

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS COMERCIAIS NO
PROCESSAMENTO E NA QUALIDADE DE SUCO DE MAÇÃ**

PONTA GROSSA

2013

ACÁCIO ANTONIO FERREIRA ZIELINSKI

**IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS COMERCIAIS NO
PROCESSAMENTO E NA QUALIDADE DE SUCO DE MAÇÃ**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Wosiacki

Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

PONTA GROSSA

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Zielinski, Acácio Antonio Ferreira
Z66 Impacto da aplicação de enzimas
pectinolíticas comerciais no processamento
e na qualidade de suco de maçã/ Acácio
Antonio Ferreira Zielinski. Ponta Grossa,
2013.
75f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e
Tecnologia de Alimentos - Área de
Concentração: Ciências e Tecnologia de
Alimentos), Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Wosiacki.
Co-Orientador: Prof. Dr. Alessandro
Nogueira.

1.Estádio de maturação. 2.Pectinases
comerciais. 3.Análise multivariada.
4.Compostos fenólicos. 5.Capacidade
antioxidante. I.Wosiacki, Gilvan. II.
Nogueira, Alessandro. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV. T.

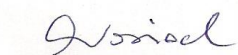
CDD: 664

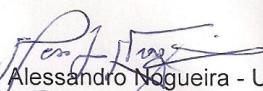
TERMO DE APROVAÇÃO

Acácio Antonio Ferreira Zielinski

IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS COMERCIAIS NO PROCESSAMENTO E NA QUALIDADE DE SUCO DE MAÇÃ

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:


Orientador Prof. Dr. Gilvan Wosiacki - UEPG


Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG


Profa. Dra. Maria Helene Giovanetti Canteri – UTFPR


Profa. Dra. Michele Rigon Spier - UFPR

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de 2013.

*Dedico este trabalho a minha família que me apoiou
durante o período do Mestrado*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me dar a vida e forças para a realização deste trabalho.

A minha família por todo apoio, carinho e atenção que foram dedicados a mim durante a minha vida pessoal e profissional. Muito obrigado aos meus amados Antonio, Zenir, Jessica e Cyntia.

Ao Professor e amigo Gilvan Wosiacki por me orientar neste trabalho e nos ensinamentos.

Ao Professor e amigo Alessandro Nogueira por me co-orientar e pela ajuda.

Aos membros da banca: Professores Alessandro, Maria Helene e Michele por aceitarem a participação e avaliarem o trabalho.

Aos professores do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Departamento de Engenharia de Alimentos pela estrutura fornecida.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos amigos do mestrado e do Grupo de Trabalho sobre Maçã (GTM).

RESUMO

A indústria de processamento de suco de frutas teve um desenvolvimento espantoso ao longo dos últimos 100 anos e invariavelmente enzimas participaram deste fenômeno, podendo ser utilizadas na maceração, na extração e na clarificação. O objetivo deste trabalho foi verificar o impacto da aplicação de preparações enzimáticas (Ultrazym[®] AFP L, Pectinex[®] Ultra Clear, Pectinex[®] SMASH XXL, Panzym[®] YieldMASH) comerciais para auxiliar a etapa de maceração visando aumentar a produção no processamento de suco de maçã sobre as características físico e químicas dos produtos. O suco, obtido por maceração com adição de enzimas na polpa, foi extraído por força centrífuga das cultivares *Fuji Suprema* e *Lis Gala*. Esse processamento associado ao uso de técnicas estatísticas multivariadas (PCA e HCA) permitiu verificar a ação das preparações enzimáticas nos parâmetros de físico e químicos avaliados (rendimento, viscosidade, pH, açúcares, ácido D-galacturônico, acidez total, turbidez, cor, perfil de compostos fenólicos, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante). O uso das técnicas estatísticas multivariadas permitiu explorar e classificar de maneira a concluir a semelhança ou a diferença entre os produtos obtidos com ou sem as preparações enzimáticas. As frutas processadas em estágio de pré-maturação da cultivar *Lis Gala* não apresentaram mudanças nos parâmetros físicos e químicos analisados. O uso da preparação Pectinex[®] SMASH XXL não ocasionou mudanças na maioria dos sucos em relação aos controles (sem enzimas). As outras preparações testadas (Pectinex[®] Ultra Clear, Ultrazym[®] AFPL, Panzym[®] YieldMASH) causaram alterações nesses parâmetros para todos os estádios de maturação da cultivar *Fuji Suprema* e para os estádios maduro e senescente da cultivar *Lis Gala*. O interesse nos compostos fenólicos está vinculado à sua capacidade antioxidante, a qual contribui para a proteção dos efeitos prejudiciais do estresse oxidativo na saúde humana. De acordo com o PCA e HCA, as quatro preparações enzimáticas utilizadas foram efetivas nos estádios verde e maduro da cultivar *Lis Gala* para aumentar a extração dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante (FRAP). Para a *Fuji Suprema* todas as enzimas foram efetivas no estágio de pré-maturação, enquanto para o estágio maduro apenas Pectinex[®] Ultra Clear e Panzym[®] YieldMASH foram capazes de aumentar a concentração de fenólicos e atividade antioxidante. No estágio senescente dos frutos não foi observada alteração com a aplicação das preparações enzimáticas, devido ao fato da presença das enzimas endógenas, que podem minimizar ou inibir a ação da preparação adicionada. Com os resultados encontrados destaca-se a importância de se conhecer o estágio de maturação e a cultivar selecionada no processamento de suco para a seleção adequada da preparação enzimática, visando atender a eficiência do processo e as características do produto final.

Palavras-chaves: estágio de maturação, pectinases comerciais, análise multivariada, compostos fenólicos, capacidade antioxidante

ABSTRACT

Industrial processing of fruit juices had an amazing development over the past 100 years and invariably enzymes participated in this phenomenon, they can be used in the maceration, extraction and clarification. The aim of this study was to verify the impact of the application of commercial enzymatic preparations (Ultrazym[®] AFP L, Pectinex[®] Ultra Clear, Pectinex[®] SMASH XXL, Panzym[®] YieldMASH) in the apple juice processing on the physical and chemical characteristics of the products. The juice obtained by enzymatic maceration of the pulp and extracted by centrifuge force associate to the use of multivariate statistical techniques (PCA and HCA) showed the action of the enzymatic preparations in the parameters evaluate (yield, viscosity, pH, sugars, D-galacturonic acid, total acidity, color, individual phenolic compounds, total phenolic compounds and antioxidant capacity). The use of multivariate statistical techniques allowed exploring and classifying of way to conclude that the juices obtained with or without the enzymatic preparations showed similarity or difference between them. The fruits processed in unripe stage of *Lis Gala* variety did not showed changes in physical and chemicals parameters evaluated. As well as, the use of Pectinex[®] SMASH XXL did not cause changes in most juices in relation to controls (without enzymes). The other tested preparations (Pectinex[®] Ultra Clear, Ultrazym[®] AFPL, Panzym[®] YieldMASH) caused changes in these parameters for all ripening stages of *Fuji Suprema* variety and ripe and senescent stages of *Lis Gala* variety. Currently the interest in phenolic compounds is attached in theirs antioxidant capacity, which contributes to the protection from the harmful effects of oxidative stress on human health. According to the PCA and HCA the four enzymatic preparations used were effective in the unripe and ripe stage for *Lis Gala* variety to increase the phenolic compounds and the antioxidant capacity (FRAP). For *Fuji Suprema* all enzymes were effective at the unripe stage, while for ripe stage only Pectinex[®] Ultra Clear and Panzym[®] YieldMASH were able to increase the phenolic and antioxidant properties. In senescent stage of fruits were not observed change with the application of the enzymatic preparations, due to the fact of presence of endogenous enzymes that may minimize or inhibit the action of preparation added. Based on the results found, highlights that it is necessary to know the ripening stage and the variety selected in the juice processing to proper selection of the enzymatic preparation to attend the efficiency of process and the characteristics of the final product

Keywords: ripening stages, commercial pectinases, multivariate techniques, phenolic compounds, antioxidant activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1 – Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina 20

CAPÍTULO II

Figura 1 – Classificação dos frutos de acordo com teste de Lugol 29

Figura 2 – Gráfico de dispersão simples entre PC1 vs. PC2 das variáveis entre as amostras de suco de maçã..... 40

Figura 3 – Dendrograma das amostras de sucos obtidas pela análise hierárquica de agrupamento.. 41

CAPÍTULO III

Figure 1 – A scatter plot PC1 vs. PC2 on the main sources of variability between the apple juices samples..... 58

Figure 2 – Dendrogram for juices samples obtained from the hierarchical cluster analysis. .. 59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Características físicas da <i>Lis Gala</i> e <i>Fuji Suprema</i> em diferentes estádios de maturação.....	29
Tabela 2 – Parâmetros físicos e químicos dos sucos controles e por extração enzimática da cultivar <i>Fuji Suprema</i> em diferentes estádios de maturação.	37
Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos dos sucos controles e por extração enzimática da cultivar <i>Lis Gala</i> em diferentes estádios de maturação.	38
Tabela 4 – Parâmetros físicos e químicos dos sucos de maçãs.	42

CAPÍTULO III

Table 1 – Physical characteristics of <i>Lis Gala</i> and <i>Fuji Suprema</i> in different ripening stages.	50
Table 2 – Effect of enzymatic treatment on the principals phenolic compounds, total phenols and antioxidant capacity (FRAP) in apple juice processing with fruit of three different ripening of <i>Fuji Suprema</i> variety.....	56
Table 3 – Effect of Enzymatic treatment on the principals phenolic compounds, total phenols and antioxidant capacity (FRAP) in apple juice processing with fruit of three different ripening of <i>Lis Gala</i> variety.....	57
Table 4 – Principals compounds phenols, total phenols and antioxidant capacity of apple juices.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FAO	Food and Agriculture Organization
PCA	Principal Components Analysis
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
NTU	Unidade de Turbidez Nefelométricas
L^*	Luminosidade
a^*	Vermelho-verde
b^*	Amarelo-azul
C^*	Chroma
h^*	Hue angle
SST	Sólidos Solúveis Totais
ATT	Ácidoz Total Titulável
D-Gal	Ácido D-galacturônico
η	Rendimento
SAC	Sacarose
GLU	D-Glucose
FRU	D-Frutose
SORB	D-Sorbitol
DPA	Desvio Padrão Agrupado
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
EPAGRI	Estação Experimental de Agricultura e Extensão Rural de Santa Catarina
TPC	Total phenolic content
FRAP	Ferric Reducing/Antioxidant Power
CHL	Cholorogenic acid
PHL	Phloridzin
PB1	Procyanindin B1
PB2	Procyanindin B2
QGA	Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside
QGL	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside
QRH	Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnoside

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 CAPÍTULO I	16
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	17
1.2.1 MAÇÃ	17
1.2.2 TECNOLOGIA ENZIMÁTICA APLICADA AO PROCESSAMENTO DE SUCOS	18
1.2.3 PECTINASES.....	20
1.2.4 ANÁLISE MULTIVARIADA	21
REFERÊNCIAS	23
2 CAPÍTULO II: IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS COMERCIAIS NO PROCESSAMENTO DE SUCO DE MAÇÃ EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO: UMA APLICAÇÃO QUIMIOMÉTRICA	26
2.1 INTRODUÇÃO	28
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.2.1 Amostras de Maçãs.....	29
2.2.2 Padrões e enzimas.....	30
2.2.3 Processamento de suco de maçã por maceração enzimática	30
2.2.4 Rendimento.....	30
2.2.5 Viscosidade, pH e Brix	30
2.2.6 Açúcares.....	31
2.2.7 Ácido D-galacturônico.....	31
2.2.8 Turbidez.....	32
2.2.9 Medida de cor	32
2.2.10 Análises estatísticas e aplicação quimiométrica	32
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
2.4 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	43

3	CAPÍTULO III: ENZYMATIC MACERATION WITH DIFFERENT COMMERCIAL PECTINASES IN APPLE JUICE PROCESSING: INFLUENCE OF RIPENING STAGE ON MAJOR PHENOLIC COMPOUNDS	47
3.1	INTRODUCTION	49
3.2	MATERIAL AND METHODS	50
3.2.1	Apple samples.....	50
3.2.2	Chemicals and enzymes.....	50
3.2.3	Apple juice processing by enzymatic maceration.....	51
3.2.4	HPLC analysis of phenolic compounds.....	51
3.2.5	Total Phenolic Content	52
3.2.6	Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) Assay.....	52
3.2.7	Statistical analysis and chemometric application	52
3.3	RESULTS AND DISCUSSION	53
3.3.1	The phenolic in different ripening stage	53
3.3.2	Enzymatic maceration in the phenolic extraction.....	54
3.3.3	Enzymatic maceration in the antioxidant capacity	55
3.3.4	A chemometric approach.....	58
3.4	CONCLUSION	61
	REFERENCES	62
4	CAPÍTULO 4	66
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE 1	74
	ANEXO 1	75

INTRODUÇÃO

O mercado consumidor de frutas *in natura* apresenta-se muito exigente em relação à qualidade dos frutos, considerando como descarte aqueles com ausência dos padrões exigidos pelos consumidores (tamanho, aspecto e forma), dentre os quais cerca de 70% estão adequados ao processamento industrial.

Os frutos destinados ao processamento podem apresentar diferentes estádios de maturação, pois não há uma classificação para identificar as frutas a serem destinadas ao processo. Isto pode ocasionar perda de eficiência do processo, pelo motivo de não se conhecer o estágio de maturação dos frutos.

A indústria de processamento de suco de frutas teve um desenvolvimento espantoso ao longo dos últimos 100 anos e invariavelmente enzimas participaram deste fenômeno, pois as preparações já existentes atendiam os propósitos industriais e as novas conduziam a modificações nas unidades industriais racionalizando os processos, melhorando a qualidade dos produtos finais. A aplicação de enzimas em sucos pode ser usada em diferentes etapas de processamento como na extração, na maceração e na clarificação.

A tecnologia enzimática, desenvolvida para o processamento de maçã, visa aumentar o rendimento do suco e diminuir a quantidade de resíduo (bagaço). Neste processo a parede celular é rompida pelo efeito de enzimas pectinolíticas, liberando os compostos solúveis, como o ácido D-galacturônico e os açúcares neutros, como a D-arabinose, a D-galactose, a L-ramnose e a D-xilose, ligados às substâncias pécticas. As desvantagens do processo com o uso de enzimas na extração de suco de maçã são a perda da qualidade sensorial, com tendência ao escurecimento e ao aumento de custos. O produto, todavia, apresenta maior apelo nutricional pelos altos teores de compostos solúveis e compostos fenólicos, além de fibras e flavonóides.

Nos produtos de maçã, como suco e sidra, os compostos fenólicos têm sido considerados, interessantes devido a sua influência nas características organolépticas, como acidez e sabor adstringente, na formação de certo aromas e na clarificação de bebidas. O interesse nos compostos fenólicos está na sua capacidade antioxidante, o que contribui para a proteção dos efeitos prejudiciais do estresse oxidativo na saúde humana.

O uso de celulases nas preparações enzimáticas não encontra suporte na legislação europeia, especialmente na da Alemanha, maior consumidor mundial de suco de maçã, pelo motivo de que o suco pode ser fraudado pela adição de material celulósico como matéria-

prima. Assim sendo, um mercado de potencial significativo como o europeu, incentiva à pesquisa de novas preparações enzimáticas sem a adição de celulases.

Portanto os trabalhos visam o uso de pectinases comerciais sem atividade declarada de celulases, de modo a verificar os parâmetros físicos e químicos dos sucos obtidos de frutos processados em três diferentes estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente) das cultivares *Fuji Suprema* e *Lis Gala*.

1 CAPÍTULO I

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o impacto da aplicação de preparações enzimáticas (Ultrazym[®] AFP L, Pectinex[®] Ultra Clear, Pectinex[®] SMASH XXL, Panzym[®] YieldMASH) comerciais no processamento de suco de maçã sobre as características físico e químicas dos produtos.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Verificar a ação de diferentes preparações enzimáticas comerciais na produção e na qualidade de suco de maçã processadas com matérias primas em três diferentes estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente) provenientes de duas cultivares (*Lis Gala* e *Fuji Suprema*).

Determinar o efeito das preparações enzimáticas sobre os compostos fenólicos individuais por HPLC, os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante (FRAP).

Explorar e classificar por ferramentas quimiométricas a ação das diferentes preparações enzimáticas nos sucos obtidos.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 MAÇÃ

Os primeiros relatos da utilização de maçã (*Malus domestica*) para o consumo humano constam de, pelo menos, 200 a.C., sendo que os principais locais originários são de clima temperado localizados na Ásia menor, no Cáucaso da Ásia Central, na cordilheira do Himalaia na Índia e no Paquistão assim como no oeste da China. As maçãs foram trazidas para o Ocidente por mercadores que utilizavam a histórica Rota da Seda nos tempos neolíticos ou da pedra lascada (DENARDI; CAMILO, 1997; MABBERLEY; JARVIS; JUNIPER, 2001).

Fruto de clima temperado, comercializado de forma *in natura* tanto no cenário internacional quanto no nacional, com uma atividade expressiva no Sul do Brasil (WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000; RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005), apresenta, de acordo com a *Food and Agriculture Organization* (2009), produção nacional aproximada de um milhão de toneladas anuais.

O mercado consumidor é abastecido pelas maçãs consideradas **comerciais**, beneficiadas e classificadas a fim de atender o comprador exigente. Sendo assim, resta aos processadores a utilização das maçãs desclassificadas para o comércio, denominadas **industriais**, sem os padrões exigidos pelo consumidor (tamanho, aspecto, forma). Cerca de um terço das maçãs de descarte apresentam-se inadequadas ao processamento de sucos e outros derivados; entretanto, para a maçã destinada ao consumo *in natura* ou ao processamento de produtos nobres, a qualidade deve ser similar com relação aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais (WOSIACKI; PHOLMAN; NOGUEIRA, 2004; FERTONANI et al., 2006). Segundo Rizzon, Bernardi e Miele (2005) as melhores maçãs para a produção de sucos e derivados, apresentam elevados teores de açúcares e ácidos, mas para Wosiacki, Pholman e Nogueira (2004) a matéria-prima a ser disponibilizada ao setor industrial compõe-se praticamente de Gala e Fuji, cultivares que deixam a desejar com relação aos teores de compostos fenólicos e acidez.

O suco de maçã é o segundo mais consumido no mundo (HÜBNER, 2001) com um consumo de 1,6 milhões de toneladas de concentrado ao ano.

De acordo com Northcote (1958) o suco está contido no vacúolo de cada célula parenquimatosa do tecido comestível da maçã. Para realizar a extração de suco, é necessária

uma desorganização nos tecidos de maneira a obter uma mistura das paredes celulares e de líquido. Para isso, existem diversas técnicas distintas desde o uso de prensas até o tratamento enzimático com enzimas pectinolíticas e celulolíticas.

Na indústria, o método convencional utilizado para a extração de suco inicia-se pela moagem em moinhos de facas e/ou de martelo (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010; OLIVEIRA, 2006). Desse processo resulta o bagaço, muitas vezes destinado ao descarte, e o suco integral que pode ser clarificado por meio de enzimas pectinolíticas, quando não usadas antes da etapa de prensagem. A operação de filtração com terras diatomáceas é realizada para o polimento do produto acabado (OLIVEIRA et al., 2006). Segundo Nogueira et al. (2005), após a prensagem também podem ser adicionadas enzimas pectinolíticas, com a finalidade de auxiliar essa etapa.

1.2.2 TECNOLOGIA ENZIMÁTICA APLICADA AO PROCESSAMENTO DE SUCOS

Como principal subproduto da maçã tem-se o bagaço (torta da extração obtida durante a prensagem), com 20 a 40% da quantidade total de frutos processados. A quantidade gerada e a composição estão diretamente relacionadas à tecnologia empregada na extração do suco. O bagaço compreende as cascas e polpas (94,5 %), as sementes (4,4 %) e os centros (1,1 %). Esse subproduto contém 80% de umidade, 11,6-44,5% de fibras compostas por 12,0-23,2 % de celulose, 6,4-19,1 % de lignina, 3,5-18 % de pectina e 5,0-6,2 % de hemicelulose, além de 14 % de sólidos solúveis, dentre os quais a maioria corresponde aos açúcares glucose, frutose e sacarose (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010). Com esta composição, o bagaço é altamente susceptível à deterioração por microrganismos e, portanto, a disposição inadequada do material pode acarretar problemas de forte impacto ambiental (NOGUEIRA et al., 2005).

A moderna gestão agroindustrial preconiza uma tecnologia limpa com o gerenciamento adequado dos resíduos produzidos no meio agrícola e no industrial. A tecnologia limpa aplicada ao processamento de suco de maçã pode visar à diminuição de bagaço, ou seja, otimizar ao máximo a extração de suco de maçã, com redução nas perdas de processo. A introdução de preparações enzimáticas na extração de suco de maçã visa minimizar o descarte de resíduos sólidos na natureza (OLIVEIRA et al., 2006).

A tecnologia enzimática na indústria de processamento de suco pode ser aplicada em diferentes etapas: na maceração (DEMIR et al., 2001; MIHALEV et al., 2004), na extração (WILL; BAUCKHAGE; DIETRICH, 2000; OLIVEIRA et al., 2006) e na clarificação (SIN et al., 2006; LIEW ABDULLAH et al., 2007; MARKOWSKI et al., 2009).

A aplicação de enzimas pectinolíticas é vista com parcimônia, pois, no que diz respeito ao processo inicial de despectinização de sucos para posterior clarificação e polimento de sucos prontos para beber e de não concentrados. Mas com total apoio é visto a necessidade de seu emprego no caso de concentração, etapa necessária para a qual o mercado industrial conta com um arsenal completo de preparações enzimáticas (HASSELBECK, 2008).

A utilização da tecnologia limpa para a produção de suco de maçã está relacionada fortemente à tecnologia de liquefação total da polpa, desenvolvida para o processamento de maçã, com o objetivo de aumentar o rendimento do suco e diminuir a quantidade de bagaço. Nesse processo, a parede celular é rompida pelo efeito sinérgico de pectinases e celulases (WILL; BAUCKHAGE; DIETRICH, 2000; WILL et al., 2003), sendo liberados os compostos solúveis, como o ácido D-galacturônico, os açúcares neutros D -arabinose, D -galactose, L-ramnose e D -xilose, ligados às substâncias pécticas e a D -glucose, às celuloses (WILL et al., 2003; GRASSIN, FAUQUEMBERGUE, 1996; ACAR, 1999).

Para Will, Bauckhage e Dietrich (2000) e Jaroslaw et al. (2009) as desvantagens do processo enzimático no suco são a perda da qualidade sensorial, a tendência ao escurecimento, o aumento de custos e as restrições legais. O produto, todavia, apresenta maior apelo nutricional em função dos altos teores de compostos solúveis e polifenóis, além de fibras despolimerizadas e flavonóides.

Entre os principais compostos bioativos encontrados nos frutos e em sucos de maçãs podem ser citados os compostos fenólicos. A aplicação de enzimas pectinolíticas no processamento de sucos tem sido relatada por diversos autores como capacidade simultânea no efeito sobre os compostos fenólicos e atividade antioxidante, com aumento consequente da extração desses componentes (WILL et al., 2002; OSZMIANSKI et al., 2009; OSZMIANSKI et al., 2011).

A estrutura da parede celular está intrinsecamente ligada às interações das regiões das ramnogalacturonanas e da homogalacturonana, constituintes da pectina. De acordo com Da Silva, Franco e Gomes (1997), para a degradação dos principais polímeros constituintes da parede das células vegetais é necessária a participação de diferentes enzimas específicas.

1.2.3 PECTINASES

As pectinases são classificadas de acordo com o seu modo de ação, substrato preferencial e reação catalisada. Existem basicamente três tipos de pectinases: [1] pectinálises (ou transeliminases); as [2] poligalacturonases e as [3] pectinaesterases (DIANO et al., 2008).

A pectinálise (EC 4.2.2.10) rompe as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácidos D-galacturônicos por um mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio dos carbonos das posições C₄ e C₅ do ácido D-galacturônico (Figura 1), produzindo um produto insaturado de 4,5 – ácido galacturônico (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; BUSTO et al., 2006).

A poligalacturonase (EC 3.2.1.15) catalisa a clivagem hidrolítica da cadeia do ácido poligalacturônico com a introdução da molécula de água por meio das pontes de hidrogênio (Figura 1) (ALKORTA et al., 1998, DIANO et al., 2008).

A pectinesterase (EC 3.1.1.11) responsável pela de-esterificação da pectina (Figura 1), produz um polissacarídeo que pode ser subsequentemente hidrolisado pela poligalacturonase (KAYSHAP et al., 2001; UENOJO; PASTORE, 2007).

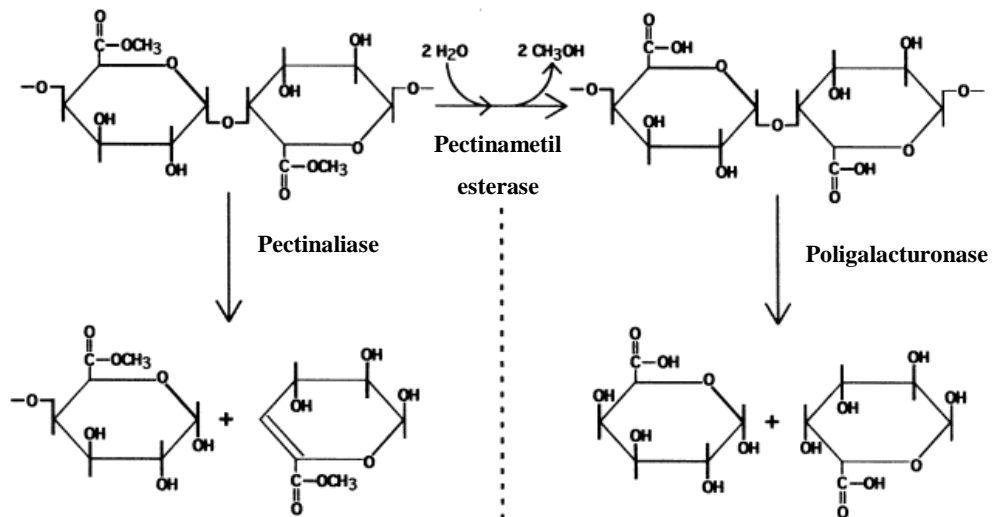


Figura 1 - Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina (DIANO et al., 2008)

Como resultado destas atividades enzimáticas específicas, é possível encontrar preparações comerciais constituídas pela mistura destas enzimas (*pool*). Essas preparações são amplamente utilizadas na indústria de alimentos para melhorar as condições de processo para o processamento de suco de frutas.

1.2.4 ANÁLISE MULTIVARIADA

1.2.4.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um método estatístico no qual cada componente principal (fator) apresenta uma combinação linear com as variáveis originais, sendo uma das técnicas mais empregadas para analisar um conjunto de dados contendo muitas variáveis. Uma das principais razões para o sucesso da PCA é o fato de que oferece, em geral, representações gráficas de baixa dimensão, com razoável precisão, com a variabilidade dos dados durante a redução de um grande número de variáveis, para algumas componentes independentes (DA SILVA et al., 2005; VALLADARES et al., 2009).

Considera-se p o conjunto de variáveis observadas sobre q elementos, formando um conjunto de dados X ($p \times q$), através da diagonalização da matriz de covariância $X_t X$ (forma alternativa de observar a informação), onde X_t é a transposta da matriz dos dados originais X . Os elementos dos autovetores, chamados de “*loadings*” (pesos) na terminologia PCA, representam os cossenos diretores, ou seja, a contribuição com que cada um dos eixos originais entra na composição dos novos eixos, chamados de componentes principais. Os autovalores, denominado “*scores*”, representam a quantidade de variância original descrita pelos respectivos autovetores. Então, os componentes principais obtidos serão combinações lineares das p variáveis, de forma tal que o primeiro componente principal PC1 tenha variância máxima. Assim, o primeiro componente principal (PC1) é uma combinação linear de X que configura as variáveis na direção de maior dispersão, ou seja, na direção da maior parte da variação nos pontos observados. O segundo componente principal (PC2) é outra combinação linear de X e representa o segundo eixo com maior variância, sendo ortogonal a PC1, isto é, o eixo com máxima quantidade de variância não explicada pelo primeiro autovetor e assim por diante. Isto equivale a dizer que os componentes principais não são autocorrelacionados (DA SILVA et al., 2005; SOUZA JUNIOR; GASPARINI, 2006).

1.2.4.2 Análise hierárquica de agrupamentos (HCA)

A análise hierárquica de agrupamentos é (HCA) utilizada para reconhecer padrões (similaridades) de amostras a partir de um conjunto de dados obtidos, ou seja, de acordo com as variáveis escolhidas esta técnica agrupa as amostras entre si. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades; portanto, quanto mais

próximos estiverem os pontos no espaço amostral, maior a similaridade entre as amostras. Os resultados são apresentados sob a forma de dendrogramas (PANERO et al., 2009; SANTANA; BARRONCAS, 2007).

Existem diversas maneiras de arranjar agrupamento no espaço n-dimensional. A maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos mais próximos, usando a distância euclidiana, substituindo-os por um novo ponto localizado na metade da distância entre eles. Este procedimento, quando repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, leva a construção do dendrograma, onde, no eixo horizontal são colocadas as amostras e, no eixo vertical, o índice de similaridade, s_{ij} , entre os pontos i e j , calculado segundo a seguinte expressão:

$$s_{ij} = 1 - \frac{d_{ij}}{d_{m\acute{a}x}}$$

Nessa, d_{ij} corresponde à distância entre os pontos i e j e $d_{m\acute{a}x}$, à distância máxima entre qualquer par de pontos. Os dendrogramas, portanto, consistem em diagramas que representam a similaridade entre pares de amostra (ou grupo de amostras) numa escala que vai de um (identidade) a zero (nenhuma similaridade) (MOITA NETO, MOITA, 1998). Os dendrogramas são construídos diretamente pelos programas estatísticos, que fazem classificação dos dados através de agrupamento hierárquico (*Hierarchical Analysis ou Cluster Analysis*).

REFERÊNCIAS

- ACAR, J. The production of cloudy apple nectar using total liquefaction enzymes. **Fruit Processing**, v. 8, p. 314-317, 1999.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- BUSTO, M. D.; GARCÍA-TRAMONTÍN, K. E.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1477-1483, 2006.
- DA SILVA, J. B. P.; MALVESTITI, I.; HALLWASS, F.; RAMOS, M. N.; LEITE, L. F. C. C.; BARREIRO, E. J. Aplicação de análise de componentes principais para verificação de atribuições de sinais nos espectros de RMN ¹H: o caso dos 3-aril (1,2,4)-oxadiazol-5-carboidrazida benzilidenos. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 492-496, 2005.
- DA SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim do SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.
- DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Novas cultivares de macieira: proposta de nova composição de pomares como polinizadoras/produtoras. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 10, n. 2, p. 25-30, 1997.
- DEMIR, N.; ACAR, J.; SARIOGLU, K.; MUTLU, M. The use of comercial pectinase in fruit industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 47, n. 4, p. 275-280, 2001.
- DIANO, N.; GRIMALDI, T.; BIANCO, M.; ROSSI, S.; GABROVSKA, K.; YORDANOVA, G.; GODJEVARGOVA, T.; GRANO, V.; NICOLUCCI, C.; MITA, L.; BENCIVENGA, U.; CANCEGLIA, P.; MITA, D. G. Apple juice clarification by immobilized pectolytic enzymes in packed or fluidized bed reactors. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 23, p. 11471-11477, 2008.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2009.
- FERTONANI, H. C. R.; SIMOES, D. R. S.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Potencial da variedade Joaquina para o processamento de suco clarificado e vinho seco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 434-440, 2006.
- GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Apple pomace liquefaction: a new technology. **Fruit Processing**, v. 12, p. 490-495, 1996.
- HASSELBECK, G. Enzyme preparations for the manufacture of fruit juice from the point of view of the application technology. **Fruit Processing**, v.18, n. 2, p. 82-86, 2008.
- HÜBNER, M. Retentate – Waste or a Valuable Product? – New Solutions. **Fruit Processing**, v. 9, p. 358-363, 2001.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JAROSLAW, M.; FASTYN, M.; PLOCHARSKI, W.; URLAUB, R.; DADAS, A.; Apple pomace extraction with new enzyme preparations. **Fruit Processing**, v. 19, n. 3, p. 118-125, 2009.

KAYSHAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

LIEW ABDULLAH, A. G.; SULAIMAN, N. M.; AROUA, M. K.; MEGAT MOHD NOOR, M. J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 65-71, 2007.

MABBERLEY, D. J.; JARVIS, C. E.; JUNIPER, B. E. The name of the apple. **Telopea**, v. 9, n. 2, p. 421-430, 2001.

MARKOWSKI, J.; MIESZCZAKOWSKA, M.; PŁOCHARSKI, W. Effect of apple cultivar and enzyme treatment on phenolic compounds content during clear apple juice production. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 5, p.1002-1010, 2009.

MIHALEV, K.; SCHIEBER, A.; MOLLOV, P.; CARLE, R. Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7306-7310, 2004.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

NORTHCOTE, D. H. The cell walls of higher plants: their composition structure and growth. **Biological Reviews**, n. 35, p. 53-102, 1958.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C.; OLIVEIRA, M. C. S. de; PASSOS, M.; WOSIACKI, G. Avaliação da trituração e de tratamentos enzimáticos na obtenção de suco de maçã por centrifugação. **Publicatio UEPG Ciências Exatas Terra, Ciências Agrárias e Engenharia**, v. 11, p. 7-12, 2005.

OLIVEIRA, M. C. S. de; SILVA, N. C. C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Avaliação do método de liquefação enzimática na extração de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 909-915, 2006.

PANERO, M. F. P.; VIEIRA, Â. M. F.; CRUZ, M. F. V.; MOURA, H. E. B. S. Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 33-40, 2009.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 750-756, 2005.

SANTANA, G. P.; BARRONCAS, P. S. R.. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus (AM). **Acta Amazônia**, v. 37, n. 1, p. 111-118, 2007.

SIN, H. N.; YUSOF, S.; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; RAHMAN, R. ABD. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 313-319, 2006.

SOUZA JUNIOR, C. V. N.; GASPARINI, C. E. Análise da equidade e da eficiência dos estados no contexto do federalismo fiscal brasileiro. **Estudos Econômicos**, v. 36, n. 4, p. 803-832, 2006.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

VALLADARES, G. S.; CAMARGO, O. A.; CARVALHO, J. R. P.; SILVA, A. M. C. Assessment of heavy metals in soils of a vineyard region with the use of principal component analysis. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 361-367, 2009.

WILL, F.; BAUCKHAGE, K.; DIETRICH, H. Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. **European Food Research and Technology**, v. 211, p. 291-297, 2000.

WILL, F.; MEHRLANDER, K.; DIETRICH, H.; DONGOWSKI, G.; SEBRIES, S. Enzymatic liquefaction of apple mash by a two-step process. **Fruit Processing**, p. 429-432, 2003.

WOSACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de maçã. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas não alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Edgard Blücher, 2010, v. 2, cap. 15, p. 269-301.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. Brazilian apple production – A few years later. **Fruit Processing**, v. 12, p. 472-475, 2000.

WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B. C.; NOGUEIRA, A. Características de cultivares de maçã: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 347-352, 2004.

2 CAPÍTULO II: IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS COMERCIAIS NO PROCESSAMENTO DE SUCO DE MAÇÃ EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO: UMA APLICAÇÃO QUIMIOMÉTRICA.

IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS COMERCIAIS NO PROCESSAMENTO DE SUCO DE MAÇÃ EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO: UMA APLICAÇÃO QUIMIOMÉTRICA

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi verificar o efeito da aplicação de diferentes preparações pectinolíticas comerciais na produção de suco de maçã das cv. *Lis Gala* e cv. *Fuji Suprema* em três diferentes estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente). Uma abordagem quimiométrica foi usada para explorar as modificações nos parâmetros químicos e físicos dos sucos. O suco foi obtido por maceração enzimática na polpa e extraído por força centrífuga. O uso de técnicas estatísticas multivariadas permitiu verificar a ação das preparações enzimáticas sobre os parâmetros químicos e físicos. As frutas processadas em estádio de pré-maturação (cultivar *Lis Gala*) não apresentaram mudanças nos parâmetros analisados para nenhuma das enzimas utilizadas. A preparação Pectinex[®] SMASH XXL foi a única preparação aplicada em amostras em todos os estádios de maturação com resultados similares em relação aos controles. Pectinex[®] Ultra Clear, Ultrazym[®] AFPL e Panzym[®] YieldMASH causaram mudanças nos parâmetros para todos os estádios de maturação da cultivar *Fuji Suprema* e para os estádios maduro e senescente da cultivar *Lis Gala* formando um grupo com os maiores valores de rendimento, viscosidade, D-glucose, acidez total titulável e ácido D-galacturônico. Por meio dos resultados encontrados, destaca-se que é preciso conhecer o estádio de maturação e a cultivar selecionada no processamento de suco para a seleção adequada da preparação enzimática para atender a eficiência do processo.

Palavras-chaves: estádio de maturação, pectinases, extração por força centrífuga, análise multivariada

2.1 INTRODUÇÃO

A indústria de processamento de suco de frutas teve um desenvolvimento incrível ao longo dos últimos 100 anos e invariavelmente enzimas participaram deste fenômeno, pois as preparações existentes atendiam os propósitos industriais ou as novas conduziam a modificações nas unidades industriais racionalizando os processos, melhorando a qualidade dos produtos finais. A aplicação de enzimas na extração de sucos de frutas pode ser usada em diferentes etapas de processamento. Entre elas podem ser citadas a maceração (DEMIR et al., 2001; MIHALEV et al., 2004), a extração (WILL et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2006; RIBEIRO et al.; 2010) e a clarificação (SIN et al., 2006; LIEW ABDULLAH et al., 2007; MARKOWSKI et al., 2009).

A aplicação da tecnologia enzimática na produção de suco de maçãs leva à degradação da pectina e diminuição da viscosidade do suco em consequência do aumento no rendimento do suco e redução do volume de bagaço (OSZMIANSKI et al., 2009). O controle de qualidade de sucos de maçã obtidos por processo enzimático vai constatar um aumento nos níveis de sólidos solúveis totais, causado pela despolimerização dos polissacarídeos da parede celular (WILL et al., 2000; WILL et al., 2002).

De maneira a explorar todas as variáveis do índice de qualidade técnicas multivariadas tem sido utilizadas para garantir a autenticidade e qualidade de sucos (VARDIN et al., 2008), para classificação da matéria-prima (BELTON et al., 1998; VIEIRA et al., 2011), tipo de processamento (BLANCO-GOMIS et al., 1998, ROCHA et al., 2013) e propriedades sensoriais (BLEIBAUM, et al., 2002), entre outras aplicações. O objetivo da análise de componentes principais (PCA) é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados originais, preservando o máximo de informação (variância) possível. Esta redução é conseguida através da criação de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs). A fim de compreender a PCA, a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) visa definir as amostras em classes com base na similaridade dos participantes da mesma classe e as diferenças entre os membros de diferentes classes (SHAW, 2003; CORREIA e FERREIRA, 2007).

Esta pesquisa teve como objetivo caracterizar o impacto da aplicação das preparações enzimáticas na qualidade do suco de maçã de duas cultivares diferentes (*Lis Gala* e *Fuji Suprema*) em três diferentes estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente) por meio de uma abordagem quimiométrica.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Amostras de Maçãs

Maçãs das cultivares *Fuji Suprema* e *Lis Gala* foram coletadas na Estação Experimental de Santa Catarina (EPAGRI-SC), em três diferentes estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente). Vinte quilos (20 kg) de cada estádio foram colhidos, sendo as frutas coletadas de seis árvores dentro da plantação, em quatro pontos cardeais em cima e embaixo das árvores para homogeneizar o lote.

Teste de Lugol foi usado para estimar o índice de maturação (REID et al., 1982) (Figura 1) (ANEXO 1). As frutas nos diferentes estádios de maturação foram pesadas (60 unidades por cultivar e por estádio) e medidas com um paquímetro digital (Insize, Waregem, Bélgica) em relação à altura e ao diâmetro (Tabela 1).



Figura 1 - Classificação dos frutos de acordo com teste de Lugol

Tabela 1 – Características físicas da *Lis Gala* e *Fuji Suprema* em diferentes estádios de maturação de 60 unidades.

Cultivar	Estádio	Índice de Maturação	Massa (g)	Altura (mm)	Diâmetro (mm)
<i>Fuji Suprema</i>	Pré-maturação	1.0	172.11 ± 41.98	74.98 ± 6.92	63.07 ± 6.47
	Maduro	3.0 – 3.5	183.53 ± 57.66	76.84 ± 8.59	63.82 ± 8.11
	Senescente	> 4.5	174.93 ± 44.37	76.13 ± 7.14	63.82 ± 7.28
<i>Lis Gala</i>	Pré-maturação	1.0	109.63 ± 21.76	59.66 ± 3.97	55.77 ± 6.18
	Maduro	3.5	146.30 ± 30.98	67.84 ± 4.83	63.37 ± 5.90
	Senescente	> 4.5	165.19 ± 20.62	71.18 ± 4.69	65.56 ± 5.56

2.2.2 Padrões e enzimas

Sacarose, D-glucose, D-sorbitol, ácido D-galacturônico, ácido orto-fosfórico foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O açúcar D-frutose foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). As preparações pectinolíticas comerciais: Ultrazym[®] AFP L; Pectinex[®] Ultra Clear; Pectinex[®] SMASH XXL foram cedidas pela LNF de Bento Gonçalves representante da Novozymes na América Latina e a Panzym[®] YieldMASH foi doada pela Begerow da Alemanha.

2.2.3 Processamento de suco de maçã por maceração enzimática

As maçãs foram selecionadas, lavadas, sanitizadas (100 mg L⁻¹ de hipoclorito de sódio por 15 min), enxaguadas e fragmentadas (moídas) em liquidificador industrial LAR2 (Metvisa, Brusque, SC, Brasil). A polpa de maçã (100 g) foi colocada em cada frasco erlenmeyer de 250 mL de capacidade e acondicionada a 35 °C em agitador tipo *shaker* MA832 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) sob agitação (150 rpm). Depois da temperatura de estabilização (35 °C, 10 min), as preparações enzimáticas foram adicionadas conforme a recomendação do fabricante (APÊNDICE 1) e a reação foi conduzida durante o período de uma (1) hora a 35 °C. Depois deste tempo, os erlenmeyers com a polpa foram colocados em banho de água fervente (dois minutos) para desnaturação das enzimas e o suco foi obtido por centrifugação (8000 x g, 20 min) com o uso de uma centrífuga laboratorial HIMAC CR-GII (Hitachi, Hitachi, Ibaraki, Japão). Os sucos foram estocados a - 20 °C até o momento das análises.

2.2.4 Rendimento

O rendimento gravimétrico dos sucos foi determinado considerando a razão da massa de suco obtido a partir de uma massa conhecida de matéria prima, sendo expresso em porcentagem (%).

2.2.5 Viscosidade, pH e Brix

Os indicadores medidos por intermédio de instrumentos científicos foram a viscosidade, propriedade intensiva, medida com viscosímetro capilar de Ostwald Cannon-

Fenske modelo 100 (Vidrolabor, São Paulo, Brasil) em banho-maria com temperatura controlada de $20,0 \pm 1,0$ °C; os valores do pH, com pHmetro TEC-3MP (Tecnal, Piracicaba, Brasil) e o teor de sólidos solúveis expresso em °Brix, com refratômetro de bancada 2AWJ (Biobrix, Ribeirão Preto, Brasil).

2.2.6 Açúcares

Para a determinação do teor de açúcares, foi utilizado o método descrito por Chinnici et al. (2005) com modificações. As amostras foram diluídas 1:10 (v/v) com água Ultra-Pura (Milli-Q) e filtradas em filtro seringa (0,22 µm) que por sua vez foram analisadas em um sistema cromatográfico (HPLC) Waters 2695 (Milford, MA, EUA) composto de uma bomba quartenária, degaseificador, auto injetor e equipado com coluna Waters Sugar PakTM 1 (300 x 6.5 i.d.) e com detector de índice de refração Waters RI 2414 (Milford, MA, EUA). O volume de injeção foi de 10 µL a um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ em condição isocrática com água Ultra-Pura com acetato de cálcio (0,01 µM) como fase móvel. A temperatura da coluna foi mantida a 80 °C e o detector a 50 °C. Para a identificação dos analitos nas amostras, foram utilizados como referencial interno os tempos de retenção de cada padrão puro. A quantificação foi calculada por curvas de calibração da sacarose, D-glucose, D-frutose e D -sorbitol.

2.2.7 Ácido D-galacturônico

As amostras foram diluídas (1:10) em ácido orto-fosfórico (0,1%) e filtradas em filtro de seringa (0,22 µm) antes da análise, tendo sido usado um sistema cromatográfico (HPLC) Waters 2695 (Milford, MA, EUA) composto de uma bomba quartenária, degaseificador, auto injetor e equipado com uma coluna Shodex KC 811 (300 x 8 mm i.d.) e com um detector de foto diodo Waters PDA 2998 (Milford, MA, USA). A temperatura da coluna foi de 40 °C. A fase móvel usada consistiu de ácido orto-fosfórico (0,1% v/v) usando um procedimento de eluição isocrática com um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Para identificação dos analitos nas amostras foi utilizado o tempo de retenção do padrão puro e a detecção foi a 210 nm. Para a quantificação foi respeitada uma curva de calibração do ácido D-galacturônico.

2.2.8 Turbidez

A turbidez dos sucos foi medida nefelometricamente usando um turbidímetro TB-1000 (Tecnopon, Piracicaba, Brasil) com uma cubeta cilíndrica de 5 cm, expressa em unidades nefelométricas de turbidez (NTU).

2.2.9 Medida de cor

As propriedades da cor (L^* , a^* , b^*) das amostras de sucos foram determinadas usando um colorímetro Ultra Scan PRO Hunter Lab (Reston, VA, USA). As amostras foram colocadas em uma células de 1 cm³ e os valores de L^* , a^* e b^* foram determinados usando Iluminant D65 com ângulo de observação de 10°. O parâmetro Chroma (C^*) foi calculado por: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$. O parâmetro Hue angle (h^*) foi calculado por: $h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) + 180^\circ$ quando $a^* < 0$ e $h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ quando $a^* > 0$ (FUKUMOTO et al., 2002).

2.2.10 Análises estatísticas e aplicação quimiométrica

Os dados foram apresentados como médias \pm desvios padrões agrupados (DPA). A fim de comparar os resultados dentro de dois grupos de amostras (Cluster 1 e Cluster 2) encontrados na análise hierárquica de agrupamentos (HCA), os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilks para verificar a normalidade da distribuição das amostras, seguido pelo teste F para checar a homogeneidade de variâncias ($p > 0,05$) e o teste t -Student (distribuição normal dos resultados) ou teste U -Mann-Whitney (distribuição não normal dos dados). Níveis de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos. A análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) foram realizadas no software STATISTICA 7.1 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

A PCA foi aplicada para separar as amostras ($n=30$) de acordo com os valores das variáveis de rendimento, viscosidade, pH, sólidos solúveis totais (SST), sacarose, D-glucose, D-frutose, D-sorbitol, luminosidade (L^*), a^* , b^* , Chroma (C^*), Hue Angle (h^*), acidez total titulável (ATT), ácido D-galacturônico (D-Gal) e turbidez (NTU). Para este fim, os resultados obtidos para cada um dos parâmetros foram adaptados como colunas e as amostras de suco como linhas. *Eigen values* superiores a 0,5 foram adotados para explicar a projeção das amostras no plano. O pré-processamento auto escalado foi utilizado para atribuir pesos iguais

aos resultados. O propósito deste procedimento é normalizar a importância estatística de todas as variáveis.

A HCA foi realizada nos dados autoescalados, com semelhanças das amostras foram calculadas com base no quadrado da distância euclidiana e o método de Ward foi usado para estabelecer os clusters. O dendrograma impõe uma hierarquia nesta semelhança, de modo que pode ter uma visão bidimensional da semelhança ou dissemelhança de todo o conjunto de amostras usadas no estudo (GRANATO et al., 2010).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 e 2 são apresentados para a cv. *Fuji Suprema* e cv. *Lis Gala*, respectivamente, as características de qualidade dos sucos processados com ou sem preparação enzimática em três diferentes estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente).

Em todos os estádios de maturação e nas diferentes cultivares de maçã o efeito do tratamento com as preparações enzimáticas comerciais apresentou um aumento de rendimento, alcançando um total de 44% com o uso da Pectinex[®] Ultra Clear no estádio de maturação senescente da cultivar *Fuji Suprema*. Essas preparações mostraram-se eficientes no rendimento em todos os estádios de maturação em ambas as cultivares, mesmo num estádio mais drástico (pré-maturação) para o processamento.

Os estádios de maturação das frutas influenciaram de maneira direta também a eficiência do processo (centrifugação), pois com os frutos verdes apresentavam polpa mais consistente, com liberação do suco mais difícil. À medida que os frutos amadureceram, houve maior liberação, pelo motivo das células estarem mais expostas, permitindo a eficiência das enzimas na parede celular dos frutos. De acordo com Le Bourvellec et al. (2005) para produção de suco de frutas é necessária a quebra da parede celular primária e a lamela média, o que permite a liberação do suco contido nas células e utilização na produção comercial. O uso de enzimas pectinolíticas para o aumento na produção de sucos é relatado por diversos autores (WILL et al., 2000; OSZMIANSKI et al., 2009; MIESZCZAKOWSKA-FRAC et al., 2012).

A aplicação das preparações enzimáticas ocasionou um aumento na viscosidade dos sucos com matéria primas em todos os estádios de maturação. De acordo com Will et al. (2000), com o tratamento enzimático (curto tempo de reação) na extração de suco ocorre um aumento na concentração de coloides nos sucos ocasionando um aumento na viscosidade.

Esses coloides livres são principalmente oligo- e polissacarídeos liberados pela influencia das enzimas pectinolíticas na parede celular (WILL et al., 2000; WILL et al., 2002).

Observou-se que a aplicação de enzimas na extração de suco de maçã proporciona um aumento nos valores de °Brix (Tabela 1 e 2), em função da depolimerização dos materiais da parede celular resultando em aumento das substâncias responsáveis pelos acréscimos dos teores de sólidos solúveis, como polissacarídeos, oligossacarídeos, monossacarídeos e os polifenóis (WILL et al., 2000; WILL et al., 2003).

A aplicação das diferentes preparações enzimáticas não ocasionou aumento nos teores de açúcares em nenhum dos estádios de maturação e em nenhuma das cultivares avaliadas (Tabela 1 e 2). A principal modificação foi observada nos períodos de maturação em que ocorreu uma evolução natural nos açúcares devido à transformação do amido em açúcares solúveis (DUQUE et al., 1999).

A maceração enzimática em todos os estádios de maturação e nas duas cultivares resultou em um aumento na acidez total (ATT) dos sucos de maçãs, assim como diminuição do pH (Tabela 1 e 2) com exceção para o uso da preparação Pectinex[®] SMASH XXL que não resultou em modificação na ATT do produto. A preparação Pectinex[®] Ultra Clear foi a que mais apresentou acidificação no meio seguida pela Panzym[®] YieldMASH e a Ultrazym[®] AFPL, com aumento da acidez nos sistemas (*Fuji Suprema* e *Lis Gala*) em torno de 27-34%, 19-31% e 15-22%, respectivamente.

O emprego das pectinases promove maior contribuição no aumento da acidez na extração de suco, sendo possível observar a maior liberação de ácido D-galacturônico para as preparações Pectinex[®] Ultra Clear e Panzym[®] YieldMASH confirmando para estas a maior ATT encontrada. Para a cv. *Fuji Suprema* (Tabela 1) a maior liberação de ácido D-galacturônico foi para os sucos provindos de frutos de matéria-prima madura, enquanto para a cv. *Lis Gala* (Tabela 2) para os provindos de frutos senescentes. De acordo com Kashyap et al. (2001) em frutas verdes, a pectina é recoberta a microfibrilas de celulose na parede celular. Essa pectina é insolúvel e, conseqüentemente, confere rigidez nas paredes celulares. No entanto, durante o amadurecimento, a estrutura de pectina é modificada por enzimas que ocorrem naturalmente nos frutos. Essas alterações implicam na ruptura da cadeia de pectina ou de cadeias laterais ligadas às unidades que constituem a cadeia principal. Em ambos os casos, o resultado é que a pectina torna-se mais solúvel, com menor aderência sobre as paredes das células circundantes e o tecido da planta abrandando.

A turbidez é principalmente causada por polissacarídeos no suco, como a pectina (LIEW ABDULLAH et al., 2007). Portanto, o uso de enzimas pectinolíticas (pectinases)

ocasiona um decréscimo da turbidez do suco, proporcionado pelo resultado da degradação da pectina (MIESZCZAKOWSKA-FRAC et al., 2012). A maior turbidez foi encontrada nos sucos das duas cultivares para os sucos processados com frutos senescentes. Todas as preparações utilizadas em todos os níveis de maturação dos frutos da cv. *Fuji Suprema* foram eficientes acima de 65% no decréscimo da turbidez (Tabela 1), enquanto que para a cv. *Lis Gala* acima de 60% (Tabela 2), com exceção para a preparação Pectinex[®] SMASH XXL, pouco eficiente nos sucos processados no estágio de maturação verde, mas resultou na diminuição da turbidez total em 41% para o suco da *Fuji Suprema* e em 50% para a *Lis Gala*.

Por meio da turbidez, os sucos podem ser classificados como clarificados, visto que o processo de centrifugação aplicado juntamente com as preparações comerciais auxilia no decréscimo da turbidez do suco, visto que sucos turvos apresentam turbidez estabilizada em $T \geq 250$ NTU (DIETRICH et al., 1996). Sucos turvos de maçãs produzidos por Mihalev et al. (2004) da cultivar Brettacher e Oszmianski et al. (2009) da cultivar Champion apresentaram turbidez maior que 250 NTU.

As propriedades de cor, assim como a turbidez tratada anteriormente, são atributos decisivos na aparência visual de sucos (GERARD; ROBERTS, 2004; LIM et al., 2010). O valor L^* apresenta a luminosidade dos sucos produzidos com a maceração enzimática nos diferentes estádios de maturação. De acordo com Liew Abdullah et al. (2007), indica indiretamente o nível de clarificação dos sucos de frutas. Não foi possível estabelecer qual enzima foi mais efetiva no processo, pois todas as preparações utilizadas não seguiram a tendência esperada no aumento do valor de L^* . Isso pode ter sido influenciado pela matéria-prima utilizada e o método de extração do suco que não proporcionou um produto límpido. Os valores encontrados foram inferiores aos determinados por Oszmianski et al. (2009) e Oszmianski et al. (2011). Segundo Mihalev et al. (2004), a cor muda com a oxidação do suco e não com o tratamento enzimático. No processamento executado neste trabalho, não foi adicionado nenhum tipo de agente antioxidante para inibir este escurecimento. Os resultados encontrados apresentaram-se para luminosidade (L^*) inferiores aos determinados por Mihalev et al. (2004) para sucos oxidados com valores em torno de 92.8.

Os valores de Chroma (C^*) caracterizam as amostras com baixa intensidade de cor (com valores médios de 2,71) e os valores de Hue angle (h^*) caracterizam os sucos do amarelo ao amarelo esverdeado para as ambas cultivares, nos diferentes estádios de maturação. Deve-se ressaltar que a percepção visual da cor é influenciada pela dispersão da luz nas partículas, percebida pela turbidez do suco. Wu e Sun (2013) relatam que as

propriedades de cor em sucos estão relacionadas à percepção de sabor, principalmente doçura e outras características de qualidade.

Tabela 2 – Parâmetros físicos e químicos dos sucos controles e por maceração enzimática da cultivar *Fuji Suprema* em diferentes estádios de maturação.

Amostras	η (%)	Viscosidade (mm ² /s)	pH	SST (°Brix)	SAC (g/100mL)	GLU (g/100mL)	FRU (g/100mL)	SORB (g/100mL)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C</i> *	<i>h</i> *	ATT (g/100mL)	D-Gal (g/100mL)	Turbidez (NTU)	
Pré-maturação	I	61,30	0,84	3,67	10,50	2,54	1,61	6,25	0,21	27,37	-0,37	1,32	1,37	105,52	0,64	0,00	51,00
	II	62,90	0,99	3,40	11,50	2,54	1,60	6,18	0,22	28,11	-0,20	2,37	2,38	94,73	0,73	0,06	9,80
	III	69,97	1,11	3,52	11,75	2,53	1,60	6,12	0,21	27,14	-0,26	1,26	1,29	101,52	0,81	0,13	16,40
	IV	64,53	1,02	3,58	11,00	2,60	1,63	6,28	0,22	27,74	-0,10	2,20	2,21	93,26	0,64	0,00	30,00
	V	64,68	0,99	3,39	11,00	2,52	1,58	6,12	0,21	31,99	1,30	8,12	8,22	80,87	0,76	0,13	11,05
	DPA	3,26	0,10	0,12	0,49	0,03	0,02	0,07	0,01	2,00	0,69	2,88	2,91	9,43	0,08	0,06	17,30
Maduro	I	61,64	0,86	3,80	11,75	3,51	1,66	6,75	0,30	28,54	0,29	3,12	3,14	84,64	0,54	0,00	45,00
	II	71,44	0,99	3,59	12,25	3,49	1,69	6,89	0,32	28,65	-0,09	2,90	2,90	91,72	0,66	0,09	15,60
	III	69,96	1,06	3,44	12,75	3,43	1,68	6,67	0,31	28,05	0,04	2,36	2,36	89,08	0,71	0,15	15,70
	IV	68,05	1,01	3,74	12,00	3,57	1,70	6,87	0,31	27,27	0,61	1,71	1,82	70,44	0,54	0,00	14,50
	V	62,76	0,98	3,47	12,00	3,57	1,68	6,86	0,31	26,41	-0,07	0,41	0,42	103,81	0,68	0,14	13,10
	DPA	4,36	0,07	0,16	0,38	0,06	0,01	0,09	0,01	0,94	0,30	1,09	1,08	12,10	0,08	0,07	13,60
Senescente	I	49,94	0,94	3,87	12,50	4,99	1,74	7,00	0,62	27,64	0,32	2,18	2,20	81,49	0,49	0,00	72,00
	II	68,40	1,01	3,65	13,75	4,91	1,73	7,02	0,61	29,88	1,93	5,87	6,17	71,81	0,56	0,05	20,50
	III	72,29	1,07	3,53	14,00	4,90	1,73	7,01	0,61	27,85	0,04	2,51	2,51	87,48	0,65	0,09	18,75
	IV	66,68	1,02	3,79	13,75	5,02	1,70	6,99	0,62	27,24	-0,28	1,42	1,44	101,24	0,53	0,00	22,50
	V	62,27	1,00	3,55	13,50	4,86	1,68	6,98	0,60	27,60	0,04	2,20	2,20	88,83	0,60	0,07	17,00
	DPA	8,60	0,05	0,15	0,59	0,07	0,03	0,02	0,01	1,05	0,88	1,74	1,87	10,80	0,06	0,04	23,50

Nota: I (Controle); II (Ultrazym® AFPL); III (Pectinex® Ultra Clear); IV (Pectinex® SMASH XXL); V (Panzym® YieldMASH); η : rendimento; SST: sólidos solúveis totais; SAC: sacarose; GLU: D-glucose; FRU: D-frutose; SORB: D-sorbitol. *L**: luminosidade; *a**: vermelho-verde; *b**: amarelo-azul; *C**: intensidade de cor; *h**: ângulo Hue ; ATT: acidez total titulável; D-Gal: ácido D-galacturônico; DPA: desvio padrão agrupado.

Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos dos sucos controles e por maceração enzimática da cultivar *Lis Gala* em diferentes estádios de maturação.

Amostras	η (%)	Viscosidade (mm ² /s)	pH	SST (°Brix)	SAC (g/100mL)	GLU (g/100mL)	FRU (g/100mL)	SORB (g/100mL)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C</i> *	<i>h</i> *	ATT (g/100mL)	D-Gal (g/100mL)	Turbidez (NTU)	
Pré-maturação	I	47,86	0,86	3,65	11,00	3,20	0,97	6,07	0,12	25,15	-0,30	2,99	3,00	95,71	0,58	0,00	38,00
	II	49,71	1,02	3,62	12,00	3,10	0,97	6,26	0,14	27,77	-0,61	2,12	2,21	105,96	0,66	0,03	7,75
	III	58,20	1,05	3,41	12,50	3,00	1,03	6,15	0,13	28,23	-0,55	2,69	2,75	101,61	0,74	0,08	7,50
	IV	56,81	1,01	3,60	12,00	3,04	0,93	6,09	0,13	23,82	-0,21	2,14	2,15	95,61	0,62	0,00	18,70
	V	56,03	0,96	3,46	11,50	3,20	0,99	6,17	0,14	27,94	-0,70	2,99	3,07	103,10	0,72	0,10	14,95
	DPA	4,62	0,07	0,11	0,57	0,09	0,04	0,07	0,01	1,98	0,21	0,43	0,43	4,60	0,07	0,05	12,50
Maduro	I	52,15	0,90	3,84	12,20	4,57	1,09	6,41	0,16	27,91	-0,17	2,96	2,97	93,08	0,52	0,00	34,00
	II	59,13	0,93	3,53	13,00	4,51	1,09	6,42	0,16	27,74	0,08	2,29	2,30	87,99	0,64	0,07	5,60
	III	65,22	0,99	3,51	13,20	4,44	1,14	6,38	0,16	27,87	0,50	2,14	2,20	76,86	0,68	0,11	11,70
	IV	63,13	0,96	3,75	12,80	4,54	1,12	6,34	0,17	27,57	0,20	2,39	2,40	85,21	0,52	0,00	13,40
	V	62,95	0,99	3,50	13,00	4,50	1,05	6,23	0,16	27,80	0,17	2,58	2,59	86,27	0,66	0,11	14,70
	DPA	5,17	0,04	0,16	0,38	0,05	0,03	0,08	0,00	0,13	0,24	0,32	0,30	5,88	0,08	0,05	10,70
Senescente	I	51,24	0,90	3,89	13,00	5,58	1,27	6,89	0,17	27,65	0,40	2,89	2,92	82,19	0,50	0,00	80,00
	II	66,21	0,99	3,58	14,00	5,50	1,31	6,95	0,18	27,51	0,28	2,40	2,41	83,27	0,61	0,07	9,20
	III	66,94	1,01	3,49	14,00	5,49	1,27	6,91	0,15	28,26	1,30	3,57	3,80	70,00	0,67	0,15	14,55
	IV	52,01	0,90	3,68	14,40	5,50	1,22	6,88	0,16	27,71	-0,23	3,16	3,17	94,12	0,54	0,00	17,85
	V	66,94	0,97	3,52	14,00	5,56	1,23	6,89	0,16	27,16	0,50	2,69	2,74	79,36	0,66	0,13	14,05
	DPA	8,26	0,05	0,16	0,52	0,04	0,04	0,03	0,01	0,40	0,55	0,45	0,52	8,65	0,07	0,07	29,70

Nota: I (Controle); II (Ultrazym® AFPL); III (Pectinex® Ultra Clear); IV (Pectinex® SMASH XXL); V (Panzym® YieldMASH); η : rendimento; SST: sólidos solúveis totais; SAC: sacarose; GLU: D-glucose; FRU: D-frutose; SORB: D-sorbitol. *L**: luminosidade; *a**: vermelho-verde; *b**: amarelo-azul; *C**: intensidade de cor; *h**: ângulo Hue; ATT: acidez total titulável; D-Gal: ácido D-galacturônico; DPA: desvio padrão agrupado.

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada a fim de avaliar os dados das análises realizadas. Essa análise envolve um procedimento matemático que identifica padrões de dados para expressá-los de tal modo a realçar semelhanças e diferenças, quando sejam difíceis de encontrar em um conjunto de elevada dimensão e a facilidade de uma representação gráfica não esteja disponível, sendo uma ferramenta poderosa e adequada para a análise de resultados. A outra vantagem principal do PCA é a compressão dos dados depois de encontrados esses padrões, reduzindo o número de dimensões, sem muita perda de informação (SHAW, 2003).

A PC1 explicou-se 27,97% da variância total e a PC2 explicou 27,07%, totalizando 55,04%. As amostras (Figura 2) foram separadas ao longo da primeira componente principal (PC1) pelas diferenças observadas no rendimento, sólidos solúveis totais (SST), sacarose, D-frutose, D-sorbitol, L^* , a^* , b^* , Chroma (C^*) e Hue angle (h^*). A segunda PC separou as amostras com base na viscosidade, acidez total titulável (ATT), ácido D-galacturônico, turbidez (NTU) e pH. O teor de D-glucose foi representado na quarta PC. As primeiras quatro PCs contribuíram para explicar 83,54% da variação no conjunto de dados. A PCA representa uma das ferramentas mais usadas, principalmente devido suas características de aplicabilidade. Essa permite a visualização das amostras em um espaço n-dimensional, identificando as direções em que a maioria da informação é contida. Por conseguinte, é possível explicar diferenças nas várias amostras, por meio dos fatores obtidos a partir da matriz de correlação generalizada dos conjuntos de dados (GRANATO et al., 2010; HOSSAIN et al., 2011).

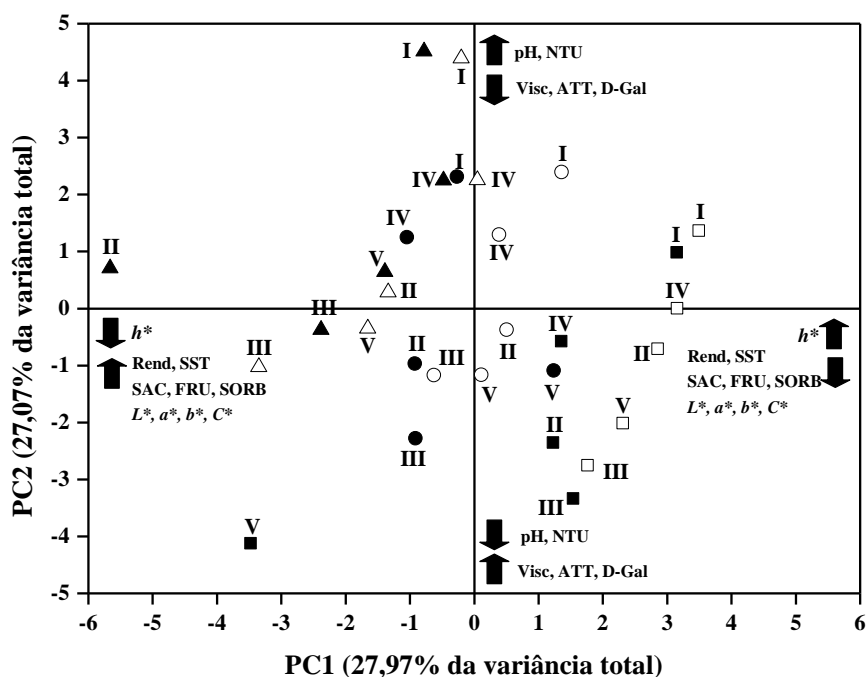


Figura 2 – Gráfico de dispersão simples entre PC1 vs. PC2 das variáveis entre as amostras de suco de maçã. Nota: I (Controle); II (Ultrazym[®] AFPL); III (Pectinex[®] Ultra Clear); IV (Pectinex[®] SMASH XXL); V (Panzym[®] YieldMASH); formas com preenchimento correspondem a cultivar *Fuji Suprema* e formas sem preenchimento correspondem a cultivar *Lis Gala*, (■) pre-maturação; (●) maduro; (▲) senescente; (□) pré-maturação; (○) maduro; (Δ) senescente, ↑ maiores valores dos componentes; ↓ menores valores dos componentes.

A similaridade das amostras foi avaliada usando análise hierárquica de agrupamentos (HCA), sendo dois *clusters* sugeridos (Figura 3).

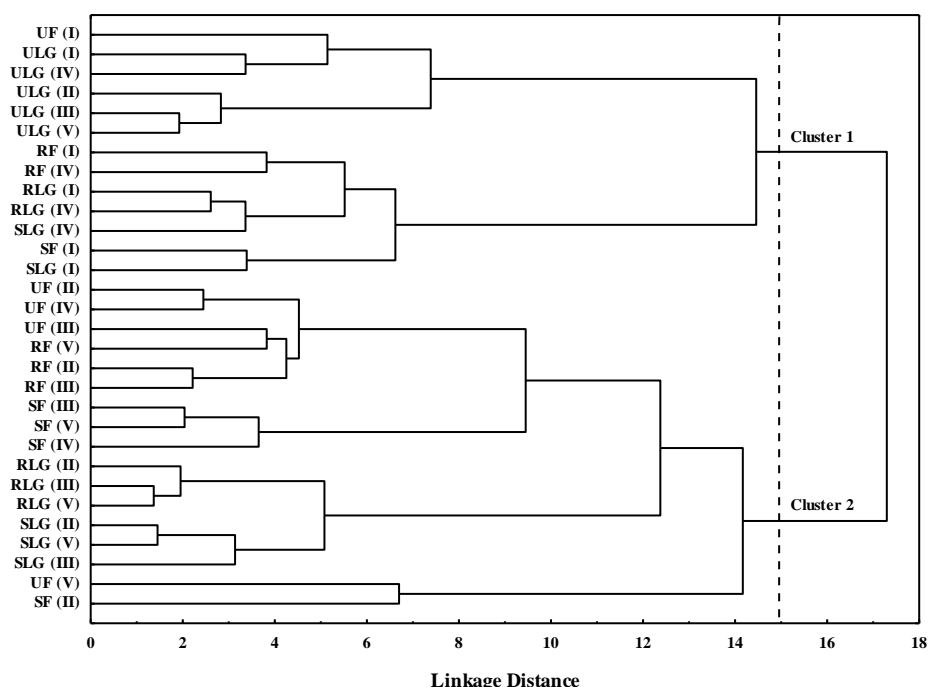


Figura 3 – Dendrograma das amostras de sucos obtidas pela análise hierárquica de agrupamento. Nota: UF: pré-maturação *Fuji Suprema*; RF: maduro *Fuji Suprema*; SF: senescente *Fuji Suprema*; ULG: pré-maturação *Lis Gala*; RLG: maduro *Lis Gala*; SLG: senescente *Lis Gala*; I (Controle); II (Ultrazym[®] AFPL); III (Pectinex[®] Ultra Clear); IV (Pectinex[®] SMASH XXL); V (Panzym[®] YieldMASH).

Depois de agrupar as amostras, o teste *t* de Student ou teste *U* de Mann-Whitney foi realizado para comparar as médias de cada parâmetro avaliado dentro dos dois grupos (Tabela 4). Os dados indicaram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros rendimento, viscosidade, pH, D-glucose, acidez titulável total e do ácido D-galacturônico e não significativas para TSS, sacarose, D-frutose, D-sorbitol, L^* , a^* , b^* , Chroma, Hue angle e turbidez.

De acordo com a Figura 3 o cluster 1 foi formado principalmente por todas as amostras dos controles das duas cultivares [UF(I), RF(I), SF(I), ULG(I), RLG(I), SLG(I)] e amostras das preparações enzimáticas que apresentaram baixa alterações nos parâmetros de qualidade dos sucos. Interessante observar que no estágio verde para cv. *Lis Gala* a aplicação das quatro diferentes preparações [ULG(II), ULG(III), ULG(IV), ULG(V)] não ocasionou mudança nos parâmetros em comparação ao controle, assim como não foram observadas alterações em quatro diferentes amostras [UF (IV), ULG(IV), RLG(IV), SLG(IV)] com aplicação da Pectinex[®] SMASH XXL.

O cluster 2 foi formado principalmente por todas as amostras que sofreram modificações nos sucos devido a ação enzimática. As preparações enzimáticas

responsáveis por estas mudanças foram Ultrazym[®] AFPL; Pectinex[®] Ultra Clear e Panzym[®] YieldMASH. Este agrupamento apresentou os maiores valores de rendimento, viscosidade, D-glucose, acidez total titulável e ácido D-galacturônico e os menores níveis de pH (Tabela 4).

A viscosidade ($r = 0,59$, $p < 0,001$) apresentou-se correlacionada com o rendimento com diferença significativa entre os clusters, mostrando que à medida que ocorre o aumento do rendimento, há aumento da viscosidade, devido a despolimerização promovida pelas enzimas no material da parede celular (WILL et al., 2000). Os teores de acidez total titulável ($r = -0,90$, $p < 0,001$) e de ácido D-galacturônico ($r = -0,80$, $p < 0,001$) são correlacionados aos valores de pH apresentando diferença significativa entre os clusters. É possível verificar que a aplicação das enzimas ocasionam um decréscimo nos valores de pH, proporcionando aumento nos teores de acidez total titulável e de ácido D-galacturônico. Os teores de ácido D-galacturônico ($r = 0,77$, $p < 0,001$) são correlacionados aos teores de acidez total titulável. Portanto a acidificação proporcionada no meio é ocasionada pela liberação do ácido D-galacturônico no meio, como relatado por Will et al. (2002).

Tabela 4 – Parâmetros físicos e químicos dos sucos controles e por maceração enzimática.

Variáveis	Cluster 1 (n=13)	Cluster 2 (n=17)	DPA ^a	p-valor ^b	p-valor ^c
Rendimento (%)	56,00b	66,07a	6,96	0,05	< 0,001
Viscosidade (mm²/s)	0,93b	1,00a	0,06	0,06	< 0,01
pH	3,69a	3,53b	0,14	0,10	< 0,01
SST (°Brix)	12,16	12,85	1,07	0,71	0,08
Sacarose (g/100mL)	3,87	4,14	1,07	0,79	0,51
D-glucose (g/100mL)	1,25b	1,49a	0,30	0,39	0,03
D-frutose (g/100mL)	6,47	6,64	0,36	0,97	0,20
D-sorbitol (g/100mL)	0,21b	0,30a	0,17	0,32	0,13
Luminosidade (<i>L</i> *)	27,27	28,05	1,32	0,85	0,11
Vermelho-Verde (cordinada <i>a</i> *)	-0,10	0,30	0,58	0,17	0,06
Amarelo-Azul (cordinada <i>b</i> *)	2,51	2,78	1,38	< 0,01	0,40
Intensidade de cor (<i>C</i> *)	2,55	2,83	1,41	< 0,01	0,54
Hue angle (<i>h</i> *)	92,20	87,53	10,36	0,72	0,23
Acidez total titulável (g/100mL)	0,58b	0,66a	0,08	0,46	< 0,01
Ácido D-galacturônico (g/100mL)	0,02b	0,09a	0,06	0,30	< 0,001
Turbidez (NTU)	31,90	15,31	18,12	< 0,01	0,08

Nota: Diferentes letras na mesma linha representam resultados com diferença estatística ($p < 0,05$).

^a DPA: desvio padrão do agrupamento

^b Valor de probabilidade obtido pelo teste *F* para homogeneidade de variância

^c Valor de probabilidade obtido pelo teste *t*-Student ou teste *U*-Mann-Whitney

2.4 CONCLUSÃO

A aplicação de todas as preparações enzimáticas na extração de suco de maçã proporcionou aumento do rendimento alcançando um total de 44% com o uso Pectinex[®] Ultra Clear no estágio de maturação senescente (*Fuji Suprema*) e redução na turbidez. Por meio de abordagem quimiométrica, foi possível separar as amostras em dois agrupamentos: [1] amostras controles (sem enzimas), as amostras no estágio de pré-maturação da cultivar *Lis Gala* com aplicação de todas as preparações enzimáticas e as nos outros estádios para a Pectinex[®] SMASH XXL em ambas as cultivares com os maiores pH. [2] Amostras processadas com o auxílio das preparações Ultrazym[®] AFPL, Pectinex[®] Ultra Clear e Panzym[®] YieldMASH em todos os estádios de maturação para a *Fuji Suprema* e nos estádio maduro e senescente para a *Lis Gala* diferenciando com os maiores valores de rendimento, viscosidade, D-glucose, acidez total titulável e ácido D-galacturônico. Portanto, é preciso conhecer o estágio de maturação e a cultivar a ser utilizada no processamento de suco para a escolha adequada da preparação enzimática a fim de atender o proposto desejado.

REFERÊNCIAS

BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M. Application of chemometrics to the ¹H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1-2, p. 207-213, 1998.

BLANCO-GOMIS, D.; FERNANDEZ-RUBIO, P.; GUTIÉRREZ-ALVAREZ, Ma. D.; MANGAS-ALONSO, J. J. Use of high-performance liquid chromatographic-chemometric techniques to differentiate apple juices clarified by microfiltration and ultrafiltration. **Analyst**, v. 123, n. 1, p. 125-129, 1998.

BLEIBAUM, R. N.; STONE, H.; TAN, T.; LABRECHE, S.; SAINT-MARTIN, E.; ISZ, S. Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tongue sensors for apple juices. **Food Quality and Preference**, v. 13, n. 6, p. 409-422, 2002.

CHINNICI, F.; SPINABELLI, U.; RIPONI, C.; AMATI, A. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid

chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 2-3, p. 121-130, 2005.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

DEMIR, N.; ACAR, J.; SARIOGLU, K.; MUTLU, M. The use of commercial pectinase in fruit industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 47, n. 4, p. 275-280, 2001.

DIETRICH, H.; GIERSCHNER, K.; PECORONI, S.; ZIMMER, E.; WILL, F. Neue Erkenntnisse zu dem Phänomen der Trübungsstabilität – Erst Ergebnisse aus einem laufenden Forschungsprogramm. **Flüssiges Obst**, v. 63, p. 7-10, 1996.

DUQUE, P.; BARREIRO, M. G.; ARRABAÇA, J. D. Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit I. Sucrose metabolism and glycolysis. **Physiologia Plantarum**, v. 107, n. 1, p. 14-23, 1999.

FUKUMOTO, L. R.; TOIVONEN, P. M. A.; DELAQUIS, P. J. Effect of wash water temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic and vascular tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4503 – 4511, 2002.

GERARD, K. A.; ROBERTS, J. S. Microwave heating of apple mash to improve juice yield and quality. **LWT – Food Science and Technology**, v. 37, n. 5, p. 551-557, 2004.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1542-1549, 2010.

HOSSAIN, M. B.; PATRAS, A.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B., BRUNTON, N. P. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on *in vitro* antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 179-189, 2011.

KASHYAP, D. R.; COHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

LE BOURVELLEC, C.; BOUCHET, B.; RENARD, C. M. G. C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1725, n. 1, p. 10-18, 2005.

LIEW ABDULLAH, A. G.; SULAIMAN, N. M.; AROUA, M. K.; MEGAT MOHD NOOR, M. J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 65-71, 2007.

LIM, J. Y.; YOON, H. S.; KIM, K. Y.; KIM, K. S.; NOH, J. G.; SONG, I. G. Optimum conditions for the enzymatic hydrolyze of citron waste juice using response surface methodology (RSM). **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 1135-1142, 2010.

MARKOWSKI, J.; MIESZCZAKOWSKA, M.; PŁOCHARSKI, W. Effect of apple cultivar and enzyme treatment on phenolic compounds content during clear apple juice production. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1002-1010, 2009.

MIESZCZAKOWSKA-FRAC, M.; MARKOWSKI, J.; ZBRZEZNIAK, M.; PŁOCHARSKI, W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. **LWT – Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 251-256, 2012.

MIHALEV, K.; SCHIEBER, A.; MOLLOV, P.; CARLE, R. Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7306-7310, 2004.

OLIVEIRA, M. C. S.; SILVA, N. C. C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Avaliação do método de liquefação enzimática na extração de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 906-915, 2006.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; KOLNIAK, J. Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 7078-7085, 2009.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; KOLNIAK, J. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 623-631, 2011.

REID, M. S.; PADFIELD, C. A. S.; WATKINS, C. B.; HARMAN, J. E. Starch iodine pattern as a maturity index for Granny Smith apples. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 25, n. 2, p. 229-237, 1982.

RIBEIRO, D. S.; HERIQUE, S. M.; OLIVEIRA, L. S.; MACEDO, G. A.; FLEURI, L. F. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 635-640, 2010

ROCHA, A. S.; ZIELINSKI, A. A. F.; ÁVILA, S.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Influence of processing on the quality of pomaceas juice (*Pyrus communis* and *Malus domestica*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 1, p. 101-107, 2013.

SHAW, P. J. A. **Multivariate statistics for the Environmental Sciences**. London: Hodder-Arnold, 2003, 233 p.

SIN, H. N.; YUSOF, S.; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; RAHMAN, R. ABD. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 4, p. 313-319, 2006.

VARDIN, H.; TAY, A., OZEN, B.; MAUER, L. Authentication of pomegranate juice concentrate using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 742-748, 2008.

VIEIRA, R. G.; PRESTES, R. A.; DENARDI, F.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Chemical pattern of Brazilian apples. A chemometric approach based on the Fuji and Gala varieties. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 418-426, 2011.

WILL, F.; BAUCKHAGE, K.; DIETRICH, H. Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. **European Food Research and Technology**, v. 211, n. 4, p. 291-297, 2000.

WILL, F.; MEHRLÄNDER, K.; DIETRICH, H.; DONGOWSKI, G.; SEBRIES, S. Enzymatic liquefaction of apple mash by a two-step process. **Fruit Processing**, v. 13, p. 429-432, 2003.

WILL, F.; SCHULZ, K.; LUDWIG, M.; OTO, K.; DIETRICH, H. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 653-660, 2002.

WU, D.; SUN, D. W. Colour measurements by computer vision for food quality control – A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 5 – 20, 2013.

**3 CAPÍTULO III: ENZYMATIC MACERATION WITH DIFFERENT
COMMERCIAL PECTINASES IN APPLE JUICE PROCESSING:
INFLUENCE OF RIPENING STAGE ON MAJOR PHENOLIC
COMPOUNDS**

**ENZYMATIC MACERATION WITH DIFFERENT COMMERCIAL
PECTINASES IN APPLE JUICE PROCESSING: INFLUENCE OF RIPENING
STAGE ON MAJOR PHENOLIC COMPOUNDS**

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of different enzymatic preparations in the total phenolic compounds (Folin-Ciocalteu), phenolic profile by HPLC and antioxidant capacity (FRAP) during apple juice processing. Apples of *Lis Gala* and *Fuji Suprema* varieties in three ripening stages (unripe, ripe and senescent) were used. The multivariate statistical techniques allowed analyzing the action of the enzymatic preparations using a classification method. It was possible to verify that the four enzymatic preparations used increased levels of phenols and antioxidant capacity, in the unripe and ripe stage for *Lis Gala* and unripe stage of *Fuji Suprema*. In the ripe stage of *Fuji Suprema* only Pectinex[®] Ultra Clear and Panzym[®] YieldMASH were able to increase the properties. In senescent stage were not observed alteration with application of enzymes, due to the fact that the presence of endogenous enzymes can have minimized or inhibited the action of preparation added. It was possible confirmed that use of enzymatic preparation according to ripening stage occurred higher increase in phenols contents and antioxidant capacity.

Keywords: Pectinases, phenolic compounds, antioxidant capacity, multivariate analysis.

3.1 INTRODUCTION

The phenolic compounds in apple products, such as juice and cider, have been considered important because they influence such as color, acidity and astringent taste, aromas and beverages clarification (MANGAS et al., 1999). Currently, interest in phenolic compounds is due to their antioxidant capacity, which contributes to protect human health from the damaging effects of oxidative stress (OSZMIANSKI; WOJDYLO, 2007; RIBEIRO et al. 2010).

The major classes of phenolic compounds found in apples are phenolic acids and flavonoids. The main representatives of phenolic acids are acids *p*-coumaroylquinic and 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) and flavonoids are the flavan-3-ols (epicatechin, catechin and procyanidins), anthocyanins (cyanidin), flavonols (quercetins) and dihydrochalcones (phloretin and phloridzin) (AWAD; DE JAGER; VAN WESTING, 2000; GUYOT et al., 1997; SPANOS; WROLSTAD, 1992; TSAO et al., 2005; VANZANI et al., 2005).

Several authors report that, application of pectinolytic enzymes, in the juice processing, results in increased of phenolic compounds extraction, which reflects the antioxidant capacity of the juice. (WILL et al., 2002; OSZMIANSKI et al., 2009; OSZMIANSKI et al., 2011). Another possibility to increase the phenolic compounds in apple juices can be through the selection of the cultivar, since cultivars differ greatly in their content of phenolic compounds (WILL et al., 2008), as well as the ripening stage of fruit (ZHANG; LI; CHENG, 2010).

The apples are harvested at different degrees of ripeness, for the cold-storage are destined the fruits that have an unripe stage (pre-maturation) (HARKER; HALLET, 1992), the immediate marketing the ripe stage fruits. The apples that are intended for the industrial sector are those that do not have the physical characteristic of acceptability (appearance, size and shape). In same countries, like Brazil, the disqualified apples for marketed are processed in warm periods (25–35 °C) and it can remain for hours or days at receiving, which speeds up the ripening process. Thus, in the apple processing can be found in three different ripening stages: unripe (pre-maturation), ripe or full ripe phase and senescent (PAGANINI et al., 2004; FERTONANI et al., 2006).

The application of chemometric tools to the characterization, determination of origin and quality control of food products have been increasingly used food research.

There are many applications of multivariate techniques in order to relate and classify antioxidant capacity and major phenolic compounds present in many foods (BIGLARI et al., 2009; ÇAM et al., 2009; HOSSAIN et al., 2011).

Therefore, this study aimed to characterized the application of enzymatic preparation on principals phenolic compounds, total phenols and antioxidant capacity of apple juice processing from two different varieties (*Lis Gala* and *Fuji Suprema*) in three different ripening stages (unripe, ripe and senescent) with a chemometric approach.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Apple samples

Samples of *Fuji Suprema* and *Lis Gala* apples, 2011/2012 harvest, were collected at the Caçador-SC in the Experimental Station of the Agricultural and Rural Extension Company, Santa Catarina (EPAGRI) in three different ripening stages (unripe, ripe and senescent), with about 20 kg of samples for each stage and each variety. The apples from the same cultivar were collected at different cardinal points from six different trees and the top and bottom to homogenize the lot. The maturation index was determined by using the Starch-iodine test (REID et al., 1982). The fruits in different ripening stages were weighed (60 units for variety) and measured with a digital pachymeter (Insize, Waregem, Belgium) in relation to height and diameter (Table 1).

Table 1 - Physical characteristics of *Lis Gala* and *Fuji Suprema* in different ripening stages.

Variety	Ripening Stage	Maturation Index	Weight (g)	Height (mm)	Diameter (mm)
<i>Fuji Suprema</i>	Unripe	1.0	172.11 ± 41.98	74.98 ± 6.92	63.07 ± 6.47
	Ripe	3.0 - 3.5	183.53 ± 57.66	76.84 ± 8.59	63.82 ± 8.11
	Senescent	4.5	174.93 ± 44.37	76.13 ± 7.14	63.82 ± 7.28
<i>Lis Gala</i>	Unripe	1.0	109.63 ± 21.76	59.66 ± 3.97	55.77 ± 6.18
	Ripe	3.5	146.30 ± 30.98	67.84 ± 4.83	63.37 ± 5.90
	Senescent	4.5	165.19 ± 20.62	71.18 ± 4.69	65.56 ± 5.56

3.2.2 Chemicals and enzymes

Folin-Ciocalteu reagent; Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetremethylchroman-2-carboxylic acid), TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine), chlorogenic acid; phloridzin;

(+)-catechin; procyanidin B1, procyanidin B2, quercetin-3-*O*-galactoside, quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-rhamnoside, quercetin-3-*O*-rutinoside were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and acetonitrile from Merck (Darmstadt, Germany). Commercial pectinolytic preparations: Ultrazym[®] AFPL; Pectinex[®] Ultra Clear; Pectinex[®] SMASH XXL were provided by LNF Bento Gonçalves - Novozymes Latin America and Panzym[®] YieldMASH was donated by Begerow (Germany).

3.2.3 Apple juice processing by enzymatic maceration

The apples were selected, washed, sanitized (100 mg/L of sodium hypochlorite, 25 °C/15 min) and fragmented (grinded) in industrial blender LAR2 (Metvisa, Brusque, SC, Brazil). The apple pulp (100 g) was placed in each erlenmeyer and conditioned at 35 °C in shaker MA832 (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) under agitation (150 rpm), after the temperature stabilization. The enzymatic preparations were added according to the manufacturer's recommendation and reaction was conducted during one (1) hour. After this time the erlenmeyers with pulp were placed in bath of boiling water for denaturation of enzymes and the juices were obtained by centrifugation (8000 x *g*, 20 min) with laboratorial centrifuge HIMAC CR-GII (Hitachi, Hitachi, Ibaraki, Japan). The juices were stored at -20 °C for further analysis.

3.2.4 HPLC analysis of phenolic compounds

The phenolic profile analysis was based on the methodology described by Guyot et al. (1998) with modifications. The apple juices (4 mL) were freeze-dried (model LD, Terroni, São Paulo, SP, Brazil) and reconstituted with 2 mL of 2.5% acetic acid and methanol (75:25). Thus, the samples were filtered through syringe filter 0.2 µm (Nylon) prior to analysis. The HPLC apparatus was a 2695 Alliance (Waters, Milford, MA, USA), with photodiode array detector PDA 2998 (Waters, Milford, MA, USA), quaternary pump and auto sampler. Separation was performed on Symmetry C18 (4.6 x 150mm, 3.5µm) column (Waters, Milford, MA, USA) at 20 °C. The mobile phase was composed of solvent A (2.5% acetic acid, v/v) and solvent B (acetonitrile). The following gradient was applied: 3-9% B (0-5 min), 9-16% B (5-15 min), 16-36.4% B (15-33 min), followed by washing and reconditioning the column. The flow rate was 1.0 mL/min, and the runs were monitored at 280 nm (flavan-3-ols and dihydrochalcones),

320 nm (hydroxycinnamic acids) and 350 nm (flavonols). Quantification was performed using calibration curves of standards.

3.2.5 Total Phenolic Content

The total phenolic content was determined by colorimetric analysis of Folin-Ciocalteu described by Singleton e Rossi (1965). In a test tube were added 8.4 mL of distilled water, 100 μ L of sample or (+) catechin (standard, 10-400 mg/L), and 500 μ L of Folin-Ciocalteu reactive. After 3 min 1.0 mL of saturated sodium carbonate was added into each tube and the tube was agitated immediately in Vortex. After of 1 h the absorbance was measured by spectrophotometer MINI UV 1240 (Shimadzu, Tokyo, Japan) at 720 nm. The total phenolic content was expressed as (+) catechin equivalents [mg catechin/100 mL of juice] of the sample.

3.2.6 Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) Assay

To determine the antioxidant capacity the spectrophotometric FRAP method was used as described by Benzie; Strain (1996) with modifications. The absorbance reading was at 593 nm. After the first reading (L1), performed within 5 seconds, the absorbance was monitored for 6 min (L6) every 15 seconds. To calculate the FRAP value absorbance values, sample concentration, and the standard solution used as reference 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxilic acid 1 mmol/L (Trolox - Flucka Chemicals Suisse, Switzerland – 56510) were correlated. The absorbance values were calculated from differences between L1 and L6. A solution containing the reactive and enzymatic inhibitor was used as a blank. A calibration curve was plotted for different concentrations of Trolox (0.1 to 1.0 mmol/L).

3.2.7 Statistical analysis and chemometric application

Data were presented as mean \pm pooled standard deviation. Pearson products (r) were used to evaluate the strength of correlation among the parameters evaluated. Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA), implemented in the STATISTICA 7.1 software (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA), were the chemometric methods used to analyze the results.

PCA was applied to separate the samples ($n = 30$) according to their values of principal phenolic compounds determined by HPLC, phenols total and antioxidant capacity (FRAP). For this purpose, the results obtained for each parameter were adopted as columns and the juice samples as rows. Eigen values higher than 0.5 were adopted to explain the projection of the samples on the factor plane. Autoscaling was used as a pretreatment of the results. The purpose of this procedure is to equalize the statistical importance of all the variables.

Hierarchical cluster analysis is a preliminary (HCA) way to study datasets in the search for natural groupings among the samples characterized by the values of a set of measured features. Owing to its unsupervised character, HCA is a pattern recognition technique that can be used to reveal the structure residing in a dataset. HCA was performed on autoscaled data, sample similarities were calculated on the basis of the squared Euclidean distance and the Ward hierarchical agglomerative method was used to establish clusters. The dendrogram imposes a hierarchy on this similarity, so that we can have a two-dimensional vision of the similarity or dissimilarity of the entire set of samples used in the study (GRANATO et al., 2010). Next, the same procedure was applied to following variables: chlorogenic acid, phenol compounds and antioxidant capacity (FRAP). In order to compare the results within the four suggest clusters. Hartley's test was carried out to check for homogeneity of variances. One-way ANOVA and Fischer's LSD *pos hoc* test were applied to identify contrasts among the clusters and for the variables that presented non-homogenous variances ($p < 0.05$), the equivalent to ANOVA non-parametric test was used.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 The phenolic in different ripening stage

The content of individual phenolic and total phenols analyzed (Table 2 and 3) were lower than that found in studies with European apple juice (OSZMIANSKI et al., 2011; MARKOWSKI et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2008), due to the fact that the Brazilian fruits are produced for *in natura* consumption and not for industrial purposes (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). The total phenolic levels of Brazilian apple juices shown between 100 to 900 mg/L (WOSIACKI et al., 2008), while Europe juices levels of 700 to 3000 mg/L (NOGUEIRA et al., 2008; GÖKMEN; 2001).

With the ripening fruits, there was an increase in the levels of phenolic compounds and antioxidant capacity (FRAP) for both cultivars. Juices from the unripe apples have smaller phenols content, probably due to oxidation of these compounds in the processing, once; unripe fruits are more susceptible to enzymatic browning due to low content of ascorbic acid and high capacity of polyphenoloxidase (PPO) (LOZANO et al., 1994; MURATA et al., 1995).

Chlorogenic acid and phloridzin were the phenolic compounds in higher concentration in both cultivars. These compounds were found in higher concentrations in the samples of senescent apples. Other authors reported these phenolics compounds with the higher levels found in apples (AWAD et al., 2001; KONDO et al., 2002; VEBERIC et al., 2005).

The procyanidin B1 showed the evolution duration the ripening fruits as related by Zhang et al. (2010). The flavonols (quercetin-3-*O*-galactoside, quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-rhamnoside and quercetin-3-*O*-rutinoside) were determinate in highest levels in samples of unripe apples of *Fuji Suprema* variety and senescent apples of *Lis Gala*. Awad et al. (2001) reported that the quercetin glycosides levels range with cultivar and moreover, the content depends of fruit position on the tree. Fruits of *Fuji Suprema* shows a specific characteristic compared the others varieties, that after full bloom, the fruit epidermis is evenly covered with a dark red color, even in the shaded parts of the plant and during ripening they will losing the coloration getting with a brindle red (CAMILO; DENARDI, 2002).

At the beginning of ontogenesis, fruits have a high content of phenols, which decrease until the onset of ripening, where in the concentration of phenols remains practically the same or slightly increase (AWAD et al., 2001; BLANCO et al., 1992; MACHEIX, FLEURIET; BILLOT, 1990).

3.3.2 Enzymatic maceration in the phenolic extraction

In the processing of apple juice by traditional process, by pressing, most of the phenolic compounds present in fruits are retained in the pomace, by non-covalent bonds with cell wall, (Le BOURVELLEC; BOUCHET; RENARD, 2005), and because that apple phenolics are mainly localized in the peel and in the seeds (MARKOWSKI et al., 2009; OSZMIANSKI et al., 2011), however with enzyme treatment there was an increase in content of phenols of the juices (Table 2 and 3).

The increase in total phenols in the juices of unripe and ripe apples was, on average, 23% and 9% respectively for *Fuji Suprema* whereas for the *Lis Gala* variety, 67% and 28 %, respectively. This indicates that the enzymatic treatment acted the best form in the *Lis Gala* variety.

The juices of ripe and unripe apples which were added the enzymes III (Pectinex[®] Ultra Clear) and V (Panzym[®] YieldMASH) showed the highest levels of the total phenolic compounds, however that enzymes with polygalacturonase (declared by the manufacturer) are better than pectin lyases (declared by the manufacturer) (enzymes II and IV) for this purpose. The procyanidins may have influenced the action of pectin lyase, since they can form bridges between soluble pectins and protect pectin homogalacturonans preventing their degradation by pectin lyase (Le BOURVELLEC; GUYOT; RENARD, 2009). In the samples from senescent fruits, this is not observed, probably due to the presence of endogenous enzymes that could have minimized or inhibited the action of enzymes added (BEN-ARIE et al., 1979). According Table 2 and 3, in some treatments the amount of total phenols decreased probably due to a secondary enzymatic capacity of the preparations employed, as reported by Mihalev et al. (2004).

3.3.3 Enzymatic maceration in the antioxidant capacity

The effect of enzyme treatment on the antioxidant capacity was measured as the ability of reduction of iron using the method FRAP. The treatments with pectinase resulted in increased antioxidant capacity of juices from the unripe and ripe fruits, compared to controls. It was found an average increase of 55% and 12%, for unripe and ripe stages, respectively for *Fuji Suprema* variety (Table 2), and for *Lis Gala* variety (Table 3), an average increase of 49% and 33%, for the same ripening stages, respectively. In the juices of senescent apples with enzyme treatment there was not variation average antioxidant activities, probably due the content of endogenous enzymes, as previously mentioned.

Table 2 – Effect of enzymatic treatment on the principals phenolic compounds (mg/L), total phenols (mg/L) and antioxidant capacity (FRAP) (μM), and in apple juice processing with fruit of three different ripening of *Fuji Suprema* variety.

Samples	CHL	PHL	PB1	PB2	QGA	QGL	QRH	QRU	TPC	FRAP	
UF	(I)	11.06	21.26	8.12	nd	7.81	1.92	4.52	10.52	231.22	2407.34
	(II)	12.21	22.69	7.76	4.07	6.99	1.83	4.09	10.09	229.98	3863.64
	(III)	18.21	26.15	8.03	nd	4.25	1.60	2.51	9.72	288.10	3989.51
	(IV)	12.02	25.63	7.98	nd	8.05	1.90	4.63	10.38	282.84	3538.46
	(V)	15.95	28.25	9.94	3.38	9.93	2.11	5.46	10.81	308.19	3576.92
	PSD	3.05	2.80	0.89	2.05	2.07	0.18	1.09	0.42	35.49	626.51
RF	(I)	9.98	19.04	5.92	nd	5.18	1.61	3.00	9.79	228.13	2799.28
	(II)	10.57	22.11	7.30	4.09	5.03	1.64	2.97	9.80	242.97	2979.02
	(III)	9.94	20.82	5.20	3.91	6.12	1.76	3.57	10.09	255.95	3319.00
	(IV)	8.93	23.76	5.11	nd	4.41	1.50	2.84	9.45	238.79	2774.19
	(V)	11.40	21.99	9.31	6.62	8.34	1.96	5.17	10.32	254.40	3430.11
	PSD	0.91	1.75	1.77	2.88	1.54	0.18	0.97	0.33	11.52	300.12
SF	(I)	17.45	24.79	10.63	nd	5.59	1.77	3.11	10.44	304.17	3881.72
	(II)	18.99	29.23	6.44	nd	4.95	1.71	2.84	10.15	335.39	4157.71
	(III)	12.26	22.75	6.30	5.86	5.01	1.72	2.90	9.91	287.79	4111.89
	(IV)	13.49	30.89	2.29	nd	4.83	1.75	2.80	10.54	315.92	3706.09
	(V)	11.21	22.42	5.16	nd	6.31	1.76	3.65	10.16	289.64	3645.16
	PSD	3.37	3.85	3.00	2.62	0.62	0.03	0.35	0.25	19.78	231.40

Note: PSD: pooled standard deviation; UF: unripe Fuji; RF: ripe Fuji; SF: senescent Fuji; I (Control); II (Ultrazym[®] AFPL); III (Pectinex[®] Ultra Clear); IV (Pectinex[®] SMASH XXL); V (Panzym[®] YieldMASH); CHL, chlorogenic acid; PHL, phloridzin; PB1, procyanidin B1; PB2, procyanidin B2; QGA, quercetin-3-*O*-galactoside; QGL, quercetin-3-*O*-glucoside; QRH, quercetin-3-*O*-rhamnoside; QRU, quercetin-3-*O*-rutinoside; TPC: total phenols compounds; FRAP: ferric reducing antioxidant power; nd: not detected.

Table 3 – Effect of Enzymatic treatment on the principals phenolic compounds (mg/L), total phenols (mg/L) and antioxidant capacity (FRAP) (μM), and in apple juice processing with fruit of three different ripening of *Lis Gala* variety.

	Samples	CHL	PHL	PB1	PB2	QGA	QGL	QRH	QRU	CFT	FRAP
ULG	(I)	16.24	13.86	6.28	nd	2.66	1.38	2.20	9.03	233.69	2659.14
	(II)	21.38	27.68	8.95	nd	9.06	2.26	5.27	10.73	373.72	3881.70
	(III)	24.46	27.73	13.25	10.73	10.99	2.47	7.19	10.81	408.04	4043.01
	(IV)	28.77	27.19	9.18	9.23	9.07	2.15	5.92	10.15	415.46	4141.33
	(V)	21.01	25.84	5.98	7.24	9.66	2.21	6.06	10.37	366.00	3094.09
	PSD	4.63	9.40	2.93	5.12	3.24	0.42	1.88	0.72	73.42	652.55
RLG	(I)	16.12	14.66	6.78	nd	8.65	2.20	4.56	10.59	300.77	2782.26
	(II)	21.37	18.77	5.70	6.30	9.46	2.35	5.15	10.53	365.37	3725.81
	(III)	20.20	21.71	10.08	nd	11.74	2.62	6.43	11.14	391.34	5430.07
	(IV)	22.98	17.02	11.43	4.23	11.12	2.53	5.60	10.88	394.59	3690.86
	(V)	18.35	18.72	8.79	nd	11.55	2.60	6.09	11.17	379.60	3376.34
	PSD	2.66	2.59	2.34	2.97	1.37	0.18	0.74	0.30	38.40	986.13
SLG	(I)	26.58	15.78	6.82	nd	8.50	2.34	4.93	10.71	438.18	5004.01
	(II)	37.78	20.15	12.33	nd	8.22	2.30	5.12	10.29	482.23	5143.39
	(III)	23.70	20.14	9.43	8.44	7.45	2.30	5.44	10.05	376.82	4844.16
	(IV)	30.58	18.62	7.75	nd	8.49	2.28	5.10	10.32	398.76	3679.76
	(V)	28.69	18.10	11.48	nd	8.07	2.25	5.19	10.19	466.00	5317.32
	PSD	5.30	1.80	2.35	3.77	0.43	0.03	0.18	0.25	44.34	648.85

Note: PSD: pooled standard deviation; ULG: unripe LisGala; RLG: ripe LisGala; SLG: senescent LisGala; I (Control); II (Ultrazym[®] AFPL); III (Pectinex[®] Ultra Clear); IV (Pectinex[®] SMASH XXL); V (Panzym[®] YieldMASH); CHL, chlorogenic acid; PHL, phloridzin; PB1, procyanidin B1; PB2, procyanidin B2; QGA, quercetin-3-*O*-galactoside; QGL, quercetin-3-*O*-glucoside; QRH, quercetin-3-*O*-rhamnoside; QRU, quercetin-3-*O*-rutinoside; TPC: total phenols compounds, FRAP: ferric reducing antioxidant power; nd: not detected.

3.3.4 A chemometric approach

The principal component analysis (PCA) were applies in order to evaluate the data of principal phenolic compounds determined for HPLC, total phenols and antioxidant capacity. PC1 explained up to 54.90% of total variance and PC2 explained 14.39%, totalizing 69.29%. Samples were separated along the first principal component (PC1) by differences observed in CHL, PB1, QGA, QGL, QRH, QRU, TPC and FRAP. The second PC separated the samples on the basis of CHL and FRAP. The content of PHL and PB2 was represented on thirty and fourth PC. The first fourth PCs contributed to explain up to 89.82% of variability in the data set.

In observation of a scatter plot (Figure 1) it was possible suggested reasons for the locations of the juices processing with or without preparation enzymatic on the basis of their composition phenolic and antioxidant capacity. In the left X-axis juices were observed with highest levels of properties described and right X-axis with lowest. The samples with lowest levels of antioxidant capacity are above Y-axis and chlorogenic acid and below the Y-axis the highest values.

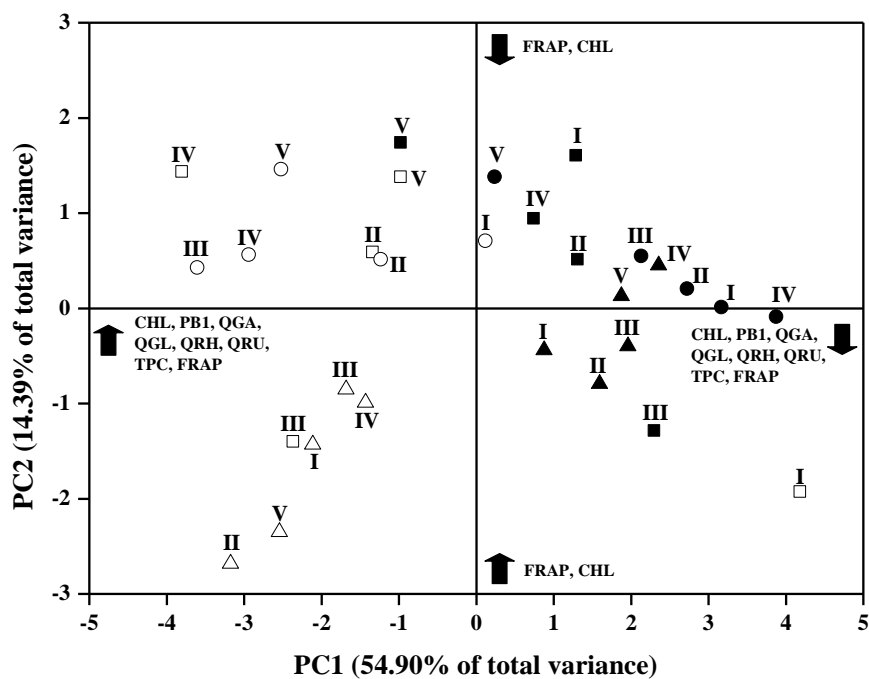


Figure 1– A scatter plot PC1 vs. PC2 on the main sources of variability between the apple juices samples. Note: I (Control); II (Ultrasym[®] AFPL); III (Pectinex[®] Ultra Clear); IV (Pectinex[®] SMASH XXL); V (Panzym[®] YieldMASH); forms blacks correspond *Fuji Suprema* variety and forms unfilled correspond *Lis Gala* variety,

(■) unripe; (●) ripe; (▲) senescent; (□) unripe; (○) ripe; (△) senescent; ↑higher levels of components; ↓lower levels of components.

The results of Person's correlation analysis showed a significant ($p < 0.01$) and a higher association between antioxidant capacity with CHL ($r = 0.66$) and TPC ($r = 0.92$). Using this variables to classify the juices production with application of enzymatic preparations, the similarity of sample was evaluated using the hierarchical cluster analysis (HCA) applied to the samples, four clusters were suggested (Figure 2).

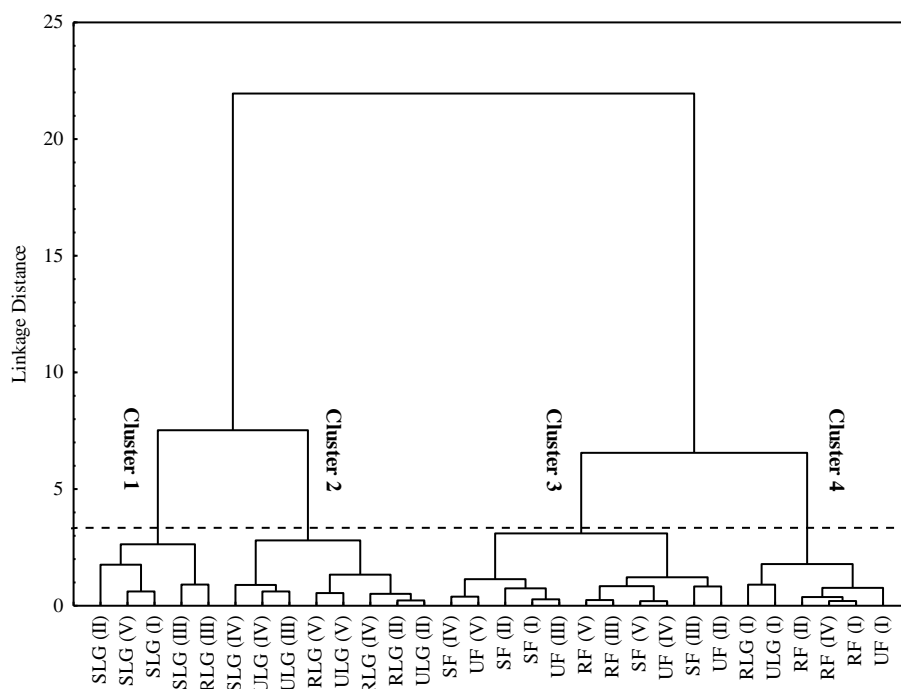


Figure 2– Dendrogram for juices samples obtained from the hierarchical cluster analysis. Note: UF: unripe Fuji; RF: ripe Fuji; SF: senescent Fuji; ULG: unripe Lis Gala; RLG: ripe Lis Gala; SLG: senescent Lis Gala; I (Control); II (Ultrazym[®] AFPL); III (Pectinex[®] Ultra Clear); IV (Pectinex[®] SMASH XXL); V (Panzym[®] YieldMASH)

Juices in cluster 1 (Table 4) contained samples with the highest levels of CHL, PB1, QGL, total phenols compounds and antioxidant capacity. This cluster was characterized by the samples provide *Lis Gala* variety in ripe and senescent stage with application of enzymes and senescent control juice. Cluster 2 showed the highest content of QGA, QGL, QRH and QRU. The cluster 2 also was characterized for samples provide *Lis Gala* variety in all ripening stages only in samples that occurred enzymatic treatment with the four enzymes tested. The cluster 3 was formed principally for samples provide the *Fuji Suprema* variety and showed the highest levels of PHL and intermediate values of others individuals phenols, TPC and antioxidant capacity. Cluster 4 included the samples with lower proprieties analyzed with

the controls juices in unripe and ripe stages of both varieties. According Alonso-Salces et al. (2005) and Zhang et al. (2010) during ripening of apples occurred the increase of phenolic compounds, the levels changes conform the varieties. Several authors reported that application of pectinolytic enzymes in juice processing also result in increased of phenolic compounds (WILL et al., 2000, MARKOWSKI et al., 2009; OSMIANSKI et al., 2009).

According HCA the four enzymatic preparations used was effective in unripe and ripe stage for *Lis Gala* varieties for increase phenols and antioxidant properties. For *Fuji Suprema* variety all enzymatic preparations were effective in the unripe stage, while for ripe stage only Pectinex® Ultra Clear and Panzym® YieldMASH were able to increase medium levels of phenolic compounds and antioxidant capacity. In senescent stage were not observed alteration with application of enzymes, due to the fact that the presence of endogenous enzymes can have minimized or inhibited the action of preparation added (BEN-ARIE et al., 1979).

Table 4 – Principals compounds phenols, total phenols and antioxidant capacity of apple juices

Variables	Cluster 1 (n=5)	Cluster 2 (n=8)	Cluster 3 (n=11)	Cluster 4 (n=6)	PSD ^a	p-value ^b	p-value ^c
CHL	27.39 ^a	23.61 ^a	13.92 ^b	12.15 ^b	7.25	0.26	< 0.01
PHL	19.18 ^b	20.20 ^b	25.06 ^a	19.11 ^b	5.11	0.07	< 0.05
PB1	10.03 ^a	8.88 ^b	7.19 ^b	6.59 ^b	2.45	0.29	< 0.05
PB2	1.69	4.72	2.17	0.68	3.41	0.17	0.13
QGA	8.80 ^a	9.92 ^a	6.40 ^b	5.62 ^b	2.39	0.48	< 0.01
QGL	2.36 ^a	2.36 ^a	1.81 ^b	1.71 ^b	0.35	0.18	< 0.01
QRH	5.42 ^a	5.80 ^a	3.70 ^b	3.35 ^b	1.34	0.56	< 0.01
QRU	10.48 ^a	10.62 ^a	10.24 ^{ab}	9.86 ^b	0.47	0.29	< 0.05
TPC	430.91 ^a	387.69 ^b	286.58 ^c	245.93 ^d	75.35	0.28	< 0.01
FRAP	5147.79 ^a	3704.11 ^b	3747.29 ^b	2733.54 ^c	786.91	0.59	< 0.01

Note: Different letters in the same line represent statically different results (p<0.05).

^a PSD: pooled standard deviation

^bProbability values obtained by Hartley test (*F* max) for homogeneity of variances

^cProbability values obtained by one-way ANOVA

Phenolic compounds, principally flavonoids, are substances with high redox potentials, and therefore have high antioxidant capacity. This is due on one hand to the number and acidity of their phenolic hydroxyl groups, and on the other hand to the resonance between the free electron pair on the phenolic oxygen and the benzene ring, which increases electron delocalization and confers a partial negative charge an thus a nucleophilic character

upon the substitution position adjacent to the hydroxyl group (PIETTA, 1999, CHEYNIER, 2006).

In our study, procyanidin B1 ($r = 0.47$, $p < 0.01$), quercetin-3-*O*-glucoside ($r = 0.50$, $p < 0.01$) and quercetin-3-*O*-rhamnoside ($r = 0.37$, $p < 0.05$) are correlated with the antioxidant capacity measured by FRAP, with significant difference among clusters. According TSAO et al. (2005) procyanidins shown higher antioxidant capacity measured by FRAP while quercetin glycosides as a group with moderate antioxidant capacity. The antioxidant capacity of procyanidins is due to the presence of the catechol unit on the aromatic B-ring (RICE-EVANS et al., 1996), which stabilizes free radicals and their ability to chelate metals and proteins due to several *o*-dihydroxy phenolic groups in such high molecular weight structure (SANTOS BUELGA; SCALBERT, 2000); while for flavonols (quercetin glycosides) the combination of the catechol moiety with double bond at C2-C3 and 3-OH renders an extremely active scavenger (van ACKER et al., 1996).

The principal phenolic acid found in apples is chlorogenic acid (AWAD et al., 2001; KONDO et al., 2002; VEBERIC et al., 2005; KHANIZADEH et al., 2007). This compound showed significant difference among the clusters ($p < 0.01$), and a correlation ($r = 0.66$, $p < 0.001$) with antioxidant capacity by FRAP. The antioxidant capacity of hydroxycinnamic acids is related to the presence of catechol moiety, that when a hydrogen atom is abstracted, generates a semiquinone stabilized by hydrogen bonds (AMORATI et al., 2006).

3.4 CONCLUSION

The present study demonstrated that enzymatic treatment had a positive effect on the production of apple juice by improving phenolic contents. Using chemometric approach, it was observed that the ripening stage influence positively the action of enzymatic preparations on phenolic extraction. The commercial pectinases Pectinex[®] Ultra Clear and Panzym[®] YieldMASH were effective in extraction phenols in ripe and unripe stage. The ripening stages more affect for varieties analyzed were for unripe and ripe, while that *Lis Gala* variety has more influence for enzymes. For senescent stage there was not alteration in phenols and antioxidant capacity, because in this stage there is presence of endogenous enzymes and minimized or inhibited the action of preparation added. Thus, it was possible confirmed that used of enzymatic preparation according to ripening stage occurred higher increase in phenols contents and antioxidant capacity.

REFERENCES

ALONSO-SALCES, R. M.; HERRERO, C.; BARRANCO, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 113-123, 2005.

AMORATI, R.; PEDULLI, G. F.; CABRINI, L.; ZAMBONIN, L.; LANDI, L. Solvent and pH. Effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2932-2937, 2006.

AWAD, M. A., DE JAGER, A.; VAN WESTING, L. M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. **Scientia Horticulturae**, v. 83, n. 3-4, p. 249-263. 2000.

AWAD, M.; DE JAGER, A.; VAN DER PLAS, L.; VAN DER KROL, A. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of Elstar and Jonagold apples during development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 90, n. 1-2, p. 69-83, 2001.

BEN-ARIE, R.; KISLEV, N.; FRENKEL, C. Ultrastructural Changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. **Plant Physiology**, v. 64, n. 2, p. 197-202, 1979.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BIGLARI, F.; ALKHARKI, A. F. M.; EASA, A. E. Cluster analysis of antioxidant compounds in dates (*Phoenix dactylifera*): Effect of long-term cold storage. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 998-1101, 2009.

BLANCO, D.; MORÁN, M. J.; GUTIÉRREZ, M. D.; MORENO, J.; DAPENA, E.; MANGAS, J. J. Biochemical study of the ripening of cider apple varieties. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 194, n. 1, p. 33-37. 1992.

ÇAM, M.; YASAR, H.; GÖKHAN, D. Classification of eight pomegrate juices based on antioxidant activity measure for four methods. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 721-726, 2009

CAMILO, A. P.; DENARDI, F. Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: Editora Palotti, 2006, cap. 5, p. 113-166.

FERTONANI, H. C. R.; SIMOES, D. R. S.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Potencial da variedade Joaquina para o processamento de suco clarificado e vinho seco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 434-440, 2006.

GÖKMEN, V.; ARTIK, N.; ACAR, J.; KAHRAMAN, N.; POYRAZOĞLU, E. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 3, p.194 - 199. 2001.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1542-1549, 2010.

GUYOT, S.; MARNET, N.; LARABA, D.; SANONER, P.; DRILLEAU, J. F. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1698-1705, 1998.

GUYOT, S.; SOUQUET, J. M.; MOUTOUNET, M.; DRILLEAU, J. F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 351-357, 1997.

HARKER, F. R.; HALLET, I. C. Physiological changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1291-1294, 1992.

HOSSAIN, M. B.; PATRAS, A.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on *in vitro* antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. **Journal of Function Foods**, v. 3, n. 3, p. 179-189, 2011.

KONDO, S.; TSUDA, K.; MUTO, N.; UEDA, J. E. Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 96, n. 1-4, p. 177-185, 2002.

Le BOURVELLEC, C.; BOUCHET, B.; RENARD, C. M. G. C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1725, n. 1, p. 10-18, 2005.

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

LOZANO, J. E.; DRUDIS-BISCARRI, R.; IBARZ-RIBAS, A. Enzymatic Browning in Apple Pulps. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 3, p. 564-567, 1994.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. Changes and metabolism of phenolic compounds in fruits. In: MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Ratón: CRC Press, 1990. p. 149-237.

MANGAS, J. J.; RODRÍGUES, R.; SAÚREZ, B.; PICINELLI, A.; DAPENA, E. Study of the phenolic profile of cider apple cultivar at maturity by multivariate techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4046-4052, 1999.

MARKOWSKI, J.; MIESZCZAKOWSKA, M.; PŁOCHARSKI, W. Effect of apple cultivar and enzyme treatment on phenolic compounds content during clear apple juice production. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1002-1010, 2009.

MIHALEV, K.; SCHIEBER, A.; MOLLOV, P.; CARLE, R. Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7306 – 7310, 2004.

MURATA, M.; TSURUTANI, M.; TOMITA, M.; HOMMA, S.; KANEKO, K. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1115 – 1121, 1995.

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

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Apple Cider Fermentation. In: HUI, Y. H.; ÖZGÜL EVRANUZ, E. **Handbook of plant-based fermented food and beverage technology**. Boca Raton: CRC. Press, 2012, cap. 12, p. 209-236.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A. Effect of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 6, p. 755-762, 2007.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; KOLNIAK, J. Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 7078-7085, 2009.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; KOLNIAK, J. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 623-631, 2011.

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

REID, M. S.; PADFIELD, C. A. S.; WATKINS, C. B.; HARMAN, J. E. Starch iodine pattern as a maturity index for Granny Smith apples. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 25, p. 229-237, 1982.

RIBEIRO, D. S.; HERIQUE, S. M.; OLIVEIRA, L. S.; MACEDO, G. A.; FLEURI, L. F. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 635-640, 2010

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

SANTOS BUELGA C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1094–1117, 2000.

SHAW, P. J. A. **Multivariate statistics for the Environmental Sciences**. London: Hodder-Arnold, 2003, 233 p.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage — a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1478–1487, 1992.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁN, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v. 71, n. 4, p. 1741-1751, 2007.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4989-4995, 2005.

VANZANI, P., ROSSETTO, M. RIGO, A.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; AMATO, E.; SCARPA, M. Major phytochemicals in apple cultivars: Contribution peroxyl radical trapping efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3377-3382, 2005.

VEBERIC, R.; TROBEC, M.; HERBINGER, K.; HOFER, M.; GRILL, D.; STAMPAR, F. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 10, p. 1687-1694, 2005.

WILL, F.; ROTH, M.; OLK, M.; LUDWIG, M.; DIETRICH, H. Processing and analytical characterisation of pulp-enriched cloudy apple juices. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2057-2063, 2008.

WILL, F.; SCHULZ, K.; LUDWIG, M.; OTO, K.; DIETRICH, H. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 653-660, 2002.

WOSIACKI, G.; A. NOGUEIRA, SILVA, N.; DENARDI, F. VIEIRA, R. Quality profile of samples of 139 apples. **Acta Alimentaria**, v. 37, n. 1, p. 9 – 22, 2008.

ZHANG, Y.; LI, P.; CHENG, L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in ‘Honeycrisp’ apple flesh. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1013-1018, 2010.

4 CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No primeiro trabalho [**Capítulo II**] foi avaliado o comportamento de quatro diferentes preparações enzimáticas comerciais (Ultrazym[®] AFPL; Pectinex[®] Ultra Clear; Pectinex[®] SMASH XXL e Panzym[®] YieldMASH) nos parâmetros físicos e químicos (rendimento, viscosidade, pH, açúcares, ácido D-galacturônico, acidez total, turbidez e cor). Foi verificado que o emprego das preparações ocasiona um aumento do rendimento, da viscosidade, do ácido D-galacturônico e da acidez total, e com isso redução do pH. O uso de pectinases ocasiona nos sucos a quebra da pectina e com isso uma diminuição da turbidez a como foi observado. Com o emprego de técnicas multivariadas foi possível explorar e classificar os dados em um todo reduzindo a um plano bidimensional todas as análises realizadas, e permitiu observar que as frutas processadas em estágio de pré-maturação para a cultivar *Lis Gala* não apresentaram mudanças nos parâmetros de qualidade para nenhuma das enzimas utilizadas, assim como Pectinex[®] SMASH XXL foi a única preparação com amostras que se apresentaram semelhantes em relação aos controles. Pectinex[®] Ultra Clear, Ultrazym[®] AFPL e Panzym[®] YieldMASH causaram mudanças nos parâmetros de qualidade analisados para todos os estádios de maturação da cultivar *Fuji Suprema* e para os estádios maduro e senescente da cultivar *Lis Gala*.

No segundo trabalho [**Capítulo III**] com o uso das mesmas preparações verificou-se a influência destas nos compostos fenólicos individuais determinados por HPLC, nos compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante. Da mesma forma para todos os parâmetros físicos e químicos as técnicas multivariadas resolveram o problema de entender todas as variáveis analisadas em um plano bidimensional, e com isso foi verificado que o emprego das preparações de acordo com o estágio de maturação utilizado no processamento de suco maçã há um aumento nos compostos fenólicos individuais analisados, nos compostos fenólicos totais e consequentemente da atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

ALONSO-SALCES, R. M.; HERRERO, C.; BARRANCO, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 113-123, 2005.

AMORATI, R.; PEDULLI, G. F.; CABRINI, L.; ZAMBONIN, L.; LANDI, L. Solvent and pH. Effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2932-2937, 2006.

AWAD, M. A., DE JAGER, A.; VAN WESTING, L. M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. **Scientia Horticulturae**, v. 83, n. 3-4, p. 249-263. 2000.

AWAD, M.; DE JAGER, A.; VAN DER PLAS, L.; VAN DER KROL, A. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of Elstar and Jonagold apples during development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 90, n. 1-2, p. 69-83, 2001.

BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M. Application of chemometrics to the ¹H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1-2, p. 207-213, 1998.

BEN-ARIE, R.; KISLEV, N.; FRENKEL, C. Ultrastructural Changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. **Plant Physiology**, v. 64, n. 2, p. 197-202, 1979.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BIGLARI, F.; ALKHARKI, A. F. M.; EASA, A. E. Cluster analysis of antioxidant compounds in dates (*Phoenix dactylifera*): Effect of long-term cold storage. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 998-1101, 2009.

BLANCO, D.; MORÁN, M. J.; GUTIÉRREZ, M. D.; MORENO, J.; DAPENA, E.; MANGAS, J. J. Biochemical study of the ripening of cider apple varieties. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 194, n. 1, p. 33-37. 1992.

BLANCO-GOMIS, D.; FERNANDEZ-RUBIO, P.; GUTIÉRREZ-ALVAREZ, Ma. D.; MANGAS-ALONSO, J. J. Use of high-performance liquid chromatographic-chemometric techniques to differentiate apple juices clarified by microfiltration and ultrafiltration. **Analyst**, v. 123, n. 1, p. 125-129, 1998.

BLEIBAUM, R. N.; STONE, H.; TAN, T.; LABRECHE, S.; SAINT-MARTIN, E.; ISZ, S. Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tongue sensors for apple juices. **Food Quality and Preference**, v. 13, n. 6, p. 409-422, 2002.

ÇAM, M.; YASAR, H.; GÖKHAN, D. Classification of eight pomegrate juices based on antioxidant activity measure for four methods. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 721-726, 2009

CAMILO, A. P.; DENARDI, F. Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: Editora Palotti, 2006, cap. 5, p. 113-166.

CHINNICI, F.; SPINABELLI, U.; RIPONI, C.; AMATI, A. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 2-3, p. 121-130, 2005.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

DEMIR, N.; ACAR, J.; SARIOGLU, K.; MUTLU, M. The use of comercial pectinase in fruit industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 47, n. 4, p. 275-280, 2001.

DEMIR, N.; ACAR, J.; SARIOGLU, K.; MUTLU, M. The use of commercial pectinase in fruit industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 47, n. 4, p. 275-280, 2001.

DIETRICH, H.; GIERSCHNER, K.; PECORONI, S.; ZIMMER, E.; WILL, F. Neue Erkenntnisse zu dem Phänomen der Trübungsstabilität – Erst Ergebnisse aus einem laufenden Forschungsprogramm. **Flüssiges Obst**, v. 63, p. 7-10, 1996.

DUQUE, P.; BARREIRO, M. G.; ARRABAÇA, J. D. Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit I. Sucrose metabolism and glycolysis. **Physiologia Plantarum**, v. 107, n. 1, p. 14-23, 1999.

FERTONANI, H. C. R.; SIMOES, D. R. S.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Potencial da variedade Joaquina para o processamento de suco clarificado e vinho seco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 434-440, 2006.

FUKUMOTO, L. R.; TOIVONEN, P. M. A.; DELAQUIS, P. J. Effect of wash water temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic and vascular tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4503 – 4511, 2002.

GERARD, K. A.; ROBERTS, J. S. Microwave heating of apple mash to improve juice yield and quality. **LWT – Food Science and Technology**, v. 37, n. 5, p. 551-557, 2004.

GÖKMEN, V.; ARTIK, N.; ACAR, J.; KAHRAMAN, N.; POYRAZOĞLU, E. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 3, p.194 - 199. 2001.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1542-1549, 2010.

GUYOT, S.; MARNET, N.; LARABA, D.; SANONER, P.; DRILLEAU, J. F. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1698-1705, 1998.

GUYOT, S.; SOUQUET, J. M.; MOUTOUNET, M.; DRILLEAU, J. F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 351-357, 1997.

HARKER, F. R.; HALLET, I. C. Physiological changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1291-1294, 1992.

HOSSAIN, M. B.; PATRAS, A.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B., BRUNTON, N. P. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on *in vitro* antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 179-189, 2011.

KASHYAP, D. R.; COHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KONDO, S.; TSUDA, K.; MUTO, N.; UEDA, J. E. Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 96, n. 1-4, p. 177-185, 2002.

Le BOURVELLEC, C.; BOUCHET, B.; RENARD, C. M. G. C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1725, n. 1, p. 10-18, 2005.

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

LIEW ABDULLAH, A. G.; SULAIMAN, N. M.; AROUA, M. K.; MEGAT MOHD NOOR, M. J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 65-71, 2007.

LIM, J. Y.; YOON, H. S.; KIM, K. Y.; KIM, K. S.; NOH, J. G.; SONG, I. G. Optimum conditions for the enzymatic hydrolyze of citron waste juice using response surface methodology (RSM). **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 1135-1142, 2010.

LOZANO, J. E.; DRUDIS-BISCARRI, R.; IBARZ-RIBAS, A. Enzymatic Browning in Apple Pulps. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 3, p. 564-567, 1994.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. Changes and metabolism of phenolic compounds in fruits. In: MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 149–237.

MANGAS, J. J.; RODRÍGUES, R.; SAÚREZ, B.; PICINELLI, A.; DAPENA, E. Study of the phenolic profile of cider apple cultivar at maturity by multivariate techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4046-4052, 1999.

MARKOWSKI, J.; MIESZCZAKOWSKA, M.; PŁOCHARSKI, W. Effect of apple cultivar and enzyme treatment on phenolic compounds content during clear apple juice production. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1002-1010, 2009.

MIESZCZAKOWSKA-FRAC, M.; MARKOWSKI, J.; ZBRZEZNIAK, M.; PŁOCHARSKI, W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. **LWT – Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 251-256, 2012.

MIHALEV, K.; SCHIEBER, A.; MOLLOV, P.; CARLE, R. Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7306-7310, 2004.

MURATA, M.; TSURUTANI, M.; TOMITA, M.; HOMMA, S.; KANEKO, K. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1115 – 1121, 1995.

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

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Apple Cider Fermentation. In: HUI, Y. H.; ÖZGÜL EVRANUZ, E. **Handbook of plant-based fermented food and beverage technology**. Boca Raton: CRC. Press, 2012, cap. 12, p. 209-236.

OLIVEIRA, M. C. S.; SILVA, N. C. C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Avaliação do método de liquefação enzimática na extração de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 906-915, 2006.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A. Effect of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 6, p. 755-762, 2007.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; KOLNIAK, J. Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 7078-7085, 2009.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; KOLNIAK, J. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 623-631, 2011.

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

REID, M. S.; PADFIELD, C. A. S.; WATKINS, C. B.; HARMAN, J. E. Starch iodine pattern as a maturity index for Granny Smith apples. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 25, p. 229-237, 1982.

RIBEIRO, D. S.; HERIQUE, S. M.; OLIVEIRA, L. S.; MACEDO, G. A.; FLEURI, L. F. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 635-640, 2010

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROCHA, A. S.; ZIELINSKI, A. A. F.; ÁVILA, S.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Influence of processing on the quality of pomaceas juice (*Pyrus communis* and *Malus domestica*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 1, p. 101-107, 2013.

SANTOS BUELGA C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1094–1117, 2000.

SHAW, P. J. A. **Multivariate statistics for the Environmental Sciences**. London: Hodder-Arnold, 2003, 233 p.

SIN, H. N.; YUSOF, S.; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; RAHMAN, R. ABD. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 4, p. 313-319, 2006.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage — a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1478–1487, 1992.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁN, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v. 71, n. 4, p. 1741-1751, 2007.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4989-4995, 2005.

VANZANI, P., ROSSETTO, M. RIGO, A.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; AMATO, E.; SCARPA, M. Major phytochemicals in apple cultivars: Contribution peroxyl radical trapping efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3377-3382, 2005.

VARDIN, H.; TAY, A., OZEN, B.; MAUER, L. Authentication of pomegranate juice concentrate using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 742-748, 2008.

VEBERIC, R.; TROBEC, M.; HERBINGER, K.; HOFER, M.; GRILL, D.; STAMPAR, F. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 10, p. 1687-1694, 2005.

VIEIRA, R. G.; PRESTES, R. A.; DENARDI, F.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Chemical pattern of Brazilian apples. A chemometric approach based on the Fuji and Gala varieties. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 418-426, 2011.

WILL, F.; BAUCKHAGE, K.; DIETRICH, H. Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. **European Food Research and Technology**, v. 211, n. 4, p. 291-297, 2000.

WILL, F.; MEHRLÄNDER, K.; DIETRICH, H.; DONGOWSKI, G.; SEBRIES, S. Enzymatic liquefaction of apple mash by a two-step process. **Fruit Processing**, v. 13, p. 429-432, 2003.

WILL, F.; ROTH, M.; OLK, M.; LUDWIG, M.; DIETRICH, H. Processing and analytical characterisation of pulp-enriched cloudy apple juices. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2057-2063, 2008.

WILL, F.; SCHULZ, K.; LUDWIG, M.; OTO, K.; DIETRICH, H. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 653-660, 2002.

WOSIACKI, G.; A. NOGUEIRA; SILVA, N.; DENARDI, F. VIEIRA, R. Quality profile of samples of 139 apples. **Acta Alimentaria**, v. 37, n. 1, p. 9 – 22, 2008.

WU, D.; SUN, D. W. Colour measurements by computer vision for food quality control – A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 5 – 20, 2013.

ZHANG, Y.; LI, P.; CHENG, L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in ‘Honeycrisp’ apple flesh. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1013-1018, 2010.

APÊNDICE 1

Apêndice 1 - Preparações enzimáticas comerciais.

Nome comercial	Fabricante	Enzima	Atividade (U/mL)*	Recomendação (mL/ton)
Ultrazym [®] AFP L	Novozymes	Pectinoliase	3000	40-60
Pectinex [®] Ultra Clear	Novozymes	Poligalacturonase	7900	40-60
Pectinex [®] SMASH XXL	Novozymes	Pectinoliase	22500	40-60
Panzym [®] YieldMASH	Begerow	Poligalacturonase	46000	40-60

*Atividade segundo a ficha técnica do fabricante.

ANEXO 1

Anexo 1 - Teste iodo-amido para determinação da maturação de maçãs.

