eight solvents at T = 283.15, 298.15, 313.15, 323.15, and 333.15K**. Fluid Phase Equilibria 261, p. 111–114, 2007.

ANEXOS

Anexo 1 – Análise de variância das médias das concentrações de ácido ferúlico com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.57702303	0.11540461	4.17	0.0307
Error	9	0.24885120	0.02765013		
Corrected Total	14	0.82587422			

$R^2 = 0.698681$ C.V.= 22.33904

Anexo 2 - Análise de variância das médias das concentrações de quercetina com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.28500705	0.05700141	1.42	0.3032
Error	9	0.36004256	0.04000473		
Corrected Total	14	0.64504960			

$R^2 = 0.441837$ C. V. = 23.69466

Anexo 3 - Análise de variância das médias das concentrações de resveratrol com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.41842826	0.08368565	4.12	0.0317
Error	9	0.18266721	0.02029636		
Corrected Total	14	0.60109547			

$R^2 = 0.696109$ C.V.= 18.23979

Anexo 4 - Análise de variância das médias das concentrações de rutina com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.42189990	0.08437998	10.65	0.0009
Error	10	0.07920474	0.00792047		
Corrected Total	15	0.50110464			

$R^2 = 0.841940$ C.V.= 11.46872

Anexo 5 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de ácido ferúlico em seis tratamentos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.05251500	0.01050300	18.05	0.0004
Error	8	0.00465620	0.00058203		
Corrected Total	13	0.05717121			

$R^2 = 0.918557$ C.V. = 7.672715

Anexo 6 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de quercetina em seis tratamentos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.04226631	0.00845326	6.83	0.0068
Error	9	0.01113539	0.00123727		
Corrected Total	14	0.05340170			

$R^2 = 0.791479$ C. V. = 12.12673

Anexo 7 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de resveratrol em seis tratamentos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.02342642	0.00468528	3.77	0.0404
Error	9	0.01117193	0.00124133		
Corrected Total	14	0.03459835			

$R^2 = 0.677096$ C. V. = 10.81502

Anexo 8 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de rutina em seis tratamentos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.04025861	0.00805172	3.97	0.0304
Error	10	0.02029322	0.00202932		
Corrected Total	15	0.06055184			

$R^2 = 0.664862$ C. V. = 13.86146

Anexo 9 - Análise de variância das médias das concentrações de ácido ferúlico com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.70222293	0.34044459	14.05	0.0001
Error	12	0.29081515	0.02423460		
Corrected Total	17	1.99303808			

$R^2 = 0.854084$ C. V. = 18.82630

Anexo 10 - Análise de variância das médias das concentrações de quercetina com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	2.24899964	0.44979993	24.25	<.0001
Error	12	0.22258068	0.01854839		
Corrected Total	17	2.47158032			

$R^2 = 0.909944$ C. V. = 13.48515

Anexo 11 - Análise de variância das médias das concentrações de resveratrol com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.90597300	0.38119460	40.79	<.0001
Error	12	0.11213981	0.00934498		
Corrected Total	17	2.01811282			

$R^2 = 0.944433$ C. V. = 10.39668

Anexo 12 - Análise de variância das médias das concentrações de rutina com seis tratamentos para o crescimento ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.91675637	0.38335127	20.68	<.0001
Error	12	0.22244584	0.01853715		
Corrected Total	17	2.13920221			

$R^2 = 0.896015$ C. V. = 15.24299

Anexo 13 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de ácido ferúlico em seis tratamentos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.01538157	0.00307631	1.94	0.1677
Error	11	0.01747663	0.00158878		
Corrected Total	16	0.03285820			

$R^2 = 0.468120$ C. V. = 27.08500

Anexo 14 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de quercetina em seis tratamentos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.01383663	0.00276733	1.83	0.1808
Error	12	0.01812021	0.00151002		
Corrected Total	17	0.03195685			

$R^2 = 0.432979$ C.V.= 26.25309

Anexo 15 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de resveratrol em seis tratamentos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.02794587	0.00558917	4.28	0.0182
Error	12	0.01566620	0.00130552		
Corrected Total	17	0.04361207			

$R^2 = 0.640783$ C. V. = 28.18892

Anexo 16 - Análise de variância das médias de velocidade específica de crescimento com adição de rutina em seis tratamentos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.03225966	0.00645193	4.84	0.0118
Error	12	0.01599531	0.00133294		
Corrected Total	17	0.04825497			

$R^2 = 0.668525$ C. V. = 28.65362